

Universidad de Huelva

Departamento de Sociología, Trabajo Social y Salud
Pública



Determinación de la densidad de *Demodex folliculorum* en pacientes con blefaritis mediante técnica molecular de PCR

**Memoria para optar al grado de doctor
presentada por:**

Juan Manuel Iglesias Martín

Fecha de lectura: 27 de mayo de 2025

Bajo la dirección de los doctores:

Carlos Ruiz Frutos

Alberto Tenorio Abreu

Huelva, 2025



Determinación de la densidad de *Demodex folliculorum*
en pacientes con blefaritis
mediante técnica molecular de PCR



Juan Iglesias Martín

TESIS DOCTORAL

UNIVERSIDAD DE HUELVA

2025



UNIVERSIDAD DE HUELVA

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

TESIS DOCTORAL

Determinación de la densidad de
Demodex folliculorum en pacientes con
blefaritis mediante técnica molecular de PCR

Autor: Juan Iglesias Martín

Tesis de Doctorado dirigida por el

Prof. Dr. D. Carlos Ruiz Frutos

y el Dr. D. Alberto Tenorio Abreu

HUELVA 2025

DEDICATORIA

A Marina, Mario y Sara. Lo sois todo para mí.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, mi agradecimiento a los directores de esta Tesis, por haber aceptado el reto de este trabajo. Al Prof. Dr. Carlos Ruiz Frutos por su destacada profesionalidad, por ofrecer siempre su valioso juicio y por brindarme su constante asesoramiento con generosidad y dedicación. Al Dr. Alberto Tenorio por su esfuerzo, tesón y perfeccionismo. A pesar de sus múltiples compromisos, asumió este trabajo con un compromiso excepcional, convirtiéndose en un verdadero reto trabajar conjuntamente en la clínica diaria. Un profesional brillante, y aún más admirable en lo personal.

A la Prof. Mónica Ortega por su invaluable ayuda en la elaboración de esta obra, por su excelente labor, su profesionalismo y por la paciencia demostrada ante los cambios y correcciones a lo largo del proceso.

De forma muy especial, a los miembros del Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario Juan Ramón Jiménez de Huelva. Todos han colaborado, directa o indirectamente, de forma decisiva.

A la Dra. Cristina Delgado, a quien siempre he profesado una profunda admiración y agradecimiento, tanto por su excepcional liderazgo como por el cariño que siempre ha brindado.

A la Dra. Maruja Valero, reconocida experta en la elaboración de proyectos de investigación, cuya dedicación y arduo trabajo siempre me han inspirado. Agradezco profundamente su amistad entrañable y su incansable apoyo durante mi formación como especialista.

Finalmente, mi más sincero agradecimiento a mis padres y hermanos, por su constante ánimo y por estar siempre a mi lado. Nada de lo que he logrado tendría sentido sin vuestro amor y apoyo incondicional.

ÍNDICE

Capítulo I: Introducción.....	1
1.1. Marco teórico.....	2
1.1.1 Región palpebral.....	2
1.1.1.1 Anatomía.....	2
1.1.1.2 Mecanismos de protección del globo ocular.....	4
1.1.1.2.1 Párpados.....	4
1.1.1.2.2 Película lagrimal.....	5
1.1.1.2.3 Factores químicos y neurales.....	8
1.1.2 Blefaritis.....	11
1.1.2.1 Aspectos generales.....	11
1.1.2.2 Epidemiología.....	11
1.1.2.3 Clasificación y etiopatogenia.....	13
1.1.2.4 Manifestaciones clínicas.....	17
1.1.2.5 Secuelas.....	19
1.1.2.6 Diagnóstico.....	19
1.1.2.7 Tratamiento.....	22
1.1.2.7.1 Blefaritis anterior.....	22
1.1.2.7.2 Blefaritis posterior.....	24
1.1.2.8 Blefaritis atípicas.....	26
1.1.3 <i>Demodex Folliculorum</i>	27
1.1.3.1 Perspectiva histórica.....	27
1.1.3.2 Epidemiología.....	28
1.1.3.3 Clasificación y ciclo de vida.....	30

1.1.3.4 Patogenia.....	31
1.1.3.5 Diagnóstico.....	36
1.1.3.6 Tratamiento.....	38
1.2 Antecedentes y Justificación.....	41
Capítulo II: Hipótesis y Objetivos.....	49
2.1 Hipótesis y Objetivos.....	50
2.1.1 Hipótesis.....	50
2.2.2 Objetivos.....	51
Capítulo III: Material y Método.....	53
3.1 Diseño metodológico.....	54
3.2 Aspectos éticos.....	56
3.3 Obtención de la muestra a estudio.....	57
3.4 Variables.....	58
3.5 Instrumentos.....	58
3.5.1 Detección de Demodex folliculorum mediante	
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	59
3.6 Recogida y análisis de datos.....	64
3.7 Procedimientos.....	64
3.7.1 Oftalmología.....	64
3.7.2 Microbiología.....	67

3.8	Limitaciones del estudio.....	67
3.9	Análisis estadístico.....	68
	Capítulo IV: Resultados.....	69
4.1	Matriz de datos.....	70
4.2	Características demográficas y clínicas de los casos y controles.....	70
4.3	Presencia, densidad y conteo de DF en casos de blefaritis y en los controles.....	73
4.4	Densidad de infestación por DF y conteo por visualización directa en los casos de blefaritis según tipo y nivel de gravedad.....	75
4.5	Densidad de infestación por DF y conteo por visualización directa antes y después del tratamiento en pacientes con demodicosis.....	80
	Capítulo V: Discusión.....	90
	Capítulo VI: Conclusiones.....	103
	Capítulo VII: Referencias bibliográficas.....	105
	Capítulo VIII: Anexos.....	119
	Capítulo IX: Indicadores de Calidad.....	135

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Imagen de lamelas anterior y posterior del párpado. Página 3

Figura 1.2. Esquema de la composición de la película lagrimal. Página 5

Figura 1.3. Orificios de glándulas de Meibomio bien demarcados en el borde palpebral en paciente sometido a expresión terapéutica de tapones lipídicos. Página 7

Figura 1.4. Paciente con blefaritis anterior. Página 13

Figura 1.5. Paciente con blefaritis posterior. Página 14

Figura 1.6. Ejemplar adulto de DF. Página 33

Figura 1.7. Cilindros de caspa (collaretes) en pestañas de paciente con demodicosis. Página 37

Figura 1.8. *Demodex* moribundos en pestanas tras realizar tratamiento con TTO. Página 41

Box plot 1: Diferencia de copias de ADN entre la visita 1 y 2. Página 88

Box plot 2: Diferencia de número de *Demodex*

entre la visita 1 y 2. Página 89

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución del tipo y gravedad de blefaritis en el grupo de casos. Página 71

Tabla 2. Prevalencia de enfermedades concomitantes en casos. Página 72

Tabla 3. Presencia de enfermedades concomitantes en controles.

Página 72

Tabla 4. Comparativa por copias y carga de Demodex en ambos grupos (Prueba de la U de Mann-Whitney). Página 74

Tabla 5. Densidad y conteo de DF según tipo de blefaritis y nivel de gravedad. Página 75

Tabla 6. Comparativa por tipo de blefaritis en el grupo de casos (Prueba de Kruskal-Wallis). Página 76

Tabla 7. Comparaciones dos a dos de los tipos de blefaritis en el grupo de casos (Prueba de la U de Mann-Whitney). Página 77

Tabla 8. Comparativa por gravedad en el grupo de casos (Prueba de Kruskal-Wallis). Página 77

Tabla 9. Comparaciones dos a dos por nivel de gravedad en el grupo de casos (Prueba de la U de Mann-Whitney). Página 78

Tabla 10. Comparativa por sexo en el grupo de casos (Prueba de la U de Mann-Whitney). Página 79

Tabla 11. Comparativa por edad en el grupo de casos (Prueba de la U de Mann-Whitney). Página 80

Tabla 12. Distribución de los escalones terapéuticos según tipo de blefaritis y su nivel de gravedad. Página 81

Tabla 13. Densidad y contaje de DF antes de recibir el tratamiento. Página 81

Tabla 14. Comparativa por tipo de tratamiento en el grupo de casos (Prueba de Kruskal-Wallis). Página 82

Tabla 15. Comparaciones dos a dos por nivel de gravedad en el grupo de casos (Prueba de la U de Mann-Whitney). Página 82

Tabla 16. Comparativa entre la primera y segunda visita en el grupo de casos (Prueba de Wilcoxon). Página 83

Tabla 17. Comparativa por tipo de blefaritis en el grupo de casos entre la primera y segunda visita (Prueba de Wilcoxon). Página 84

Tabla 18. Comparativa por nivel de gravedad de blefaritis en el grupo de casos entre la primera y segunda visita (Prueba de Wilcoxon). Página 84

Tabla 19. Comparativa por tipo de tratamiento en el grupo de casos entre la primera y segunda visita (Prueba de Wilcoxon). Página 85

Tabla 20. Prevalencia de condicionantes en la evolución de la enfermedad en el grupo de casos Página 86

GLOSARIO

Aceite de árbol de té: Aceite esencial obtenido de las hojas del árbol *Melaleuca alternifolia*, de la familia de las mirtáceas, usado por sus propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivirales.

Blefaritis: Inflamación de los párpados, a menudo debido a una infección.

Carcinoma: Tumor maligno formado por células epiteliales.

Chalazion: Es una masa no dolorosa en el párpado causada por la obstrucción de una glándula de Meibomio, la cual produce secreciones grasas.

Córnea: Membrana transparente y convexa que cubre la parte anterior del ojo.

Demodicosis: Infección causada por el ácaro *Demodex* en la piel o los folículos pilosos.

Distiquiasis: Crecimiento anómalo de pestañas adicionales en el borde del párpado, que pueden rozar contra el ojo.

Folículo: Cavidad en la que se encuentra una glándula o una estructura en el organismo.

Glándulas de Meibomio: Glándulas sebáceas ubicadas en el párpado que producen una sustancia oleosa que forma parte de la película lagrimal.

Huésped: Ser vivo que alberga a otro ser vivo, como un parásito o microorganismo.

Infestación: Presencia de organismos parásitos en el organismo de un ser vivo.

Madarosis: Pérdida de las pestañas, a menudo asociada con enfermedades oculares.

Meibomitis: Inflamación de las glándulas de Meibomio, que se encuentran en el párpado y secretan una sustancia aceitosa.

Palpebral: Relativo al párpado.

Parásito: Organismo que vive a expensas de otro.

Película lagrimal: Capa de lágrimas que recubre la superficie ocular.

Párpado: Piel que cubre y protege el ojo.

Periocular: Que está alrededor del ojo.

Rosácea: Enfermedad crónica de la piel caracterizada por enrojecimiento facial.

Síndrome de Sjögren: Enfermedad autoinmune que afecta las glándulas exocrinas, especialmente las lagrimales y salivales, causando sequedad en los ojos y la boca.

Superficie ocular: Capa externa del ojo, incluyendo la córnea y la conjuntiva.

Triquiasis: Crecimiento anómalo de las pestañas hacia el interior del ojo, lo que puede provocar irritación o daño en la córnea.

Gen: Elemento hereditario que transmite características en los seres vivos.

RESUMEN

Se ha planteado como indicador la infestación por *Demodex folliculorum* (DF) en diferentes enfermedades de los párpados y la superficie ocular. El objetivo de la tesis doctoral ha sido evaluar la presencia y densidad del ácaro en el área interpalpebral mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR), en comparación con la microscopía óptica como método de referencia, para valorar la posible relación entre la presencia y densidad del parásito y la blefaritis. **Método.** Se analizaron 194 ojos (148 casos y 46 controles) de pacientes diagnosticados de blefaritis mediante examen periocular y palpebral (casos) y pacientes similares en edad, sexo y región demográfica sin patología (controles). Evaluándose síntomas, grado blefaritis y disfunción de las glándulas de Meibomio. Excluyéndose a pacientes con cirugía ocular previa (últimos 6 meses) y tratamiento con medicación ocular tópica y/o sistémica (último mes) y los que no firmaron consentimiento informado. Para la detección y cuantificación de DF se utilizaron dos técnicas a modo comparativo: conteo directo mediante microscopía óptica como método de referencia y cuantificación del ADN mediante PCR a tiempo real. Se realizó un estudio prospectivo unicéntrico e intervencional en los pacientes con demodicosis confirmada. Ante la falta de normalidad de los datos para su análisis se emplearon pruebas estadísticas no paramétricas. Para evaluar la eficacia de los tratamientos empleados y los cambios en la densidad de DF a lo largo del tiempo se realizó un análisis longitudinal, utilizándose la prueba de Wilcoxon con muestras pareadas para realizar comparaciones antes y después del tratamiento en cada paciente; y Kruskal-Wallis para comparar la eficacia global de los diferentes escalones terapéuticos. Así como comparaciones por pares entre los escalones terapéuticos, utilizando la prueba de la U de Mann-Whitney con el fin de identificar diferencias específicas entre cada uno de ellos. Considerándose un nivel de significancia de $p < 0.05$. **Resultados.** De los 148 ojos del grupo de casos, 52 tenían blefaritis anterior, 52 blefaritis mixta y 44 blefaritis posterior. En los casos la prevalencia de DF fue del 40%, mientras que entre los controles del 10%, diferencia significativa ($p < 0.01$ en ambos) mediante la técnica de microscopía óptica. En relación al número de copias de ADN, el grupo con patología presentó una media significativamente mayor (11958.22; SD=27792.24) respecto al grupo sin patología observable (5461.68; SD=14964.22), con un estadístico de prueba de 4220.50 ($p < 0.001$). Asimismo, la carga de DF mediante microscopía fue notablemente más alta en el grupo con patología (media=1.10; SD=2.05) frente al grupo sin patología (media=0.15; SD=0.51), con un estadístico de prueba de 4385.00 ($p < 0.001$). La blefaritis mixta presentó los valores más elevados tanto en número de copias de ADN como en número de DF, seguida por la blefaritis anterior. Así mismo, el número de copias de ADN según la gravedad de la blefaritis muestra valores crecientes desde los casos leves hasta los severos ($p < 0.001$), pero la carga de DF, aunque los valores también aumentan con la gravedad, las diferencias no alcanzaron significación estadística ($p = 0.76$). En los resultados obtenidos mediante PCR se observa una mayor densidad en mujeres ($p = 0.013$), no evidente mediante la técnica de visualización directa ($p = 0.743$). El índice de parasitación es significativamente mayor en pacientes mayores de 59 años, encontrando diferencias significativas tanto en el número de copias de ADN como en el número DF observados por microscopía ($p < 0.05$ en ambos casos). En una segunda fase del estudio se analizaron 118 muestras oculares, antes y después del tratamiento específico frente al parásito, apreciando diferencias significativas en el número de copias de ADN entre la primera y segunda visita ($p < 0.001$). Sin embargo, no se encuentran estas diferencias en el número de DF mediante microscopía ($p = 0.453$). Es observable diferencias significativas en el número de copias de ADN en los pacientes con gravedad moderada ($p = 0.006$) y severa ($p = 0.044$) después de realizar el tratamiento. **Conclusiones.** La PCR cuantitativa en tiempo real se ha mostrado mucho más sensible que el método estándar de conteo mediante microscopía óptica para la detección y cuantificación de *Demodex folliculorum*. Se ha observado asociación entre *Demodex folliculorum* y la blefaritis mixta y anterior; así como también con la gravedad de la blefaritis, existiendo mayor densidad en la blefaritis moderada y grave. Los protocolos de tratamiento disminuyeron significativamente la densidad de *Demodex folliculorum* en la blefaritis moderada y grave.

Palabras clave. *Demodex folliculorum*, Blefaritis, Reacción en Cadena de la Polimerasa.

ABSTRACT

Infestation by *Demodex folliculorum* (DF) has been proposed as an indicator in various eyelid and ocular surface diseases. The aim of the doctoral thesis was to evaluate the presence and density of the mite in the interpalpebral area using polymerase chain reaction (PCR), compared to optical microscopy as the reference method, to assess the potential relationship between the presence and density of the parasite and blepharitis. **Method.** A total of 194 eyes (148 cases and 46 controls) from patients diagnosed with blepharitis were analyzed through periocular and palpebral examination (cases), and similar patients in terms of age, sex, and demographic region without pathology (controls). Symptoms, the degree of blepharitis, and Meibomian gland dysfunction were evaluated. Patients with prior ocular surgery (within the last 6 months), those treated with topical or systemic ocular medication (within the last month), and those who did not sign the informed consent were excluded. Two techniques were used for the detection and quantification of DF as a comparative approach: direct counting through optical microscopy as the reference method, and DNA quantification via real-time PCR. A prospective, single-center, interventional study was conducted in patients with confirmed demodicosis. Since the data did not follow a normal distribution for analysis, non-parametric statistical tests were employed. To evaluate the efficacy of the treatments used and changes in DF density over time, a longitudinal analysis was performed, using the Wilcoxon paired-sample test for comparisons before and after treatment for each patient, and the Kruskal-Wallis test to compare the overall efficacy of different therapeutic steps. Pairwise comparisons between therapeutic steps were made using the Mann-Whitney U test to identify specific differences between each. A significance level of $p < 0.05$ was considered. **Results.** Of the 148 eyes in the case group, 52 had anterior blepharitis, 52 had mixed blepharitis, and 44 had posterior blepharitis. In the case group, the prevalence of DF was 40%, while in the control group, it was 10%, with a significant difference ($p < 0.01$ in both) using the optical microscopy technique. Regarding the number of DNA copies, the pathology group showed a significantly higher mean (11958.22; SD=27792.24) compared to the group without observable pathology (5461.68; SD=14964.22), with a test statistic of 4220.50 ($p < 0.001$). Furthermore, the DF load using microscopy was notably higher in the pathology group (mean=1.10; SD=2.05) compared to the group without pathology (mean=0.15; SD=0.51), with a test statistic of 4385.00 ($p < 0.001$). Mixed blepharitis presented the highest values in both DNA copies and DF numbers, followed by anterior blepharitis. Similarly, the number of DNA copies according to the severity of blepharitis showed increasing values from mild to severe cases ($p < 0.001$), but DF load, while also increasing with severity, did not show statistical significance ($p = 0.76$). The PCR results showed a higher density in women ($p = 0.013$), which was not evident using the direct visualization technique ($p = 0.743$). The parasitization index was significantly higher in patients over 59 years old, with significant differences both in the number of DNA copies and the number of DF observed by microscopy ($p < 0.05$ in both cases). In a second phase of the study, 118 ocular samples were analyzed before and after specific treatment for the parasite, observing significant differences in the number of DNA copies between the first and second visits ($p < 0.001$). However, no differences were found in the number of DF under microscopy ($p = 0.453$). Significant differences were observed in the number of DNA copies in patients with moderate ($p = 0.006$) and severe ($p = 0.044$) severity after treatment. **Conclusions.** Real-time quantitative PCR proved to be much more sensitive than the standard counting method using optical microscopy for the detection and quantification of *Demodex folliculorum*. An association was observed between *Demodex folliculorum* and mixed and anterior blepharitis, as well as with the severity of blepharitis, with higher density in moderate and severe cases. Treatment protocols significantly decreased the density of *Demodex folliculorum* in moderate and severe blepharitis.

Key words. *Demodex folliculorum*, Blepharitis, Polymerase Chain Reaction.

Capítulo I: Introducción

1.1 Marco Teórico

1.1.1 Región palpebral

1.1.1.1 Anatomía

La región palpebral está conformada por los párpados superior e inferior. Los párpados tienen una longitud de unos 30 mm, uniéndose en el canto interno y externo. En el canto externo el ángulo se apoya directamente sobre el globo ocular a diferencia del canto interno donde el ángulo queda separado del globo ocular por una pequeña área llamada *lacus lacrimalis*, donde se encuentra la carúncula¹.

Un concepto importante es la división de los párpados en una lamela anterior y otra posterior. La lamela anterior del párpado engloba la piel y el músculo orbicular. La lamela posterior se compone del tarso y la conjuntiva. En el borde palpebral puede distinguirse una línea, más marcada en algunas personas que en otras, que se conoce como línea gris y que actuaría como línea divisoria entre las dos lamelas antes mencionadas^{1,2}. (Fig.1.1.)

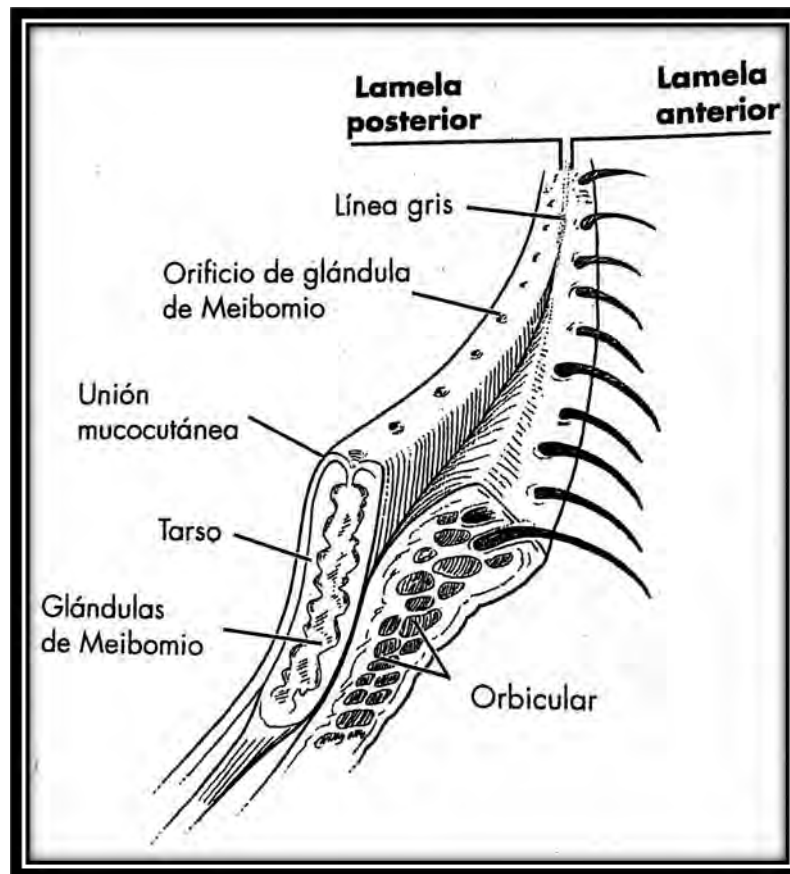


Figura 1.1 Imagen de lamelas anterior y posterior del párpado. Tomada de: Nerad, Jeffrey A. Oculoplastic Surgery: The requisites in ophthalmology. 2001.

Hay diferencias sutiles al evaluar el párpado superior respecto al inferior. El párpado superior se extiende desde el borde palpebral hasta el límite inferior de la ceja, mientras que el párpado inferior no presenta una delimitación tan clara con la mejilla. El párpado superior descansa 1-2 mm por debajo del limbo superior mientras que el inferior descansa a lo largo del limbo inferior^{1,3}.

Los párpados se insertan en los huesos de la órbita a través de los tendones cantales medial y lateral. Los tendones se insertan a su vez en las placas tarsales compuestas por tejido fibroso. Dentro de las placas tarsales se encuentran las glándulas de Meibomio o glándulas sebáceas modificadas. Los folículos de las pestañas por el

contrario se originan en la superficie anterior de la placa tarsal y salen del párpado por el margen^{2,3,4}.

Existen 3 o 4 hileras de pestañas a lo largo del margen palpebral superior, y 1 o 2 hileras de pestañas en el margen palpebral inferior. Las pestañas se extienden desde el lateral de los puntos lagrimales hasta el canto lateral².

1.1.1.2 Mecanismos de protección del globo ocular

1.1.1.2.1 Párpados

Los globos oculares se encuentran cubiertos anteriormente por los párpados, los cuales cumplen las siguientes funciones:

- Eliminar el estímulo luminoso durante el cierre palpebral y evitar la desecación de la córnea.
- Las pestañas actúan como sensores que inducen el cierre de los párpados a modo de barrera contra cuerpos extraños.
- Facilitar la distribución de la lágrima por la superficie ocular mediante el parpadeo y también limpiarla de impurezas mediante su acción de barrido^{4,5}.
- Efecto de aspiración de la lágrima y bombeo a través de la vía lagrimal mediante el parpadeo.

1.1.1.2.2 Película lagrimal

La película de lágrima es el segundo mecanismo de defensa de la superficie del globo ocular después de los párpados. Se caracteriza por estar compuesta por tres capas: mucosa, acuosa y lipídica. (Fig.1.2.)

La película lagrimal presenta un gradiente de concentración de mucina, siendo más abundante en la porción interna, que se adhiere a la córnea y conjuntiva. Mientras que en la porción más externa la concentración de mucina es menor y la película queda cubierta por lípidos que reducen la evaporación lagrimal.

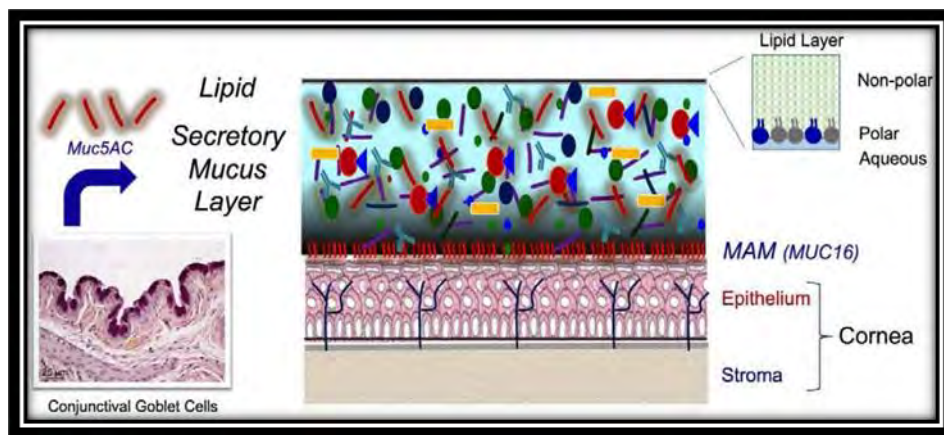


Figura 1.2. Esquema de la composición de la película lagrimal. **Tomada de:** Pflugfelder SC, Stern ME. Biological functions of tear film. Exp Eye Res. 2020 Aug;197:108115.

Las mucinas que forman la capa mucosa se unen a las membranas celulares y permiten fijar la película lagrimal a la superficie ocular. Son secretadas por las células caliciformes que se encuentran localizadas en la conjuntiva^{6,7}. La capa mucinosa de la película lagrimal atrapa cuerpos extraños para ser eliminados posteriormente por el drenaje de la vía lagrimal.

Las glándulas lagrimales accesorias de Kraused y Wolfring se encargan de la secreción acuosa basal, en tanto que la secreción lagrimal refleja y la mayoría de proteínas de la lágrima se producen en la glándula lagrimal principal. Las proteínas de la lágrima cumplen una función primordial en la defensa contra agentes microbianos⁹. Además, contiene electrolitos y factores de crecimiento.

La película lipídica de la película lagrimal es producida casi en su totalidad por las glándulas de Meibomio cuyos orificios se encuentran en el borde palpebral. (Fig.1.3.)

La capa lipídica reduce la tensión superficial en la interfaz aire - lágrima dando como resultado que la película lagrimal se extienda sobre la superficie ocular. Los lípidos polares y no polares se encargan de impedir la evaporación entre dos parpadeos¹⁰⁻¹³.

A diferencia del componente acuoso de la película lagrimal, que parece acortarse poco después de un parpadeo, la capa lipídica parece ser continua sobre los meniscos de lágrima y, de hecho, continúa moviéndose sobre la superficie ocular después del parpadeo.

La evaporación de la lágrima entre parpadeos puede contribuir al ojo seco, siendo la tasa de evaporación lagrimal un indicador de la estabilidad de la capa lipídica lagrimal con tasas más altas de evaporación lagrimal asociadas con un aumento de la sequedad ocular y malestar¹⁴⁻¹⁶.

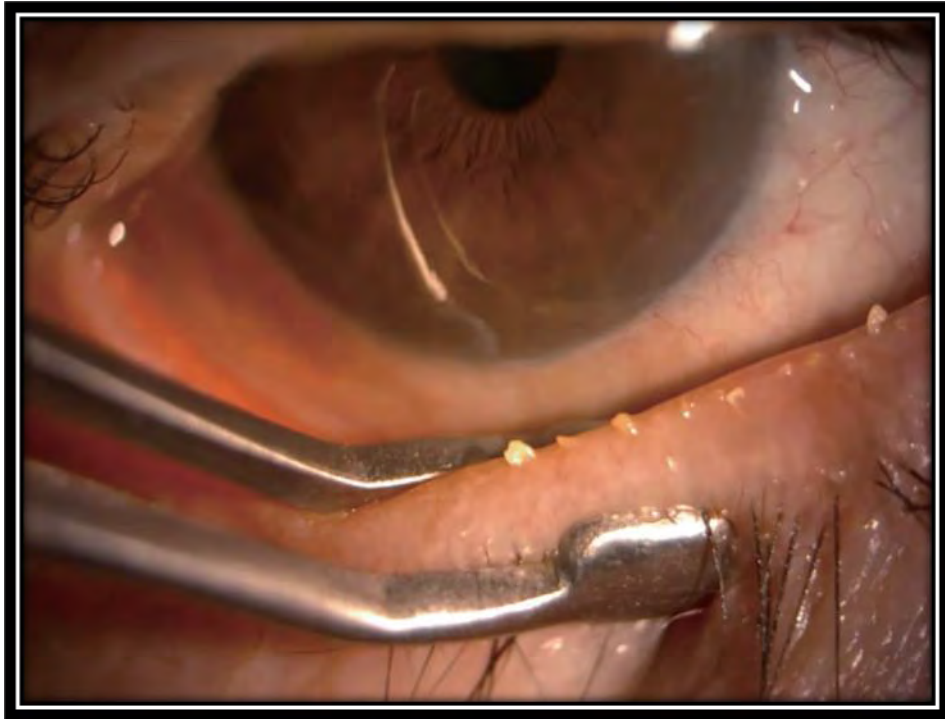


Figura 1.3. Orificios de glándulas de Meibomio bien demarcados en el borde palpebral en paciente sometido a expresión terapéutica de tapones lipídicos. **Tomada de:** Arita R, Fukuoka S. Non-pharmaceutical treatment options for meibomian gland dysfunction. Clin Exp Optom. 2020 nov;103(6):742-755.

1.1.1.2.3 Factores químicos y neurales

Factores hormonales en la producción lagrimal

El mecanismo por el que se regula la secreción de lágrima no está aún bien aclarado, pero existe una regulación que depende de las hormonas sexuales. Se ha informado que los niveles bajos de andrógenos están consistentemente asociados con el ojo seco¹⁷. En las glándulas de Meibomio y glándulas lagrimales se han identificado receptores para hormonas esteroideas¹⁸.

Los cambios biofísicos y bioquímicos en la película lagrimal en mujeres posmenopáusicas se han investigado en algunos estudios. No obstante, las terapias hormonales sustitutivas no siempre mejoran la secreción lagrimal¹⁹.

Los andrógenos actúan sobre las células epiteliales acinares regulando la actividad de las glándulas de Meibomio y con ello la producción de lípidos de la película lagrimal. Asimismo, son necesarios para el funcionamiento de las glándulas lagrimales. Esto explica que pacientes sometidos a tratamientos antiandrogénicos pueden presentar disfunción de las glándulas de Meibomio palpebrales con reducción del tiempo de rotura lagrimal (BUT) y ojo seco^{20,21}.

Además, el descenso de niveles de andrógenos que se produce con el incremento de edad se correlaciona con una atrofia en las glándulas de Meibomio y alteración de la capa lipídica de la lágrima.

Regulación neural en la producción lagrimal

Se conoce menos de la innervación sensorial de la conjuntiva y del margen del párpado a diferencia de la córnea. En la conjuntiva, las terminaciones nerviosas libres peptidérgicas se encuentran principalmente alrededor de los vasos sanguíneos del estroma, pero también se pueden encontrar en menor grado en el epitelio o alrededor de los acinos de las glándulas de Meibomio y los folículos linfáticos^{22,23}.

Los componentes de la película lagrimal son producidos principalmente por las glándulas lagrimales principales y accesorias, las glándulas de Meibomio y las células caliciformes conjuntivales. La regulación neural de la secreción por cada uno de estos tejidos es distinta.

Las glándulas lagrimales principal y accesorias, las células mucosas conjuntivales y las glándulas de Meibomio tienen abundante innervación incluyendo fibras simpáticas, parasimpáticas y fibras sensoriales del trigémino²⁴.

La glándula lagrimal está innervada principalmente por fibras parasimpáticas y en menor medida simpáticas y sensoriales²⁵.

Las glándulas de Meibomio palpebrales producen los principales componentes lipídicos de las lágrimas. La secreción se produce cuando las células acinares se rompen y liberan su contenido en la luz del sistema de conductos (secreción holocrina). No existen estudios que examinen el papel de los nervios y sus neurotransmisores en la regulación de la secreción holocrina de las glándulas de Meibomio. Sin embargo, se ha demostrado la proximidad de las fibras nerviosas a las glándulas de Meibomio en una amplia gama de especies animales incluyendo a los humanos²⁴.

Regulación neural del parpadeo

Las vías neuronales implicadas en el parpadeo reflejo son más conocidas que las del parpadeo espontáneo. El músculo orbicular actúa para cerrar el párpado superior durante el parpadeo. La estimulación de la superficie ocular surge en los nervios sensoriales que se proyectan hacia las neuronas motoras del nervio facial (VII par craneal) a través de las fibras sensoriales del trigémino (V par craneal)^{26,27}.

En el margen del párpado, la morfología de las terminaciones nerviosas sensoriales es más diversa e incluye abundantes corpúsculos de Meissner, terminaciones de disco de Merkel y terminaciones nerviosas libres dérmicas e intraepiteliales²⁸. Además, existen terminaciones nerviosas complejas lanceoladas, circulares de Ruffini, Merkel y libres alrededor de las pestañas²⁸. Muchos de estos tipos de terminaciones están especializados para la detección de estímulos mecánicos de muy baja intensidad, lo que explica por qué los valores del umbral mecánico en el borde palpebral son similares o incluso inferiores a los de la córnea²⁹.

1.1.2 Blefaritis

1.1.2.1 Aspectos generales

La blefaritis es una inflamación o infección del párpado incluyendo el margen palpebral, dividiéndose este último en una lamela anterior y otra posterior^{1,2}. Cuando se afectan las estructuras adyacentes, conjuntiva y/o córnea, pasa a denominarse blefarokeratoconjuntivitis; siendo esta afectación frecuente.

