



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

Asociación de *Malassezia spp.* con dermatitis  
atópica en pacientes pediátricos.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
ESPECIALISTA EN:

DERMATOLOGÍA PEDIÁTRICA

P R E S E N T A:

Dra. Karina Marianela Landín Romero

TUTORES:

Dra. Adriana María Valencia Herrera  
M. en C. Mirna Eréndira Toledo Bahe  
Dra. Francisca Hernández Hernández  
M. en C. Alejandro Bonifaz Trujillo



CIUDAD DE MÉXICO

FEBRERO 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

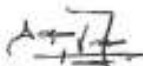
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## HOJA DE FIRMAS

---

**DR. SARBELIO MORENO ESPINOSA**  
DIRECTOR DE ENSEÑANZA Y DESARROLLO ACADÉMICO  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ



---

**DRA. ADRIANA MARÍA VALENCIA HERRERA**  
MÉDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE DERMATOLOGÍA PEDIÁTRICA  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

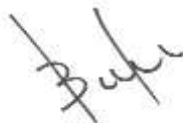
---

**M. EN C. MIRNA ERÉNDIRA TOLEDO BAHENA**  
MÉDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE DERMATOLOGÍA PEDIÁTRICA  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ



---

**DRA. FRANCISCA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ**  
UNIDAD DE MICOLOGÍA.  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA.  
FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO



---

**M. en C. ALEXANDRO BONIFAZ TRUJILLO**  
DEPARTAMENTO DE MICOLOGÍA DEL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO "DR.  
EDUARDO LICEAGA"

## **DEDICATORIA**

### **A mi esposo e hijos:**

Les dedico este trabajo de investigación por brindarme su cariño; dándole a cada uno de mis días la fortaleza para cumplir nuestros sueños.

### **A mis padres:**

En especial a ellos que no escatimaron esfuerzos y me apoyaron incondicionalmente con su confianza y perseverancia en los momentos que más los necesite; gracias a su comprensión este trabajo se hizo realidad.

### **A mis tutores de Tesis:**

Quienes con sus conocimientos, profesionalismo y experiencia guiaron el desarrollo y culminación de la presente investigación previo a la obtención del título en Subespecialidad de Dermatología Pediátrica.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>6</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>8</b>
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>8</b>
<b>DERMATITIS ATÓPICA</b> .....	<b>8</b>
Definición .....	8
Epidemiología .....	8
Clínica .....	9
Criterios diagnósticos HANIFIN Y RAJKA .....	9
Escalas de gravedad de la dermatitis atópica .....	10
Índice de SCORAD (Severity Scoring of Atopic Dermatitis) .....	10
Fisiopatología .....	11
Disfunción de la barrera cutánea .....	11
Factores ambientales .....	12
Disfunción inmunológica .....	12
Microbioma .....	14
<b>MALASSEZIA SPP. Y SU INTERACCIÓN CON LA PIEL EN DERMATITIS ATÓPICA</b> .....	<b>15</b>
Sensibilización de <i>Malassezia spp.</i> .....	16
Inmunoanálisis para detección de IgE específica para <i>Malassezia spp.</i> .....	17
Estudios previos de <i>Malassezia spp.</i> y DA .....	19
Métodos de identificación de <i>Malassezia spp.</i> .....	24
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>26</b>
<b>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>26</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>26</b>
<b>OBJETIVOS DEL ESTUDIO</b> .....	<b>26</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>27</b>
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>27</b>
<b>CONSIDERACIONES ÉTICAS</b> .....	<b>31</b>
<b>CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD</b> .....	<b>33</b>
<b>PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	<b>34</b>
<b>DESCRIPCIÓN DE VARIABLES</b> .....	<b>35</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	<b>43</b>
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>45</b>
<b>CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES</b> .....	<b>47</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>48</b>
<b>LIMITACIÓN DEL ESTUDIO</b> .....	<b>50</b>
<b>ANEXOS</b>	
<b>ANEXO 1</b>	
Criterios diagnósticos de dermatitis atópica .....	<b>51</b>

<b>ANEXO 2</b>	
Índice de SCORAD .....	42
<b>ANEXO 3</b>	
Hoja de recolección de datos .....	53
<b>ANEXO 4</b>	
Fotografías clínicas .....	56
<b>ANEXO 5</b>	
Examen directo de escamas .....	60
<b>ANEXO 6</b>	
Morfología macroscópica y microscópica de cultivos ADM.....	61
<b>ANEXO 7</b>	
Prueba de catalasa .....	63
<b>ANEXO 8</b>	
Morfología microscópica de aislamientos .....	64
<b>ANEXO 9</b>	
Gel de agarosa de extracción de DNA .....	66
<b>ANEXO 10</b>	
Gel de agarosa de PCR .....	68
<b>ANEXO 11</b>	
Gel de agarosa de purificación de PCR.....	70
<b>ANEXO 12</b>	
Gel de agarosa de restricción enzimática .....	72
<b>ANEXO 13</b>	
Guía de tamaño de ampliación, puntos de corte y tamaño de los fragmentos por las enzimas Hhal y BTSC1 .....	76
<b>ANEXO 14</b>	
Gráficas.....	78