La inflamación o infección del borde del párpado es un hallazgo habitual en las consultas de Oftalmología y pueden observarse en el 38,9% de los pacientes que acuden a las consultas de Oftalmología general³⁰.

Aunque este proceso inflamatorio puede ser agudo, con frecuencia causado por agentes infecciosos, inmunitarios o alérgicos identificados, es más habitual que curse de manera crónica en pacientes con apenas sintomatología o incluso asintomáticos.

1.1.2.2 Epidemiología

A pesar de que la blefaritis es una de las patologías más frecuentes en Oftalmología, aún existe insuficiente información epidemiológica sobre su incidencia y prevalencia. Esto puede deberse a que en la práctica clínica existe una gran variabilidad a la hora de catalogar la enfermedad y también en que los estudios publicados presentan diferentes grupos de edad³¹⁻³⁵.

Los síntomas relacionados con la blefaritis son muy frecuentes y los pacientes de menor edad pueden incluso referirlos en mayor medida que los mayores³⁶. Del mismo

modo, los Oftalmólogos objetivan blefaritis en un 37% de los pacientes atendidos en consulta y los Optometristas en un 47%³⁶.

La prevalencia también es diferente atendido a la clasificación y etiología de la blefaritis. Los pacientes con blefaritis anterior estafilocócica resultaron ser más jóvenes, con una media de 40 años, y mayoritariamente mujeres (80%)³⁷. Por otro lado, en la blefaritis posterior o disfunción de glándulas de Meibomio (DGM) la prevalencia varía mucho según la literatura consultada³⁸, siendo un hallazgo frecuente en la población anciana, predominantemente masculina y con diferencias raciales, siendo más común en pacientes asiáticos que en caucásicos³⁹.

Si analizamos las características epidemiológicas de la DGM en la población general adulta de España la prevalencia de DGM asintomática es del 21,9 %, siendo mayor con la edad y en varones; mientras que la prevalencia de DGM sintomática es del 8,6 % y también aumenta con la edad, pero no se asocia con el sexo⁴⁰.

1.1.2.3 Clasificación y etiopatogenia

Tradicionalmente se ha empleado una clasificación anatómica para dividir a las blefaritis según la zona en la que predomine la afectación del margen palpebral. Si afecta principalmente a la lamela anterior del párpado se denomina blefaritis anterior, concentrándose la inflamación y/o infección por delante de la línea gris limitándose a la piel del párpado, el borde libre de éste y las pestañas. Pueden objetivarse collaretes o secreciones sebáceas^{41,42}. (Fig.1.4.)

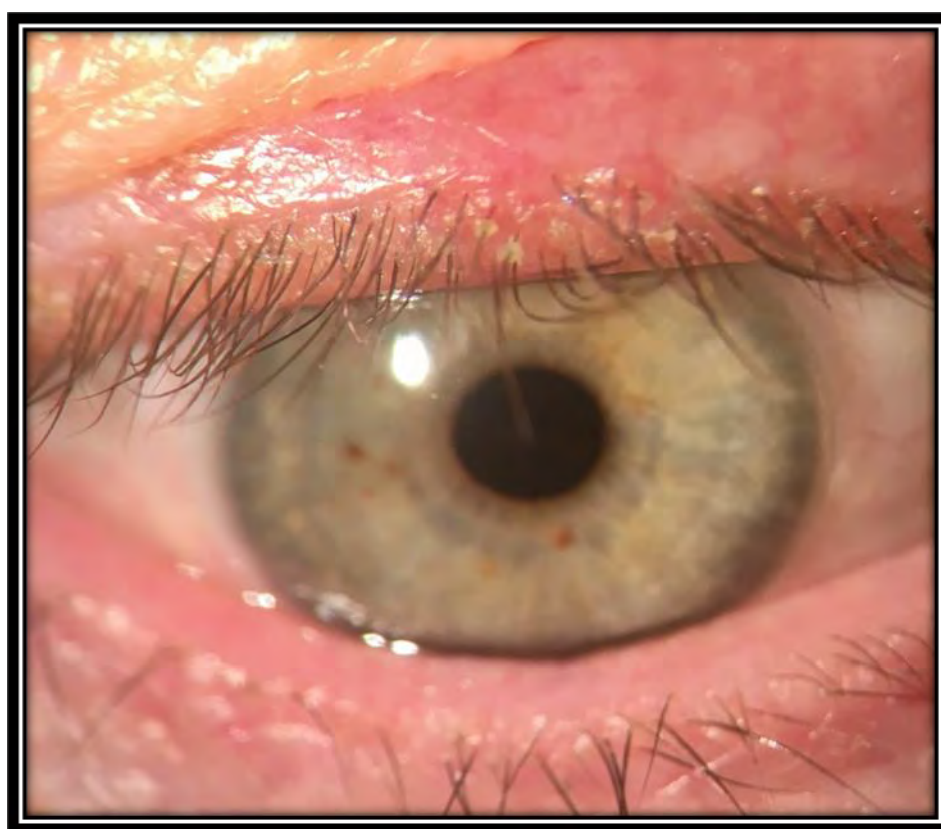


Figura 1.4. Paciente con blefaritis anterior. **Foto tomada por:** el Dr. Juan Iglesias Martín. Servicio de Oftalmología. Hospital Universitario Juan Ramón Jiménez. Huelva.

La blefaritis se denomina posterior cuando la inflamación y/o infección afecta principalmente a las glándulas de Meibomio y a la conjuntiva del tarso, con apenas compromiso de la piel del párpado o de su borde libre^{41,42}. (Fig.1.5.)

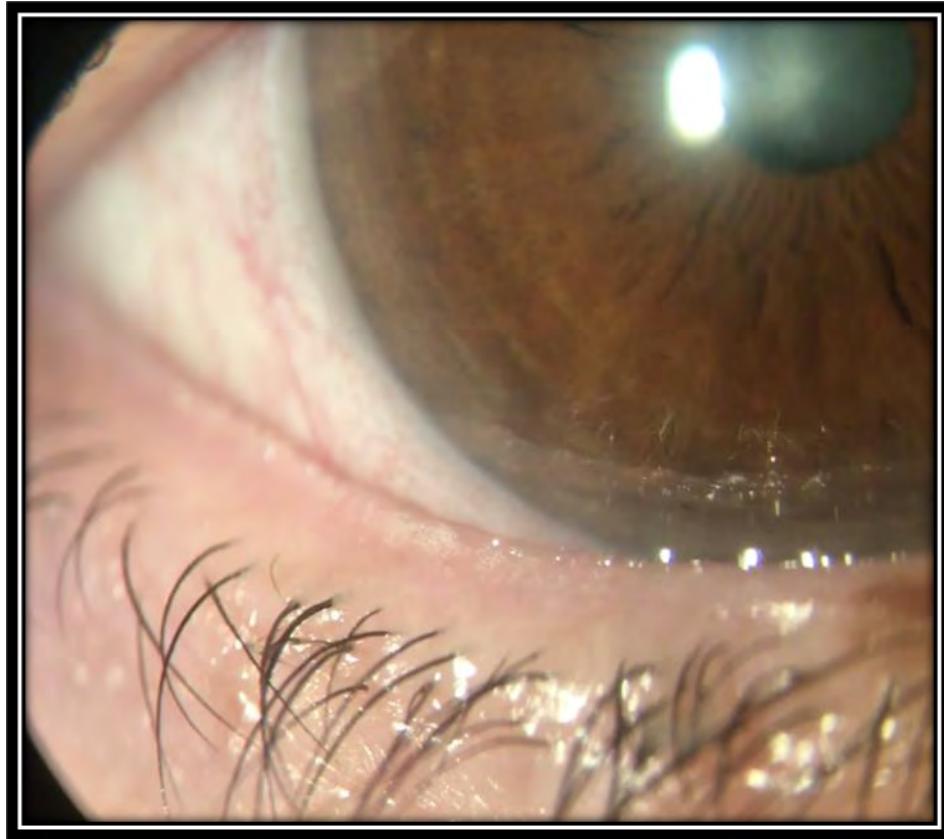


Figura 1.5. Paciente con blefaritis posterior. **Foto tomada por:** el Dr. Juan Iglesias Martín. Servicio de Oftalmología. Hospital Universitario Juan Ramón Jiménez. Huelva.

En el caso de que la blefaritis se localice tanto en la lamela anterior como la posterior se denomina mixta. En este caso el comportamiento clínico de la blefaritis posterior se equipara al problema dermatológico acompañante junto con periodos de empeoramiento y remisión.

Además de esta clasificación anatómica existen múltiples clasificaciones para describir la inflamación crónica que afecta al borde palpebral y por extensión a otras estructuras adyacentes.

McCulley³⁷ realiza una clasificación de las blefaritis crónicas en función de sus características clínicas dividiéndolas en tres categorías que afectan predominantemente a la mitad anterior del párpado:

- Blefaritis estafilocócica que cursa con inflamación de la lamela anterior con eritema cutáneo, telangiectasias y collaretes alrededor de pestañas, costras e incluso ulceraciones. Es más habitual en mujeres jóvenes y se asocia con infección por *S. aureus* (46%) y *S. epidermidis* (92%) en muestras microbiológicas.
- Blefaritis seborreica que puede asociarse con dermatitis seborreica en cuero cabelludo y pliegues cutáneos (nasogenianos e inguinales), con escamas grasientas en la lamela anterior del párpado. No tiene distribución por sexo pero afecta a personas de mayor edad que la estafilocócica.
- Blefaritis estafilocócica y seborreica mixta con signos inflamatorios más llamativos y encontrándose mayor cantidad de *S. aureus* (80%).

A continuación, el mismo McCulley³⁷ describe otras tres formas que afectarían principalmente a la lamela posterior del párpado:

- Blefaritis seborreica meibomiana donde existe dilatación de los conductos de las glándulas de Meibomio con secreción espumosa sobre el borde palpebral.
- Blefaritis por inflamación focal o generalizada de las glándulas de Meibomio donde a diferencia de la anterior se produce una obstrucción de los conductos terminales. Esta forma se asocia a rosácea y dermatitis seborreica.

- Blefaritis asociada a dermatitis descamativas (dermatitis atópica y psoriásica).

Un grupo de trabajo internacional promovido por la sociedad Tear Film and Ocular Surface Society (TFOS)³⁸ se ocupó de unificar las blefaritis seborreicas meibomianas y por inflamación focal o generalizada, siendo renombradas como disfunción de glándulas de Meibomio (DGM).

Esta DGM se define como una inflamación crónica y difusa de las glándulas de Meibomio donde se produce obstrucción de los conductos terminales, pero también cambios en la cantidad y calidad de la propia secreción que producen. De manera que puede darse una hipersecreción seborreica o bien una hiposecreción según el estado de las glándulas.

En la práctica clínica habitual es frecuente encontrar diferentes tipos de blefaritis durante el seguimiento de un mismo paciente, con solapamiento de signos y síntomas. Esto se debe a que existen múltiples factores patogénicamente relacionados con esta enfermedad:

- Infecciones por microorganismos: bacterias (*S. aureus*, *Propionibacterium acnes*, *Corynebacterium spp* o *Moraxella lacunata* entre las más destacadas), virus (papiloma y *Molluscum contagiosum*), hongos y parásitos como ácaros del género *Demodex*⁴³.
- Trastornos alérgicos o de hipersensibilidad (dermatitis atópica y de contacto).
- Dermatitis seborreica y rosácea entre otros trastornos dermatológicos.

1.1.2.4 Manifestaciones clínicas

Los **síntomas en las blefaritis** son inespecíficos respecto a otros tipos de problemas oculares ya que puede aparecer lagrimeo, fotofobia, picor, quemazón, irritación y enrojecimiento tanto palpebral como ocular, incluso sin signos evidentes del cuadro inflamatorio⁴². Estos síntomas tan variables suelen ser bilaterales, aunque en ocasiones asimétricos y los pacientes notan empeoramiento matutino debido al contacto de los párpados con la superficie ocular durante el sueño, y a la ausencia del parpadeo que provoca que se acumulen productos inflamatorios y lípidos en la película lagrimal.

Una historia clínica detallada permite identificar los posibles factores de riesgo que puedan estar ocasionando la cronificación del problema y esto permitiría lograr un abordaje integral del mismo⁴⁴.

Estos **factores de riesgo** pueden clasificarse en cuatro grupos⁴⁴:

1. Factores socioeconómicos: raza asiática, edad avanzada y bajo nivel socioeconómico.
2. Factores oculares: ojo seco y otras patologías inflamatorias oculares, cirugía palpebral, uso crónico de lentes de contacto y colirios con conservantes y cuadros infecciosos que incluyen la parasitosis por especies del género *Demodex*.
3. Factores sistémicos: menopausia, déficit de andrógenos, síndrome de Sjögren, hipertensión arterial, hipercolesterolemia, diabetes, hiperplasia de próstata y enfermedades cutáneas (rosácea, dermatitis atópica y psoriasis principalmente).
4. Factores farmacológicos: terapia hormonal sustitutiva, antiandrogénicos, antiprostáticos, antihistamínicos, antidepresivos y retinoides.

Una exploración palpebral mediante biomicroscopía con lámpara de hendidura permite evidenciar una serie de signos característicos como son:

Alteración de las pestañas:

La disminución del número de pestañas (madarosis), su acortamiento, fragilidad, crecimiento aberrante (triquiasis y distiquiasis) y la presencia de escamas duras entorno a las mismas conocidas como collaretes suelen ser signos de blefaritis crónica.

La asociación de collaretes, enrojecimiento de conjuntiva con o sin reacción papilar e infiltrados en la periferia de la córnea es característica de infección por estafilococos, llegando a provocar opacidad corneal y vascularización periférica⁴⁵.

En las blefaritis seborreicas además de hiperemia de la conjuntiva se asocian con depósitos lipídicos a modo de grumos entorno a las pestañas y las glándulas de Meibomio suelen aumentar de tamaño por bloqueo de los orificios de salida provocando la aparición de orzuelos.

Alteración del borde libre palpebral:

Se produce una congestión de los vasos sanguíneos del borde libre de los párpados por inflamación de folículos pilosos, glándulas de Zeiss, glándulas de Moll, glándulas sudoríparas y de Meibomio.

En las blefaritis posteriores se observa una secreción espesa de lípidos sobre los orificios de las glándulas de Meibomio provocando inicialmente una secreción espumosa sobre el borde palpebral y la superficie ocular y posteriormente, conforme se cronifica la enfermedad, aparece una queratinización del borde libre con estenosis de los conductos glandulares.

La blefaritis crónica ocasiona una hipertrofia del margen de los párpados con cicatrices y granulomas conjuntivales junto con malposición del párpado y de las propias pestañas.

1.1.2.5 Secuelas

En las formas agudas se asocian orzuelos y chalazión que pueden dar lugar a un defecto cosmético. La anomalía palpebral ocasionada por estos procesos suele ser generalmente transitoria. Sin embargo, en casos graves puede inducir una distorsión permanente del borde palpebral y en general del propio párpado.

En las blefaritis crónicas además de la deformación palpebral se producen con frecuencia anomalías en las pestañas.

En general las secuelas más frecuentes son la distorsión del margen del párpado, la presencia de conjuntivitis crónica y de ojo seco⁴⁶. Estas secuelas son menos frecuentes en pacientes jóvenes^{47,48} siendo más evidentes en pacientes mayores, sobre todo en relación con la rosácea y la dermatitis seborreica^{42,45}.

1.1.2.6 Diagnóstico

El diagnóstico de blefaritis se basa habitualmente en la historia clínica del paciente y en los hallazgos característicos de la biomicroscopía con lámpara de hendidura.

Los síntomas de la blefaritis son bastante inespecíficos^{42,49} y los pacientes pueden referir sensación de cuerpo extraño, picor, ardor o sequedad ocular. Es habitual

la presencia de enrojecimiento ocular, irritación, quemazón, lagrimeo, visión borrosa o fluctuante y en ocasiones fotofobia cuando existe afectación corneal. Estos síntomas empeoran por las mañanas y se intensifican con la exposición al aire acondicionado, la calefacción y a las actividades que disminuyan la frecuencia de parpadeo como la lectura. En pacientes con blefaritis crónicas pueden referir síntomas subjetivos graves e incapacitantes mientras que los signos objetivos en la exploración sean sutiles o apenas apreciables si no se examinan adecuadamente^{44,50}.

La exploración palpebral mediante biomicroscopía revela una serie de signos como son la descamación de la piel y el engrosamiento del borde libre con eritema y telangiectasias. Es frecuente la formación de costras en las pestañas, pérdida de las pestañas y párpados pegados por la presencia de secreciones principalmente matutinas.

El diagnóstico es por tanto esencialmente clínico, basado en la historia clínica y en la exploración mediante lámpara de hendidura de los márgenes de los párpados y del comportamiento de la película lagrimal.

No existen pruebas diagnósticas específicas de blefaritis excepto el empleo de técnicas de imagen in vivo como la Meibografía, que ayuda al diagnóstico de las alteraciones de las glándulas de Meibomio mediante imágenes de la estructura acinar en forma de racimos en el espesor del tarso de los párpados, empleando una luz infrarroja que permite su análisis computarizado y revela datos de la integridad de las mismas⁵¹.

Además, se han empleado en estudios de investigación otras tecnologías como la Tomografía de Coherencia Óptica (OCT), Ultrasonido o la Microscopía Confocal⁵²; aunque no se ha extendido su uso en la práctica clínica a diferencia de la Meibografía.

Las **pruebas clínicas clásicas** solo proporcionan una evaluación indirecta de la función de las glándulas de Meibomio y de la secreción de las mismas, pero tienen la

ventaja de ser accesibles y de bajo coste. Pueden distinguirse principalmente cuatro tipos⁵³:

1. Cuestionarios sintomáticos, inicialmente diseñados para el ojo seco: tanto el DEQ-5 como el OSDI pueden resultar útiles para el diagnóstico y seguimiento de las blefaritis.
2. Evaluación de la expresión palpebral: aporta datos de la calidad de la secreción de las glándulas de Meibomio según sea clara (normal) o espesa a modo de “pasta de dientes” (patológica); y también datos cuantitativos según el número de glándulas que puedan o no excretar su contenido.
3. Tiempo de rotura de la película lagrimal (BUT): empleando colorantes vitales como la fluoresceína, rosa de Bengala o verde de lisamina que permiten una valoración cuantitativa del BUT, y por tanto la relación que existe entre la disfunción de las glándulas de Meibomio y el ojo seco evaporativo. Estas tinciones también nos permiten resaltar las áreas de afectación corneal y conjuntival.
4. Test de Schirmer: es la prueba que permite medir la cantidad de lágrima producida siendo un criterio diagnóstico del síndrome de Sjögren y síndrome de ojo seco en general incluso cuando la exploración inicial no muestra datos evidentes de patología, especialmente en las blefaritis, que ayuda en el diagnóstico de ojo seco evaporativo.

También han ido surgiendo diferentes técnicas diagnósticas usadas en el diagnóstico precoz del ojo seco que pueden resultar útiles como son la determinación de la altura del menisco lagrimal mediante interferometría o imagen de video⁵⁴, y la osmolaridad de la lágrima⁵⁵.

Los cultivos de los márgenes cutáneos y de las glándulas de Meibomio de los párpados pueden estar indicados en pacientes que tienen blefaritis anterior recidivante con o sin inflamación severa y en pacientes que no responden al tratamiento instaurado. Igualmente, la evaluación microscópica de pestañas depiladas puede revelar la existencia de ácaros del género *Demodex* en caso de blefaritis crónicas^{56,192}.

Siempre debe tenerse en cuentas la posibilidad de un carcinoma en pacientes con blefaritis que no responden al tratamiento, especialmente en casos unilaterales, casos de asimetría marcada, resistencia al tratamiento o bien lesiones focales recurrentes que no responden al tratamiento⁵⁷. Ante la duda debe de remitirse la pieza de biopsia para su estudio anatomopatológico para descartar la existencia de un carcinoma de glándulas sebáceas o un carcinoma de las glándulas de Meibomio.

1.1.2.7 Tratamiento

1.1.2.7.1 Blefaritis anterior

La primera medida fundamental es la higiene palpebral, que incluye la aplicación de masaje, calor local y soluciones o geles jabonosos comerciales. El empleo adecuado de estas medidas puede reducir el componente lipídico y bacteriano implicado en la blefaritis^{37,38,58}.

Habitualmente se aplica calor local mediante toallitas calientes planchadas o impregnadas en agua caliente y posteriormente se procede al masaje del párpado en sentido horizontal desde el canto interno hacia el lateral. Los exfoliantes palpebrales que usan una dilución de champú para bebés han sido la terapia más ampliamente aceptada^{59,60}, pero estudios recientes demuestran la superioridad de preparados

comerciales preferiblemente mediante toallitas especiales⁶¹. Además, el champú para bebés puede tener un efecto adverso sobre la función de las células caliciformes de la conjuntiva⁶¹.

La frecuencia de aplicación de estas medidas puede variar en función de la intensidad del proceso patológico, aunque se recomienda mantener la higiene palpebral por la mañana durante largos periodos de tiempo, incluso tras desaparecer los síntomas⁶².

El tratamiento con antibióticos tópicos ha demostrado proporcionar cierto alivio sintomático de las blefaritis y ha sido eficaz en disminuir las bacterias en el borde palpebral en los casos de blefaritis anterior, aunque se desconoce el mecanismo exacto por el que la flora microbiana interviene en el proceso. Se han empleado con éxito prácticamente todos los ungüentos oftálmicos disponibles, pero de entre ellos, los macrólidos (eritromicina o azitromicina) parecen aportar la ventaja de añadir un efecto antiinflamatorio.⁶² La frecuencia y duración del tratamiento dependerá de la severidad de la blefaritis y de la respuesta al tratamiento, pero por lo general no se recomienda la prescripción de pomadas o colirios antibióticos a largo plazo, aunque es un enfoque que adoptan algunos facultativos.⁶²

Se puede utilizar un ciclo corto de corticoides tópicos aplicados varias veces al día en casos de inflamación palpebral moderada o intensa, o en casos de queratitis marginal o flictenulas⁶³. Una vez que se controla la inflamación, los corticoides se pueden disminuir de forma gradual hasta suspenderlos y luego utilizar de forma intermitente para mantener al paciente clínicamente estable. Se debe utilizar la dosis mínima eficaz de corticoides y en la medida de lo posible evitar el tratamiento a largo plazo⁶³. Los pacientes deben ser advertidos de los potenciales efectos adversos de los

corticoides, como son el riesgo de aumento de la presión intraocular y catarata. Estos efectos adversos se pueden reducir utilizando corticoides de baja penetración ocular como la fluorometolona o hidrocortisona. Además, la aplicación local de inhibidores de calcineurina, como la Ciclosporina A o la pomada de Tacrolimus pueden aportar un beneficio adicional en el control de los síntomas inflamatorios persistentes^{63,64}.

1.1.2.7.2 Blefaritis posterior

En el apartado anterior se comentó que la limpieza de párpados es particularmente útil en los casos de blefaritis anterior, mientras que las compresas calientes son muy útiles en la blefaritis posterior y en la DGM. El régimen terapéutico óptimo con frecuencia se realiza en función de la respuesta al tratamiento. El paso inicial en el tratamiento es recomendar al paciente la utilización de compresas calientes además de la higiene palpebral⁶⁵.

A pesar de la eficacia demostrada de las compresas calientes en muchos estudios clínicos, el cumplimiento es con frecuencia deficiente, debido al tiempo necesario y a la dificultad que supone mantener la temperatura de la compresa durante un periodo prolongado de tiempo. Además de las compresas caseras, ahora hay una amplia variedad de dispositivos disponibles en el mercado para la gestión de las anomalías del párpado que elevarán la temperatura del párpado durante un periodo de tiempo más prolongado^{66,67}.

Como la DGM provoca la reducción del grosor de la capa lipídica, puede ser beneficioso reemplazar los lípidos por colirios lubricantes oculares o que contengan lípidos^{68,69}.

Los suplementos dietéticos mediante ácidos grasos omega-3 de manera prolongada pueden mejorar algunos signos asociados a las blefaritis posteriores, aunque debe valorarse el balance riesgo-beneficio por su potencial efecto anticoagulante⁷⁰.

Las tetraciclinas se usan para tratar la blefaritis crónica debido a sus efectos antimicrobianos y antiinflamatorios, y varios estudios han descrito los efectos beneficiosos de la minociclina y la doxiciclina^{71,72}. Sin embargo, hasta la fecha no existen ensayos clínicos aleatorizados, controlados y con doble enmascaramiento que demuestren la eficacia de los antibióticos sobre la higiene del párpado u otros tratamientos^{73,74}. Igualmente, debe tenerse en cuenta el impacto positivo de la azitromicina sistémica en el tratamiento de la DGM, especialmente en personas que sufren intolerancia u otros antibióticos sistémicos⁷⁵⁻⁷⁷.

Ante la elevada proporción de pacientes con una respuesta parcial o insatisfactoria a los tratamientos tradicionales de la blefaritis, se han incorporado al arsenal terapéutico algunas técnicas que persiguen mejorar la secreción de las glándulas sebáceas de los párpados o las alteraciones vasculares presentes. Existen diversos métodos para el exprimido forzado de las glándulas de Meibomio sin la aplicación de calor^{78,79}. Estos métodos incluyen el aislamiento del párpado para exprimirlo entre los dedos del examinador y aplicar fuerza apretando los párpados uno contra el otro; o bien utilizando un objeto rígido en la superficie interior del párpado y el pulgar, el dedo u otro objeto rígido en el párpado exterior para aplicar fuerza^{78,80}. Sin embargo, un factor limitante en todos estos métodos es el dolor que experimenta el paciente, que solo se alivia mínimamente con anestésicos tópicos. Por ello se han desarrollado dispositivos comerciales que aplican, de forma controlada y mantenida en el tiempo, calor y presión sobre los párpados.

Asimismo, existen dispositivos de luz pulsada intensa (LPI) que han sido empleados con éxito en diferentes afecciones dermatológicas, como la rosácea⁸¹, que emiten una radiación filtrada capaz de reducir las telangiectasias patológicas asociadas a la blefaritis, mejorar la secreción sebácea y aliviar los síntomas asociados al ojo seco evaporativo^{82,83}.

1.1.2.8 Blefaritis atípicas

Los pacientes que no respondan al tratamiento o que presenten una inflamación atípica del borde palpebral deben ser reevaluados cuidadosamente para descartar la presencia de un tumor palpebral. La presencia de ciertas características como una lesión nodular, ulceración, cicatrices, pérdida de pestañas, costras y descamación de la dermis, o nódulos conjuntivales amarillentos asociados a inflamación pueden sugerir la presencia de un tumor palpebral.

El carcinoma de células basales y el carcinoma de células escamosas son los tumores malignos que con más frecuencia afectan a los párpados, seguidos por el melanoma y el carcinoma sebáceo⁸⁴. El carcinoma sebáceo puede tener un origen multicéntrico y debido a su extensión pagetoide puede inducir una inflamación conjuntival grave. Este tipo de tumor suele ser difícil de diagnosticar y debe sospecharse en pacientes de edad avanzada con chalazión de repetición o con blefaritis y/o conjuntivitis unilaterales crónicas que no responden al tratamiento⁸⁴.

También hay que destacar los casos reportados de blefaritis como efecto secundario de las terapias sistémicas, particularmente en el contexto de la quimioterapia, con fármacos como bortezomib, cetuximab, inhibidores de TNF α y dupilumab⁸⁵. Es crucial realizar un seguimiento regular y atento de los pacientes que se

someten a estos tratamientos para establecer rápidamente una terapia de apoyo adecuada.

Además, debe considerarse también la posibilidad de una infección por especies del género *Demodex* en aquellos pacientes que no presenten mejoría clínica con los tratamientos mencionados en el anterior capítulo.

1.1.3 *Demodex Folliculorum*

1.1.3.1 Perspectiva histórica

Aunque los ácaros del género *Demodex* se han asociado recientemente con la blefaritis durante muchos años se creía que eran inocuos. Henle fue el primer autor en detectar especies del género *Demodex* en un caso de acné facial en 1841⁸⁶. Sin embargo, no fue hasta 1876 cuando se informa por primera vez del ácaro del género *Demodex* como una manifestación ocular, cuando Michel detectó su presencia en el folículo piloso del párpado⁸⁶. Sin embargo, la importancia clínica de las especies del género *Demodex* aún no era concluyente.

En 1900, Hunsche estudió las pestañas de 116 cadáveres e informó que, aunque la incidencia de la infestación por especies del género *Demodex* aumentaba con la edad, el ácaro era esencialmente no patógeno y que no resultaba dañino; al mismo tiempo, Raehlmann sugirió que el *Demodex*, aunque a veces asintomático, podría provocar conjuntivitis y dermatitis angular⁸⁶.

Hubo una confusión temprana sobre la patogénesis de ácaros del género *Demodex* y la blefaritis no estaba implicada en ese momento.

En 1963, Akbulatova describió por primera vez a *Demodex brevis* como una subespecie distinta al *Demodex folliculorum*, prefiriendo ambas un nicho diferente⁸⁷.

La asociación con blefaritis fue establecida definitivamente por Coston⁸⁸ en 1967, que describió la anatomía y fisiología completa del ácaro con imágenes del microscopio óptico junto con hallazgos clínicos detallados. Es importante destacar que señaló que la blefaritis inducida por las especies *Demodex* no era una afección aislada y podría presentarse como patología cutánea, como rosácea, dermatitis perioral, e incluso carcinoma basocelular. El estudio de Coston no fue aceptado por todos en la comunidad científica oftalmológica.

1.1.3.2 Epidemiología

La prevalencia de pacientes con blefaritis en los Estados Unidos se estima en más de 25 millones en un momento dado⁸⁹. Sin embargo, es importante recordar que no todos estos casos se asocian con ácaros del género *Demodex*; Del mismo modo, el *Demodex sp.* puede estar presente en individuos asintomáticos o personas que se quejan de sequedad ocular.

Como resultado, los informes epidemiológicos sobre blefaritis por el género *Demodex* no han sido claros. En un estudio de 2018 en el que participaron más de 500 personas el *Demodex sp.* se detectó en el 79,2% de los pacientes con blefaritis, pero también en el 31,4% de los controles (P, 0,001)⁹⁰. En otro estudio de 229 pacientes con síntomas de ojo seco se encontró *Demodex sp.* en el 40,2% de los pacientes⁹¹. En consecuencia, aunque estos parásitos son la infestación más común en el subgrupo de pacientes con blefaritis, sigue siendo bastante común entre pacientes que padecen síntomas de ojo seco y en la población general¹⁹².

Las personas de cualquier edad, sexo o raza pueden contraer blefaritis por *Demodex sp.* Varios estudios han demostrado que la prevalencia y la carga de infestación por *Demodex sp.* aumenta notablemente con la edad, en pacientes con o sin diagnóstico de blefaritis^{92,93}.

En los pacientes de edad avanzada, por lo general de 50 a 70 años, se cree que tienen un sistema inmunológico más débil y una mayor fragilidad general de la piel, permitiendo así la penetración del ácaro⁹⁰. Sin embargo, la literatura es mixta cuando se trata de sexo, con algunos estudios que muestran una prevalencia más alta en mujeres, mientras que otros reportan lo mismo en los hombres^{90,94,95}.

A pesar de estos informes contradictorios, es evidente que la infestación por *Demodex sp.* es más prevalente entre hombres y mujeres mayores. Esta observación puede ser estratificada para blefaritis anterior y posterior. En general la blefaritis anterior es menos frecuente y los pacientes tienen más probabilidades de ser mujeres y más jóvenes, en comparación con aquellos que padezcan de blefaritis posterior⁹⁶. La fisiopatología subyacente detrás de esta diferencia no es bien entendida.

Demodex sp. ha sido reportado en todo el mundo⁹⁷, y se han identificado más de 100 especies de estos ácaros, de las cuales solo 2 (*Demodex brevis* y *Demodex folliculorum*) han sido halladas en la piel de seres humanos. Sin embargo, la secuenciación del genoma mitocondrial sugiere que las 2 especies se comportan de diferente manera en lo que respecta a la transmisión, y como resultado, puede haber variaciones geográficas. *Demodex folliculorum* tiende a residir en los folículos pilosos del párpado más cercanos a la superficie anterior de la piel, y por tanto se cree que es más contagioso, pasando de un huésped a otro con mayor frecuencia que su homólogo el *Demodex brevis*⁹⁸.

Como resultado, *Demodex folliculorum* no presenta una diferencia geográfica clara entre huéspedes de países como China, España o Estados Unidos, lo que podría explicarse por la fuerte globalización de la era moderna⁹⁹. Por otro lado, *Demodex brevis* muestra bastante variación genética consistente entre huéspedes de origen europeo y ascendencia asiática, posiblemente debido a una mayor dificultad de transmisión. En cualquier caso, es importante tener en cuenta la infestación por *Demodex sp.* es independiente de la raza.

1.1.3.3 Clasificación y ciclo de vida

Demodex brevis (DB) y *Demodex folliculorum* (DF) son ectoparásitos que comparten el *phylum Arthropoda*, pero existen características bien documentadas que hacen que estas especies sean distintas.

Los ácaros adultos de DB son ligeramente más cortos, aproximadamente 0,15 a 0,2 mm de longitud, mientras que los organismos DF tienden a crecer hasta 0,3-0,4 mm¹⁰⁰. En particular los ácaros difieren en su nicho preferido en el cuerpo. A pesar de que ambos pueden tener manifestaciones oculares el DB tiene una distribución más amplia en el cuerpo porque se encuentra más comúnmente en otros lugares como en el cuello y el pecho¹⁰¹.

Los *Demodex sp.* son los ectoparásitos más habituales del cuerpo humano y se encuentran comúnmente en individuos mayores de 40 años y prácticamente universales después de los 45 años^{102,103}.

Curiosamente, los *Demodex sp.* no tienen aparato excretor, y de ahí su corta vida útil, de manera que al regurgitar material fecal después de la muerte pueden ocasionar un estímulo inflamatorio en el huésped¹⁰⁴.

En la presentación ocular, el DF se encuentra más típicamente en la base de las pestañas, en el canal superior de una unidad pilosebácea, alimentándose de células de la piel y de sebo. El DB tiende a infiltrarse más profundamente en las glándulas sebáceas y de Meibomio, alimentándose de células epiteliales glandulares para su supervivencia, lo que se cree que contribuye a la formación de chalazion^{105,106,203,206}.

Los *Demodex sp.* se reproducen a través de fertilización interna y muestran un ciclo de vida de 14 a 18 días desde la fase de huevo a larva¹⁰⁶. El apareamiento se produce en la apertura del folículo y los huevos se liberan en el cabello cercano a los folículos o glándulas sebáceas donde eclosionan en unas 100 horas¹⁰⁰. Debido a la limitada esperanza de vida de los ácaros adultos, de aproximadamente 3 semanas, el apareamiento frecuente es crítico para la propagación efectiva de la progenie de los *Demodex sp.*

1.1.3.4 Patogenia

El papel patogénico del parásito en oftalmología ha sido debatido durante muchos años, existiendo antecedentes de enfermedades oftalmológicas en los cuales se han encontrado cantidades importantes de estos ácaros como la rosácea ocular y la blefaritis crónica^{105,106}.

Los factores predisponentes para la infestación por *Demodex sp.* han sido descritos y discutidos ampliamente, como son la edad, el déficit de higiene ocular, el

uso de gafas, la exposición a la luz solar, el estrés, la rosácea, la diabetes mellitus, la deficiencia inmunológica e incluso en pacientes que reciben tratamiento para la insuficiencia renal y leucemia, entre otros^{107,108,109}.

Las manifestaciones clínicas están directamente relacionadas con el grado de infestación, de manera que una cantidad de 5 ácaros por folículo piloso puede ser interpretado como un estado parasitario considerable¹¹⁰. Sin embargo, algunos autores sugieren que este ácaro podría ser beneficioso para el ser humano mientras que el ambiente del huésped no facilite su excesiva proliferación¹¹¹. Incluso se ha sugerido que la presencia del parásito controlaría la actividad bacteriana sirviendo como defensa hacia otras especies de ácaros¹¹². Esto se debe a que el *Demodex sp.* suele ser considerado un comensal de la piel humana⁹⁰, aunque hoy en día sigue siendo tema de debate.

El mecanismo de transmisión es por medio del contacto directo de la piel infestada con el ácaro en etapa larval o etapa adulta, así como también por contacto con toallas, ropa de cama y polvo que contengan el ácaro en etapa oval¹⁰⁷. El traspaso del ácaro de un individuo a otro no necesariamente generará la enfermedad, pudiendo ocurrir más frecuentemente en el caso de una deficiencia inmune¹¹³. La enfermedad ocasionada por ambos parásitos recibe el nombre de demodicosis.

***Demodex* y blefaritis anterior**

DF encuentra su hábitat principal en la base del folículo de las pestañas causando daño mecánico directo al hacerlo^{106,114}. Estas abrasiones epiteliales microscópicas pueden causar hiperplasia e hiperqueratinización reactiva^{114,115}. Los

ácaros ponen sus huevos en la base de las pestañas lo que provoca una distensión folicular y pestañas mal dirigidas (distiquiasis)¹¹⁶. (Fig.1.6.)

Como estos ácaros no tienen órganos excretores el material no digerido es regurgitado y se combina con estas células epiteliales, queratina, y huevos para formar la mayor parte de los depósitos cilíndricos de las pestañas, que resulta patognomónico de la infestación por *Demodex sp*^{112,116}. Estos depósitos a su vez contienen proteasas y lipasas que causan síntomas de irritación palpebral¹¹². De hecho, de todos los síntomas oculares investigados, el único síntoma que se correlacionó directamente con *Demodex sp* fue la irritación de los párpados.



Figura 1.6. Ejemplar adulto de DF. Foto tomada por: el Dr. Alberto Tenorio Abreu. Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Juan Ramón Jiménez. Huelva.

Los estafilococos y estreptococos de la superficie de los ácaros están directamente implicados en la blefaritis microbiana, tanto anterior como posterior¹⁰⁶.

Además, las bacterias alojadas en el interior de los ácaros (*Bacillus oleronius*) también han demostrado que activan el sistema inmunológico del huésped^{106,112,196}. Incluso en su muerte, los ácaros pueden provocar una respuesta inflamatoria mediante la liberación de una serie de antígenos bacterianos que desencadenan la cascada inflamatoria del huésped.

Por último, se cree que los residuos liberados por los ácaros causan una respuesta inmunitaria de hipersensibilidad retardada que está respaldada por un aumento en el número de Células T CD4+, macrófagos y células de Langerhans solo en sujetos con un hallazgo positivo de DF^{106,112,117}. La medición de estas respuestas inflamatorias del huésped puede ser una valiosa prueba no invasiva para *Demodex sp.*

***Demodex* y blefaritis posterior**

El DB se ha relacionado con la DGM sintomática, en parte debido a su predisposición a invadir la glándula de Meibomio, donde causa una obstrucción mecánica primaria de su orificio^{114,197,199,202,204}. En consecuencia, se ha encontrado que la gravedad de la DGM se correlaciona con la demodicosis por DB y no por DF^{118,197}.

El acumulo de los excrementos del parásito contribuye aún más a este bloqueo y también puede provocar una reacción mediada por células^{119,199,202,204}. Este bloqueo conduce al relleno, hinchazón y agrandamiento de la glándula.

Se ha planteado la hipótesis de que actúa como un cuerpo extraño, causando una reacción granulomatosa localizada^{120,203,204}. Este granuloma puede desarrollar un chalazion, que se sospecha que es causado por una respuesta del huésped a cuerpo extraño. Esta hipótesis se ve confirmada por la evidencia del ácaro DB en el centro de

granulomas meibomianos como chalazion y una alta correlación entre la prevalencia de DB y el chalazion^{106,116,203,204,206}. En un estudio reciente el DB también tendía a asociarse con una mayor tasa de recurrencia de chalazion después de su extirpación quirúrgica¹²¹.

***Demodex* e inflamación de la superficie ocular**

La inflamación del borde del párpado puede extenderse y causar inflamación de la conjuntiva, lo que da lugar a una blefarconjuntivitis. Esto parece ser cierto no solo para los adultos sino también para los niños, a pesar de que normalmente se piensa que están excluidos de la infestación por *Demodex sp.* Pacientes pediátricos con blefarconjuntivitis recalcitrantes que no se resuelven con un tratamiento convencional pueden responder después de un ciclo corto de aceite de árbol de té^{122,205}.

Staphylococcus epidermidis y *Staphylococcus aureus* son los principales patógenos en la blefarconjuntivitis pediátrica, y como ha como se ha mencionado, los ácaros del género *Demodex* pueden ser un vector de estas bacterias en el ojo^{106,196,205}.

Kheirkhah et al. fueron los primeros en informar sobre los cambios inducidos por *Demodex sp.* en la córnea¹²³. La inflamación por una blefaritis anterior y posterior puede afectar a la córnea causando queratopatía punteada superficial, neovascularización, infiltración estromal y marginal, lesiones flictenulares, opacidades, cicatrices nodulares, limbitis, e incluso la perforación^{121,123}.

Por tanto, se aconseja realizar un cribado de *Demodex sp.* en aquellas queratitis refractarias de causa desconocida en pacientes con o sin blefaritis evidente^{124,198}.

***Demodex* y comorbilidades**

El ácaro se ha implicado no solo en la rosácea facial sino también en casos de rosácea ocular^{105,106,123}. De hecho, la correlación entre *Demodex sp.* y la gravedad de la rosácea ocular también se ha demostrado¹⁰⁶.

La infestación por estos parásitos no se limita a los márgenes de los párpados, pestañas y glándulas de Meibomio. La literatura dermatológica sugiere que *Demodex sp.* también puede estar asociado con una multitud de afecciones de la piel, como los carcinomas de células basales y sebáceas^{106,125,126}.

1.1.3.5 Diagnóstico

El diagnóstico clínico de la blefaritis por *Demodex sp.* comúnmente se basa en los signos más que en los síntomas, ya que los síntomas de la demodicosis coinciden con otras afecciones del segmento anterior del ojo, incluyendo la blefaritis anterior y posterior, ojo seco evaporativo y no evaporativo, así como procesos inflamatorios de la superficie ocular. Los pacientes pueden quejarse de picazón, ardor, sensación de cuerpo extraño, pestañas enmarañadas o con costras, lagrimeo, visión borrosa, molestias o irritación ocular, entre otros^{103,121}. El síntoma más común que sugiere *Demodex sp.* es la picazón, especialmente por la noche, cuando los ácaros tienden a ser más activos.

Los criterios actuales para el diagnóstico de la blefaritis por *Demodex sp.* son complejos. En primer lugar, un fuerte índice clínico de sospecha debe desarrollarse a partir de los antecedentes cuando una blefaritis, conjuntivitis o queratitis en adultos, o bien una blefaroconjuntivitis o chalazion en los niños, son resistentes al tratamiento

estándar, especialmente a corticoides^{106,205,206}. La triquiasis puede ser secundaria a la infestación por el ácaro y sugiere una evaluación adicional.

Clínicamente, el signo más importante es el cilíndrico de caspa en la base de las pestañas en el examen con lámpara de hendidura¹⁹⁴. Los estudios han demostrado que si clínicamente es evidente esta caspa cilíndrica entre el 50% y el 90% de los pacientes tendrán *Demodex sp*¹¹⁵. (Fig.1.7.)

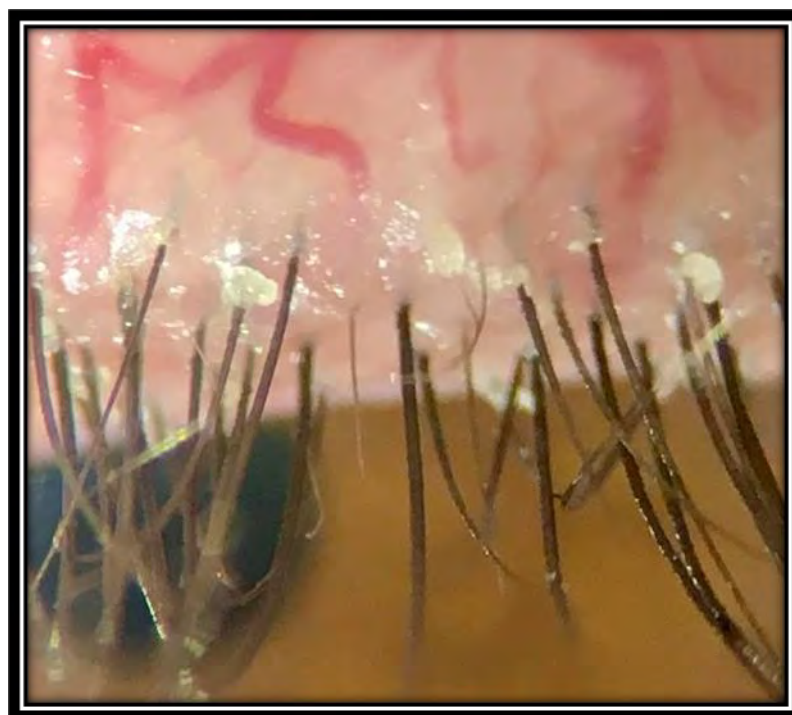


Figura 1.7. Cilindros de caspa (collaretes) en pestañas de paciente con demodicosis. **Foto tomada por:** el Dr. Juan Iglesias Martín. Servicio de Oftalmología. Hospital Universitario Juan Ramón Jiménez. Huelva.

Un diagnóstico definitivo de la infestación por el ácaro se realiza mediante el muestreo de pestañas y su posterior examen con un microscopio óptico¹²¹. El muestreo estándar definido por Coston recomienda la depilación de 4 pestañas donde se evidencia el cilindro de caspa en su base¹²⁷. Sin embargo, es importante tener en cuenta las limitaciones de este muestreo, ya que la caspa cilíndrica y el *Demodex sp.* no siempre se

retiran por completo durante la depilación; por lo tanto, debe tenerse cuidado para no dañar el folículo de las pestañas al retirarlo y deben analizarse varias muestras para confirmar el diagnóstico. Si los ácaros son extraídos con éxito son visibles a la luz del microscopio y se puede realizar su conteo.

Por último, la microscopía confocal in vivo (IVCM) ha surgido como una técnica eficaz y no invasiva para evaluar el *Demodex sp.*, especialmente si el muestreo de pestañas no es concluyente o no es realizable. Además, la IVCM proporciona una información adicional que la microscopía óptica no puede, como la evaluación de la disfunción glandular, la inflamación periglandular y los infiltrados conjuntivales^{128,195}. La IVCM genera imágenes in vivo a diferentes profundidades, que permite eliminar el proceso de extracción manual y la sección de especímenes, permitiendo una visualización más realista^{129,195}. Aunque el resultado final es que no hay diferencia estadísticamente significativa para la identificación del ácaro entre la utilización de estos dos métodos de microscopía¹²⁸.

Después de la toma de muestras, la pregunta sigue siendo qué número de ácaros representan la infestación normal frente a un sobrecrecimiento patológico, o qué cantidad de ácaros se requiere para provocar los síntomas. Se necesita más investigación en estas áreas.

1.1.3.6 Tratamiento

Uno de los objetivos principales en el tratamiento del *Demodex sp.* es reducir la sobrepoblación de parásitos en los párpados y las pestañas proporcionando un entorno más saludable para la superficie ocular que disminuya la inflamación.

Mientras que la terapia para la blefaritis tradicional incluye compresas tibias y combinaciones de antibióticos y esteroides, estas terapias no erradican el *Demodex sp.*, y a menudo son un condicionante para que persista¹³⁰.

Los pacientes deben entender que la higiene de los párpados a largo plazo es necesaria al tratarse de una enfermedad crónica que requiere terapia también crónica. Al tratar el *Demodex sp.* el objetivo principal es reducir el número de estos ácaros, ya que toda la población de ácaros no puede ser completamente eliminada^{127,131,207}. Existen una serie de opciones de tratamiento para pacientes con *Demodex sp.* y su selección se basa en la gravedad de la afección.

El agente terapéutico más eficaz y comúnmente utilizado es el aceite de árbol de té (TTO), siendo la opción de tratamiento preferido en la consulta y en el hogar del paciente frente al *Demodex sp.*^{127,132,133,193}. Se ha demostrado que una concentración tan baja de TTO como del 5% cuando se aplica en los párpados dos veces al día y hasta un 50% cuando se aplica una vez a la semana son eficaces para reducir la infestación de *Demodex sp.* cuando se aplican sobre los párpados y la base del folículo de las pestañas^{132,133}.

El objetivo de la aplicación de la solución del TTO al 50% es estimular la migración de los ácaros fuera del folículo de las pestañas. A esto le sigue una limpieza diaria de párpados con toallitas comerciales que contienen TTO al 5% para prevenir la replicación del ácaro en la superficie de la piel^{127,134}.

A los pacientes se les instruye para limpiar los párpados y las pestañas, así como untar el limpiador de párpados en las raíces de las pestañas del borde superior e inferior de los párpados^{121,135}. Las toallitas limpiadoras deben darse con una cobertura completa en la base de las pestañas para que sean efectivas y los ácaros no puedan para

poner huevos e incubar más ácaros del género *Demodex*¹³⁵. También se les indica que usen las toallitas en la frente, cejas y mejillas, ya que los ácaros viven en todas esas áreas^{132,136}.

La ivermectina y el metronidazol en administración oral se han estudiado de manera extensa, tanto de forma independiente como en terapia combinada, para la blefaritis por *Demodex sp.* resistente al tratamiento con TTO. Sin embargo, múltiples revisiones sistemáticas indican que estos agentes no son los preferidos debido a su amplio espectro de efectos adversos y su alta tasa de recaídas^{137,138,201}. Esta tasa alarmantemente alta de recaídas y de potenciales efectos secundarios pone a la ivermectina y el metronidazol detrás del TTO tópico como tratamiento de segunda línea para la blefaritis por *Demodex sp.*, ya que el TTO ofrece mejores resultados clínicos^{193,201}.

No obstante, también se ha demostrado que no existe una única opción de tratamiento que erradique al *Demodex sp.* después de 4 semanas de terapia, destacando la naturaleza crónica de la afección y la necesidad de terapia a largo plazo¹³⁵. (Fig.1.8.)

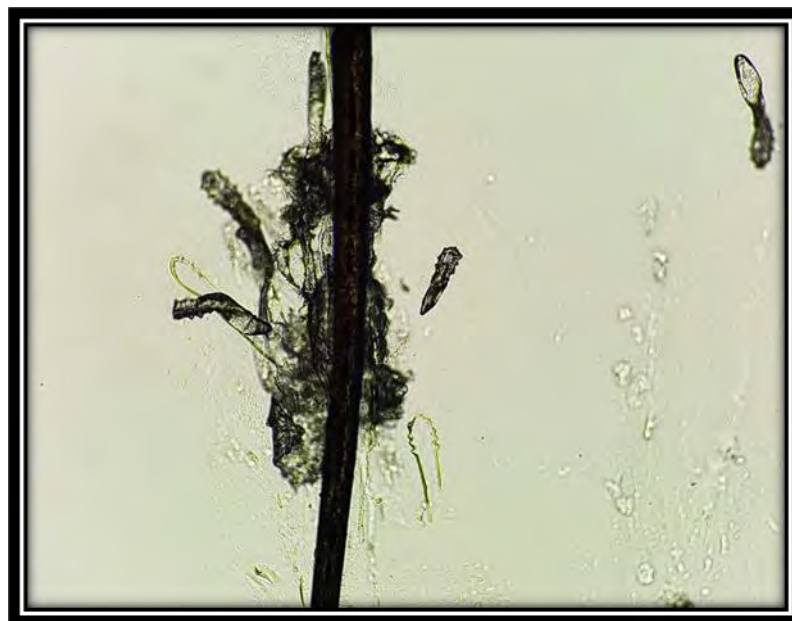


Figura 1.8. *Demodex* moribundos en pestañas tras realizar tratamiento con TTO.

Foto tomada por: el Dr. Alberto Tenorio Abreu. Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Juan Ramón Jiménez. Huelva.

1.2 Antecedentes y Justificación

La blefaritis se define como una inflamación de los párpados y es una de las enfermedades oculares más comunes que afecta tanto a niños como a adultos^{36,145}. La blefaritis se puede clasificar de diferentes maneras. En primer lugar, se puede categorizar según el proceso de la enfermedad como aguda o crónica. La blefaritis aguda puede ser de etiología bacteriana, viral o parasitaria pero la forma más común es la blefaritis crónica.

McCulley³⁷ clasificó la blefaritis crónica en seis categorías: estafilocócica, seborreica, seborreica con sobreinfección estafilocócica, seborreica con seborrea meibomiana, seborreica con meibomitis secundaria y la meibomitis primaria. Actualmente se utiliza la siguiente clasificación: estafilocócica (principalmente por *S.*

aureus), disfunción de las glándulas sebáceas y la DGM¹⁴⁸. Por otra parte, otros autores utilizan una clasificación según la ubicación anatómica, siendo anterior si la inflamación afecta principalmente a la base de las pestañas (estafilocócica y sebácea), posterior si afecta el margen del párpado posterior (sección de párpado que entra en contacto con la córnea y la conjuntiva bulbar), y la blefaritis marginal que incluye tanto la parte anterior como la posterior del párpado¹⁴⁷. La DGM afecta principalmente a las glándulas sebáceas ubicadas en el párpado posterior y por tanto se incluye como un subconjunto de la blefaritis posterior.

En Estados Unidos se estima que entre el 37 y 47% de los pacientes atendidos en las consultas de Oftalmología presentan signos de blefaritis^{36,44}.

La blefaritis frecuentemente altera la superficie ocular provocando conjuntivitis, eritema conjuntival, una deficiente función lagrimal y queratitis. También puede exacerbar los síntomas de enfermedades coexistentes de la superficie ocular incluidas las alérgicas, las conjuntivitis y deficiencia de la capa acuosa de la lágrima^{36,44}.

La naturaleza crónica de la blefaritis, su etiología incierta y la frecuente coexistencia con otras enfermedades de la superficie ocular constituyen un desafío en el manejo de los pacientes afectados⁴⁴. Sin un tratamiento definitivo su manejo incluye la aplicación de compresas tibias, higiene de párpados, antibióticos tópicos y orales junto con agentes antiinflamatorios⁴⁴. Aunque estas estrategias terapéuticas pueden abordar los síntomas y los factores contribuyentes a la blefaritis no siempre actúan sobre la causa principal.

La presencia del ácaro *Demodex sp.* en los tejidos del párpado fue informada por primera vez en 1876 y su asociación con la blefaritis se estableció en 1967; sin embargo, no ha sido hasta estos últimos 5 años cuando el número de artículos publicados sobre la blefaritis por *Demodex sp.* ha aumentado drásticamente¹⁴⁸.

Desde hace tiempo se acepta que la prevalencia de *Demodex sp.* aumenta con la edad y afecta a más del 80% de las personas mayores de 60 años y el 100% de los mayores de 70 años¹⁴⁹.

Entre los más jóvenes, en poblaciones universitarias, la prevalencia de *Demodex sp.* ha sido considerada como consistentemente baja, entre 2% y 27%¹⁵⁰⁻¹⁵².

Los investigadores que han estudiado poblaciones de pacientes con signos y síntomas de blefaritis encuentran altas tasas de infestación, con una prevalencia que oscila entre el 29% y el 90%¹⁵³. Los últimos estudios indican que los ácaros del género *Demodex* se encuentran presentes en más del 60% de los pacientes con blefaritis^{149,154-157}.

Recientemente se han encontrado tasas similares de blefaritis por *Demodex sp.* en pacientes de todas las edades¹⁵⁹. Además, más del 60% de pacientes con diagnóstico de blefaritis presentan collaretes en la base de las pestañas, que son el signo patognomónico de infestación por *Demodex sp.*¹⁵⁸. Del mismo modo, más del 60% de pacientes con blefaritis presentan *Demodex sp.* basándose en el diagnóstico por la depilación de pestañas^{159,194}.

La blefaritis por *Demodex sp.* tiene la misma prevalencia en ambos sexos^{154,158}. La tasa de infestación también es similar, independientemente del origen étnico, con un 72% de pacientes blancos, un 65% de pacientes negros y un 69% de pacientes hispanos¹⁶⁰.

La blefaritis previa, la rosácea, la diabetes y la edad avanzada son factores de riesgo para la blefaritis por *Demodex sp.*¹²¹. Otros factores que pueden predisponer a padecer demodicosis incluyen la inmunosupresión local o sistémica, el estrés, el consumo excesivo de alcohol, y una mayor exposición al sol y al tabaco^{112,121,160}.

Los collaretes son excreciones exudativas solidificadas que forman un cilindro a modo de collar alrededor de la base del folículo de las pestañas y son considerados un signo patognomónico de blefaritis por *Demodex sp.*¹⁵⁸. No sólo la presencia de collaretes es indicativa de *Demodex sp.*⁴⁵, pero encontrar un alto número de éstos se ha asociado con una infestación más grave^{115,160-162}.

Estos collareres pueden ser fácilmente identificados en la lámpara de hendidura indicando a los pacientes que miren hacia abajo o cierren los párpados, de modo que haya una visión clara de la base del margen de las pestañas superiores^{115,121,158,163}. Se ha demostrado que todos los ojos con collaretes son positivos para *Demodex sp.* identificados por microscopía¹¹⁵ o bien por prueba genética mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el ADN del ácaro¹⁵⁶.

Una muestra de pestañas depiladas vista bajo un microscopio puede permitir una mayor confirmación de la presencia de *Demodex sp.* Sin embargo, no existe un método universalmente aceptado para tomar muestras de las pestañas y cuantificar la densidad de los ácaros del género *Demodex*, y realizar comparaciones precisas resulta difícil¹⁶⁴

Se han encontrado resultados casi idénticos en las tasas de demodicosis, independientemente de si los investigadores definieron demodicosis por la presencia de collaretes¹⁵⁸ o por la depilación de pestañas con el recuento de ácaros¹⁵⁹.

Fuera de los ensayos clínicos, la depilación de pestañas y la microscopía puede ser poco práctica, y la presencia de collaretes en la lámpara de hendidura puede ser el

único diagnóstico indicador de *Demodex sp.* Además, Zhang et al.¹⁵³ recientemente concluyeron que la identificación positiva de collaretes, con la manipulación de pestañas en la lámpara de hendidura (sin depilación), puede ser el método más adecuado para el diagnóstico de *Demodex sp.* en entornos clínicos y que los collaretes por sí solos deberían alertar al médico de la alta probabilidad de demodicosis ocular.

Las anomalías de las pestañas son otro signo clínico importante de blefaritis por *Demodex sp.* La triquiasis, o dirección anómala de las pestañas es común.^{112,165} La madarosis o pérdida de pestañas se produce en casos más avanzados^{112,166} y es predictivo de blefaritis por *Demodex sp.* Sedzikowska et al.¹⁶⁷ encontraron una odds ratio de 4,30 de que los pacientes que presentaban pérdida de pestañas tendrían *Demodex sp.*

Dado que el objetivo de las pestañas es proteger la superficie ocular, el daño folicular inducido por el ácaro dando lugar a una mala dirección o pérdida de las mismas puede hacer que los pacientes con blefaritis sean más sintomáticos e impactar más negativamente sobre la salud de la superficie ocular.¹⁵⁸ También son frecuentes el eritema y las telangiectasias del borde del párpado observadas en la blefaritis por *Demodex sp.*^{106,168,169} y pueden contribuir a la percepción por los pacientes de una apariencia cosmética negativa.^{169,207,208}

La carga de síntomas y los efectos psicosociales en pacientes con blefaritis por infestación confirmada por ácaros del género *Demodex* presenta un verdadero problema de salud^{169,207,208}. Aproximadamente un tercio de los pacientes acuden a múltiples visitas médicas para resolver sus síntomas, y más de la mitad refieren sufrir síntomas frecuentemente o de forma permanente¹⁶⁹. Alrededor de la mitad de los pacientes

experimentan síntomas durante al menos cuatro años, y más de la mitad de los pacientes que experimentan síntomas no son correctamente diagnosticados¹⁶⁹.

Los pacientes que padecen blefaritis crónica refieren cierto impacto negativo en sus vidas diarias, como molestias en la conducción nocturna, cansancio en la rutina de higiene diaria, e intolerancia en el porte de lentes de contacto; y además, en mujeres la dificultad en el uso de maquillaje o pestañas artificiales^{169,207,208}. Por otra parte, los pacientes con blefaritis presentan mayor riesgo de ansiedad y depresión^{170,207,208}.

La blefaritis por ácaros del género *Demodex* es común en la población en edad de someterse a cirugía de cataratas, donde casi la mitad presentan infestación y se asocia a ojo seco^{171,158,192}.

Una superficie ocular sana es fundamental para el cálculo exitoso de la potencia de la lente intraocular (LIO) a implantar, unos buenos resultados visuales y la satisfacción después de una cirugía de catarata o una cirugía refractiva, por lo que es importante evaluar a los pacientes en el preoperatorio para descartar enfermedades de la superficie ocular y párpados, incluyendo la blefaritis por *Demodex sp.*

La blefaritis por *Demodex sp.* puede ser una enfermedad crónica lo que requiere una gestión adecuada a largo plazo²⁰⁷. Si no se trata puede provocar complicaciones corneales, algunas graves, como neovascularización, ulceración e incluso perforación.¹⁷²

Es probable que la blefaritis por *Demodex sp.* suponga una importante carga de salud pública adicional infradiagnosticada²⁰⁷. Se necesitan estudios para evaluar con precisión su impacto socioeconómico²⁰⁷.

Los ácaros del género *Demodex* pueden detectarse mediante un examen de raspado de la piel, una biopsia estándar de la superficie de la piel, una extracción con

cinta adhesiva y por métodos de exprimición¹⁷³. Sin embargo, la demodicosis ocular se puede determinar habitualmente mediante la extracción de pestañas.

La detección de los ácaros del género *Demodex* y la diferenciación entre *Demodex folliculorum* y *Demodex brevis* se pueden realizar mediante exámenes microscópicos basados en sus características morfológicas. La infestación por *Demodex folliculorum* ocurre con mayor frecuencia que *Demodex brevis*.¹⁷³

Sin embargo, el examen microscópico para la detección y la identificación del *Demodex sp.* presenta ciertas dificultades, especialmente en los estados inmaduros del ácaro. Además, este método convencional para contar *Demodex sp.* implica la depilación aleatoria de cuatro pestañas no adyacentes por párpado y posteriormente la adición de una gota de aceite (se prefiere aceite de maní) antes de montar las pestañas con un cubreobjetos. Sin embargo, esto puede conducir a resultados erróneos por varias razones:

En primer lugar, como la posibilidad de detectar *Demodex sp.* es mucho mayor al muestrear pestañas con caspa cilíndrica (collaretes) en comparación con aquellas sin caspa cilíndrica, la depilación aleatoria de pestañas puede resultar en un recuento más bajo si las pestañas sin caspa cilíndrica son las seleccionadas.

En segundo lugar, la adición de aceite antes de montar el cubreobjetos puede dar lugar en una menor incidencia por permitir que los ácaros no adherentes se vayan flotando, especialmente en pestañas sin caspa cilíndrica.

En tercer lugar, incluso si se depilan intencionalmente pestañas con caspa cilíndrica, se pueden utilizar diferentes cantidades de fragmentos de caspa cilíndrica.

En cuarto lugar, los *Demodex sp.* integrados en un collarate con fragmentos compactos de caspa no se podrían contar con precisión sin añadir alcohol.

Por último, aunque solo sean pestañas con caspa cilíndrica clínicamente evidente, algunos fragmentos de caspa cilíndrica que albergan *Demodex sp.* todavía se adhieren a la piel del párpado.

Estos errores potenciales explican por qué el uso del método convencional podría dar lugar a un recuento erróneo de *Demodex sp.* Varios informes describen el uso de técnicas moleculares para su detección como la PCR, que se dirige a varios genes para la detección e identificación de *Demodex sp.*^{99,174-176}. En estos estudios la PCR tuvo mayor sensibilidad en la detección del ácaro que el método convencional, y es un método cómodo y rápido. Además, la PCR proporciona resultados estándar, a diferencia de la observación microscópica que proporciona resultados mucho más subjetivos. El análisis de PCR se puede aplicar a una variedad de muestras, incluidas aquellas que no requieren métodos invasivos, como el empleo de hisopos y cera para la piel.

El propósito del presente estudio es comparar la sensibilidad de la PCR y el examen microscópico para diagnosticar una infestación por *Demodex sp.* en frotis cutáneo. Además, investigamos las posibles correlaciones entre la presencia y densidad de *Demodex sp.* y las características clínicas de los pacientes.

Capítulo II: Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis y Objetivos

2.1.1 Hipótesis

- Existe mayor visualización de *Demodex folliculorum* (DF) en pacientes con blefaritis comparado con pacientes sin patología observable.
- Existe mayor densidad del ácaro (copias de ADN) en pacientes con blefaritis comparado con pacientes sin patología observable.
- Existe mayor cantidad y densidad de DF en la región palpebral donde se localiza más habitualmente y por tanto en las blefaritis anteriores y mixtas.
- La infestación por DF y la gravedad de la blefaritis están relacionados por una mayor densidad de DF.
- Existe menor cantidad y densidad de DF en pacientes con demodicosis tras realizar el tratamiento.

2.2.2 Objetivos

General:

- Evaluar la presencia y cuantificar la densidad del ácaro DF del área interpalpebral, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en comparación con el método estándar, con el objeto de ver si dicha presencia puede tenerse en cuenta como indicador de demodicosis.

Específicos:

- Identificar el ácaro DF mediante microscopía óptica.
- Identificar el ácaro DF mediante PCR.
- Establecer la presencia y densidad de infestación por DF en blefaritis.
- Establecer la presencia y densidad de infestación por DF en blefaritis por subgrupos según localización topográfica en el párpado y el nivel de gravedad de la enfermedad.
- Establecer la presencia y densidad de infestación por DF en pacientes sin patología observable.
- Establecer la presencia y densidad de infestación por DF en blefaritis según la edad.
- Establecer la presencia y densidad de infestación por DF en blefaritis según el sexo.
- Determinar si hay diferencias estadísticamente significativas entre los tres tipos de blefaritis y el conteo de DF.

- Determinar si hay diferencias estadísticamente significativas entre los tres tipos de blefaritis y la densidad de infestación del DF.
- Determinar si hay diferencias estadísticamente significativas entre la gravedad de la enfermedad y el conteo de DF.
- Determinar si hay diferencias estadísticamente significativas entre la gravedad de la enfermedad y la densidad de infestación del DF.
- Determinar si hay diferencias estadísticamente significativas entre la presencia de DF en blefaritis comparado con la presencia del ácaro en pacientes sin patología observable.
- Determinar si hay diferencias estadísticamente significativas entre la densidad de DF en blefaritis comparado con la densidad del ácaro en pacientes sin patología observable.
- Determinar si hay diferencias estadísticamente significativas entre la presencia de DF en pacientes con demodicosis antes del tratamiento comparado con después del tratamiento.
- Determinar si hay diferencias estadísticamente significativas entre la densidad de DF en pacientes con demodicosis antes del tratamiento comparado con después del tratamiento.

Capítulo III: Material y Método

3.1 Diseño metodológico

3.1.1 Tipo de estudio

Se trata de un estudio de investigación prospectivo unicéntrico, siendo intervencional en los pacientes con demodicosis confirmada.

3.1.2 Población

El total de ojos analizados de pacientes que acudieron a la consulta de la Unidad de Córnea del Servicio de Oftalmología en el Hospital Juan Ramón Jiménez de Huelva (España), siendo diagnosticados de blefaritis (anterior, posterior o mixta) mediante un examen ocular completo de rutina, que incluye la valoración del área periocular y palpebral, tomados como los casos; y de pacientes con similares características de edad, sexo y región demográfica sin patología observable tomados como controles.

Se evaluaron los síntomas, el grado de blefaritis y disfunción de glándulas de Meibomio (DGM) como normal, leve, moderada y severa siguiendo una escala con un sistema de puntuación que se conoce como “Uludag Ocular Demodicosis Clinical Scoring (UODS)”¹⁷⁷.

El reclutamiento de pacientes se realizó desde febrero de 2018 hasta marzo de 2020 (2 años).

Casos

La población de casos estuvo formada por ojos de pacientes analizados en los 2 años del estudio, con diagnóstico de blefaritis, remitidos a la Unidad de Córnea del Servicio de Oftalmología.

Los criterios de inclusión fueron:

- Blefaritis en sus subtipos anterior, posterior o mixta.
- Edad de 16 años o superior.
- Pacientes que hayan firmado el consentimiento informado previamente donde se autoriza el estudio.

Los criterios de exclusión fueron:

- Cirugía ocular previa en los últimos 6 meses.
- Tratamiento con medicación ocular tópica y/o sistémica en el último mes.

Controles

La población de controles estuvo formada por ojos de pacientes analizados en los 2 años del estudio, remitidos a la Unidad de Córnea del Servicio de Oftalmología, pero sin patología observable (sin síntomas ni signos evidentes de blefaritis).

Los criterios de inclusión fueron:

- Pacientes asintomáticos y con exploración de la superficie ocular y palpebral sin hallazgos patológicos.
- Edad de 16 años o superior.
- Pacientes que hayan firmado el consentimiento informado previamente donde se autoriza el estudio.