## RESUMEN

**TÍTULO:** Asociación de *Malassezia spp.* con dermatitis atópica en pacientes pediátricos.

**INTRODUCCIÓN:** La dermatitis atópica (DA) es una enfermedad inflamatoria crónica, recurrente y pruriginosa, caracterizada por xerosis y áreas de liquenificación. El microbioma de la piel es específico para las diferentes topografías del cuerpo, se conoce que del 1% al 22% de su composición casi exclusivamente *Malassezia spp.*

Durante los últimos años, la investigación de la DA se ha centrado en la posible correlación patogénica entre esta enfermedad y *Malassezia spp.* como factor exacerbante. Esto ha dado lugar a la publicación de estudios tanto en población de niños y adultos sobre el papel de *Malassezia spp.* y la evolución clínica de DA.

**OBJETIVO:** Describir la frecuencia de colonización e identificación de *Malassezia spp.* en pacientes pediátricos con DA comparado con niños sin DA.

**PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA:** La dermatitis atópica es un trastorno inflamatorio recurrente crónico que va incrementando su prevalencia a nivel mundial con mayor predisposición para la edad pediátrica. Esta entidad clínica se asocia a cambios del microbioma (disbiosis) actualmente se conoce extensamente la asociación con bacterias comensales y, lo que ha descrito la literatura con respecto a los hongos es que reaccionan específicamente a *Malassezia spp.*, lo que lleva a una inflamación de la piel que puede exacerbar la dermatitis subyacente. No existen estudios en pacientes pediátricos mexicanos que demuestren esta asociación de *Malassezia spp.* con dermatitis atópica. Los estudios actuales no son concluyentes para explicar si las especies que colonizan a estos pacientes son diferentes a las observadas en pacientes sanos; se desconoce también el papel patogénico y su relación con la gravedad.

**JUSTIFICACIÓN:** Actualmente se desconoce el papel de *Malassezia spp.* en DA; son necesarios estudios que aporten información sobre la relación de su colonización con la gravedad de esta enfermedad y que brinden conocimientos científicos para investigaciones futuras.

**METODOLOGÍA:** El diseño de estudio fue prospectivo, transversal comparativo, observacional. Se estudió a pacientes pediátricos con diagnóstico de dermatitis atópica menores de 18 años, género femenino o masculino y controles sanos del mismo grupo de edad. Se estudiarán 56 pacientes con DA y 13 pacientes sanos, se realizó a todos los pacientes toma de muestra de escama de piel por raspado para estudio bioquímico y molecular que permitió identificar la especie de *Malassezia*. El período de estudio fue desde noviembre del 2019 hasta mayo 2020.

**PLAN DE ANÁLISIS:** Las variables de estudio se registraron en una base de datos utilizando el programa estadístico SPSS versión 24. Las variables cualitativas se expresaron en frecuencias absolutas y porcentajes, las cuantitativas (de acuerdo con la distribución de los datos) en medidas de tendencia central (media o mediana) y dispersión (desviación estándar o rangos intercuartiles).

**RESULTADOS:** Se estudiaron 69 pacientes, 56 con diagnóstico de DA y 13 en el grupo control. La media de edad fue de 8 años, con predominio de sexo femenino en un 58%. La procedencia en su mayoría de Estado de México con 55.1% y Ciudad de México con 30.4%. Los fototipos en ambos grupos más prevalentes fueron III 30% y IV 60.9%. De los antecedentes de atopia familiar de primer grado en el grupo de DA encontramos: DA en el 32.1%, rinitis alérgica en el 23.2% y asma en el 30.5%. Con respecto a los patológicos personales relacionados con atopia: alergia alimentaria en el 32.1%, rinitis alérgica 30.3%, asma 21.4% y alergia a factores ambientales en 19.6%. Se cumplieron los criterios de Hanifin y Rajka en el grupo de DA. Al realizar el examen directo de la muestra de escama de piel obtuvimos en el grupo de DA un 33.33% positivos para levaduras y en el grupo control el 1.5% con  $p < 0.05\%$ . Del crecimiento de cultivos de *Malassezia spp.* en el grupo DA el 12.5% y en el grupo control el 30.77% con una  $p > 0.05\%$ . El crecimiento de bacterias ocurrió en 44.64% del grupo DA y en el grupo control no existió. Se logró identificar las especies en el grupo con DA 5 *Malassezia furfur* y 1 *Malassezia globosa*; en el grupo control 2 *Malassezia furfur* y 1 *Malassezia globosa*. De éstas la topografía más frecuente fue cabeza y tronco.