Los criterios de exclusión fueron:

- Presencia de blefaritis.
- Lesiones palpebrales con relación conocida con el DF.

3.2 Aspectos éticos

Los pacientes que participaron en el estudio lo hicieron de forma libre, voluntaria e informada, teniendo en cuenta que cumplían con los requisitos para someterse a una prueba de detección diagnóstica inocua que formaba parte de la práctica clínica habitual y no existiendo otro procedimiento alternativo.

El presente estudio se ha regido en cada una de las fases de la actividad investigadora de los principios científicos aceptados y apoyados por el conocimiento de la bibliografía científica y de la práctica clínica; y de los principios éticos establecidos en la Declaración de Helsinki: Recomendaciones para guiar a los médicos en la investigación biomédica en seres humanos. Adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, 1964; Revisada por la 29ª Asamblea Médica Mundial, Tokio Japón 1975; Enmendada por la 59ª Asamblea General, Seúl, Corea, octubre 2008.

El tratamiento de los datos de carácter personal de los sujetos participantes de la investigación científica se ajustó a lo establecido en la Ley Orgánica 5/1992, de 29 de octubre, de Regulación del tratamiento automatizado de los datos de carácter personal.

Igualmente, se tuvo en cuenta también la Ley 41/2002 básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica y la Ley 14/2007 de investigación biomédica.

Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado por escrito (anexo 1).

3.3 Obtención de la muestra a estudio

Se analizaron todos los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión del estudio, tanto para el grupo de casos como para el grupo control, sometidos a la toma de muestras en cada ojo en el periodo de tiempo de 2 años establecido en el Hospital Juan Ramón Jiménez de Huelva (España).

Para el tamaño muestral se ha partido de diversos estudios, que analizaban la incidencia y densidad de *Demodex* en sujetos normales y afectados de blefaritis^{107,119,156}. A partir de estos datos, y con un índice de confianza del 95%, un error máximo de estimación del 10% y una tasa de reposición del 5% por posibles pérdidas, se estimó que un tamaño de muestra en las condiciones más desfavorables -donde se requeriría mayor cantidad de unidades muestrales- estimando una incidencia del 40%-42% (grupo sano). En los grupos con blefaritis anterior, posterior y mixta, la incidencia media se sitúa en el 78.7% (con un rango desde el 60% hasta el 91.7%), estimándose una muestra por cada uno de los grupos con los mismos criterios estadísticos del grupo sano.

Se obtuvo un tamaño muestral de 194 ojos, siendo 148 para el grupo de casos y 46 para el grupo de controles. De los 148 ojos del grupo de casos se distribuyeron 52 en el grupo de blefaritis anterior, 52 en el de blefaritis mixta y 44 en el de blefaritis posterior.

3.4 Variables

3.4.1 Independientes

- o Ojos con muestras positivas para DF: demostración de la existencia del ADN del ácaro en la muestra estudiada mediante PCR.
- o Ojos con muestras negativas para DF: demostración de la no existencia del ADN del ácaro en la muestra estudiada mediante PCR.
- o Densidad de la infestación: cantidad de copias de ADN del ácaro en la muestra estudiada mediante PCR en tiempo real.
- o Visualización de la infestación: número de ácaros en la muestra estudiada mediante microscopía óptica.
- o Edad: años cumplidos.
- o Sexo: El biológico: H: Hombre, M: Mujer.

3.4.2 Dependientes

- o Tipo de blefaritis para los casos: anterior, posterior o mixta.
- o Gravedad de la blefaritis para los casos: leve, moderada o severa.
- o Tipo de tratamiento para la demodicosis en casos y controles: primero, segundo o tercer escalón terapéutico.

3.5 Instrumentos

Los datos clínicos se recogieron por parte del Servicio de Oftalmología a través del programa Diraya de especialidades dentro de la historia clínica de cada paciente.

Para la detección del DF se llevó a cabo la amplificación, detección y cuantificación del ADN mediante PCR a tiempo real con el CFX-96 de Bio-rad.

Para el análisis estadístico de los datos se usó el programa IBM SPSS Statistics (versión 24.0).

3.5.1 Detección de *Demodex folliculorum* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR es una técnica de diagnóstico molecular que consiste en amplificar exponencialmente fragmentos de ADN con el fin de detectar más fácilmente la diana. Es un método potencialmente capaz de detectar cualquier fragmento genómico de cualquier ser vivo. La técnica, aprovechando las propiedades de las moléculas de ADN, consiste en una serie de ciclos de calentamientos y enfriamientos de una matriz con los elementos indispensables (buffer, nucleótidos, enzima polimerasa, cebadores y catalizador), para la elongación y multiplicación del fragmento deseado. La amplificación se lleva a cabo en un tubo de reacción cerrado inserto en un dispositivo llamado termociclador, que permite las subidas y bajadas de temperaturas programadas en series de 35 a 45 ciclos de amplificación. En cada ciclo las moléculas sintetizadas se multiplican por dos, permitiendo un crecimiento exponencial dependiente del número de ciclos totales y de la concentración inicial.

Los termocicladores actuales, adicionalmente, incorporan una serie de detectores de luz de diferentes longitudes de onda, permitiendo hacer una lectura en tiempo real si incorporamos una molécula emisora de luz llamada fluoróforo a la mezcla de reactivos. Esta técnica es la que se conoce como PCR en tiempo real, capaz de detectar la amplificación a la misma vez que se produce la reacción, apareciendo la lectura en un monitor a modo de curva logarítmica. Además, si se añade una curva patrón, es posible cuantificar el número de moléculas iniciales, pasando a ser una PCR en tiempo real

cuantitativa. Esta variante de PCR es la que se ha utilizado en la detección de *Demodex folliculorum* en el presente estudio.

Concretamente, se utilizó una PCR cuantitativa en tiempo real con sondas Taqman. Las sondas Taqman consisten en pequeños fragmentos de oligonucleótidos diseñados para que puedan hibridar con una zona interna de la molécula diana, y que a su vez llevan unidos en un extremo una molécula fluorófora y en el otro extremo un extintor (quencher). De forma que cuando la sonda está intacta no emite luz por la proximidad del quencher, pero una vez hibridado a la diana es degradada por la polimerasa liberando el fluoróforo y emitiendo luz, pudiéndose detectar y transcribir en forma de curva sigmoidea en el monitor.

El desarrollo de esta técnica para detectar *Demodex folliculorum* formó parte de la elaboración de la Tesis Doctoral¹⁴⁴ con el objetivo de poder estudiar la posible relación de la aparición de carcinoma basocelular palpebral con la presencia y densidad del ácaro.

Para la puesta a punto de la técnica, se utilizaron 3 controles positivos del parásito, obtenidos e identificados mediante visualización directa en microscopio óptico a partir de muestras de pestañas procedentes de pacientes con blefaritis crónica. Cada control positivo constó de tres ejemplares completos y adultos. También se utilizaron tres controles negativos de biopsias procedentes de tejidos profundos. Los controles positivos y negativos fueron almacenados a -20°C hasta su procesamiento. Se utilizó un sistema manual de extracción de ácidos nucleicos en columnas de sílica (ISOLATE Genomic DNA Spin Column- Bioline), apto también para para la extracción a partir de tejidos sólidos. Para el desarrollo de la técnica, se utilizaron cebadores diseñados y dirigidos a detectar la secuencia diana específica 18S ARNr (KF745889.1).

El sistema de detección utilizado fue mediante una sonda TaqMan con un fluoróforo FAM unido al extremo 5' y un extintor de señal (Quencher) al extremo 3'. El diseño de cebadores y sonda se realizó con la aplicación informática Primer Express 3.0 (Applied Biosystem). La especificidad del amplicón fue validado mediante BLAST frente a la base de datos de nucleótidos NCBI. La validez de los oligos (cebadores y sonda) fueron confirmados mediante el software on line Oligo Calculator versión 3.26. Como control de extracción y amplificación se utilizaron cebadores y sonda TaqMan para la detección del gen humano de la ARNasa P.

Las secuencias de oligonucleótidos y sonda para la detección de *Demodex folliculorum* fueron:

sense: CGAGGATCTATTGGAGGGCAAGT;

antisense: GAACTGAGATACTAACTACGAGCT;

sonda: [6FAM]AGCCGCGGTAATTCCA[BQH1a].

Las secuencias de oligonucleótidos para la detección del gen de la ARNasa P fueron:

sense: AGATTTGGACCTGCGAGCG;

antisense: GAGCGGCTGTCTCCACAAGT;

sonda: [6FAM]TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG [BQH1a].

La plataforma utilizada para el desarrollo de la PCR fue el termociclador a tiempo real 7500 Fast (Applied Biosystems), con el siguiente programa de temperaturas: 10 minutos a 95°C y 40 ciclos de 95°C 15 segundos, 55°C 25 segundos y 72°C 30 segundos. El DNA de los tres controles positivos se extrajo mediante el sistema

en columna anteriormente mencionado, obteniéndose 100 µl de eluido. El volumen total de cada reacción fue de 25 µl, compuesto de 12,5 µl de Master Mix 2X (Promega), 1 µl de mezcla de cebadores a concentración 10 mM, 1 µl de solución ROX, 0,5 µl de sonda TaqMam específica (Sigma-Aldrich), 5 µl de agua libre de ARNasa y 5µl de eluido de extracción.

El amplicón obtenido por los controles mediante la PCR, fue secuenciado por el secuenciador automático 3500 Series Genetic Analyzers (Applied Biosystems) y comparado con la base de datos del GenBank del NCBI para confirmar la especificidad de la reacción.

El amplicón de los controles positivos fue cuantificado mediante espectroscopía (Qubit 3.0 fluorometer, life technologies), realizando una curva patrón con 5 puntos de concentraciones: 10 copias/µl, 100 copias/µl, 1.000 copias/µl, 10.000 copias/µl y 100.000 copias/µl.

La sensibilidad se estableció con el número mínimo de copias capaz de detectar la PCR, mediante diluciones seriadas de concentraciones conocidas analizadas por triplicado. Las concentraciones que se utilizaron para determinar la sensibilidad fueron 1, 5, 10, 100 y 1000 copias/µl.

Finalmente, la técnica se testó con una serie piloto de 46 muestras de biopsias cutáneas parafinadas aportadas por anatomía patológica procedentes de pacientes con lesiones de carcinoma basocelular de áreas perioculares de presentación clínica nodular.

Las muestras consistieron en 15 cortes de 15 µm de grosor de una superficie de 1 cm² equivalente a 22,5 mg de tejido aproximadamente, que se desparafinaron mediante disolución con xilol durante 30 minutos y centrifugación 1 minuto a 11.000 g. El producto desparafinado se incubó a 56°C durante 24 horas en tubo cerrado con 200µl

de solución de lisis para optimizar el rendimiento en la extracción de biopsias de tejidos sólidos.

La densidad parasitaria se expresó en número de amplicones por cada 1,125 mg de muestra sólida ($22,5 \text{ mg}/20 = 1,125 \text{ mg}$, debido a que en cada reacción se utilizó 5 μl de eluido de los 100 μl obtenidos). Los resultados cuantitativos se obtuvieron mediante la variable CT (cycle threshold= ciclo umbral) en comparación a la curva patrón, calculados por el software de la plataforma 7500 Fast. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado en la misma reacción, una para la determinación de *Demodex sp.* y otra para detección de la ARNasa P como control de extracción y amplificación en la reacción. Las muestras presuntamente positivas fueron secuenciadas y cotejadas con la base de datos del NCBI. Los tres controles positivos identificados mediante microscopía óptica, fueron también amplificados e identificados mediante la PCR desarrollada. La secuenciación de los amplicones mostró una homología del 100% con el alineamiento de la secuencia KF745889.1 de la base de datos del GenBank correspondiente a *Demodex folliculorum*. Los tres controles negativos, lo fueron también mediante PCR.

La curva patrón utilizada para la cuantificación mostró valores de CT (cycle threshold= ciclo umbral) de 17,13; 21,51; 25,05; 27,58 y 30,61 para las concentraciones de 100.000, 10.000, 1.000, 100 y 10 copias/ μl respectivamente. Las concentraciones de 10, 100 y 1000 copias/ μl para determinar la sensibilidad fueron detectadas en los tres análisis por triplicado. Las concentraciones de 1 y 5 copias/ μl se detectaron por la PCR en uno de los análisis realizados por triplicado, no detectándose en dos de las tres reproducciones. Por tanto, el límite de detección se situó entre 1 y 10 copias/ μl .

3.6 Recogida y análisis de datos

El especialista en Oftalmología realizó una recogida de las variables de manera prospectiva y consecutiva durante las revisiones de los pacientes, que se almacenaron en una base de datos de Microsoft Office Excel 2016 donde previamente había sido asignado un código numérico a cada ojo por analizar sus muestras. En los pacientes con demodicosis confirmada recibieron un tratamiento específico y se recogieron los datos sociodemográficos y clínicos antes y después del mismo.

Posteriormente, el especialista en Microbiología se encargó de realizar la PCR en el laboratorio del Hospital Juan Ramón Jiménez.

Tras un proceso de depuración de la base de datos para detectar posibles anomalías o errores en la transcripción de datos, se realizó el análisis estadístico de los resultados mediante el programa IBM SPSS Statistics (versión 24.0).

3.7 Procedimientos

3.7.1 Oftalmología

En todos los candidatos se realizó una historia clínica completa e igualmente una valoración ocular rutinaria que incluyó la exploración bajo microscopía óptica de los párpados y área periocular.

Se otorgó a cada ojo del candidato un código numérico para la toma de muestras del ojo derecho o izquierdo. En total se formaron cuatro grupos de pacientes, en condiciones de estabulación normalizadas y se realizó la toma de muestras en los dos ojos de cada paciente. Los grupos se dividieron como: sin patología observable,

blefaritis anterior, posterior y mixta. Y dentro de las blefaritis, a su vez en leve, moderada o severa.

La toma de muestras se realizó de la siguiente manera:

Muestra de pestañas

Todas las tomas de muestras se realizaron por la misma persona bajo exploración con lámpara de hendidura. Se extrajeron en total 8 pestañas mediante pinza fina estéril para cada ojo; 4 pestañas en el ojo derecho y 4 en el izquierdo. En cada ojo, 2 pestañas fueron extraídas del párpado superior y 2 del inferior. La extracción se realizó con la misma técnica estandarizada ante la sospecha de *Demodex* en aquellas pestañas que se consideran altamente sospechosas (con collarate cilíndrico).

Muestra de frotis cutáneo

Se realizó frotis de piel entorno a la línea de pestañas de ambos párpados mientras el paciente mantenía los ojos cerrados. El sistema de recogida y transporte utilizado para las muestras fue el ESwab, que consiste en un paquete estéril que contiene dos componentes: un tubo con tapón de rosca de polipropileno con una etiqueta, de forma cónica y con el fondo relleno con un 1 mL de medio de transporte de Liquid Amies y una torunda de recogida de muestras que tiene una punta floqueada con fibra de nailon suave.

3.7.1.1 Pacientes con demodicosis

Los pacientes con blefaritis y demodicosis confirmada recibieron un tratamiento específico frente al DF. Igualmente, los controles que presentaron una visualización positiva de la infestación bajo microscopía óptica también recibieron tratamiento.

El tratamiento dirigido a la erradicación del parásito constaba de **tres escalones terapéuticos**:

- o 1º Escalón: el más básico para casos leves mediante una higiene palpebral diaria entregando informe explicativo de cómo realizarla empleando toallitas comerciales para el tratamiento de la blefaritis.
- o 2º Escalón: para casos moderados donde se suma a lo anterior la aplicación de pomada antibiótica de eritromicina oftálmica y aceite de árbol de té diluido al 50% en un ciclo corto de tiempo.
- o 3º Escalón: para casos severos, que con lleva mayor tiempo y frecuencia de tratamiento con aceite de árbol de té al 50% (ciclo largo de tiempo) y la adición de ivermectina oral o bien metronidazol oral para los casos refractarios, además de las medidas de los niveles anteriores.

En estos pacientes se realizó una segunda visita al mes del tratamiento y se obtuvieron nuevas muestras para Microbiología. Además de cuantificarse la densidad de DF se midió el grado de mejoría clínica entre la primera y segunda visita mediante la anamnesis y la exploración oftalmológica.

3.7.2 Microbiología

Muestra de pestañas

Las pestañas se observan con microscopio óptico con el objetivo de 10X, que junto con el aumento 10X de los oculares, aporta un aumento total de 100X. Las pestañas se visualizan una a una en búsqueda del parásito DF haciéndose un contaje medio por pestaña.

Muestra de frotis cutáneo

La detección molecular de DF mediante PCR se realiza en muestras de frotis de la zona afectada arrastrando escamas, detritus y posibles restos del parásito a estudiar. Una vez obtenida la muestra, se realizará en primer lugar la extracción de los ácidos nucleicos. Posteriormente se procederá a la amplificación, detección y cuantificación mediante PCR a tiempo real con el CFX-96 de Bio-rad. La detección se realizó mediante sondas Taqman con fluoróforos distintos para la diana y control interno. Los primers y sondas utilizadas son los descritos por Tenorio-Abreu et al. en 2016¹⁴³.

3.8 Limitaciones del estudio

La prueba diagnóstica es de alto coste, por lo que no se pudo estudiar un gran número de ojos, sino una muestra representativa. Además, el tamaño muestral también se vio afectado durante la pandemia COVID-19 debido al estado de alarma que provocó una asistencia especializada más selectiva y al empleo prácticamente exclusivo de la PCR en la detección del virus.

3.9 Análisis estadístico

Los datos recopilados fueron ingresados en una hoja de cálculo de Microsoft Excel 2016 y posteriormente exportados al software estadístico IBM SPSS Statistics versión 24.0 para su análisis.

Dada la falta de normalidad de los datos se emplearon pruebas estadísticas no paramétricas para todas las comparaciones.

En la primera parte del estudio, para evaluar las diferencias en la densidad de infestación del DF y la visualización por conteo bajo microscopio entre los grupos de casos y controles, así como para comparar variables demográficas (edad y sexo), se utilizó la prueba de la U de Mann-Whitney.

En el grupo con patología, la prueba de Kruskal-Wallis se empleó para comparar múltiples grupos en relación con el tipo y la gravedad de la blefaritis. Las comparaciones por pares entre los tipos y gravedad de blefaritis se realizaron utilizando la prueba de la U de Mann-Whitney.

En la fase intervencional, para evaluar la eficacia de los tratamientos empleados y los cambios en la densidad de *DF* a lo largo del tiempo, se realizó un análisis longitudinal. Se utilizó la prueba de Wilcoxon con muestras pareadas para realizar comparaciones antes y después del tratamiento en cada paciente. Asimismo, se empleó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar la eficacia global de los diferentes escalones terapéuticos. Posteriormente, se realizaron comparaciones por pares entre los escalones terapéuticos utilizando la prueba de la U de Mann-Whitney con el fin de identificar diferencias específicas entre cada uno de ellos. Se consideraron estadísticamente significativos los resultados basados en un nivel de significancia de 0.05.

Capítulo IV: Resultados

4.1 Matriz de datos

Se muestra en el anexo 2, donde se reúne la información de cada paciente y las muestras de cada ojo entre los casos y los controles.

4.2 Características demográficas y clínicas de los casos y controles

El grupo de casos con diagnóstico de blefaritis estuvo compuesto por 148 ojos (de 74 sujetos) frente a 46 ojos (de 23 sujetos) del grupo control, sin patología observable. Por tanto, los datos del estudio que se recogen y analizan hacen referencia a cada ojo como unidad de estudio.

Las mujeres predominan en ambos grupos, aunque con una diferencia menos marcada en el grupo con patología. En este último, las mujeres representan el 58.11% (86 ojos) y los hombres el 41.89% (62 ojos); mientras que el grupo control, las mujeres han sido el 69.57% (32 ojos) frente al 30.43% (14 ojos) de hombres.

En los casos con blefaritis, la edad media es de 56.66 años, con una distribución ligeramente sesgada hacia edades menores (coeficiente de asimetría -0.52) y desviación típica 19.08 años (rango de 16 a 84 años). Para los pacientes del grupo sin patología la edad media es de 53.70 años, con una distribución relativamente simétrica (coeficiente de asimetría 0.28), dispersión ligeramente inferior (desviación típica 14.96 años y rango de 27 a 84 años). La curtosis es negativa en ambos casos (-0.86 y -0.69, respectivamente) lo que sugiere menor concentración de valores alrededor de la media.

Respecto al nivel de gravedad de blefaritis en el grupo con patología, un 29.73% presenta blefaritis posterior y el resto con igual proporción (35.14%) de blefaritis anterior o mixta (tabla 1). Según la gravedad, los casos moderados son los más comunes en blefaritis posterior y anterior frente a los severos que presentan un mayor porcentaje de casos en blefaritis mixta.

BLEFARITIS	N	%
POSTERIOR	44	29.73%
LEVE	15	10.14%
MODERADA	16	10.81%
SEVERA	13	8.78%
ANTERIOR	52	35.14%
LEVE	13	8.78%
MODERADA	23	15.54%
SEVERA	16	10.81%
MIXTA	52	35.14%
LEVE	6	4.05%
MODERADA	15	10.14%
SEVERA	31	20.95%
	148	100%

Tabla 1. Distribución del tipo y gravedad de blefaritis en el grupo de casos.

Se analizaron como variables secundarias la prevalencia de enfermedades concomitantes que estuviesen relacionadas con un incremento del riesgo de padecer demodicosis: dermatitis, rosácea, síndrome de Sjögren y diabetes. En el grupo de casos se obtuvo que más del 90% de los casos no padecían estas enfermedades y en el grupo de controles solo se detectó diabetes con un 13.04% de prevalencia respecto a un 9.46% de los casos (tablas 2 y 3).

	DERMATITIS		ROSÁCEA		SJÖGREN		DIABETES	
	N	%	N	%	N	%	N	%
NO	134	90.54%	138	93.24%	138	93.24%	134	90.54%
SI	14	9.46%	10	6.76%	10	6.76%	14	9.46%
Total	148	100%	148	100%	148	100%	148	100%

Tabla 2. Prevalencia de enfermedades concomitantes en casos.

	DERMATITIS		ROSÁCEA		SJÖGREN		DIABETES	
	N	%	N	%	N	%	N	%
NO	46	100%	46	100%	46	100%	40	86.96%
SI							6	13.04%
Total	46	100%	46	100%	46	100%	46	100%

Tabla 3. Presencia de enfermedades concomitantes en controles.

Igualmente, se analizaron como variables secundarias la prevalencia de síntomas relacionados con alteración de la superficie ocular y que estuviesen relacionados con la infestación por DF: lagrimeo, fotofobia, picor, quemazón, irritación y enrojecimiento tanto palpebral como ocular. En el grupo de casos se obtuvo que el 72.97%% de los casos padecían estos síntomas y en el grupo de controles no se detectaron (anexo 2).

4.3 Presencia, densidad y conteo de DF en casos de blefaritis y en los controles

4.3.1 Presencia de DF

Se define la presencia de DF como la visualización positiva de la infestación bajo microscopía óptica, ya que se considera la técnica gold standard de detección.

En el grupo de casos con blefaritis la prevalencia de DF fue del 40.54%, mientras que entre los controles el ácaro se encontró en el 10.87%, diferencia que resulta significativa ($p<0.01$ en ambos).

4.3.2 Densidad de infestación por DF y conteo por visualización directa

La densidad expresada como el número de copias de ADN del ácaro en la muestra estudiada mediante PCR en tiempo real varió en los diferentes subgrupos estudiados.

Los resultados del análisis mediante la prueba de la U de Mann-Whitney evidencian diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con patología y el grupo sin patología observable en cuanto al número de copias de ADN y la carga de *Demodex*. En relación con el número de copias de ADN, el grupo con patología presentó una media significativamente mayor (11958.22; SD=27792.24) en comparación con el grupo sin patología observable (5461.68; SD=14964.22), con un estadístico de prueba de 4220.50 y un valor de $p<0.001$. Asimismo, la carga de *Demodex* fue notablemente más alta en el grupo con patología (media=1.10; SD=2.05)

frente al grupo sin patología (media=0.15; SD=0.51), con un estadístico de prueba de 4385.00 y valor de $p<0.001$.

Estos resultados sugieren que ambos parámetros, tanto el número de copias de ADN como la carga de *Demodex*, están relacionados con la presencia de patología, lo que refuerza su posible papel como marcadores biológicos en el contexto de enfermedades inflamatorias o infecciosas. Cabe destacar que, aunque inicialmente el grupo con patología estaba compuesto por 148 casos, se registró una pérdida de sujetos en las mediciones de estos parámetros, quedando finalmente 138 casos analizados para el número de copias de ADN y 144 casos para la carga de *Demodex* (tabla 4).

	GRUPO CON PATOLOGÍA			GRUPO SIN PATOLOGÍA OBSERVABLE			Prueba U de Mann-Whitney	
	N	Mean	SD	N	Mean	SD	Estadístico de prueba	p-valor
Nº COPIAS ADN	138	11958.22	27792.24	46	5461.68	14964.22	4220.50	<.001
Nº DEMODEX	144	1.10	2.05	46	0.15	0.51	4385.00	<.001

Tabla 4. Comparativa por copias y carga de *Demodex* en ambos grupos

(Prueba de la U de Mann-Whitney).

4.4 Densidad de infestación por DF y conteo por visualización directa en los casos de blefaritis según tipo y nivel de gravedad

La tabla 5 presenta las diferencias en el número de copias de ADN y la carga de *Demodex* según el tipo de blefaritis comparando los tres subgrupos (posterior, anterior y mixta).

BLEFARITIS	N	%	Media Nº Copias ADN	Media Nº de Demodex
POSTERIOR	44	29.73%	4371.60	0.50
LEVE	15	10.14%	2670.13	0.27
MODERADA	16	10.81%	5241.09	0.44
SEVERA	13	8.78%	5264.71	0.85
ANTERIOR	52	35.14%	7704.75	0.98
LEVE	13	8.78%	2246.25	0.38
MODERADA	23	15.54%	6218.46	1.22
SEVERA	16	10.81%	15372.97	1.14
MIXTA	52	35.14%	23653.37	1.74
LEVE	6	4.05%	827.46	1.50
MODERADA	15	10.14%	24575.83	2.08
SEVERA	31	20.95%	28026.08	1.65
Total	148	100%	11958.22	1.10

Tabla 5. Densidad y conteo de DF según tipo de blefaritis y nivel de gravedad.

La prueba de Kruskal-Wallis muestra diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.029$) en el número de copias de ADN entre los tipos de blefaritis. La blefaritis mixta presenta los valores más elevados (media=23653.37; SD=43960.07), seguido de la blefaritis anterior (media=7704.75; SD=11877.13) y la blefaritis posterior (media=4371.60; SD=5296.11). (tabla 6)

En cuanto al número de *Demodex*, la prueba de Kruskal-Wallis también muestra diferencias significativas entre los grupos ($p=0.006$). La blefaritis mixta presenta la mayor carga de *Demodex* (media=1.74; SD=2.56), seguida de la anterior (media=0.98; SD=1.85) y la posterior (media=0.50; SD=1.23). (tabla 6)

Tipos de Blefaritis	Nº copias ADN				Nº <i>Demodex</i>			
	N	Mean	SD	Prueba de Kruskal-Wallis	N	Mean	SD	Prueba de Kruskal-Wallis
POSTERIOR	44	4371.60	5296.11	7.109 p-value=.029	44	0.50	1.23	10.222 p-value=.006
ANTERIOR	48	7704.75	11877.13		50	0.98	1.85	
MIXTA	46	23653.37	43960.07		50	1.74	2.56	
Total	138	11958.22	27792.24		144	1.10	2.05	

Tabla 6. Comparativa por tipo de blefaritis en el grupo de casos

(Prueba de Kruskal-Wallis).

Las comparaciones dos a dos confirman que las diferencias significativas se dan entre la blefaritis posterior y la mixta, tanto en el número de copias de ADN ($p=0.008$) como en la carga de *Demodex* ($p=0.001$). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre la blefaritis posterior y anterior, ni entre la anterior y la mixta.

(tabla 7).

Los resultados refuerzan la asociación entre blefaritis mixta y el ácaro, tanto por un mayor impacto en el número de copias de ADN como una mayor carga de *Demodex*, reflejando una mayor complejidad o severidad en este subtipo.

	Nº copias ADN		Nº <i>Demodex</i>	
	Estadístico de prueba	p-valor	Estadístico de prueba	p-valor
POSTERIOR-ANTERIOR	12.464	0.135	11.898	0.122
POSTERIOR-MIXTA	22.449	0.008	24.528	0.001
ANTERIOR-MIXTA	-9.985	0.226	-12.630	0.089

Tabla 7. Comparaciones dos a dos de los tipos de blefaritis en el grupo de casos
(Prueba de la U de Mann-Whitney).

En el caso del número de copias de ADN, la prueba de Kruskal-Wallis indica diferencias estadísticamente significativas según la gravedad de la blefaritis ($p < 0.001$), con valores crecientes desde los casos leves hasta los severos (tabla 8). Esto refuerza la relación entre la severidad de la blefaritis y una mayor alteración biológica.

Para la carga de *Demodex*, aunque los valores también aumentan con la gravedad, las diferencias no alcanzan significación estadística, posiblemente debido a una mayor variabilidad dentro de los grupos. (tabla 8)

Tipos de Gravedad	Nº copias ADN				Nº <i>Demodex</i>			
	N	Mean	SD	Prueba de Kruskal-Wallis	N	Mean	SD	Prueba de Kruskal-Wallis
LEVE	33	2180.96	2794.33	20.202** p-value<.001	34	0.53	1.06	5.159 p-value=.076
MODERADA	50	9944.32	23937.77		52	1.19	2.59	
SEVERA	55	19655.38	35946.41		58	1.34	1.86	
Total	138	11958.22	27792.24		144	1.10	2.05	

Tabla 8. Comparativa por gravedad en el grupo de casos
(Prueba de Kruskal-Wallis).

Al contrastar dos a dos observamos que existen diferencias significativas a un nivel de confianza del 95% en todos los casos (tabla 9).

Las comparaciones por pares, utilizando la prueba de la U de Mann-Whitney, muestran diferencias estadísticamente significativas en el número de copias de ADN entre los tres niveles de gravedad (tabla 9). Estos resultados refuerzan la asociación entre el número de copias de ADN y la gravedad de la blefaritis, donde los casos más severos presentan alteraciones biológicas más pronunciadas.

Nº copias ADN		
	Estadístico de prueba	p-valor
LEVE-MODERADA	-20.189*	0.024
LEVE-SEVERA	-39.203**	<.001
MODERADA-SEVERA	-19.014*	0.015

Tabla 9. Comparaciones dos a dos por nivel de gravedad en el grupo de casos
(Prueba de la U de Mann-Whitney).

La tabla 10 contrasta hombres y mujeres en el grupo de casos, detectando la existencia de diferencia estadísticamente significativa en el número de copias de ADN (valor de $p=0.013$). Esto sugiere que el sexo influye de manera significativa en la cantidad de copias de ADN, con los hombres mostrando un valor medio de 6402.42 copias (SD 16690.98) y las mujeres un valor medio mucho mayor, de 15529.80 copias (SD 32515.62). Por otro lado, en cuanto al número de *Demodex*, no se encuentran diferencias significativas entre hombres y mujeres (valor de $p=0.743$), indicando que el sexo no afecta de manera relevante la cantidad de estos parásitos en los pacientes del grupo de casos.

Sexo	Nº Copias ADN				Nº <i>Demodex</i>			
	N	Mean	SD	Prueba U de Mann-Whitney	N	Mean	SD	Prueba U de Mann-Whitney
HOMBRE	54	6402.42	16690.98	2838.00	60	1	2.11	2592.00
MUJER	84	15529.80	32515.62	p-value=.013	84	1.17	2.00	p-value=.743
TOTAL	138	11958.22	27792.24		144	1.10	2.05	

Tabla 10. Comparativa por sexo en el grupo de casos

(Prueba de la U de Mann-Whitney).

Al analizar las diferencias entre grupos de edad (hasta 59 años vs. más de 59 años), se encuentran diferencias significativas tanto en el número de copias de ADN como en el número de *Demodex* (valores de $p < 0.05$ en ambos casos) (tabla 11). En cuanto a las copias de ADN, el grupo de hasta 59 años presenta un valor medio de 8817.40 copias (SD 24030.77), mientras que el grupo mayor de 59 años tiene un valor medio de 15009.30 copias (SD 30706.32), con una diferencia significativa (valor de $p = 0.004$).

En cuanto al número de *Demodex*, los pacientes menores de 59 años tienen una media de 0.61 parásitos (SD 1.26), mientras que los mayores de 59 años presentan una media de 1.58 (SD 2.51), con una diferencia también significativa (valor de $p = 0.002$). Esto indica que tanto el número de copias de ADN como el número de *Demodex* aumentan con la edad en este grupo de pacientes.

Edad*	Nº copias ADN			Prueba U de Mann-Whitney	Nº Demodex			Prueba U de Mann-Whitney
	N	Mean	SD		N	Mean	SD	
Hasta 59 años	68	8817,40	24030,77	3051.50 p-valor=.004	72	0,61	1,26	3266.50 p-valor=.002
Más de 59 años	70	15009,30	30706,32		72	1,58	2,51	
TOTAL	138	11958.22	27792.24		144	1.10	2.05	

*Agrupada según valor mediano

Tabla 11. Comparativa por edad en el grupo de casos

(Prueba de la U de Mann-Whitney).

4.5 Densidad de infestación por DF y conteo por visualización directa antes y después del tratamiento en pacientes con demodicosis

El grupo de controles, sin patología observable, tuvo una prevalencia de 5 muestras oculares (10.87%) con DF, recibiendo los pacientes el primer escalón terapéutico. También recibieron el primer escalón aquellos que presentaron síntomas relacionados con alteración de la superficie ocular a pesar de no tener presencia de DF ni blefaritis, siendo 13 muestras (28.26%) en total las que se analizaron antes y después del tratamiento.

El grupo de casos con blefaritis, por su parte tuvo una prevalencia de 60 muestras oculares (40.54%) con DF, recibiendo tratamiento de primer, segundo o tercer escalón según el nivel de gravedad de la blefaritis. Igualmente, recibieron tratamiento aquellos pacientes que presentaron síntomas relacionados con alteración de la superficie ocular a pesar de no tener presencia de DF, pero sí de blefaritis. Se analizaron un total de 118 muestras oculares (79.73%) antes y después del tratamiento.

TRATAMIENTO SEGÚN TIPO Y GRAVEDAD	1º ESCALÓN		2º ESCALÓN		3º ESCALÓN		SIN TRATAMIENTO		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
POSTERIOR	4	30.77%	22	41.51%	6	11.54%	12	40.00%	44	29.73%
LEVE	2	15.38%	3	5.66%			10	33.33%	15	10.14%
MODERADA	2	15.38%	14	26.42%					16	10.81%
SEVERA		0.00%	5	9.43%	6	11.54%	2	6.67%	13	8.78%
ANTERIOR	7	53.85%	17	32.08%	14	26.92%	14	46.67%	52	35.14%
LEVE	5	38.46%	1	1.89%			7	23.33%	13	8.78%
MODERADA	2	15.38%	16	30.19%	1	1.92%	4	13.33%	23	15.54%
SEVERA					13	25.00%	3	10.00%	16	10.81%
MIXTA	2	15.38%	14	26.42%	32	61.54%	4	13.33%	52	35.14%
LEVE	2	15.38%	3	5.66%	1	1.92%			6	4.05%
MODERADA			7	13.21%	4	7.69%	4	13.33%	15	10.14%
SEVERA			4	7.55%	27	51.92%			31	20.95%
Total	13		53		52		30		148	100%

Tabla 12. Distribución de los escalones terapéuticos según tipo de blefaritis y su nivel de gravedad.

TIPO TRATAMIENTO	N	%	Media	
			Nº copias ADN Antes de tto	Media Nº <i>Demodex</i> Antes de tto
1º ESCALÓN	13	8.78%	3654.56	0.46
2º ESCALÓN	53	35.81%	5690.12	1.09
3º ESCALÓN	52	35.14%	24738.57	1.81
SIN TRATAMIENTO	30	20.27%	1562.64	0
Total	148	100%	11958.22	1.10

Tabla 13. Densidad y conteo de DF antes de recibir el tratamiento.

La tabla 14 compara la cantidad de copias de ADN y número de *Demodex* en pacientes con patología en función del tratamiento. La prueba de Kruskal-Wallis para comparar los diferentes tipos de tratamiento (escalones) en relación al número de copias de ADN indica diferencias significativas entre los grupos de tratamiento en cuanto al número de copias de ADN ($p < 0.001$).

En cuanto al número de *Demodex* entre los grupos de tratamiento no hay diferencias significativas a un nivel de confianza del 95% ($p = 0.100$); sin embargo, los

resultados no son concluyentes de forma rotunda a un nivel de confianza del 90%, ya que estarían en el borde del umbral que define la significación.

Tipos de tratamiento	Nº copias ADN				Nº Demodex			
	N	Mean	SD	Prueba de Kruskal-Wallis	N	Mean	SD	Prueba de Kruskal-Wallis
1º ESCALÓN	13	3654,56	3828,65	22.840 p-valor<.001	13	0,46	0,63	4.600 p-valor=.100
2º ESCALÓN	49	5690,12	8817,19		53	1,09	1,88	
3º ESCALÓN	52	24738,57	41273,79		52	1,81	2,59	
Total	114	11958.22	27792.24		118	1,34	2,19	

Tabla 14. Comparativa por tipo de tratamiento en el grupo de casos

(Prueba de Kruskal-Wallis).

Para explorar las diferencias más específicas entre los escalones, se realizó la prueba de la U de Mann-Whitney. Esta prueba detectó la existencia de diferencias significativas entre el primer y tercer escalón, y entre el segundo y tercero, pero no entre el primer y segundo escalón. Esto indica que los tratamientos del tercer escalón son muy distintos en cuanto a la cantidad de copias de ADN comparado con los tratamientos de los otros dos escalones.

Nº copias ADN		
	Estadístico de prueba	p-value
1º ESCALÓN-2º ESCALÓN	-0.425	0.967
1º ESCALÓN-3º ESCALÓN	-30.038	0.003
2º ESCALÓN-3º ESCALÓN	-29.613	<.001

Tabla 15. Comparaciones dos a dos por nivel de gravedad en el grupo de casos

(Prueba de la U de Mann-Whitney).

La tabla 16 realiza una comparativa entre la primera y segunda visita en los pacientes que presentan patología. En términos generales, se observa que existen

diferencias significativas en el número de copias de ADN entre la primera y segunda visita, con un valor de $p < 0.001$ para la prueba de Wilcoxon. Esto sugiere que el tratamiento o la evolución de la patología tiene un efecto notable sobre la cantidad de copias de ADN entre las dos visitas. Sin embargo, la prueba no encuentra diferencias significativas en el número de *Demodex* entre las visitas, ya que el valor de p es 0.453, lo que indica que el número de estos parásitos no cambia de manera significativa entre las dos visitas.

Visita	Nº copias ADN				Nº <i>Demodex</i>			
	N	Mean	SD	Prueba de Wilcoxon	N	Mean	SD	Prueba de Wilcoxon
1ª VISITA	58	18436,17	32518,70	-3.302	56	1,36	2,00	-.750
2ª VISITA	58	11504,53	34757,38	p-valor<.001	56	1,16	1,82	p-valor=.453

Tabla 16. Comparativa entre la primera y segunda visita en el grupo de casos
(Prueba de Wilcoxon).

La prueba de Wilcoxon para analizar por tipo de blefaritis (tabla 17), encuentra diferencias significativas en el número de copias de ADN solo en los pacientes con blefaritis posterior, con un valor de $p = 0.011$, lo que indica una diferencia importante entre las dos visitas en este subgrupo.

En cambio, en los pacientes con blefaritis anterior y mixta, no se observan diferencias significativas en el número de copias de ADN (valores de p de 0.088 y 0.131, respectivamente). En cuanto al número de *Demodex*, no se encuentran diferencias significativas para ninguno de los tipos de blefaritis, con valores de p superiores a 0.05 en todos los casos.

Prueba de Wilcoxon			
TIPO BLEFARITIS		Nº Copias ADN_1 - Nº Copias ADN_2	Nº Demodex_1 - Nº Demodex_2
ANTERIOR	Z	-1,706b	-0,599b
	Sig. asin. (bilateral)	0,088	0,549
MIXTA	Z	-1,511b	-0,179b
	Sig. asin. (bilateral)	0,131	0,858
POSTERIOR	Z	-2,534b	-0,756b
	Sig. asin. (bilateral)	0,011	0,450

Tabla 17. Comparativa por tipo de blefaritis en el grupo de casos entre la primera y segunda visita (Prueba de Wilcoxon).

En función de la gravedad de la patología (Tabla 18), existen diferencias significativas en el número de copias de ADN en los pacientes con gravedad moderada y severa (valores de p de 0.006 y 0.044, respectivamente), lo que sugiere que la evolución de la patología en estos grupos puede estar asociada a un cambio significativo en el número de copias de ADN. En cambio, en los pacientes con gravedad leve, no se observan diferencias significativas en el número de copias de ADN (valor de $p=1$). Las diferencias, tampoco son significativas, en el número de *Demodex* (valores de p superiores a de 0.05) en función de la gravedad.

Prueba de Wilcoxon			
GRAVEDAD		Nº Copias ADN_1 - Nº Copias ADN_2	Nº Demodex_1 - Nº Demodex_2
LEVE	Z	0,000b	-1,000c
	Sig. asin. (bilateral)	1,000	0,317
MODERADA	Z	-2,722c	-0,256c
	Sig. asin. (bilateral)	0,006	0,798
SEVERA	Z	-2,014c	-0,649c
	Sig. asin. (bilateral)	0,044	0,517

Tabla 18. Comparativa por nivel de gravedad de blefaritis en el grupo de casos entre la primera y segunda visita (Prueba de Wilcoxon).

En los pacientes con el segundo y tercer escalón terapéutico, Wilcoxon (tabla 19) detecta diferencias significativas para el número de copias de ADN entre la primera y segunda visita, con valores de p de 0.036 y 0.033, respectivamente, lo que indica que el tratamiento tiene un efecto notable en la cantidad de copias de ADN en estos grupos. Sin embargo, no se encuentran diferencias significativas en el número de *Demodex* en ninguno de los escalones, con valores de p de 1 y 0.359 en los tratamientos segundo y tercero, respectivamente. El primer escalón no se puede contrastar por falta de datos suficientes.

Prueba de Wilcoxon			
TIPO TRATAMIENTO		Nº Copias ADN _2 - Nº Copias ADN _1	Nº <i>Demodex</i> _2 - Nº <i>Demodex</i> _1
2º ESCALÓN	Z	-2,094b	0,000c
	Sig. asin. (bilateral)	0,036	1,000
3º ESCALÓN	Z	-2,129b	-0,917b
	Sig. asin. (bilateral)	0,033	0,359

Tabla 19. Comparativa por tipo de tratamiento en el grupo de casos entre la primera y segunda visita (Prueba de Wilcoxon).

4.5.1 Variables secundarias después del tratamiento en los casos

Se analizaron como variables secundarias la prevalencia de cumplimiento del tratamiento y de la asistencia a las consultas en la segunda visita, ya que pueden influir en la evolución de la enfermedad (tabla 20).

	CUMPLIDOR		ACUDE	
	N	%	N	%
NO	18	12.16%	40	27.03%
SI	96	64.86%	108	72.97%
SIN DATOS*	34	22.97%		
Total	148	100%	148	100%

*Corresponden a los pacientes que no acudieron a la segunda visita y por tanto no disponemos de información del cumplimiento del tratamiento.

Tabla 20. Prevalencia de condicionantes en la evolución de la enfermedad
en el grupo de casos

Igualmente se recogieron la prevalencia de mejoría sintomática (subjética) y de mejoría clínica (objetiva) tras el tratamiento en la segunda visita, siendo del 96.49% y del 98.24% respectivamente.

4.5.2 Diagramas de cajas (Box plots)

El análisis del box-plot de las diferencias entre la primera y segunda visita, en términos de número de copias de ADN y número de *Demodex*, ofrece una visión sobre la variabilidad de los cambios observados en estos parámetros y la existencia de valores atípicos.

La caja representa el intervalo en el que se encuentran la mayoría de los cambios (entre el cuartil 25 y el cuartil 75). Este rango permite visualizar cómo varían los resultados entre visitas para la mayoría de los pacientes.

Las líneas o “bigotes” indican los valores que están dentro de un rango aceptable, basado en los datos generales. Los valores fuera de este rango son considerados atípicos.

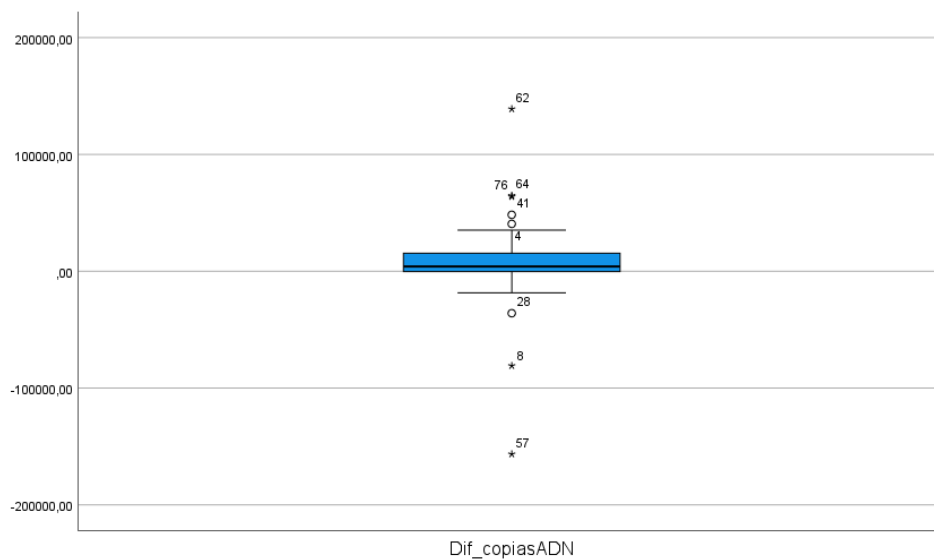
Los valores marcados con "o" o bien "*" corresponden a pacientes cuyos resultados se desvían significativamente del resto, valores atípicos (outliers). Esto podría deberse a casos clínicamente particulares, errores en la medición o respuesta diferencial al tratamiento.

4.5.2.1 Box-plot de diferencias en número de copias de ADN

La mayoría de los pacientes experimentaron una reducción en el número de copias de ADN entre visitas, pero algunos mostraron valores negativos (aumentos), lo cual es atípico y merece atención para investigar las causas.

Destacan los casos identificados como 57, 8 y 28, cuyos valores negativos sugieren un aumento inesperado de copias en la segunda visita. Estos valores atípicos inferiores a cero en el box-plot podrían indicar fallos en la adherencia al tratamiento, resistencia al mismo o condiciones individuales que alteran la respuesta esperada

(Box plot 1).

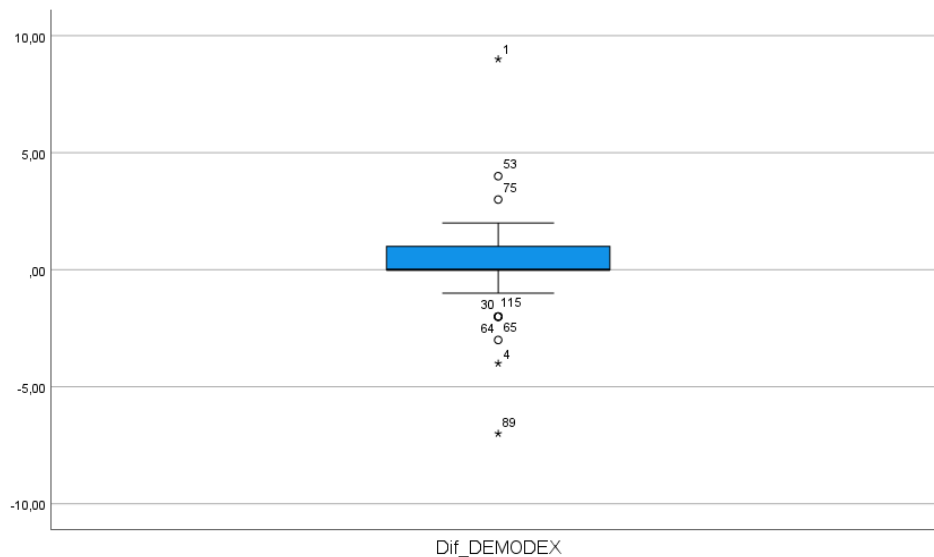


Box plot 1: Diferencia de copias de ADN entre la visita 1 y 2.

4.5.2.2 Box-plot de diferencias en número de *Demodex*

Aunque no se observaron diferencias significativas a nivel global, hay pacientes con incrementos inesperados en la segunda visita.

Los valores atípicos identificados 89, 4, 64, 65, 30 y 115, indicando una posible mayor infestación en la segunda visita. La identificación de estos casos puede ayudar a perfeccionar estrategias terapéuticas o a estudiar subgrupos con características particulares (Box plot 2).



Box plot 2: Diferencia de número de *Demodex* entre la visita 1 y 2.

Capítulo V: Discusión

El presente estudio ensaya una técnica molecular para la detección y cuantificación de *Demodex folliculorum* con el objetivo de usarla y estandarizarla como herramienta al diagnóstico de laboratorio de la blefaritis asociada a dicho parásito. Para ello se utiliza el frotis de la línea palpebral con un hisopo que posteriormente se suspende en medio líquido y con el que se hará la extracción y amplificación de los ácidos nucleicos. Estas muestras presentan la ventaja de su fácil obtención y de no ser cruentas para los pacientes.

Esta PCR fue desarrollada previamente por el equipo investigador de nuestro centro para la detección y cuantificación del parásito en biopsias cutáneas debido a la posible asociación entre *D. folliculorum* y el desarrollo de carcinoma basocelular. Esta técnica mostró unos excelentes resultados de sensibilidad, especificidad y reproducibilidad en el estudio¹⁸⁹.

La blefaritis crónica es una afección ocular que puede estar relacionada con la infestación por *D. folliculorum*, asociándose a exacerbaciones y manifestaciones más graves. Con la PCR cuantitativa que presentamos en este estudio pretendemos hacer un diagnóstico más preciso, además de utilizar una muestra más sencilla y eliminando el sesgo del observador que se produce en la observación de pestañas mediante microscopía óptica.

Por tanto, en el presente estudio, se propone el uso de la PCR cuantitativa de *D. folliculorum* como método diagnóstico y de seguimiento en la evolución del tratamiento de la blefaritis crónica, en la que *Demodex folliculorum* juega un posible papel asociado.

La blefaritis es una inflamación ocular crónica que afecta principalmente al margen del párpado, encontrada en aproximadamente el 47% de los pacientes a los que se realizan exámenes oculares^{36,44,178}. La blefaritis altera frecuentemente la superficie ocular provocando conjuntivitis, deficiencia funcional de la lágrima y queratitis. También puede exacerbar los síntomas de las enfermedades de la superficie ocular coexistentes como la conjuntivitis alérgica y el ojo seco.

La naturaleza crónica de la blefaritis, su etiología incierta y la frecuente coexistencia de otras enfermedades de la superficie ocular dificultan el manejo de los pacientes afectados⁴⁴. El tratamiento incluye la aplicación de compresas tibias, higiene de los párpados, antibioterapia tópica y oral, así como fármacos antiinflamatorios tópicos⁴⁴. Estas estrategias abordan los síntomas y factores que contribuyen a la blefaritis, pero no la causa principal.

Investigaciones recientes sugieren que la blefaritis por este parásito está infradiagnosticada¹⁶³ debido a la superposición de los síntomas con otras enfermedades de la superficie ocular. Existe una falta de consenso en torno al diagnóstico, tratamiento, y signos y síntomas de la blefaritis causada por *Demodex*.

En una reunión de expertos realizada en Estados Unidos¹⁷⁷ se llegó a la conclusión de que la blefaritis por *Demodex* es crónica y recurrente, y, con respecto a aspectos demográficos como la edad, informaron una mayor frecuencia en personas mayores de 59 años. Otros estudios también han demostrado que la prevalencia del parásito aumenta notablemente con la edad, en pacientes con o sin diagnóstico de blefaritis^{92,93}. Con respecto a nuestros resultados, encontramos que el índice de parasitación es significativamente mayor en pacientes mayores de 59 años, coincidiendo

con el resto de autores, y encontramos diferencias significativas tanto en el número de copias de ADN como en el número de *Demodex* observados por microscopía.

En relación al sexo, analizando nuestros resultados obtenidos mediante PCR se observa una diferencia estadísticamente significativa, siendo la densidad mayor en mujeres. Sin embargo, mediante la técnica de visualización directa no se han observado diferencias en la distribución por sexo. En comparación con otros estudios, algunos muestran una prevalencia más alta en mujeres, mientras que otros reportan la misma prevalencia en ambos sexos^{90,94,95,154,158}.

La prevalencia de *D. folliculorum* mediante visualización por microscopía óptica en nuestro estudio fue cuatro veces superior en los pacientes con blefaritis frente a los controles sanos, y la densidad media fue diez veces superior en los casos de blefaritis que en el grupo control. En comparación a otros estudios, Wesolowska et al, en 2014, informaron de prevalencias del 54,7% y 40% en una cohorte de pacientes hospitalizados con cualquier patología y controles de muestras de personal sanitario respectivamente, aunque en la cohorte de pacientes hospitalizados no se detallaron los casos con blefaritis. Por otro lado, Murphy et al. en 2017, mediante un cuestionario y la búsqueda de *D. folliculorum* en 156 personas en Irlanda, determinaron una prevalencia global mediante visualización directa del 68%¹⁸³. Mongi et al. en Argentina, en un estudio entre 2005 y 2015, encontraron un 53% de prevalencia mediante microscopía de infestación en 72 pacientes examinados incluyendo pacientes sintomáticos y asintomáticos¹⁸⁴.

En otro estudio español de 2005, en el que se estudió el índice de parasitación mediante microscopía óptica en pacientes con blefaritis crónica en comparación a un grupo control de pacientes sanos, observaron presencia del ácaro en el 75% de los

pacientes con blefaritis y en el 20% de los pacientes del grupo control, con un índice de parasitación de 0,69 y 0,08 ácaros/pestaña respectivamente¹⁴⁴, coincidiendo en proporción con nuestros datos de cuatro veces más de presencia y diez veces más en índice de parasitación en pacientes con blefaritis frente a los controles sanos.

Algunos autores han relacionado *D. folliculorum* con algunos síndromes como ojo seco, rosácea o diabetes^{105,106,121,123,177,192}. En el presente estudio, que incluye datos de dermatitis, rosácea, síndrome de Sjögren y diabetes, se relacionó la presencia de DF con todos ellos excepto con la diabetes al no encontrarse diferencias significativas con el grupo control sano, a diferencia de una serie de estudios que relacionan y consideran la diabetes un factor de riesgo para el desarrollo de blefaritis por *Demodex*¹²¹. Además, diferentes autores establecen una clara asociación entre la rosácea y la blefaritis por *Demodex folliculorum* y lo consideran un factor de riesgo^{105, 106, 123}, al igual que nuestro estudio en el que se aprecia una mayor prevalencia que en el grupo control.

Se ha identificado un aumento de la prevalencia de *Demodex* en pacientes con trastornos de la piel que incluyen pitiriasis folicular, dermatitis perioral, acné, dermatitis seborreica, y carcinoma basocelular, entre otras^{191,200}. Un estudio encontró que los estudiantes afectados por enfermedades de la piel tienen tasas más altas de infestación de *Demodex* en comparación con personas sanas, y sugirió que la infestación de ácaros se asocia con la aparición de las siguientes cinco dermatitis: rosácea, blefaritis, acné vulgar, alopecia seborreica y pitiriasis⁵². Otros síndromes que se han relacionado con la presencia de *Demodex* son la caspa cilíndrica en las pestañas¹¹⁵, blefaritis asociada a queratoconjuntivitis¹⁸⁶ o la queratitis refractaria^{124,198}. El grupo de expertos DEPTH¹⁷⁷ determinó que el síndrome de ojo seco aparece en más de la mitad de los pacientes con *Demodex* coincidiendo con nuestro estudio en el que la prevalencia de ojo seco en pacientes con blefaritis fue del 77% frente al grupo control que no hubo ningún paciente

con ojo seco, por lo que parece que el ojo seco puede ser un síndrome asociado a blefaritis, o la blefaritis se agrava con el síndrome de ojo seco. En resumen, en cuanto a la clínica, parece que *Demodex* está ampliamente extendido entre la población, y se comporta como un oportunista que agrava los síndromes relacionados con alteraciones de la piel.

El grupo de expertos DEPTH¹⁷⁷ estableció que la blefaritis por *Demodex* puede diagnosticarse en función de las collarettes, los ácaros y/o los síntomas del paciente, y consideraron que los pacientes que no responden a las terapias típicas deben ser evaluados ante la posibilidad de demodicosis. Además, los autores aconsejaron realizar examen de la blefaritis por *Demodex* en cada exploración ocular de manera rutinaria¹⁷⁷. Establecieron que el examen con lámpara de hendidura es el método más común utilizado para diagnosticar la demodicosis y que la visualización de los ácaros no es necesaria para hacer el diagnóstico. Igualmente, consideraron que la depilación no es necesaria, al igual que tampoco el conteo de los ácaros de manera individual¹⁷⁷. Sin embargo, admitieron que el recuento de ácaros individualmente se correlaciona con la densidad/gravedad de los collares y la gravedad de los síntomas¹⁷⁷.

Por otra parte, los expertos del grupo DEPTH¹⁷⁷, establecieron que los ácaros del género *Demodex* son parásitos comunes que se encuentran de manera comensal en la piel periocular y cuando hay sobrecrecimiento pueden aparecer síntomas de blefaritis, y establecieron que la blefaritis por *Demodex* es una afección crónica y recurrente, que, aunque es posible su erradicación, la posibilidad de recidiva es alta.

En nuestro estudio, mediante visualización directa, se observó que en el 40% de los casos con blefaritis se pudo verificar la presencia del parásito, con una media de 1,10 parásitos por paciente, mientras que en el grupo control de sanos la prevalencia fue

del 10% con una media de 0,15 parásitos por paciente, siendo significativamente más baja tanto en prevalencia como en cantidad en el control sano. Nuestros datos coinciden con otros estudios en los que hay mayor prevalencia de *Demodex* en pacientes con blefaritis que en pacientes sanos^{105-107, 119-123}.

En cuanto a los resultados por PCR, observamos que en el 100% de los casos con blefaritis se detecta ADN de *D. folliculorum* con una densidad media en número de copias de 11958, mientras que en el grupo control sano el parásito se detecta en el 97%, siendo la densidad media de 5461 copias. Estos hallazgos demuestran la enorme ubicuidad que presenta este ácaro entre la población humana, prácticamente casi la población total estaría parasitada y/o colonizada o presenta restos genómicos de dicho parásito según los resultados del presente estudio.

Con estos hallazgos, podemos decir que la utilización de la PCR como método diagnóstico puede presentar ventajas en cuanto a sensibilidad y estandarización diagnóstica. Aunque, sin embargo, la simple presencia de *D. folliculorum* no parece implicar necesariamente enfermedad ya que en el grupo control había presencia genómica casi en la totalidad del conjunto, pero la densidad sí parece estar relacionada con la clínica de la blefaritis. Por tanto, en estudios adicionales, sería conveniente establecer puntos de corte con el método molecular a efectos de mejorar la interpretación de los resultados.

En la actualidad, son escasos los estudios de detección y cuantificación de *Demodex* mediante PCR. El primer artículo fue publicado en 2012 por Casas et al.¹⁷⁶, donde empleaban la PCR cuantitativa para el estudio de la rosácea mediante biopsias cutáneas del área facial por microabrasión. El análisis de la piel detectó el *D. folliculorum* con mayor frecuencia en la rosácea que en los controles de la misma edad

(96% frente a un 74%, $p < 0.01$). La densidad de *D. folliculorum* fue 5.7 veces mayor en los pacientes con rosácea que en los voluntarios sanos. Coincidiendo con nuestro estudio en el que se detecta mediante PCR seis veces más densidad en número de copias de ADN en pacientes con blefaritis moderada y severa frente a los controles sanos, no existiendo diferencias entre blefaritis leve y controles sanos.

En otro estudio realizado en Tailandia¹⁵⁶ en 2016, se comparó también la detección de *Demodex* mediante microscopía óptica y PCR. Este estudio se realizó sobre 100 pacientes seleccionados desde la consulta de oftalmología con patología ocular, aunque no describieron de forma detallada el tipo de signos o síntomas en el conjunto total, es decir, no se especificaron los casos de blefaritis. Si lo hicieron en los casos con *Demodex* confirmado, describiendo el porcentaje de ellos que presentaban caspa cilíndrica y disfunción de las glándulas de Meibomio. Se hicieron cinco grupos etarios de 20 paciente cada uno, aunque no se igualaron en sexo (dos tercios fueron mujeres). Las muestras obtenidas de cada paciente fueron 8 pestañas (dos de cada párpado), realizándose examen por microscopía óptica y posteriormente realizando PCR convencional a tiempo final, aunque por ninguno de los métodos se hizo cuantificación. Los resultados de este estudio fueron que en el 41% y en el 78% de los pacientes se detectó *Demodex folliculorum* mediante visualización directa y PCR respectivamente. En comparación con nuestro estudio, el porcentaje detectado por visualización directa coincide casi de forma exacta en ambos estudios. Sin embargo, mediante PCR, aunque en el estudio tailandés se duplica el porcentaje en comparación con la microscopía, se aleja de la sensibilidad reportada en nuestro estudio, en el que se detectó en el 100% de los pacientes. Si bien es verdad, que nosotros utilizamos una PCR “más moderna” y a “tiempo real” basado en la detección de sondas que emiten luz y es captada por un detector altamente sensible, generalmente con mayor sensibilidad que una PCR a

tiempo final. También hay que decir que la muestra para detección de ADN en nuestro caso fue distinta. Realizamos un frotis abarcando toda la línea palpebral de ambos párpados con el que quizás con esta técnica se arrastre mayor cantidad de restos genómicos, aunque para saber realmente qué muestra ofrece un mayor rendimiento diagnóstico se debió comparar con la extracción realizada desde las pestañas en paralelo, algo que en estudios adicionales podremos realizar.

En nuestro estudio, a diferencia del estudio tailandés¹⁵⁶, la PCR cuantitativa nos permitió no solo confirmar la presencia del *Demodex folliculorum*, sino también obtener datos en número de copias de ADN o densidad. En el grupo de casos la densidad media total en número de copias de ADN fue el doble que en los controles sanos. Sin embargo, si comparamos la densidad de los casos de blefaritis moderada y severa, la media de la densidad en copias de ADN fue seis veces superior que el grupo control sano, por tanto, en nuestro estudio existe una relación estadísticamente significativa entre gravedad y densidad de *Demodex*. Esta asociación entre gravedad y densidad de parásito también se observa en los datos obtenidos mediante visualización directa. Sin embargo, en el estudio tailandés¹⁵⁶, no se pudo relacionar la gravedad con la presencia de *Demodex folliculorum*, en el que midieron la gravedad en una escala de 0 a 10 en función del grado de disfunción de las glándulas de Meibomio, que no es una variable idéntica a las nuestras en las que el diagnóstico de blefaritis lo basamos principalmente en la presencia de collaretes entre otros signos de alteración del margen palpebral y de las pestañas. Dichos datos tampoco serían exactamente comparables con los nuestros al no haber cuantificado la presencia de *Demodex*.

Trave et al.¹⁸⁷, recientemente en 2024, publicó otro estudio para la detección de *Demodex* en la rosácea papulopustular mediante examen microscópico y PCR empleando la biopsia cutánea superficial estandarizada, en el cuero cabelludo y en la

cara. En el examen microscópico los pacientes con rosácea presentaron una mayor prevalencia de muestras positivas para *Demodex* que los controles en el cuero cabelludo y en la cara. La PCR también mostró una mayor prevalencia de muestras positivas para *Demodex* en la cara y en el cuero cabelludo en pacientes con rosácea. Pero en este caso tampoco cuantificaron ni por microscopía óptica ni por PCR, tan solo por microscopía consideraron positivas biopsias con más de 5 parásitos, pero no se hizo conteo ni calcularon densidades. Aunque la prevalencia fue estadísticamente superior en los casos respecto a los controles, el tamaño muestral fue muy pequeño, de tan solo 20 casos y 10 controles, por lo que los datos de este estudio no se muestran con solidez suficiente. Por otra parte, una vez más en este caso se utilizó una PCR convencional a tiempo final con las diferencias o desventajas antes mencionadas frente a la PCR cuantitativa en tiempo real que utilizamos nosotros. Las muestras tampoco fueron las mismas que en nuestro estudio, empleando biopsia cutánea versus frotis palpebral para PCR y conteo en pestañas. Por tanto, este estudio viene a reforzar la idea de *Demodex* está asociado a afecciones de la piel que en este caso sería la rosácea y en el nuestro la blefaritis.

En 2016, Sánchez España et al.¹⁸⁹, publicaron el primer estudio sobre cuantificación de *D. folliculorum* en el carcinoma basocelular (CBC) de la región periocular mediante PCR en tiempo real, donde se analizaron biopsias de tumores extirpados quirúrgicamente. Se obtuvieron 375 especímenes de CBC como casos y 51 muestras de lesiones periorcarias benignas como controles. La prevalencia de *D. folliculorum* en los pacientes con CBC fue el doble que en los controles. En nuestro estudio la prevalencia en los casos fue cuatro veces superior que, en los controles, aunque esta diferencia se puede deber a que en el estudio de Sánchez España los controles eran lesiones benignas, pero no era piel sana. Además, el grupo de casos también mostró una mayor densidad de infestación que el grupo control al igual que en

nuestro estudio. También se observó que en los pacientes con biopsias positivas frente a *Demodex* presentaban un riesgo 3 veces mayor de desarrollar CBC que los que fueron negativas. Este trabajo, junto con el artículo de Tenorio-Abreu et al.¹⁴³ en el que desarrollaron la PCR cuantitativa en tiempo real para estandarizar la cuantificación relativa por masa de tejido de la parasitación por *D. folliculorum*, fue parte de la Tesis Doctoral en 2018 titulada “Desarrollo de una PCR para la detección y cuantificación de la parasitación por *Demodex folliculorum* en biopsias de neoplasias cutáneas del área periocular”¹⁴⁴.

Recientemente en 2024 se ha publicado un estudio en china¹⁹⁰ en el que compararon la detección y cuantificación de *Demodex* por microscopía óptica y PCR a tiempo real cuantitativa al igual que nuestro estudio. En el estudio participaron 88 pacientes, 60 casos de blefaritis con alta sospecha de *Demodex* y 28 pacientes sanos como control. Las muestras para estudio fueron tres pestañas de cada párpado para observación directa al microscopio y un frotis con hisopo húmedo sobre la línea palpebral para hacer PCR cuantitativa en tiempo real. En el 80% y 70% de los casos fueron positivos mediante visualización directa y PCR respectivamente, y en el 36% y 25% de los controles fueron positivas mediante microscopía y PCR respectivamente, mostrándose la PCR menos sensible que la microscopía. Justamente lo contrario que en nuestro estudio, en el que la PCR fue mucho más sensible que la microscopía tanto en los casos como en los controles, llegándose a detectar en la totalidad de los casos y la mayoría de los controles. En cuanto a la cantidad de parásitos, en el estudio chino no muestran datos de medias o índice de parasitación, sino de mediana y rangos, así que en los casos muestran una mediana de 2 parásitos por paciente con rango de 0 a 21, y en los controles muestran una mediana de 0 con rango entre 0 y 5 parásitos por pestaña. La mediana de los resultados por PCR en los casos fue de 57 copias con rango entre 0 y

105.146 copias, y la mediana en los controles fue de 0 con un rango entre 0 y 21.060 copias. No podemos comparar con nuestros datos porque no hablan de medias, aunque en el conteo de parásitos con el dato de la mediana se puede intuir un hallazgo similar en ambos estudios, no siendo así por PCR en el que nuestro estudio muestra una mayor mediana.

En la segunda parte de nuestro estudio pretendimos medir la eficacia del tratamiento mediante la cuantificación de la densidad tras el mismo. Los pacientes recibieron tratamiento de primer, segundo o tercer escalón dependiendo del nivel de gravedad que presentaban, siendo a mayor gravedad mayor escalón terapéutico. Así, tras el tratamiento se observó una disminución estadísticamente significativa en la densidad de *Demodex* en los casos de blefaritis moderada y severa medida mediante PCR, por lo que la eficacia del tratamiento quedó demostrada en el estudio. En la blefaritis leve no se observó disminución de la densidad tras el tratamiento. Estos datos indican la importancia del papel del parásito *Demodex* en la gravedad de la blefaritis. Por el contrario, tanto en la blefaritis leve, antes y después del tratamiento, así como en los controles sanos, las densidades mediante PCR fueron similares, por lo que estos hallazgos sugieren que la población en general se encuentra en estados basales de colonización que cuando el parásito prolifera y aumenta la densidad aparecen una mayor frecuencia de complicaciones. Sin embargo, mediante visualización directa no se observaron diferencias significativas tras el tratamiento en ningún grupo de gravedad, por lo que con esta técnica tradicional no hubiéramos demostrado la eficacia del tratamiento en la disminución de la cantidad de parásitos.

Como aporte práctico del presente estudio, se ha logrado cuantificar y establecer la densidad de infestación por tipo y gravedad de blefaritis. La PCR puede aportar

beneficios a la hora de evaluar la eficacia de los tratamientos aplicados en segunda visita, pudiéndose cuantificar la posible reducción de la carga.

La metodología empleada permitió detectar con alta sensibilidad y especificidad la presencia del ácaro en el área palpebral y específicamente en la blefaritis. Nuestros datos y los de estudios previos demuestran que existe una mayor densidad de copias de ADN de *Demodex* en pacientes con blefaritis, apoyando la hipótesis sobre la patogenia del ácaro y su rol en diferentes enfermedades dermatológicas. Sería necesario desarrollar nuevos trabajos prospectivos con mayor nivel de evidencia para comparar los resultados de la PCR cuantitativa y el recuento de ácaros a la microscopía.

Proponemos que la PCR podría emplearse en pacientes con blefaritis, con o sin signos claros de demodicosis del área palpebral, como una alternativa más sensible a la microscopía, con el fin de identificar la presencia de un reservorio de *Demodex* que podría representar una diana de tratamiento. Con suerte, en el futuro, podrían estar disponibles tratamientos efectivos para controlar la infestación de *Demodex* y podrían ser útiles para prevenir las recurrencias de la blefaritis poco tiempo después de la interrupción de un tratamiento estándar.

Además, la PCR podría ser particularmente útil en pacientes que rechazan procedimientos invasivos o dolorosos, ya que ha demostrado ser una técnica muy sensible.

Capítulo VI: Conclusiones

1. La PCR cuantitativa en tiempo real para la detección y cuantificación de *Demodex folliculorum* se ha mostrado mucho más sensible que el método estándar de conteo mediante microscopía óptica.
2. La muestra de frotis palpebral para la detección y cuantificación de *Demodex folliculorum* puede ser una excelente alternativa indolora para el estudio del parásito en cuadros de blefaritis.
3. *Demodex folliculorum* es un parásito ubicuo y comensal cuyo aumento de densidad se asocia a múltiples afecciones cutáneas, entre ellas la blefaritis crónica.
4. La densidad de *Demodex folliculorum* aumenta progresivamente con la edad, siendo significativamente superior en la cohorte de mayores de 59 años que en el resto de la población.
5. La densidad de *Demodex folliculorum* fue significativamente superior en mujeres en los datos obtenidos de PCR, no siendo así mediante visualización directa.
6. Existe relación entre *Demodex folliculorum* y blefaritis anterior y mixta.
7. Existe relación entre *Demodex folliculorum* y gravedad de la blefaritis, existiendo mayor densidad en blefaritis moderada y grave.
8. Los protocolos de tratamiento disminuyeron significativamente la densidad de *Demodex folliculorum* en la blefaritis moderada y grave.

Capítulo VII: Referencias bibliográficas

1. Laiseca Rodríguez, Andrés. Cervera Taulet, Manuel. Laiseca Rodríguez, Dolores. Cirugía palpebral paso a paso. Córdoba: Editorial MAC LINE, S.L.; 2004. 184 p.
2. Nerad, Jeffrey A. Oculoplastic Surgery: The requisites in ophthalmology. Editorial Mosby; 2001. 608 p.
3. Sand JP, Zhu BZ, Desai SC. Surgical Anatomy of the Eyelids. Facial Plast Surg Clin North Am. 2016 May;24(2):89-95
4. Ferry A. The eyelids. En: Sorsby A, ed, Modern ophtalmology, Vol. 4. Philadelphia: Editorial JB Lippincott; 1972, p. 833-53.
5. Pastor Pons I. Terapia manual en el sistema oculomotor. Vol. 1. Zaragoza: Editorial Elsevier Masson; 0212. 256 p.
6. Mantelli F, Mauris J, Argüeso P. The ocular surface epithelial barrier and other mechanisms of mucosal protection: from allergy to infectious diseases. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2013; 13:563–8.
7. Govindarajan B, Gipson IK. Membrane-tethered mucins have multiple functions on the ocular surface. Exp Eye Res. 2010; 90:655–63.
8. Gipson IK, Spurr-Michaud S, Tisdale A. Human conjunctival goblet cells express the membrane associated mucin MUC16: localization to mucin granules. Exp Eye Res. 2015; 145:230–4.
9. Willcox MDP, Argüeso P, Georgiev GA, Holopainen JM, Laurie GW, Millar TJ, Papas EB, Rolland JP, Schmidt TA, Stahl U, Suarez T, Subbaraman LN, Uçakhan OÖ, Jones L. TFOS DEWS II Tear Film Report. Ocul Surf. 2017 jul;15(3):366-403.
10. Peng CC, Cerretani C, Li Y, Bowers S, Shahsavarani S, Lin MC, et al. Flow evaporimeter to assess evaporative resistance of human tear-film lipid layer. Ind Eng Chem Res. 2014; 53:18130–9.
11. Bron AJ, Tiffany JM, Gouveia SM, Yokoi N, Voon LW. Functional aspects of the tear film lipid layer. Exp Eye Res. 2004; 78:347–60.
12. Knop E, Knop N, Millar T, Obata H, Sullivan DA. The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the subcommittee on anatomy, physiology, and pathophysiology of the meibomian gland. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011; 52:1938–78.
13. Craig JP, Tomlinson A. Importance of the lipid layer in human tear film stability and evaporation. Optom Vis Sci. 1997; 74:8–13.
14. Mathers WD. Ocular evaporation in meibomian gland dysfunction and dry eye. Ophthalmology. 1993; 100:347–51.
15. Shimazaki J, Sakata M, Tsubota K. Ocular surface changes and discomfort in patients with meibomian gland dysfunction. Arch Ophthalmol. 1995; 113:1266–70.
16. Mathers WD, Lane JA. Meibomian gland lipids, evaporation, and tear film stability. Adv Exp Med Biol. 1998; 438:349–60.
17. Mathers WD, Stovall D, Lane JA, Zimmerman MB, Johnson S. Menopause and tear function: the influence of prolactin and sex hormones on human tear production. Cornea. 1998; 17:353–8.
18. Rocha EM, Wickham LA, da Silveira LA, Krenzer KL, Yu FS, Toda I, Sullivan BD, Sullivan DA. Identification of androgen receptor protein and 5alpha-

- reductase mRNA in human ocular tissues. *Br J Ophthalmol*. 2000 Jan;84(1):76-84.
19. Taner P, Akarsu C, Atasoy P, Bayram M, Ergin A. The effects of hormone replacement therapy on ocular surface and tear function tests in post-menopausal women. *Ophthalmologica*. 2004; 218:257–9.
 20. Schaumberg DA, Buring JE, Sullivan DA, Dana MR. Hormone replacement therapy and dry eye syndrome. *JAMA*. 2001; 286:2114–9.
 21. Sullivan DA, Rocha EM, Aragona P, Clayton JA, Ding J, Golebiowski B, et al. TFOS DEWS II Sex, Gender, and Hormones report. *Ocul Surf*. 2017; 15:284–333.
 22. Chung CW, Tigges M, Stone RA. Peptidergic innervation of the primate meibomian gland. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37(1):238–245.
 23. The structure of corpuscular nerve endings in the limbal conjunctiva of the human eye. *J Anat*. 1991; 177:75–84.
 24. Belmonte C, Nichols JJ, Cox SM, Brock JA, Begley CG, Bereiter DA, Dartt DA, Galor A, Hamrah P, Ivanusic JJ, Jacobs DS, McNamara NA, Rosenblatt MI, Stapleton F, Wolffsohn JS. TFOS DEWS II pain and sensation report. *Ocul Surf*. 2017 jul;15(3):404-437.
 25. Ruskell GL. Changes in nerve terminals and acini of the lacrimal gland and changes in secretion induced by autonomic denervation, *Z fur Zellforsch Mikrosk Anat Vienna*. Austria 1948) 1969;94(2):261–281.
 26. Hiraoka M, Shimamura M. Neural mechanisms of the corneal blinking reflex in cats. *Brain Res*. 1977;125(2):265–275.
 27. Pellegrini JJ, Horn AK, Evinger C. The trigeminally evoked blink reflex. I. Neuronal circuits. *Exp Brain Res*. 1995;107(2):166–180.
 28. Munger BL, Halata Z. The sensorineural apparatus of the human eyelid. *Am J anatomy*. 1984;170(2):181–204.
 29. Lowther GE, Hill RM. Sensitivity threshold of the lower lid margin in the course of adaptation to contact lenses. *Am J Optom Arch Am Acad Optom*. 1968;45(9):587–594.
 30. Hom MM, Martinson JR, Knapp LL, Paugh JR. Prevalence of Meibomian gland dysfunction. *Optom Vis Sci*. 1990 Sep;67(9):710-2.
 31. Schein OD, Munoz B, Tielsch JM, et al. Prevalence of dry eye among the elderly. *Am J Ophthalmol* 1997; 124:723-8.
 32. Lin PY, Tsai SY, Cheng CY, et al. Prevalence of dry eye among an elderly Chinese population in Taiwan: the Shihpai Eye Study. *Ophthalmology* 2003; 110:1096-101.
 33. Uchino M, Dogru M, Yagi Y, et al. The features of dry eye disease in a Japanese elderly population. *Optom Vis Sci* 2006; 83:797-802.
 34. Jie Y, Xu L, Wu YY, Jonas JB. Prevalence of dry eye among adult Chinese in the Beijing Eye Study. *Eye (Lond)* 2009; 23:688-93.
 35. McCarty CA, Bansal AK, Livingston PM, et al. The epidemiology of dry eye in Melbourne, Australia. *Ophthalmology* 1998; 105:1114-9.
 36. Lemp MA, Nichols KK. Blepharitis in the United States 2009: a survey based perspective on prevalence and treatment. *Ocul Surf* 2009;7: S1-S14.
 37. McCulley JP, Dougherty JM, Deneau DG. Classification of chronic blepharitis. *Ophthalmology* 1982; 89:1173-80.

38. Schaumberg DA, Nichols JJ, Papas EB, et al. The International Workshop on Meibomian Gland Dysfunction: report of the subcommittee on the epidemiology of, and associated risk factors for, MGD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52:1994-2005.
39. Alghamdi YA, Mercado C, McClellan AL, Batawi H, Karp CL, Galor A. Epidemiology of Meibomian Gland Dysfunction in an Elderly Population. *Cornea*. 2016 jun;35(6):731-5.
40. Viso E, Rodríguez-Ares MT, Abelenda D, Oubiña B, Gude F. Prevalence of asymptomatic and symptomatic meibomian gland dysfunction in the general population of Spain. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012 may 4;53(6):2601-6.
41. McCulley JP, Shine WE. Meibomian gland function and the tear lipid layer. *Ocul Surf*. 2003 jul;1(3):97-106.
42. Foulks GN, Bron AJ. Meibomian gland dysfunction: a clinical scheme for description, diagnosis, classification, and grading. *Ocul Surf*. 2003 jul;1(3):107-26.
43. Demirkazık M, Koltas İS. Blepharitis Caused by Demodex. *Turkiye Parazitol Derg*. 2020 Mar 20;44(1):21-24.
44. Amescua G, Akpek EK, Farid M, Garcia-Ferrer FJ, Lin A, Rhee MK, Varu DM, Musch DC, Dunn SP, Mah FS; American Academy of Ophthalmology Preferred Practice Pattern Cornea and External Disease Panel. Blepharitis Preferred Practice Pattern®. *Ophthalmology*. 2019 Jan;126(1): P56-P93.
45. Tavassoli S, Wong N, Chan E. Ocular manifestations of rosacea: A clinical review. *Clin Exp Ophthalmol*. 2021 Mar;49(2):104-117.
46. Vernhardsdottir RR, Magno MS, Hynnekleiv L, Lagali N, Dartt DA, Vehof J, Jackson CJ, Utheim TP. Antibiotic treatment for dry eye disease related to meibomian gland dysfunction and blepharitis - A review. *Ocul Surf*. 2022 oct; 26:211-221.
47. Viswalingam M, Rauz S, Morlet N, Dart JK. Blepharokeratoconjunctivitis in children: diagnosis and treatment. *Br J Ophthalmol* 2005; 89:400-3.
48. Hammersmith KM, Cohen EJ, Blake TD, et al. Blepharokeratoconjunctivitis in children. *Arch Ophthalmol* 2005; 123:1667-70.
49. Mathers WD, Choi D. Cluster analysis of patients with ocular surface disease, blepharitis, and dry eye. *Arch Ophthalmol*. 2004 nov;122(11):1700-4.
50. Akpek EK, Merchant A, Pinar V, Foster CS. Ocular rosacea: patient characteristics and follow-up. *Ophthalmology*. 1997 nov;104(11):1863-7.
51. Fineide F, Arita R, Utheim TP. The role of meibography in ocular surface diagnostics: A review. *Ocul Surf*. 2021 Jan; 19:133-144.
52. Robin M, Liang H, Baudouin C, Labbé A. In vivo Meibomian gland imaging techniques: A review of the literature. *J Fr Ophtalmol*. 2020 Apr;43(4): e123-e131.
53. Wolffsohn JS, Arita R, Chalmers R, Djalilian A, Dogru M, Dumbleton K, Gupta PK, Karpecki P, Lazreg S, Pult H, Sullivan BD, Tomlinson A, Tong L, Villani E, Yoon KC, Jones L, Craig JP. TFOS DEWS II Diagnostic Methodology report. *Ocul Surf*. 2017 jul;15(3):539-574.
54. Bandlitz S, Purslow C, Murphy PJ, Pult H. Comparison of a new portable digital meniscometer and optical coherence tomography in tear meniscus radius measurement. *Acta Ophthalmol*. 2014 Mar;92(2): e112-8.

55. Liu H, Begley C, Chen M, Bradley A, Bonanno J, McNamara NA, Nelson JD, Simpson T. A link between tear instability and hyperosmolarity in dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009 Aug;50(8):3671-9.
56. Kheirkhah A, Blanco G, Casas V, Tseng SC. Fluorescein dye improves microscopic evaluation and counting of demodex in blepharitis with cylindrical dandruff. *Cornea* 2007; 26:697-700.
57. Herwig-Carl MC, Loeffler KU. Differenzialdiagnosen der Benetzungsstörung [Differential diagnoses of dry eye syndrome and blepharitis]. *Ophthalmologe.* 2018 feb;115(2):107-113.
58. Smith RE, Flowers CW Jr. Chronic blepharitis: a review. *CLAO J.* 1995 Jul;21(3):200-7.
59. McCulley JP, Shine WE. Changing concepts in the diagnosis and management of blepharitis. *Cornea.* 2000 Sep;19(5):650-8.
60. Romero JM, Biser SA, Perry HD, Levinson DH, Doshi SJ, Terraciano A, Donnenfeld ED. Conservative treatment of meibomian gland dysfunction. *Eye Contact Lens.* 2004 Jan;30(1):14-9.
61. Sung J, Wang MTM, Lee SH, Cheung IMY, Ismail S, Sherwin T, Craig JP. Randomized double-masked trial of eyelid cleansing treatments for blepharitis. *Ocul Surf.* 2018 Jan;16(1):77-83.
62. Bernades TF, Bonfioli AA. Blepharitis. *Sem Ophthalmol.* 2010;25 (3):79-83.
63. Perry HD, Doshi-Carnevale S, Donnenfeld ED, Solomon R, Biser SA, Bloom AH. Efficacy of commercially available topical cyclosporine A 0.05% in the treatment of meibomian gland dysfunction. *Cornea.* 2006 feb;25(2):171-5.
64. Kiiski V, Remitz A, Reitamo S, Mandelin J, Kari O. Long-term safety of topical pimecrolimus and topical tacrolimus in atopic blepharoconjunctivitis. *JAMA Dermatol.* 2014 May;150(5):571-3.
65. Key JE. A comparative study of eyelid cleaning regimens in chronic blepharitis. *CLAO J* 1996; 22:209-12.
66. Lacroix Z, Léger S, Bitton E. Ex vivo heat retention of different eyelid warming masks. *Cont Lens Anter Eye* 2015;38(3):152–156.
67. Bitton E, Lacroix Z, Léger S. In-vivo heat retention comparison of eyelid warming masks. *Cont Lens Anter Eye* 2016;39(4):311–315.
68. McCann LC, Tomlinson A, Pearce EI, Papa V. Effectiveness of artificial tears in the management of evaporative dry eye. *Cornea* 2012;31(1):1–5.
69. Sindt CW, Foulks GN. Efficacy of an artificial tear emulsion in patients with dry eye associated with meibomian gland dysfunction. *Clin Ophthalmol* 2013; 7:1713–1722.
70. Al-Namaeh M. A systematic review of the effect of omega-3 supplements on meibomian gland dysfunction. *Ther Adv Ophthalmol.* 2020, Vol. 12: 1–9
71. Ta CN, Shine WE, McCulley JP, Pandya A, Trattler W, Norbury JW. Effects of minocycline on the ocular flora of patients with acne rosacea or seborrheic blepharitis. *Cornea* 2003;22(6):545–548.
72. Pfeffer I, Borelli C, Zierhut M, Schaller M. Treatment of ocular rosacea with 40 mg doxycycline in a slow release form. *J Dtsch Dermatol Ges* 2011;9(11):904–907.

73. Lindsley K, Matsumura S, Hatef E, Akpek EK. Interventions for chronic blepharitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;5:CD005556.
74. Voils SA, Evans ME, Lane MT, Schosser RH, Rapp RP. Use of macrolides and tetracyclines for chronic inflammatory diseases. *Ann Pharmacother* 2005;39(1):86–94.
75. Kashkouli MB, Fazel AJ, Kiavash V, Nojomi M, Ghiasian L. Oral azithromycin versus doxycycline in meibomian gland dysfunction: a randomised double-masked open-label clinical trial. *Br J Ophthalmol* 2015;99(2):199–204.
76. Greene JB, Jeng BH, Fintelmann RE, Margolis TP. Oral azithromycin for the treatment of meibomitis. *JAMA Ophthalmol* 2014;132(1):121–122.
77. Igami TZ, Holzchuh R, Osaki TH, Santo RM, Kara-Jose N, Hida RY. Oral azithromycin for treatment of posterior blepharitis. *Cornea* 2011;30(10):1145–1149.
78. Hom MM, Silverman MW. Displacement technique and meibomian gland expression. *J Am Optom Assoc* 1987;58(3):223–226.
79. Korb DR, Greiner JV. Increase in tear film lipid layer thickness following treatment of meibomian gland dysfunction. *Adv Exp Med Biol* 1994; 350:293–298.
80. Korb DR, Henriquez AS. Meibomian gland dysfunction and contact lens intolerance. *J Am Optom Assoc* 1980;51(3):243–251.
81. Goldberg DJ. Current trends in intense pulsed light. *J Clin Aesthet Dermatol* 2012;5(6):45–53.
82. Vegunta S, Patel D, Shen JF. Combination Therapy of Intense Pulsed Light Therapy and Meibomian Gland Expression (IPL/MGX) Can Improve Dry Eye Symptoms and Meibomian Gland Function in Patients With Refractory Dry Eye: A Retrospective Analysis. *Cornea* 2016;35(3):318–322.
83. Gupta PK, Vora GK, Matossian C, Kim M, Stinnett S. Outcomes of intense pulsed light therapy for treatment of evaporative dry eye disease. *Can J Ophthalmol* 2016;51(4):249–253.
84. Margo CE, Mulla ZD. Malignant tumors of the eyelid: a population-based study of non-basal cell and non-squamous cell malignant neoplasms. *Arch Ophthalmol* 1998; 116:195-8.
85. Di Zazzo A, Giannaccare G, Villani E, Barabino S. Uncommon Blepharitis. *J Clin Med*. 2024 Jan 25;13(3):710.
86. Norn MS. CHAPTER I. Historical data and anatomy. *Acta Ophthalmologica*. 1970; 48:8–22.
87. Desch C, Nutting WB. *Demodex folliculorum* (Simon) and *D. brevis* Akbulatova of man: redescription and reevaluation. *J Parasitol*. 1972; 58:169–177.
88. Coston TO. *Demodex folliculorum* blepharitis. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1967; 65:361–392.
89. Rabensteiner DF, Aminfar H, Boldin I, et al. The prevalence of meibomian gland dysfunction, tear film and ocular surface parameters in an Austrian dry eye clinic population. *Acta Ophthalmol*. 2018;96: e707–e711.
90. Zeytun E, Karakurt Y. Prevalence and load of *Demodex folliculorum* and *Demodex brevis* (Acari: Demodicidae) in patients with chronic Blepharitis in the province of Erzincan, Turkey. *J Med Entomol*. 2019; 56:2–9.

91. Rabensteiner DF, Aminfar H, Boldin I, et al. Demodex mite infestation and its associations with tear film and ocular surface parameters in patients with ocular discomfort. *Am J Ophthalmol*. 2019; 204:7–12.
92. Zeytun E, Ölmez H. Demodex (Acari: Demodicidae) infestation in patients with KOAH, and the association with immunosuppression. *Erzincan Univ J Sci Technology*. 2017; 10:220–231.
93. López-Ponce D, Zuazo F, Cartes C, et al. High prevalence of Demodex spp. infestation among patients with posterior blepharitis: correlation with age and cylindrical dandruff. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2017;92: 412–418.
94. Ozdemir MH, Aksoy U, Sönmez E, et al. Prevalence of Demodex in health personnel working in the autopsy room. *Am J Forensic Med Pathol*. 2005; 26:18–23.
95. Durmaz S, Yula E, Aycan Kaya Ö, et al. Sociodemographic characteristics of patients with Demodex brevis and Demodex folliculorum infestation and its association with rosacea and Behçet's disease. *Biomed Res*. 2015; 26:549–555.
96. McCulley JP, Dougherty JM, Deneau DG. Classification of chronic blepharitis. *Ophthalmology*. 1982; 89:1173–1180.
97. Enginyurt O, Karaman U, Cetin F, et al. The prevalence of Demodex species and its relationship with the metabolic syndrome in women of malatya province, Turkey. *Jundishapur J Microbiol*. 2015;8.
98. Palopoli MF, Fergus DJ, Minot S, et al. Global divergence of the human follicle mite Demodex folliculorum: persistent associations between host ancestry and mite lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112: 15958–15963.
99. Zhao YE, Ma JX, Hu L, et al. Discrimination between Demodex folliculorum (Acari: Demodicidae) isolates from China and Spain based on mitochondrial cox1 sequences. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2013; 14:829–836.
100. Rather PA, Hassan I. Human Demodex mite: the versatile mite of dermatological importance. *Indian J Dermatol*. 2014; 59:60–66.
101. Aylesworth R, Vance JC. Demodex folliculorum and Demodex brevis in cutaneous biopsies. *J Am Acad Dermatol*. 1982; 7:583–589.
102. Sedzikowska A, Oseka M, Skopinski P. The impact of age, sex, blepharitis, rosacea and rheumatoid arthritis on Demodex mite infection. *Arch Med Sci*. 2018; 14:353–356.
103. Hom MM, Mastrolta KM, Schachter SE. Demodex: clinical cases and diagnostic protocol. *Optom Vis Sci*. 2013;90: e198–205.
104. Panzer R, Krebs S. Mites, caterpillars and moths. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2020; 18:867–880.
105. Basta-Juzbasić A, Šubić JSk, Ljubojević S. Demodex folliculorum in development of dermatitis rosaceiformis steroidica and rosacea-related diseases. *Clin Dermatol*. 2002; 20:135–140.
106. Liu J, Sheha H, Tseng SC. Pathogenic role of Demodex mites in blepharitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2010; 10:505–510.
107. Wesolowska M, Knysz B, Reich A, Blazejewska D, Czarnecki M, Gladysz A, Pozowski A, Misiuk-Hojlo M. Prevalence of Demodex spp. in eyelash follicles in different populations. *Arch Med Sci*. 2014 May 12;10(2):319-24.

108. Whitfeld M, Gunasingam N, Leow LJ, Shirato K, Preda V. Staphylococcus epidermidis: A possible role in the pustules of rosacea. J Am Acad Dermatol. 2011; 64:49–52.
109. Karıncaoglu Y, Seyhan ME, Bayram N, Aycan O, Taskapan H. Incidence of Demodex folliculorum in patients with end stage chronic renal failure. Ren Fail. 2005; 27:495–9.
110. Hsu CK, Hsu MML, Lee JYY. Demodicosis: A clinicopathological study. J Am Acad Dermatol. 2009; 60:453–62.
111. Mastrotta KM. Demodex may be beneficial to humans. Optom Times. 2018; 10:15.
112. Nicholls SG, Oakley CL, Tan A, Vote BJ. Demodex species in human ocular disease: New clinicopathological aspects. Int Ophthalmol. 2017; 37:303–12.
113. Sastre N, Francino O, Curti JN, Armenta TC, Fraser DL, Kelly RM, et al. Detection, prevalence and phylogenetic relationships of Demodex spp and further skin prostigmata mites (Acari, Arachnida) in wild and domestic mammals. PLOS ONE. 2016; 11:1–20
114. English FP, Nutting WB. Demodicosis of ophthalmic concern. Am J Ophthalmol. 1981;91(3):362–372.
115. Gao YY, Di Pascuale MA, Li W, et al. High prevalence of Demodex in eyelashes with cylindrical dandruff. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005; 46:3089–3094.
116. Liang L, Ding X, Tseng SC. High prevalence of Demodex brevis infestation in chalazia. Am J Ophthalmol. 2014;157(2):342–348.e1.
117. Bevins CL, Liu FT. Rosacea: ¿skin innate immunity gone awry? Nat Med. 2007;13(8):904–906.
118. Liang L, Liu Y, Ding X, Ke H, Chen C, Tseng SCG. Significant correlation between meibomian gland dysfunction and keratitis in young patients with Demodex brevis infestation. Br J Ophthalmol. Epub 2017 Oct 21.
119. Bhandari V, Reddy JK. Blepharitis: always remember demodex. Middle East Afr J Ophthalmol. 2014;21(4):317–320.
120. Yam JC, Tang BS, Chan TM, Cheng AC. Ocular demodicidosis as a risk factor of adult recurrent chalazion. Eur J Ophthalmol. 2014;24(2):159–163.
121. Luo X, Li J, Chen C, Tseng S, Liang L. Ocular demodicosis as a potential cause of ocular surface inflammation. Cornea. 2017;36 Suppl 1: S9–S14.
122. Liang L, Safran S, Gao Y, Sheha H, Raju VK, Tseng SC. Ocular demodicosis as a potential cause of pediatric blepharoconjunctivitis. Cornea. 2010;29(12):1386–1391.
123. Kheirkhah A, Casas V, Li W, Raju VK, Tseng SC. Corneal manifestations of ocular demodex infestation. Am J Ophthalmol. 2007;143(5): 743–749.
124. Gao YY, Wang T, Jiang YT, Yang MJ, Lu XH, Zheng L, Wang ST, Shi WY. Should ocular *Demodex* be checked and treated in refractory keratitis patients without blepharitis? Int J Ophthalmol. 2023 feb 18;16(2):201-207.
125. Erbagci Z, Erbagci I, Erkilic S. High incidence of demodicidosis in eyelid basal cell carcinomas. Int J Dermatol. 2003;42(7):567–571.

126. Galea M, Sharma R, Srinivasan S, Roberts F. Demodex blepharitis mimicking eyelid sebaceous gland carcinoma. *Clin Exp Ophthalmol*. 2014;42(2):208–210.
127. Gao YY, Di Pascuale MA, Li W, et al. In vitro and in vivo killing of ocular Demodex by tea tree oil. *Br J Ophthalmol*. 2005; 89:1468–1473.
128. Kojima T, Ishida R, Sato EA, et al. In vivo evaluation of ocular demodicosis using laser scanning confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011; 52:565–569.
129. Petroll WM, Jester JV, Cavanagh HD. In vivo confocal imaging: general principles and applications. *Scanning*. 1994; 16:131–149.
130. Leibowitz HM, Capino D. Treatment of chronic blepharitis. *Arch Ophthalmol*. 1988;106(6):720.
131. Schachter S. A different approach to treating demodex blepharitis. *Optometry Times*. Epub 2014 Jan 3.
132. Gao YY, Di Pascuale MA, Elizondo A, Tseng SC. Clinical treatment of ocular demodicosis by lid scrub with tea tree oil. *Cornea*. 2007;26(2):136–143.
133. Tighe S, Gao YY, Tseng SC. Terpinen-4-ol is the most active ingredient of tea tree oil to kill Demodex mites. *Transl Vis Sci Technol*. 2013; 2:2.
134. Gao YY, Xu DL, Huang IJ, Wang R, Tseng SC. Treatment of ocular itching associated with ocular demodicosis by 5% tea tree oil ointment. *Cornea*. 2012;31(1):14–17.
135. Ngo W, Jones L, Bitton E. Short-term comfort responses associated with the use of eyelid cleansing products to manage Demodex folliculorum. *Eye Contact Lens*. Epub 2017 Sep 21.
136. Murphy O, O'Dwyer V, Lloyd-McKernan A. The efficacy of tea tree face wash, 1,2-octanediol and microblepharoexfoliation in treating Demodex folliculorum blepharitis. *Cont Lens Anterior Eye*. 2018;41(1): 77–82.
137. Navel V, Mulliez A, Benoist d'Azy C, et al. Efficacy of treatments for Demodex blepharitis: a systematic review and meta-analysis. *Ocul Surf*. 2019; 17:655–669.
138. Ebbelaar CCF, Venema AW, Van Dijk MR. Topical ivermectin in the treatment of Papulopustular Rosacea: a systematic review of evidence and clinical guideline recommendations. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2018; 8:379–387.
139. Arya M., Shergill I.S., Williamson M., Gommersall L., Arya N., Patel H.R. Basic Principles of Real-Time Quantitative PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn*. 2005; 5:209–219.
140. Quan PL, Sauzade M, Brouzes E. dPCR: A Technology Review. *Sensors (Basel)*. 2018 Apr 20;18(4):1271.
141. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem*. 2009; 55:611–622.
142. Zhu H, Zhang H, Xu Y, Laššáková S, Korabečná M, Neužil P. PCR past, present and future. *Biotechniques*. 2020 oct;69(4):317-325.

143. Desarrollo de una PCR para la detección y cuantificación de la parasitación por *Demodex folliculorum* en biopsias de neoplasias cutáneas del área periocular. Tenorio-Abreu A, Sánchez-España J C, Naranjo González LE, González Gallego MC, Hidalgo-Grass C, Ruíz-Frutos C. *Rev Esp Quimioter* 2016;29(4): 220-223.
144. Sánchez España JC. Cuantificación del *Demodex folliculorum* mediante reacción en cadena de la polimerasa y su asociación con el carcinoma basocelular en el área periocular. [Tesis Doctoral] Huelva, España: Universidad de Huelva, 2018.
145. Viswalingham M, Rauz S, Morlet N, Dart JK. Blepharokeratoconjunctivitis in children: diagnosis and treatment. *British Journal of Ophthalmology*. 2005; 89(4):400–3.
146. American Academy of Ophthalmology. Blepharitis Preferred Practice Pattern. San Francisco, 2023.
147. Nelson JD, Shimazaki J, Benitez-del-Castillo JM, Craig JP, McCulley JP, Den S, et al. The International Workshop on Meibomian Gland Dysfunction: report of the definition and classification subcommittee. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2011; 52(4):1930–7.
148. Shah PP, Stein RL, Perry HD. Update on the management of demodex blepharitis. *Cornea* 2022; 41:934–939.
149. Cheng AMS, Sheha H, Tseng SCG. Recent advances on ocular *Demodex* infestation. *Curr Opin Ophthalmol* 2015; 26:295–300.
150. Correa Fontt J, Mena Oliva M, Pérez Campos C, et al. Prevalence of *Demo dex* spp. in eyelashes of a university's population in Santiago, Chile. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología (English Edition)* 2020; 95:159–163.
151. Murphy O, O'Dwyer V, Lloyd-McKernan A. The effect of lid hygiene on the tear film and ocular surface, and the prevalence of *Demodex* blepharitis in university students. *Cont Lens Anterior Eye* 2020; 43:159–168.
152. Vargas-ARzola J, Segura-Salvador A, Torres-Aguilar H, et al. Prevalence and risk factors to *Demodex folliculorum* infection in eyelash follicles from a university population of Mexico. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 2020; 67:156–160.
153. Zhang AC, Muntz A, Wang MTM, et al. Ocular demodex: A systematic review of the clinical literature. *Ophthalmic Physiol Opt* 2020; 40:389–432.
154. Biernat MM, Rusiecka-Ziółkowska J, Piątkowska E, et al. Occurrence of demodex species in patients with blepharitis and in healthy individuals: A 10-year observational study. *Jpn J Ophthalmol* 2018; 62:628–633.
155. Kabatas N, Dogan AS, Kabatas EU, et al. The effect of *Demodex* infestation on blepharitis and the ocular symptoms. *Eye Contact Lens* 2017; 43:64–67.
156. Kasetsuwan N, Kositphipat K, Busayarat M, et al. Prevalence of ocular demodicosis among patients at tertiary care center, Bangkok, Thailand. *Int J Ophthalmol* 2017; 10:122–127.
157. Zhu M, Cheng C, Yi H, et al. Quantitative analysis of the bacteria in blepharitis with *Demodex* infestation. *Front Microbiol* 2018; 9:1719.

158. Trattler W, Karpecki P, Rapoport Y, et al. The prevalence of Demodex blepharitis in US eye care clinic patients as determined by collarettes, a pathognomonic sign. *Clin Ophthalmol* 2022; 16:1153–1164.
159. Teo A, Rosenberg E, Jacobson A. Prevalence of Demodex colonization in patients presenting to an outpatient clinic. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2021; 62:1236.
160. Cheng AM, Hwang J, Dermer H, et al. Prevalence of ocular demodicosis in an older population and its association with symptoms and signs of dry eye. *Cornea* 2021; 40:995–1001.
161. Messaoud R, El Fekih L, Mahmoud A, et al. Improvement in ocular symptoms and signs in patients with Demodex anterior blepharitis using a novel terpinen-4-ol (2.5%) and hyaluronic acid (0.2%) cleansing wipe. *Clin Ophthalmol* 2019; 13:1043–1054.
162. Aumond S, Bitton E. Palpebral and facial skin infestation by Demodex folliculorum. *Cont Lens Anterior Eye* 2020; 43:115–122.
163. Fromstein SR, Harthan JS, Patel J, et al., Demodex blepharitis: Clinical perspectives. *Clin Optom (Auckl)* 2018; 10:57–63.
164. Luo KS, Xie A, Yang JJ, et al. Critical value of Demodex count per lash for symptomatic and clinical improvement of Demodex blepharitis. *Eye (Lond)* 2021; 36:663–665, online ahead of print.
165. Bitton E, Aumond S. Demodex and eye disease: A review. *Clin Exp Optom* 2021; 104:285–294.
166. Ayres BD, Donnenfeld E, Farid M, et al. Clinical diagnosis and management of Demodex blepharitis: The Demodex expert panel on treatment and eyelid health (DEPTH). *Eye (Lond)* 2023; Online ahead of print.
167. Sedzikowska A, Oseka M, Grytner-Zięcina B. Ocular symptoms reported by patients infested with Demodex mites. *Acta Parasitol* 2016; 61:808–814.
168. Randon M, Liang H, El Hamdaoui M, et al. In vivo confocal microscopy as a novel and reliable tool for the diagnosis of Demodex eyelid infestation. *Br J Ophthalmol* 2015; 99:336–341.
169. O'Dell L, Dierker DS, Devries DK, et al. Psychosocial impact of Demodex blepharitis. *Clin Ophthalmol* 2022; 16:2979–2987.
170. Chiang CC, Lin CL, Tsai YY, et al. Patients with blepharitis are at elevated risk of anxiety and depression. *PLoS One* 2013;8: e8333.
171. Nowomiejska K, Lukasik P, Brzozowska A, et al. Prevalence of ocular demodicosis and ocular surface conditions in patients selected for cataract surgery. *J Clin Med* 2020; 9:3069.
172. Iglesias-Martín J, Tenorio-Abreu A, Rodríguez-Molins E, Jiménez Alcántara M. Severe chronic blepharitis. Torpid evolution of several years. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)*. 2019 Jun-Jul;37(6):410-412.
173. Zhao YE, Guo N, Xun M, Xu JR, Wang M, Wang DL. Sociodemographic characteristics and risk factor analysis of Demodex infestation (Acari: Demodicidae). *J Zhejiang Univ Sci B* 2011;12(12):998-1007.
174. Sastre N, Ravera I, Ferreira D, Altet L, Sanchez A, Bardagi M, Francino O, Ferrer L. Development of a PCR technique specific for Demodex injai in biological specimens. *Parasitol Res* 2013;112(9):3369-3372.

175. Hu L, Zhao YE, Cheng J, Ma JX. Molecular identification of four phenotypes of human *Demodex* in China. *Exp Parasitol* 2014; 142:38-42.
176. Casas C, Paul C, Lahfa M, Livideanu B et al (2012) Quantification of *Demodex folliculorum* by PCR in rosacea and its relationship to skin innate immune activation. *Exp Dermatol* 21:906–910.
177. Alver O, Kıvanç SA, Akova Budak B, Tüzemen NÜ, Ener B, Özmen AT. A Clinical Scoring System for Diagnosis of Ocular Demodicosis. *Med Sci Monit.* 2017 Dec 10; 23:5862-5869.
178. Arrúa M, Samudio M, Farina N, Cibils D, Laspina F, Sanabria R, et al. Comparative study of the efficacy of different treatment options in patients with chronic blepharitis. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2015; 90:112–8.
179. Sadri E, Yeu L, Trattler W, Holdbrook M, Baba S. The prevalence of collarettes and *Demodex* blepharitis in ophthalmology and optometry practices (Titan study). Poster presented at: American Society of Cataract and Refractive Surgery Annual Meeting. Las Vegas, NV; 2021.
180. Dalkey NC. The Delphi method: an experimental study of group opinion. Santa Monica, CA: RAND Corporation; 1969.
181. Hohmann E, Brand JC, Rossi MJ, Lubowitz JH. Expert opinion is necessary: Delphi panel methodology facilitates a scientific approach to consensus. *Arthroscopy.* 2018; 34:349–51. doi: 10.1016/j.arthro.2017.11.022.
182. Okoli C, Pawlowski SD. The Delphi method as a research tool: an example, design considerations and applications. *Inf Manag.* 2004; 42:15–29. doi: 10.1016/j.im.2003.11.002.
183. Murphy O, O'Dwyer V, Lloyd-McKernan A. Ocular *Demodex folliculorum*: Prevalence and associated symptoms in an Irish population. *Int Ophthalmol.* 2018; 39:405–17.
184. Mongi F, Laconte L, Casero RD. Ácaros del género *Demodex*: ¿parásitos colonizadores de personas sanas o asociados a patología ocular? *Rev Argent Microbiol.* 2018; 50:369–73.
185. Barriga OO, al-Khalidi NW, Martin S, Wyman M. Evidence of immunosuppression by *Demodex canis*. *Vet Immunol Immunopathol.* 1992 Apr;32(1-2):37-46.
186. Liang LY, Liu Y, Ding XH, Ke HM, Chen C, Tseng SCG. Significant correlation between meibomian gland dysfunction and keratitis in young patients with *Demodex brevis* infestation. *Br J Ophthalmol* 2018;102(8):1098-1102.
187. Trave I, Salvi I, Canepa P, Parodi A, Cozzani E. Detection of demodex mites in papulopustular rosacea using microscopic examination and polymerase chain reaction: a comparative case-control study. *Arch Dermatol Res.* 2024 Jul 23;316(7):485.
188. Zhang L, Pan Z, Geng S. Sensitive, semi-nested RT-PCR amplification of fusion gene sequences for the rapid detection and differentiation of Newcastle disease virus. *Res Vet Sci.* 2010; 89:282-289.
189. Sánchez España JC, Tenorio Abreu A, Álvarez López A, Naranjo González LE, González Gallego MC, Hidalgo Grass C, Ruíz Frutos C. PCR Quantification of *D. folliculorum* in Periocular Basal Cell Carcinoma. *Ophthalmology.* 2016 Dec;123(12):2632-2633.

190. An N, Dou X, Yin N, Lu H, Zheng J, Liu X, Yang H, Zhu X, Xiao X. The Use of Digital PCR for the Diagnosis of *Demodex* Blepharitis. *Curr Eye Res*. 2024 Jan;49(1):33-38.
191. Chioveanu FG, Niculet E, Torlac C, Busila C, Tatu AL. Beyond the Surface: Understanding Demodex and Its Link to Blepharitis and Facial Dermatoses. *Clin Ophthalmol*. 2024 Jun 24; 18:1801-1810.
192. Lee WJ, Kim M, Lee SH, Chun YS, Kim KW. The varied influence of ocular Demodex infestation on dry eye disease and meibomian gland dysfunction across different age groups. *Sci Rep* 2023; 13:16324.
193. Lam NSK, Long XX, Li X, Yang L, Griffin RC, Doery JC. Comparison of the efficacy of tea tree (*melaleuca alternifolia*) oil with other current pharmacological management in human demodicosis: A systematic review. *Parasitology* 2020; 147:1587–613.
194. Man Peles I, Zahavi A, Chemodanova E, Vardizer Y. Novel in-office technique for visual confirmation of Demodex infestation in blepharitic patients. *Cornea* 2020; 39:858-61.
195. Muntz A, Purslow C, Wolffsohn JS, Craig JP. Improved Demodex diagnosis in the clinical setting using a novel in situ technique. *Cont Lens Anterior Eye* 2020; 43:345-9.
196. Zou D, Lu X, Song F, Zhong X, Chen H, Zhang J, et al. Characteristics of bacterial community in eyelashes of patients with Demodex blepharitis. *Parasit Vectors* 2024; 17:64.
197. Zhang AC, Muntz A, Wang MTM, Craig JP, Downie LE. Ocular demodex: A systematic review of the clinical literature. *Ophthalmic Physiol Opt* 2020; 40:389–432.
198. Hung KH, Lan YH, Lin JY, Kang EY, Tan HY, Chen HC, et al. Potential role and significance of ocular demodicosis in patients with concomitant refractory herpetic keratitis. *Clin Ophthalmol* 2020; 14:4469-82.
199. Gao H, Chen H, Xie HT, Xu K-K, Shi B-J, Huang Y-K. Changes in meibum lipid composition with ocular Demodex infestation. *Transl Vis Sci Technol* 2021; 10:6.
200. Aktas, Karabay E, Aksu Çerman A. Demodex folliculorum infestations in common facial dermatoses: Acne vulgaris, rosacea, seborrheic dermatitis. *An Bras Dermatol* 2020; 95:187–93.
201. Martinez-Pulgarin DF, Avila MY, Rodriguez-Morales AJ. Intervention for demodex blepharitis and their effectiveness: A systematic review and metaanalysis. *Cont Lens Anterior Eye* 2021; 44:101453.
202. Sun X, Liu Z, Sun S, Zhao S, Zhang X, Huang Y. The correlation between Demodex infestation and meibomian gland dysfunction at different ages. *BMC Ophthalmol* 2022; 22:388.
203. Jun SY, Choi YJ, Lee BR, Lee SU, Kim SC. Clinical characteristics of Demodex associated recurrent hordeola: An observational, comparative study. *Sci Rep* 2021; 11:21398.
204. Pan S, Chen Y. A clinical study on the correlation between demodex infestation and ocular surface changes in patients with meibomian gland dysfunction. *Indian J Ophthalmol* 2021; 69:2389-94.

205. Patel NV, Mathur U, Gandhi A, Singh M. Demodex blepharokeratoconjunctivitis affecting young patients: A case series. *Indian J Ophthalmol* 2020; 68:745-9.
206. Huang J, Guo MX, Xiang DM, Yan LF, Yu Y, Han L, et al. The association of demodex infestation with pediatric chalazia. *BMC Ophthalmol* 2022; 22:124.
207. Chatterjee S, Gupta J, Srinivas SP, Rao SK. Demodex and the eye - A review. *Indian J Ophthalmol*. 2025 Jan 1;73(1):10-18.
208. Rhee MK, Yeu E, Barnett M, Rapuano CJ, Dhaliwal DK, Nichols KK, Karpecki P, Mah FS, Chan A, Mun J, Gaddie IB. Demodex Blepharitis: A Comprehensive Review of the Disease, Current Management, and Emerging Therapies. *Eye Contact Lens*. 2023 Aug 1;49(8):311-318.

Capítulo VIII: Anexos

Anexo 1: Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO – INFORMACIÓN AL PACIENTE

Antes de proceder a la firma de este consentimiento informado, lea atentamente la información que a continuación se le facilita y realice las preguntas que considere oportunas.

Naturaleza:

Le estamos pidiendo que participe en un estudio de investigación porque presenta blefaritis o bien porque, aun no teniendo esta enfermedad puede ayudar a otros pacientes en su diagnóstico. Este tipo de estudio se realiza para poder saber más acerca de este problema y así poder encontrar mejores opciones terapéuticas para personas con blefaritis.

Su participación es completamente voluntaria; si no desea hacerlo su médico continuará con su atención habitual y su negativa no le traerá ningún inconveniente.

Lea toda la información que se le ofrece en este documento y haga todas las preguntas que necesite al investigador que se lo está explicando, antes de tomar una decisión. También lo alentamos a consultarlo con su familia, amigos y médicos de cabecera.

El Dr. _____ será quien dirija el estudio y
_____ será quien lo financie,
pero ni los investigadores ni _____ recibirán pago alguno.

Importancia:

1) ¿Por qué se realiza este estudio?

El propósito de esta investigación es evaluar una técnica que ayude a diagnosticar de forma más certera la presencia de un ácaro que se asocia con la blefaritis.

2) ¿Cuántas personas participarán y de dónde se las seleccionará?

Participarán un total de aproximadamente 200 pacientes seleccionados en este mismo centro.

3) ¿Qué se sabe de este tipo de ácaro?

Que se relaciona con la blefaritis, que consiste en una inflamación de los párpados que puede ocasionar quemazón, lagrimeo, enrojecimiento ocular y sensibilidad a la luz, además de facilitar las infecciones oculares.

4) ¿Qué debo hacer si acepto participar?

Si Ud. acepta participar en el estudio, lo primero que debe hacer es firmar este Consentimiento Informado. Luego, se le harán exámenes para ver si presenta todas las condiciones necesarias para ser incluido.

5) ¿Cuánto tiempo deberé permanecer en el estudio?

Los pacientes serán examinados por la misma persona en una consulta especializada, donde se le realizará una toma de muestras que consistirá en un frotis de piel con una torunda y en una depilación mecánica de 8 pestañas por ojo.

6) ¿Todos los participantes recibiremos el mismo tipo de procedimiento en el estudio?

Existirán 4 grupos y se decidirá (según presente o no blefaritis) a qué grupo pertenecerá usted, realizándose en todos ellos el mismo procedimiento de toma de muestras.

7) ¿Qué otras opciones tengo para tratar mi enfermedad, si decido no participar en este estudio de investigación?

En caso de padecer blefaritis se puede realizar un tratamiento estándar en función de los hallazgos encontrados que consiste en higiene palpebral asociando o no fármacos según la gravedad sin toma de muestra previa.

8) ¿Qué riesgos tendré si participo del estudio?

No existen apenas riesgos. La muestra de piel se realiza con una torunda roma, que no provoca irritación. Las pestañas se depilan con una pinza y sólo generan una pequeña molestia al extraerse, siendo el proceso reversible (es decir, que vuelven a crecer).

9) ¿Tendré beneficios por participar?

En caso de padecer una blefaritis resistente al tratamiento estándar, puede beneficiarse de un tratamiento específico que ayude a erradicar al ácaro.

10) ¿Qué gastos tendré si participo del estudio?

Ud. no tendrá gasto alguno.

11) ¿Qué pasará si sufro algún evento adverso mientras participo en el estudio?

Si durante el transcurso del mismo usted sufre un daño físico, una lesión o una consecuencia en su salud relacionada con el procedimiento del mismo se le proveerá toda la asistencia médica inmediata y necesaria para su tratamiento.

12) ¿Puedo dejar de participar en cualquier momento, aún luego de haber aceptado?

Usted es libre de retirar su consentimiento para participar en la investigación en cualquier momento sin que esto lo perjudique en su atención médica posterior; simplemente deberá notificar al investigador de su decisión.

Luego de que retire su consentimiento no se podrán obtener datos sobre Ud. y su salud pero toda la información obtenida con anterioridad sí será utilizada.

13) ¿Me pagarán por participar?

No se le pagará por su participación en este estudio.

14) ¿Cómo mantendrán la confidencialidad de mis datos personales? ¿Cómo harán para que mi identidad no sea conocida?

Los datos que lo identifiquen serán tratados en forma confidencial como lo exige la Ley. Salvo para quienes estén autorizados a acceder a sus datos personales, Ud. No podrá ser identificado y para ello se le asignará un código.

En caso de que los resultados de este estudio sean publicados en revistas médicas o presentados en congresos médicos, su identidad no será revelada.

15) ¿Quiénes tendrán acceso a mis datos personales?

Como parte del estudio, el Investigador Principal y todo el equipo de investigación tendrán acceso a los resultados de sus estudios.

16) ¿A quiénes puedo contactar si tengo dudas sobre el estudio y mis derechos como participante en un estudio de investigación?

16.a) Sobre el estudio: contactar al Investigador Principal.

16.b) Sobre sus derechos como participante en un estudio de investigación: Comité de Ética en Investigación.

Implicaciones para el donante/paciente:

- La donación/participación es totalmente voluntaria.
- El donante/paciente puede retirarse del estudio cuando así lo manifieste, sin dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- Todos los datos carácter personal, obtenidos en este estudio son confidenciales y se tratarán conforme a la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- La donación/información obtenida se utilizará exclusivamente para los fines específicos de este estudio.

Riesgos de la investigación para el donante/paciente:

No existen apenas riesgos. La muestra de piel se realiza con una torunda roma, que no provoca irritación. Las pestañas se depilan con una pinza y sólo generan una pequeña molestia al extraerse, siendo el proceso reversible (es decir, que vuelven a crecer).

Si requiere información adicional se puede poner en contacto con nuestro personal de XXXXXX en el teléfono: XXX XXX XXX o en el correo electrónico: XXXX@XXXX.XX

CONSENTIMIENTO INFORMADO – CONSENTIMIENTO POR ESCRITO DEL PACIENTE

Yo _____ (Nombre _____ y _____ Apellidos):
.....

- He leído el documento informativo que acompaña a este consentimiento (Información al Paciente)
- He podido hacer preguntas sobre el estudio: “Determinación de la densidad de *Demodex folliculorum* en pacientes con blefaritis mediante técnica molecular de PCR.”
- He recibido suficiente información sobre el estudio: “Determinación de la densidad de *Demodex folliculorum* en pacientes con blefaritis mediante técnica molecular de PCR.”
- He _____ hablado _____ con _____ el _____ profesional _____ sanitario _____ informador:
.....
- Comprendo que mi participación es voluntaria y soy libre de participar o no en el estudio.
- Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales y se tratarán conforme establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- Se me ha informado de que la donación/información obtenida sólo se utilizará para los fines específicos del estudio.
- **Deseo** ser informado/a de mis datos genéticos y otros de carácter personal que se obtengan en el curso de la investigación, incluidos los descubrimientos inesperados que se puedan producir, siempre que esta información sea necesaria para evitar un grave perjuicio para mi salud o la de mis familiares biológicos.

Si _____ No _____

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el *proyecto titulado* “Determinación de la densidad de *Demodex folliculorum* en pacientes con blefaritis mediante técnica molecular de PCR.”

Firma del paciente
(o representante legal en su caso)

Firma del profesional
sanitario informador

Nombre y apellidos:
Fecha:

Nombre y apellidos:
Fecha:

Anexo 2: Matriz de datos

Controles

Id	SEXO	EDAD	PATOLOGÍA ASOCIADA	Diabetes	OJO	Nº COPIAS ADN_1	Nº DEMODEX_1	SINTOMAS_1	DEMODICOSIS_1	TRATAMIENTO_1	TIPO TRATAMIENTO_1	MEJORA_2
149	MUJER	52	NO	NO	DERECHO	72,8	0	NO	NO	NO		
150	MUJER	52	NO	NO	IZQUIERDO	51,53	0	NO	NO	NO		
151	MUJER	72	NO	NO	DERECHO	30,57	0	NO	NO	NO		
152	MUJER	72	NO	NO	IZQUIERDO	84,13	0	NO	NO	NO		
153	MUJER	51	NO	NO	DERECHO	56,12	0	NO	NO	NO		
154	MUJER	51	NO	NO	IZQUIERDO	665,38	1	NO	SI	SI	1º ESCALÓN	SI
155	MUJER	39	NO	NO	DERECHO	32,86	0	NO	NO	NO		
156	MUJER	39	NO	NO	IZQUIERDO	0	0	NO	NO	NO		
157	MUJER	27	NO	NO	DERECHO	466,87	0	NO	NO	NO		
158	MUJER	27	NO	NO	IZQUIERDO	1431,98	0	NO	NO	NO		
159	HOMBRE	58	DIABETES	SI	DERECHO	2410,09	0	NO	NO	SI	1º ESCALÓN	SI
160	HOMBRE	58	DIABETES	SI	IZQUIERDO	632,54	1	NO	SI	SI	1º ESCALÓN	SI
161	MUJER	63	NO	NO	DERECHO	3336,9	0	NO	NO	SI	1º ESCALÓN	SI
162	MUJER	63	NO	NO	IZQUIERDO	334,77	0	NO	NO	SI	1º ESCALÓN	SI
163	MUJER	41	NO	NO	DERECHO	5535,54	0	NO	NO	NO		
164	MUJER	41	NO	NO	IZQUIERDO	588,42	0	NO	NO	NO		
165	MUJER	47	NO	NO	DERECHO	273,41	0	NO	NO	SI	1º ESCALÓN	SI
166	MUJER	47	NO	NO	IZQUIERDO	5262,33	0	NO	NO	SI	1º ESCALÓN	SI
167	MUJER	34	NO	NO	DERECHO	25,69	0	NO	NO	NO		
168	MUJER	34	NO	NO	IZQUIERDO	895	0	NO	NO	NO		
169	HOMBRE	48	NO	NO	DERECHO	77,14	0	NO	NO	NO		
170	HOMBRE	48	NO	NO	IZQUIERDO	116,49	0	NO	NO	NO		
171	HOMBRE	60	DIABETES	SI	DERECHO	2950,93	3	NO	SI	SI	1º ESCALÓN	SI
172	HOMBRE	60	DIABETES	SI	IZQUIERDO	16734,62	1	NO	SI	SI	1º ESCALÓN	SI
173	MUJER	76	NO	NO	DERECHO	79207,52	0	NO	NO	NO		
174	MUJER	76	NO	NO	IZQUIERDO	63761,62	0	NO	NO	NO		
175	MUJER	47	NO	NO	DERECHO	258,05	0	NO	NO	NO		
176	MUJER	47	NO	NO	IZQUIERDO	3149,36	0	NO	NO	NO		
177	MUJER	79	NO	NO	DERECHO	303,68	0	NO	NO	SI	1º ESCALÓN	SI
178	MUJER	79	NO	NO	IZQUIERDO	1371,18	1	NO	SI	SI	1º ESCALÓN	SI
179	MUJER	65	NO	NO	DERECHO	948,29	0	NO	NO	SI	1º ESCALÓN	SI
180	MUJER	65	NO	NO	IZQUIERDO	1303,51	0	NO	NO	SI	1º ESCALÓN	SI
181	HOMBRE	84	DIABETES	SI	DERECHO	21398,53	0	NO	NO	NO		
182	HOMBRE	84	DIABETES	SI	IZQUIERDO	850,82	0	NO	NO	NO		
183	MUJER	66	NO	NO	DERECHO	1026,8	0	NO	NO	NO		
184	MUJER	66	NO	NO	IZQUIERDO	808,83	0	NO	NO	NO		
185	MUJER	54	NO	NO	DERECHO	55,71	0	NO	NO	NO		
186	MUJER	54	NO	NO	IZQUIERDO	155,94	0	NO	NO	NO		
187	HOMBRE	36	NO	NO	DERECHO	623,46	0	NO	NO	NO		
188	HOMBRE	36	NO	NO	IZQUIERDO	3856,1	0	NO	NO	NO		

189	HOMBRE	56	NO	NO	DERECHO	1871,22	0	NO	NO	NO
190	HOMBRE	56	NO	NO	IZQUIERDO	4895,26	0	NO	NO	NO
191	MUJER	36	NO	NO	DERECHO	26,38	0	NO	NO	NO
192	MUJER	36	NO	NO	IZQUIERDO	941,41	0	NO	NO	NO
193	HOMBRE	44	NO	NO	DERECHO	1266,35	0	NO	NO	NO
194	HOMBRE	44	NO	NO	IZQUIERDO	21091,3	0	NO	NO	NO

Factores de riesgo y variables secundarias en los casos

Id	SEXO	EDAD	OJO	DERMATITIS	ROSACEA	SJÖGREN	DIABETES	CUMPLIDOR	ACUDE
1	MUJER	80	DERECHO	SI	NO	NO	NO	SI	SI
2	MUJER	80	IZQUIERDO	SI	NO	NO	NO	SI	SI
3	MUJER	73	DERECHO	NO	NO	SI	NO	SI	SI
4	MUJER	73	IZQUIERDO	NO	NO	SI	NO	SI	SI
5	MUJER	80	DERECHO	SI	NO	NO	NO	NO	SI
6	MUJER	80	IZQUIERDO	SI	NO	NO	NO	NO	SI
7	MUJER	30	DERECHO	NO	NO	SI	NO	SI	SI
8	MUJER	30	IZQUIERDO	NO	NO	SI	NO	SI	SI
9	MUJER	54	DERECHO	NO	NO	NO	SI	SI	SI
10	MUJER	54	IZQUIERDO	NO	NO	NO	SI	SI	SI
11	HOMBRE	75	DERECHO	NO	NO	NO	NO		NO
12	HOMBRE	75	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO		NO
13	HOMBRE	71	DERECHO	NO	NO	NO	NO		NO
14	HOMBRE	71	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO		NO
15	HOMBRE	36	DERECHO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
16	HOMBRE	36	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
17	MUJER	53	DERECHO	NO	SI	NO	NO	NO	SI
18	MUJER	53	IZQUIERDO	NO	SI	NO	NO	NO	SI
19	MUJER	32	DERECHO	NO	NO	NO	NO		NO
20	MUJER	32	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO		NO
21	MUJER	77	DERECHO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
22	MUJER	77	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
23	HOMBRE	48	DERECHO	NO	NO	NO	NO		NO
24	HOMBRE	48	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO		NO
25	MUJER	56	DERECHO	SI	NO	NO	NO		NO
26	MUJER	56	IZQUIERDO	SI	NO	NO	NO		NO
27	HOMBRE	67	DERECHO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
28	HOMBRE	67	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
29	MUJER	73	DERECHO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
30	MUJER	73	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
31	MUJER	76	DERECHO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
32	MUJER	76	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
33	HOMBRE	22	DERECHO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
34	HOMBRE	22	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	SI	SI

35	HOMBRE	39	DERECHO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
36	HOMBRE	39	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
37	HOMBRE	25	DERECHO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
38	HOMBRE	25	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
39	HOMBRE	58	DERECHO	NO	NO	NO	NO		NO
40	HOMBRE	58	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO		NO
41	MUJER	58	DERECHO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
42	MUJER	58	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
43	HOMBRE	71	DERECHO	SI	NO	NO	SI	SI	SI
44	HOMBRE	71	IZQUIERDO	SI	NO	NO	SI	SI	SI
45	MUJER	64	DERECHO	NO	NO	NO	NO		NO
46	MUJER	64	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO		NO
47	HOMBRE	48	DERECHO	NO	NO	NO	NO		NO
48	HOMBRE	48	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO		NO
49	HOMBRE	50	DERECHO	NO	NO	NO	NO		NO
50	HOMBRE	50	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO		NO
51	HOMBRE	42	DERECHO	NO	NO	NO	SI		NO
52	HOMBRE	42	IZQUIERDO	NO	NO	NO	SI		NO
53	HOMBRE	73	DERECHO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
54	HOMBRE	73	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
55	MUJER	41	DERECHO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
56	MUJER	41	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
57	HOMBRE	16	DERECHO	NO	NO	NO	NO	NO	SI
58	HOMBRE	16	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	NO	SI
59	MUJER	84	DERECHO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
60	MUJER	84	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
61	MUJER	75	DERECHO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
62	MUJER	75	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
63	MUJER	82	DERECHO	NO	NO	SI	NO	SI	SI
64	MUJER	82	IZQUIERDO	NO	NO	SI	NO	SI	SI
65	MUJER	73	DERECHO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
66	MUJER	73	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
67	HOMBRE	57	DERECHO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
68	HOMBRE	57	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
69	HOMBRE	66	DERECHO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
70	HOMBRE	66	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
71	MUJER	79	DERECHO	SI	NO	NO	NO		NO
72	MUJER	79	IZQUIERDO	SI	NO	NO	NO		NO
73	MUJER	76	DERECHO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
74	MUJER	76	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
75	MUJER	16	DERECHO	NO	SI	NO	NO	SI	SI
76	MUJER	16	IZQUIERDO	NO	SI	NO	NO	SI	SI
77	MUJER	65	DERECHO	NO	NO	NO	SI	SI	NO
78	MUJER	65	IZQUIERDO	NO	NO	NO	SI	SI	NO
79	HOMBRE	76	DERECHO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
80	HOMBRE	76	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	SI	SI

81	MUJER	60	DERECHO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
82	MUJER	60	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
83	MUJER	77	DERECHO	NO	SI	NO	NO	SI	SI
84	MUJER	77	IZQUIERDO	NO	SI	NO	NO	SI	SI
85	MUJER	59	DERECHO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
86	MUJER	59	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
87	HOMBRE	33	DERECHO	NO	NO	NO	NO		NO
88	HOMBRE	33	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO		NO
89	HOMBRE	82	DERECHO	NO	NO	NO	NO	NO	SI
90	HOMBRE	82	DERECHO	NO	NO	NO	NO	NO	SI
91	MUJER	67	DERECHO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
92	MUJER	67	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
93	HOMBRE	23	DERECHO	SI	NO	NO	NO	SI	SI
94	HOMBRE	23	DERECHO	SI	NO	NO	NO	SI	SI
95	HOMBRE	38	DERECHO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
96	HOMBRE	38	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
97	HOMBRE	73	DERECHO	NO	NO	NO	SI		NO
98	HOMBRE	73	IZQUIERDO	NO	NO	NO	SI		NO
99	HOMBRE	39	DERECHO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
100	HOMBRE	39	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
101	HOMBRE	76	DERECHO	SI	NO	NO	NO	SI	SI
102	HOMBRE	76	IZQUIERDO	SI	NO	NO	NO	SI	SI
103	MUJER	74	DERECHO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
104	MUJER	74	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
105	HOMBRE	71	DERECHO	NO	NO	NO	SI	SI	SI
106	HOMBRE	71	IZQUIERDO	NO	NO	NO	SI	SI	SI
107	MUJER	64	DERECHO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
108	MUJER	64	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
109	MUJER	39	DERECHO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
110	MUJER	39	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
111	MUJER	44	DERECHO	NO	NO	NO	NO	NO	SI
112	MUJER	44	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	NO	SI
113	MUJER	65	DERECHO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
114	MUJER	65	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
115	HOMBRE	23	DERECHO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
116	HOMBRE	23	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
117	MUJER	80	DERECHO	NO	NO	NO	NO		NO
118	MUJER	80	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO		NO
119	MUJER	58	DERECHO	NO	NO	SI	NO		NO
120	MUJER	58	IZQUIERDO	NO	NO	SI	NO		NO
121	MUJER	48	DERECHO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
122	MUJER	48	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
123	MUJER	72	DERECHO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
124	MUJER	72	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
125	HOMBRE	30	DERECHO	NO	NO	NO	NO		NO
126	HOMBRE	30	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO		NO

127	MUJER	57	DERECHO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
128	MUJER	57	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
129	MUJER	78	DERECHO	NO	SI	NO	NO	SI	SI
130	MUJER	78	IZQUIERDO	NO	SI	NO	NO	SI	SI
131	MUJER	54	DERECHO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
132	MUJER	54	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
133	HOMBRE	75	DERECHO	NO	NO	NO	SI	SI	SI
134	HOMBRE	75	IZQUIERDO	NO	NO	NO	SI	SI	SI
135	MUJER	48	DERECHO	NO	NO	SI	NO	SI	SI
136	MUJER	48	IZQUIERDO	NO	NO	SI	NO	SI	SI
137	MUJER	60	DERECHO	NO	NO	NO	NO		NO
138	MUJER	60	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO		NO
139	MUJER	16	DERECHO	NO	NO	NO	NO	NO	SI
140	MUJER	16	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	NO	SI
141	HOMBRE	36	DERECHO	NO	SI	NO	NO	SI	SI
142	HOMBRE	36	IZQUIERDO	NO	SI	NO	NO	SI	SI
143	MUJER	60	DERECHO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
144	MUJER	60	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
145	MUJER	45	DERECHO	NO	NO	NO	NO	NO	SI
146	MUJER	45	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	NO	SI
147	HOMBRE	32	DERECHO	NO	NO	NO	NO	SI	SI
148	HOMBRE	32	IZQUIERDO	NO	NO	NO	NO	SI	SI

Pacientes con demodicosis antes del tratamiento

Id	TIPO BLEFARITIS_1	GRAVEDAD_1	Nº COPIAS ADN_1	Nº DEMODEX_1	SINTOMAS_1	DEMODICOSIS_1	TRATAMIENTO_1	TIPO TRATAMIENTO_1
1	ANTERIOR	MODERADA	32783,68	10	SI	SI	SI	2º ESCALÓN
2	ANTERIOR	MODERADA	13374,22	0	SI	NO	SI	2º ESCALÓN
3	ANTERIOR	MODERADA	8856,77	2	SI	SI	SI	2º ESCALÓN
4	ANTERIOR	MODERADA	41920,43	1	SI	SI	SI	2º ESCALÓN
5	ANTERIOR	LEVE	2225,82	0	SI	NO	SI	1º ESCALÓN
6	ANTERIOR	LEVE	3692,38	2	SI	SI	SI	1º ESCALÓN
7	ANTERIOR	MODERADA	16375,52	0	SI	NO	SI	2º ESCALÓN
8	ANTERIOR	MODERADA	1303,51	0	SI	NO	SI	2º ESCALÓN
9	ANTERIOR	LEVE	2410,09	0	NO	NO	NO	
10	ANTERIOR	LEVE	4145,25	0	NO	NO	NO	
11	ANTERIOR	MODERADA	1064,6	1	NO	SI	SI	1º ESCALÓN
12	ANTERIOR	MODERADA	99,35	0	NO	NO	SI	1º ESCALÓN
13	ANTERIOR	SEVERA	2225,82	0	SI	NO	SI	3º ESCALÓN
14	ANTERIOR	SEVERA	5495,66	0	SI	NO	SI	3º ESCALÓN
15	ANTERIOR	LEVE	116,49	0	NO	NO	NO	
16	ANTERIOR	LEVE	997,53	0	NO	NO	NO	
17	ANTERIOR	MODERADA	101,53	0	NO	NO	NO	
18	ANTERIOR	MODERADA	79,87	0	NO	NO	NO	

19	ANTERIOR	LEVE	218,51	0	NO	NO	NO	
20	ANTERIOR	LEVE	3126,67	0	NO	NO	NO	
21	ANTERIOR	MODERADA	567,53	2	SI	SI	SI	2º ESCALÓN
22	ANTERIOR	MODERADA	888,55	1	SI	SI	SI	2º ESCALÓN
23	ANTERIOR	SEVERA	9182,83	1	SI	SI	SI	3º ESCALÓN
24	ANTERIOR	SEVERA	2209,79	2	SI	SI	SI	3º ESCALÓN
25	ANTERIOR	LEVE	1080,11	2	SI	SI	SI	2º ESCALÓN
26	ANTERIOR	MODERADA	2666,84	7	SI	SI	SI	2º ESCALÓN
27	ANTERIOR	SEVERA	637,99	2	SI	SI	SI	3º ESCALÓN
28	ANTERIOR	SEVERA	5739,33	0	SI	NO	SI	3º ESCALÓN
29	ANTERIOR	SEVERA	10535,15	4	SI	SI	SI	3º ESCALÓN
30	ANTERIOR	SEVERA	4586,84	2	SI	SI	SI	3º ESCALÓN
31	ANTERIOR	SEVERA	36539,39	4	SI	SI	SI	3º ESCALÓN
32	ANTERIOR	SEVERA	37611,63	1	SI	SI	SI	3º ESCALÓN
33	ANTERIOR	SEVERA	17989,46	0	SI	NO	SI	3º ESCALÓN
34	ANTERIOR	MODERADA	8120,68	0	SI	NO	SI	3º ESCALÓN
35	ANTERIOR	LEVE	2686,19	1	SI	SI	SI	1º ESCALÓN
36	ANTERIOR	LEVE	5535,54	0	SI	NO	SI	1º ESCALÓN
37	ANTERIOR	LEVE	720,47	0	SI	NO	SI	1º ESCALÓN
38	ANTERIOR	MODERADA	57,77	1	SI	SI	SI	2º ESCALÓN
39	ANTERIOR	MODERADA	453,56	0	SI	NO	SI	2º ESCALÓN
40	ANTERIOR	MODERADA	1034,25	1	SI	SI	SI	2º ESCALÓN
41	ANTERIOR	SEVERA	48442,93	0	SI	NO	SI	3º ESCALÓN
42	ANTERIOR	SEVERA	18651,74	0	SI	NO	SI	3º ESCALÓN
43	ANTERIOR	MODERADA	2241,91	1	SI	SI	SI	2º ESCALÓN
44	ANTERIOR	MODERADA	1257,22	0	SI	NO	SI	2º ESCALÓN
45	ANTERIOR	MODERADA	3241,77	0	NO	NO	NO	
46	ANTERIOR	MODERADA	3639,37	0	NO	NO	NO	
47	ANTERIOR	MODERADA	1954,19	0	NO	NO	SI	2º ESCALÓN
48	ANTERIOR	MODERADA	941,46	1	NO	SI	SI	2º ESCALÓN
49	ANTERIOR	SEVERA						
50	ANTERIOR	SEVERA						
51	ANTERIOR	LEVE		0		NO		
52	ANTERIOR	SEVERA		0		NO		
53	MIXTA	SEVERA	2085,59	5	SI	SI	SI	3º ESCALÓN
54	MIXTA	SEVERA	3884,08	0	SI	NO	SI	3º ESCALÓN
55	MIXTA	MODERADA	248,89	0	SI	NO	NO	
56	MIXTA	MODERADA	285,89	0	SI	NO	NO	
57	MIXTA	SEVERA	16494,36	1	SI	SI	SI	3º ESCALÓN
58	MIXTA	SEVERA	1391,15	0	SI	NO	SI	3º ESCALÓN
59	MIXTA	SEVERA	28165,2	6	SI	SI	SI	3º ESCALÓN
60	MIXTA	SEVERA	10459,25	1	SI	SI	SI	3º ESCALÓN
61	MIXTA	SEVERA	3639,37	0	SI	NO	SI	3º ESCALÓN
62	MIXTA	SEVERA	139220,99	0	SI	NO	SI	3º ESCALÓN
63	MIXTA	MODERADA	12441,31	0	SI	NO	SI	3º ESCALÓN
64	MIXTA	SEVERA	100552,79	4	SI	SI	SI	3º ESCALÓN

65	MIXTA	SEVERA	2705,68	1	SI	SI	SI	3º ESCALÓN
66	MIXTA	SEVERA	1728,15	3	SI	SI	SI	3º ESCALÓN
67	MIXTA	SEVERA	2070,56	2	SI	SI	SI	3º ESCALÓN
68	MIXTA	SEVERA	33502,59	0	SI	NO	SI	3º ESCALÓN
69	MIXTA	LEVE	1691,64	0	SI	NO	SI	3º ESCALÓN
70	MIXTA	MODERADA	1884,8	14	SI	SI	SI	3º ESCALÓN
71	MIXTA	SEVERA	13277,87	2	SI	SI	SI	3º ESCALÓN
72	MIXTA	SEVERA	2887,61	0	SI	NO	SI	3º ESCALÓN
73	MIXTA	MODERADA	424,99	0	SI	NO	SI	2º ESCALÓN
74	MIXTA	MODERADA	189,09	3	SI	SI	SI	2º ESCALÓN
75	MIXTA	SEVERA	181925,43	3	SI	SI	SI	3º ESCALÓN
76	MIXTA	SEVERA	68542,78	0	SI	NO	SI	3º ESCALÓN
77	MIXTA	SEVERA	3940,66	7	SI	SI	SI	3º ESCALÓN
78	MIXTA	SEVERA	339,65	1	SI	SI	SI	3º ESCALÓN
79	MIXTA	SEVERA	4236,15	0	SI	NO	SI	3º ESCALÓN
80	MIXTA	SEVERA	1940,11	0	SI	NO	SI	3º ESCALÓN
81	MIXTA	SEVERA	9182,83	3	SI	SI	SI	3º ESCALÓN
82	MIXTA	MODERADA	36539,39	5	SI	SI	SI	3º ESCALÓN
83	MIXTA	MODERADA	163226,2	1	SI	SI	SI	3º ESCALÓN
84	MIXTA	SEVERA	34733,98	1	SI	SI	SI	3º ESCALÓN
85	MIXTA	MODERADA	16614,06	0	SI	NO	SI	2º ESCALÓN
86	MIXTA	MODERADA	20490,02	0	SI	NO	SI	2º ESCALÓN
87	MIXTA	LEVE	61,65	5	SI	SI	SI	2º ESCALÓN
88	MIXTA	LEVE	9,82	3	SI	SI	SI	2º ESCALÓN
89	MIXTA	SEVERA	741,61	0	SI	NO	SI	3º ESCALÓN
90	MIXTA	SEVERA	5535,54	2	SI	SI	SI	3º ESCALÓN
91	MIXTA	SEVERA	1954,19	0	SI	NO	SI	2º ESCALÓN
92	MIXTA	SEVERA	8856,77	0	SI	NO	SI	2º ESCALÓN
93	MIXTA	LEVE	55,71	0	NO	NO	SI	1º ESCALÓN
94	MIXTA	LEVE	19,25	1	NO	SI	SI	1º ESCALÓN
95	MIXTA	LEVE	3126,67	0	SI	NO	SI	2º ESCALÓN
96	MIXTA	MODERADA	17989,46	0	SI	NO	SI	2º ESCALÓN
97	MIXTA	SEVERA	118746,15	5	SI	SI	SI	3º ESCALÓN
98	MIXTA	SEVERA	10015,15	0	SI	NO	SI	3º ESCALÓN
99	MIXTA	SEVERA		1	SI	SI	SI	2º ESCALÓN
100	MIXTA	SEVERA		3	SI	SI	SI	2º ESCALÓN
101	MIXTA	MODERADA		2	SI	SI	SI	2º ESCALÓN
102	MIXTA	MODERADA		2	SI	SI	SI	2º ESCALÓN
103	MIXTA	MODERADA						
104	MIXTA	MODERADA						
105	POSTERIOR	LEVE	85,36	0	NO	NO	NO	
106	POSTERIOR	LEVE	236,6	0	NO	NO	NO	
107	POSTERIOR	MODERADA	1431,98	0	SI	NO	SI	1º ESCALÓN
108	POSTERIOR	MODERADA	9800,28	0	SI	NO	SI	1º ESCALÓN
109	POSTERIOR	LEVE	0	0	SI	NO	NO	
110	POSTERIOR	LEVE	57,35	0	SI	NO	NO	

111	POSTERIOR	LEVE	252,51	1	SI	SI	SI	2º ESCALÓN
112	POSTERIOR	LEVE	94,45	1	SI	SI	SI	2º ESCALÓN
113	POSTERIOR	MODERADA	10309,09	0	SI	NO	SI	2º ESCALÓN
114	POSTERIOR	LEVE	857	1	SI	SI	SI	2º ESCALÓN
115	POSTERIOR	SEVERA	1831,07	0	NO	NO	SI	2º ESCALÓN
116	POSTERIOR	SEVERA	243,54	0	NO	NO	SI	2º ESCALÓN
117	POSTERIOR	LEVE	8604,28	1	NO	SI	SI	1º ESCALÓN
118	POSTERIOR	LEVE	11573,48	0	NO	NO	SI	1º ESCALÓN
119	POSTERIOR	LEVE	736,27	0	NO	NO	NO	
120	POSTERIOR	LEVE	296,05	0	NO	NO	NO	
121	POSTERIOR	LEVE	3856,1	0	NO	NO	NO	
122	POSTERIOR	LEVE	2131,32	0	NO	NO	NO	
123	POSTERIOR	SEVERA	16614,06	0	SI	NO	SI	3º ESCALÓN
124	POSTERIOR	SEVERA	13374,22	0	SI	NO	SI	3º ESCALÓN
125	POSTERIOR	SEVERA	8238,97	1	SI	SI	SI	3º ESCALÓN
126	POSTERIOR	SEVERA	14273,51	1	SI	SI	SI	3º ESCALÓN
127	POSTERIOR	MODERADA	11407,32	0	SI	NO	SI	2º ESCALÓN
128	POSTERIOR	MODERADA	13766,69	0	SI	NO	SI	2º ESCALÓN
129	POSTERIOR	SEVERA	2590,81	2	SI	SI	SI	3º ESCALÓN
130	POSTERIOR	SEVERA	5616,17	7	SI	SI	SI	3º ESCALÓN
131	POSTERIOR	LEVE	8604,28	0	NO	NO	NO	
132	POSTERIOR	LEVE	2666,84	0	NO	NO	NO	
133	POSTERIOR	MODERADA	5456,06	0	NO	NO	SI	2º ESCALÓN
134	POSTERIOR	MODERADA	18383,95	0	NO	NO	SI	2º ESCALÓN
135	POSTERIOR	MODERADA	160,12	0	NO	NO	SI	2º ESCALÓN
136	POSTERIOR	SEVERA	5338,99	0	NO	NO	SI	2º ESCALÓN
137	POSTERIOR	MODERADA	339,65	1	SI	SI	SI	2º ESCALÓN
138	POSTERIOR	MODERADA	571,64	1	SI	SI	SI	2º ESCALÓN
139	POSTERIOR	MODERADA	8419,64	0	SI	NO	SI	2º ESCALÓN
140	POSTERIOR	MODERADA	2026,13	0	SI	NO	SI	2º ESCALÓN
141	POSTERIOR	SEVERA	148,95	0	SI	NO	NO	
142	POSTERIOR	SEVERA	72,28	0	SI	NO	NO	
143	POSTERIOR	MODERADA	287,61	0	SI	NO	SI	2º ESCALÓN
144	POSTERIOR	SEVERA	66,27	0	SI	NO	SI	2º ESCALÓN
145	POSTERIOR	MODERADA	174,63	4	SI	SI	SI	2º ESCALÓN
146	POSTERIOR	MODERADA	838,61	0	SI	NO	SI	2º ESCALÓN
147	POSTERIOR	MODERADA	484,06	1	NO	SI	SI	2º ESCALÓN
148	POSTERIOR	SEVERA	32,4	0	NO	NO	SI	2º ESCALÓN

Pacientes con demodicosis después del tratamiento

Id	TIPO BLEFARITIS_2	GRAVEDAD_2	Nº COPIAS ADN_2	Nº DEMODEX_2	SINTOMAS_2	DEMODOCISIS_2	TRATAMIENTO_2	TIPO TRATAMIENTO_2	MEJORIA SINTOMATICA_2	MEJORIA CLINICA_2
1	ANTERIOR	LEVE	3312,86	1	NO	SI	SI	1º ESCALÓN	SI	SI
2	ANTERIOR	LEVE	302,54	2	NO	SI	SI	1º ESCALÓN	SI	SI
3	ANTERIOR	LEVE	494,68	1	NO	SI	SI	1º ESCALÓN	SI	SI
4	ANTERIOR	LEVE	1322,49	5	NO	SI	SI	1º ESCALÓN	SI	SI
5	ANTERIOR	LEVE			NO		SI	1º ESCALÓN	NO	SI
6	ANTERIOR	LEVE			NO		SI	1º ESCALÓN	NO	SI
7	ANTERIOR	LEVE	339,65	0	SI	NO	SI	1º ESCALÓN	SI	SI
8	ANTERIOR	LEVE	82123,52	0	SI	NO	SI	1º ESCALÓN	SI	SI
11	ANTERIOR	LEVE			NO		NO		SI	SI
12	ANTERIOR	LEVE			NO		NO		SI	SI
13	ANTERIOR	MODERADA			SI		SI	2º ESCALÓN	SI	SI
14	ANTERIOR	MODERADA			SI		SI	2º ESCALÓN	SI	SI
21	SANO	NINGUNA	190,46	0	NO	NO	SI	1º ESCALÓN	SI	SI
22	ANTERIOR	LEVE	1431,98	0	NO	NO	SI	1º ESCALÓN	SI	SI
27	ANTERIOR	MODERADA	6443,25	0	SI	NO	SI	2º ESCALÓN	SI	SI
28	ANTERIOR	MODERADA	41618,41	1	SI	SI	SI	2º ESCALÓN	SI	SI
29	ANTERIOR	NINGUNA	1753,33	3	SI	SI	SI	1º ESCALÓN	SI	SI
30	ANTERIOR	LEVE	2375,49	4	SI	SI	SI	1º ESCALÓN	SI	SI
31	SANO	NINGUNA	1248,16	3	SI	SI	SI	1º ESCALÓN	SI	SI
32	ANTERIOR	LEVE	4027,07	0	SI	NO	SI	1º ESCALÓN	SI	SI
33	ANTERIOR	LEVE			SI		SI	1º ESCALÓN	SI	SI
34	ANTERIOR	LEVE			SI		SI	1º ESCALÓN	SI	SI
37	ANTERIOR	LEVE			NO		SI	1º ESCALÓN	SI	SI
38	ANTERIOR	LEVE			NO		SI	1º ESCALÓN	SI	SI
41	SANO	NINGUNA	69,21		NO		SI	1º ESCALÓN	SI	SI
42	SANO	NINGUNA	623,46		NO		SI	1º ESCALÓN	SI	SI
43	ANTERIOR	LEVE			NO		SI	1º ESCALÓN	SI	SI
44	ANTERIOR	LEVE			NO		SI	1º ESCALÓN	SI	SI
53	MIXTA	MODERADA	1303,51	1	NO	SI	SI	2º ESCALÓN	SI	SI
54	MIXTA	MODERADA	191,85	0	NO	NO	SI	2º ESCALÓN	SI	SI
55	MIXTA	LEVE			NO		NO		SI	SI
56	SANO	NINGUNA			NO		NO		SI	SI
57	MIXTA	MODERADA	172946,49	0	NO	NO	SI	2º ESCALÓN	SI	SI
58	MIXTA	MODERADA	15567,31	0	NO	NO	SI	2º ESCALÓN	SI	SI
59	POSTERIOR	LEVE	7445,77	6	NO	SI	SI	2º ESCALÓN	SI	SI
60	POSTERIOR	LEVE	1103,79	1	NO	SI	SI	2º ESCALÓN	SI	SI
61	ANTERIOR	LEVE	168,45	0	SI	NO	SI	2º ESCALÓN	SI	SI
62	ANTERIOR	LEVE	245,31	0	SI	NO	SI	2º ESCALÓN	SI	SI
63	MIXTA	LEVE	3884,08	0	NO	NO	SI	2º ESCALÓN	SI	SI
64	MIXTA	MODERADA	35755,31	6	SI	SI	SI	2º ESCALÓN	SI	SI
65	MIXTA	LEVE	378,56	4	NO	SI	SI	2º ESCALÓN	SI	SI
66	MIXTA	MODERADA	114,81	3	NO	SI	SI	2º ESCALÓN	SI	SI

67	ANTERIOR	LEVE	12,29	0	NO	NO	SI	1º ESCALÓN		
68	ANTERIOR	LEVE	29,7	0	NO	NO	SI	1º ESCALÓN		
69	SANO	LEVE			NO		SI	1º ESCALÓN	SI	SI
70	ANTERIOR	LEVE			NO		SI	1º ESCALÓN	SI	SI
71	MIXTA	MODERADA	18120,0 1	0	SI	NO	SI	2º ESCALÓN	SI	SI
72	MIXTA	MODERADA	13866,5 9	0	SI	NO	SI	2º ESCALÓN	SI	SI
73	MIXTA	LEVE	140,58	1	NO	SI	SI	1º ESCALÓN	SI	SI
74	MIXTA	LEVE	373,12	3	NO	SI	SI	1º ESCALÓN	SI	SI
75	MIXTA	SEVERA	191370, 52	0	NO	NO	SI	3º ESCALÓN	SI	NO
76	MIXTA	MODERADA	4687,43	0	NO	NO	SI	3º ESCALÓN	SI	NO
79	MIXTA	LEVE			NO		SI	1º ESCALÓN	SI	SI
80	MIXTA	LEVE			NO		SI	1º ESCALÓN	SI	SI
81	SANO	NINGUNA			NO		SI	1º ESCALÓN	SI	SI
82	SANO	NINGUNA			NO		SI	1º ESCALÓN	SI	SI
83	SANO	NINGUNA			NO		SI	2º ESCALÓN	SI	SI
84	MIXTA	LEVE			NO		SI	2º ESCALÓN	SI	SI
85	ANTERIOR	LEVE	1136,18	0	NO	NO	SI	1º ESCALÓN	SI	SI
86	ANTERIOR	LEVE	2516,95	0	NO	NO	SI	1º ESCALÓN	SI	SI
89	MIXTA	MODERADA	19199,0 8	7	SI	SI	SI	2º ESCALÓN	SI	SI
90	MIXTA	MODERADA	5262,33	2	SI	SI	SI	2º ESCALÓN	SI	SI
91	SANO	NINGUNA	7664,27	0	NO	NO	SI	1º ESCALÓN	SI	SI
92	SANO	NINGUNA	901,49	0	NO	NO	SI	1º ESCALÓN	SI	SI
93	SANO	NINGUNA			NO		NO			
94	SANO	NINGUNA			NO		NO			
101	SANO	NINGUNA			NO		SI	1º ESCALÓN	SI	SI
102	SANO	NINGUNA			NO		SI	1º ESCALÓN	SI	SI
107	POSTERIOR	LEVE	62,55	0	NO	NO	SI	1º ESCALÓN	SI	SI
108	POSTERIOR	LEVE	58,61	0	NO	NO	SI	1º ESCALÓN	SI	SI
111	MIXTA	LEVE	197,47	1	SI	SI	SI	2º ESCALÓN	SI	NO
112	MIXTA	LEVE	296,05	1	SI	SI	SI	2º ESCALÓN	SI	NO
113	SANO	NINGUNA	453,56	0	NO	NO	SI	1º ESCALÓN	SI	SI
114	SANO	NINGUNA	844,69	0	NO	NO	SI	1º ESCALÓN	SI	SI
115	MIXTA	SEVERA	2647,62	2	SI	SI	SI	3º ESCALÓN	NO	NO
116	MIXTA	SEVERA	567,53	0	SI	NO	SI	3º ESCALÓN	NO	NO
123	POSTERIOR	LEVE	491,11	0	SI	NO	SI	1º ESCALÓN	SI	SI
124	POSTERIOR	LEVE	1926,13	0	SI	NO	SI	1º ESCALÓN	SI	SI
125	POSTERIOR	MODERADA	450,3	1	SI	SI	SI	1º ESCALÓN	SI	SI
126	POSTERIOR	MODERADA	42,95	1	SI	SI	SI	1º ESCALÓN	SI	SI
127	SANO	NINGUNA	9,01	0	NO	NO	SI	1º ESCALÓN	SI	SI
128	SANO	NINGUNA	72,28	0	NO	NO	SI	1º ESCALÓN	SI	SI
129	POSTERIOR	LEVE	6125,24	0	NO	NO	SI	2º ESCALÓN	SI	SI
130	POSTERIOR	MODERADA	955,17	5	NO	SI	SI	2º ESCALÓN	SI	SI
143	POSTERIOR	LEVE			NO		SI	1º ESCALÓN	SI	SI
144	POSTERIOR	LEVE			NO		SI	1º ESCALÓN	SI	SI
147	ANTERIOR	LEVE			NO		SI	1º ESCALÓN	SI	SI
148	ANTERIOR	LEVE			NO		SI	1º ESCALÓN	SI	SI

Diferencia de mediciones antes y después del tratamiento

Id	Dif_N°CopiasADN_1-2	Dif_DEMODEX_1-2
1	29470,82	9
2	13071,68	
3	8362,09	1
4	40597,94	-4
7	16035,87	
8	-80820,01	
21	377,07	
22	-543,43	
27	-5805,26	
28	-35879,08	
29	8781,82	1
30	2211,35	-2
31	35291,23	1
32	33584,56	
41	48373,72	
42	18028,28	
53	782,08	4
54	3692,23	
57	-156452,13	
58	-14176,16	
59	20719,43	0
60	9355,46	0
61	3470,92	
62	138975,68	
63	8557,23	
64	64797,48	-2
65	2327,12	-3
66	1613,34	0
67	2058,27	
68	33472,89	
71	-4842,14	
72	-10978,98	
73	284,41	
74	-184,03	0
75	-9445,09	
76	63855,35	
85	15477,88	
86	17973,07	
89	-18457,47	
90	273,21	0
91	-5710,08	
92	7955,28	
107	1369,43	

108	9741,67	
111	55,04	0
112	-201,6	0
113	9855,53	
114	12,31	
115	-816,55	
116	-323,99	
123	16122,95	
124	11448,09	
125	7788,67	0
126	14230,56	0
127	11398,31	
128	13694,41	
129	-3534,43	
130	4661	2

Capítulo IX: Indicadores de Calidad

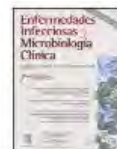
9.1 Publicaciones en revistas

Iglesias-Martín J, Tenorio-Abreu A, Rodríguez-Molins E, Jiménez Alcántara M. Severe chronic blepharitis. Torpid evolution of several years. *Enferm Infecc Microbiol Clin* (Engl Ed). 2019 Jun-Jul;37(6):410-412. English, Spanish. doi: 10.1016/j.eimc.2018.09.012. Epub 2018 Nov 15. PMID: 30447950. ISSN 0213-005X.



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Diagnóstico a primera vista

Blefaritis crónica grave. Evolución tórpida de varios años

Severe chronic blepharitis. Torpid evolution of several years

Juan Iglesias-Martín^a, Alberto Tenorio-Abreu^{b,*}, Esmeralda Rodríguez-Molins^c y Marina Jiménez Alcántara^a

^a Unidad de Gestión Clínica de Oftalmología, Hospital Juan Ramón Jiménez, Huelva, España

^b Unidad de Gestión Clínica de Microbiología, Hospital Juan Ramón Jiménez, Huelva, España

^c Unidad de Gestión Clínica de Farmacia, Hospital Juan Ramón Jiménez, Huelva, España



Caso clínico

Varón de 68 años atendido en la consulta de oftalmología por enrojecimiento y dolor en el ojo derecho de años de evolución, que ha ido empeorando en los últimos meses a pesar del tratamiento prescrito por diferentes oftalmólogos consistente en aplicación tópica de suero autólogo, ciclosporina, prednisolona, moxifloxacino y tobramicina.

un nuevo trasplante hace 3 años debido al fracaso del primero. Igualmente, requirió una intervención sobre el párpado superior del ojo derecho debido a distiquiasis. Se instila diferentes colirios de forma crónica (moxifloxacino, fluorometolona, dorzolamida y timolol).

En la primera exploración (fig. 1) presentaba telangiectasias palpebrales, secreciones oleosas en orificios de glándulas de Meibomio,



Figura 1. A) Blefaritis grave. B) Úlcera corneal que tiñe con fluoresceína sobre trasplante.

En la anamnesis no refiere hábitos tóxicos, hipertensión arterial, diabetes mellitus ni otras enfermedades sistémicas. En cuanto a sus antecedentes oftalmológicos, el paciente fue intervenido de un trasplante de córnea en dicho ojo hace 18 años y requirió

mio, pestañas distiquiásicas o ausentes de forma parcheada, junto con secreciones en la base de las mismas. A nivel del globo ocular, simbléfaron de conjuntiva inferior, hiperemia mixta y córnea con trasplante opaco, vascularizado y con una úlcera corneal sin

* Autor para correspondencia.
Correo electrónico: albetengo@hotmail.com (A. Tenorio-Abreu).

<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.09.012>

0213-005X/© 2018 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.



Figura 2. Visualización de varios ácaros *Demodex folliculorum* con microscopio óptico.

signos de infiltrado infeccioso asociado. El ojo izquierdo, a diferencia del afecto, presentaba una blefaritis leve, sin signos inflamatorios oculares.

Ante estos hallazgos el paciente se diagnosticó de rosácea ocular, que provoca blefaritis grave y adelgazamiento corneal, instaurándose tratamiento con doxiciclina oral, pomada de eritromicina al 0,5%, lubricación ocular intensa y medidas de higiene palpebral de forma diaria. Igualmente, en su ojo izquierdo se recomendó lubricación ocular e higiene palpebral diaria.

A las 4 semanas de tratamiento no presentaba mejoría. Se realizó frotis sobre la piel de los párpados y se tomaron 6 pestañas para estudio microbiológico. Mediante PCR¹ se detectaron 6.150 copias/ml de suspensión de *Demodex folliculorum*, así mismo también se visualizaron en las pestañas (fig. 2).

Evolución

Tras la confirmación de demodicosis se instaura tratamiento específico frente al parásito, que consistió en ivermectina oral 6 mg, un comprimido mañana y noche en un día, repitiéndose la misma dosis en una semana. Higiene palpebral con champú de pH neutro y después aplicar aceite de árbol de té al 50%, 2 veces al día, durante 4 semanas. También se asoció pomada de eritromicina al 0,5% por la noche durante 4 semanas.

En la revisión tras 2 semanas de tratamiento el paciente presenta una franca mejoría, con menor secreción seboreica en los

orificios de las glándulas de Meibomio y ausencia de costras en las pestañas (fig. 3). Así mismo, había ausencia de enrojecimiento ocular y de edema corneal, aunque quedando un descemetocle residual que requirió posteriormente un colgajo conjuntival. Se continuó el mismo tratamiento debido a la mejoría clínica y la confirmación microbiológica de la efectividad del mismo tras repetir la misma toma de muestras con frotis y la visualización directa con microscopía siendo negativos en ambos casos.

Después de completar las 4 semanas de tratamiento el paciente se encuentra asintomático y sin presencia de enrojecimiento ocular. Se prescribió mantener la higiene palpebral 2 veces al día con champú de pH neutro y aplicar el aceite de árbol de té una vez por semana durante 4 semanas más.

Comentario

Demodex folliculorum es un parásito de la familia de los ácaros que normalmente vive en los folículos de las pestañas². Se cree que en la mayoría de las ocasiones convive con el hospedador de forma saprofita, siendo más prevalente en edades más avanzadas³. Sin embargo, en ocasiones se le ha relacionado con afecciones cutáneas y oculares como la rosácea y blefaritis crónica^{4,5}. A pesar de que la relación de blefaritis crónica anterior y mixta con el parásito *D. folliculorum* está suficientemente documentada en la bibliografía⁴⁻⁶, normalmente *a priori* no suele ser considerado en un primer diagnóstico clínico, debido a la gran frecuencia de sobreinfecciones bacterianas. El hecho de que el paciente no responda a los tratamientos convencionales (medidas de higiene palpebral, antiinflamatorios y antibióticos) debe hacernos sospechar esta infestación parasitaria⁷⁻⁹. Por este motivo, en ocasiones el tratamiento fracasa y la blefaritis se cronifica, disminuyendo considerablemente la calidad de vida del paciente con molestias constantes¹⁰. Por tanto, en casos de blefaritis crónicas, siempre se debería pensar en la posibilidad de *D. folliculorum* como agente etiológico, que con una simple muestra de pestaña o frotis para PCR sería fácilmente detectable. Pudiéndose instaurar tratamiento específico con ivermectina aumentando considerablemente las posibilidades de éxito terapéutico. Aunque en algunos estudios se ha mostrado que la asociación de ivermectina con metronidazol ha sido superior a ivermectina sola¹¹, en el presente caso no se utilizó por estar con tratamiento previo con doxiciclina, observándose una evolución y hallazgos microbiológicos favorables, por tanto, no considerándose necesario la utilización de metronidazol.



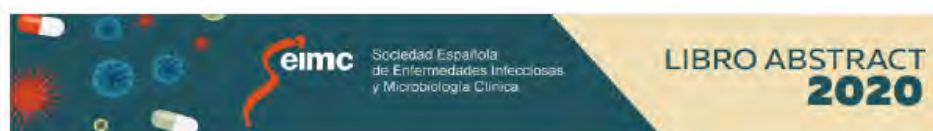
Figura 3. A) Párpado superior con ausencia de collarotes en las pestañas. B) Párpado inferior con madarosis y ausencia de secreciones.

Bibliografía

1. Tenorio-Abreu A, Sánchez-España JC, Naranjo-González LE, González-Gallego MC, Hidalgo-Grass C, Ruiz-Frutos C. Development of a PCR for the detection and quantification of parasitism by *Demodex folliculorum* infestation in biopsies of skin neoplasms periorcular area. *Rev Esp Quimioter*. 2016;29:220–3.
2. Palopoli MF, Fergus DJ, Minot S, Pei DT, Simison WB, Fernandez-Silva I, et al. Global divergence of the human follicle mite *Demodex folliculorum*: Persistent associations between host ancestry and mite lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:15958–63.
3. López-Ponce D, Zuazo F, Cartes C, Salinas-Toro D, Pérez-Valenzuela C, Valenzuela F, et al. High prevalence of *Demodex* spp. infestation among patients with posterior blepharitis: Correlation with age and cylindrical dandruff. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2017;92:412–8.
4. Forton FMN. Elucidating the role of *Demodex folliculorum* in the pathogenesis of rosacea: Exciting first steps. *Br J Dermatol*. 2018;179:252–3.
5. Sędzikowska A, Osęka M, Skopiński P. The impact of age, sex, blepharitis, rosacea and rheumatoid arthritis on *Demodex* mite infection. *Arch Med Sci*. 2018;14:353–6.
6. Mongi F, Laconte L, Casero RD. *Demodex* genus: Colonizing parasites of healthy people or mites associated with ocular pathology? [Article in Spanish]. *Rev Argent Microbiol*. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2017.09.002>, pii: S0325-7541(17)30179-7.
7. Yactayo-Miranda Y, Ta CN, He L, Kreutzer TC, Nentwich MM, Kampik A, et al. A prospective study determining the efficacy of topical 0.5% levofloxacin on bacterial flora of patients with chronic blepharo conjunctivitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2009;247:993–8.
8. Prozornala LP, Brzheviski VV. Efficacy of physiotherapy and hygienic procedures in treatment of adults and children with chronic blepharitis and dry eye syndrome. *Vestn Oftalmol*. 2013;129:68–70, 72–73.
9. Duncan K, Jeng BH. Medical management of blepharitis. *Curr Opin Ophthalmol*. 2015;26:289–94.
10. Bernardes TF, Bonfili AA. Blepharitis. *Semin Ophthalmol*. 2010;25:79–83.
11. Salem DA, El-shazly A, Nabih N, El-Bayoumy Y, Saleh S. Evaluation of the efficacy of oral ivermectin in comparison with ivermectin-metronidazole combined therapy in the treatment of ocular and skin lesions of *Demodex folliculorum*. *Int J Infect Dis*. 2013;17:e343–7.

9.2 Libro abstract

Título: Determinación de la densidad de *Demodex folliculorum* en pacientes con blefaritis mediante técnica molecular de PCR. Libro de Abstract Virtual SEIMC 2020, 25/08/2020. Código del abstract: 456. ISBN-978-84-09-22864-5.



CERTIFICADO DE PARTICIPACIÓN

La Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC):

CERTIFICA QUE:

A. Tenorio-Abreu, J. Iglesias-Martin, A. Guzmán- González, A. Peña-Monje, J.M. Saavedra Martin, F. Franco Álvarez De Luna

Son autores del abstract con título:

Determinación de la densidad de *Demodex folliculorum* en pacientes con blefaritis mediante técnica molecular de PCR.
(Código del abstract: 456)

Presentado para su publicación en el LIBRO DE ABSTRAC VIRTUAL SEIMC 2020 editado por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) en agosto de 2020 (ISBN - 978-84-09-22864-5) y accesible en la web de la SEIMC.

Y para que conste se expide el presente certificado en Madrid, a 25 de agosto de 2020.

DOCUMENTO FIRMADO DIGITALMENTE

Dr. Rafael Cantón
Presidente del Comité Científico

Dr. Jordi Vila
Presidente de la SEIMC

9.3 Participación en congresos

Comunicaciones en panel (posters):

Poster

Título: Desarrollo de una PCR para la detección y cuantificación de *D. folliculorum* en blefaritis crónica. XXIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Madrid, 25/05/2019.



CERTIFICADO DE PARTICIPACIÓN

El Presidente del Comité Científico del XXIII Congreso SEIMC 2019, en nombre de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

CERTIFICA QUE:

A. Tenorio-Abreu, J. Iglesias Martín, E. Rodríguez-Molins, A.F. Guzman González, J.M. Saavedra Martín, A.S. Molleja García, F. Franco Álvarez De Luna

han realizado la presentación POSTER de la comunicación con título:

"Desarrollo de una PCR para la detección y cuantificación de *D. folliculorum* en blefaritis crónica"

en el XXIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, celebrado en Madrid, del 23 al 25 de mayo de 2019.

Y para que conste se expide el presente certificado en Madrid a 25 de mayo de 2019.

DOCUMENTO FIRMADO DIGITALMENTE

Dr. Rafael Cantón
Presidente del Comité Científico

0386

Poster

Título: Determinación de la densidad de Demodex folliculorum en pacientes con blefaritis mediante técnica molecular de PCR. I Jornadas de Doctorado en Ciencias de la Salud, Huelva, 19/09/2019.



La Comisión Académica del programa de Doctorado en Ciencias de la Salud de la Universidad de Huelva, CERTIFICA:

Que Don Juan Manuel Iglesias Martín presentó durante las I Jornadas de Doctorado en Ciencias de la Salud, celebradas el día 19 de septiembre de 2019, el poster titulado “Determinación de la densidad de Demodex folliculorum en pacientes con blefaritis mediante técnica molecular de PCR”.

Y para que así conste, a los efectos oportunos,
en Huelva a 19 de septiembre de 2019

LOZANO
ROJAS OSCAR
MARTIN -
31869234C

Firmado
digitalmente por
LOZANO ROJAS
OSCAR MARTIN -
31869234C
Fecha: 2019.09.27
10:51:08 +02'00'

Óscar M. Lozano Rojas

Coordinador del Programa en Ciencias de la Salud

Comunicaciones orales:

Título: *¿Demodex o de moda?* Jornada de Córnea y Superficie Ocular. LII Congreso Nacional de la Sociedad Andaluza de Oftalmología, Málaga, 25/01/2020.





UNIVERSIDAD DE HUELVA

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

TESIS DOCTORAL

Autor: Juan Iglesias Martín

Tesis de Doctorado dirigida por el Prof. Dr. D. Carlos Ruiz Frutos

y el Dr. D. Alberto Tenorio Abreu

HUELVA 2025