**DISCUSIÓN:** DA es una enfermedad inflamatoria crónica, recurrente y pruriginosa que afecta con mayor frecuencia a niños y con un ligero predominio en mujeres; además de reportar que hasta el 70% presentan antecedentes familiares o personales de atopia lo cual se correlaciona con los resultados encontrados. Figueras y cols. establecen la importancia del daño en la estructura y en la función barrera cutánea que permite por un lado la penetración de alérgenos, y por otro pone en riesgo la interacción entre ésta, el microbioma cutáneo y los factores ambientales; tomando importancia el papel de *Malassezia spp.* en la patogenia de la enfermedad. En la revisión de estudios previos existe una gran controversia ya que, aunque hay quienes encuentran una relación directa entre la colonización de *Malassezia spp.*, de acuerdo con su topografía y su gravedad; así como quienes no revelan diferencia en la frecuencia de colonización de pacientes sanos vs DA. Nosotros reportamos crecimiento de *Malassezia spp.* en el 12.5% del grupo DA y en el grupo control el 30.77% con mayor frecuencia en DA leve ( $p > 0.05\%$ ), y de las especies que se identificaron son *Malassezia furfur* y *Malassezia globosa* con predominio por áreas seboreicas como cabeza y tronco.

**CONCLUSIONES:** En nuestra muestra no se logró establecer una correlación entre la gravedad de dermatitis atópica y la colonización de *Malassezia spp.* comparando pacientes con esta enfermedad y pacientes sanos, se aislaron *M. furfur* y *M. globosa* en ambos grupos sin diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0.05\%$ ), lo que puede corresponder a la microbiota fúngica esperada. La topografía más frecuente de colonización fueron cabeza y tronco lo que se justifica por la predilección de áreas seboreicas del microorganismo. Se requiere estudios que incluyan IgE específica para establecer la respuesta inmunológica de estos pacientes a *Malassezia spp.* como alérgeno que pueda agravar la DA.



## ANTECEDENTES

La dermatitis atópica (DA) afecta con mayor frecuencia a niños y su prevalencia se ha duplicado o triplicado en los países de primer mundo en los últimos 30 años.<sup>1,2,3</sup> Entre un 15-30% de los casos corresponde a población infantil y un 2-10% de los adultos están afectados.<sup>1,3</sup> La DA es una enfermedad heterogénea y multifactorial que se expresa en diferentes fenotipos basada en la interacción entre factores genéticos y ambientales, alteraciones en la función de barrera cutánea y la desregulación inmunitaria.<sup>4,5</sup> La pérdida de integridad en la piel permite por un lado la penetración de alérgenos, y por otro pone en riesgo la interacción entre esta barrera cutánea, su microbioma y los factores externos a los que se encuentra expuesto.<sup>5,6</sup>

Las levaduras del género *Malassezia spp.* son parte de este microbioma y se encuentran en 75-80% de personas sanas;<sup>4,7</sup> residen a nivel de epidermis y en el infundíbulo del folículo, lo que le da gran oportunidad de interactuar con múltiples componentes del sistema inmunológico.<sup>8</sup> Los mecanismos por los cuales puede contribuir a la patogenia de la DA no se entienden completamente.<sup>7</sup> Se acepta que en la DA existe sensibilización a múltiples alérgenos generando anticuerpos IgE específicos que inducen la liberación de citoquinas pro-inflamatorias. Además, induce células T auto-reactivas que reaccionan de forma cruzada entre las proteínas fúngicas y sus homólogos humanos. Estos mecanismos contribuyen a la inflamación de la piel en DA influyendo así en la evolución de la enfermedad.<sup>1,8</sup>

Varios estudios recientes reportaron una posible correlación entre la gravedad de DA y la sensibilización mediada por IgE a *Malassezia spp.*; siendo aún controversial este aspecto ya que ninguno ha comprobado su hipótesis.<sup>1,3</sup>

## DERMATITIS ATÓPICA

### DEFINICIÓN

La Academia Americana de Dermatología (AAD) y la Academia Americana de Asma, Alergia e Inmunología (ACAAI) definen a la DA como una dermatosis inflamatoria, crónica, pruriginosa y recurrente que se caracteriza por **xerosis, eritema y liquenificación**. Comúnmente se presenta en la población pediátrica, pero también puede afectar a los adultos.<sup>3,9</sup>

### EPIDEMIOLOGÍA

La incidencia y prevalencia exactas de la DA son difíciles de establecer, ya que muchos de los casos leves no se diagnostican.<sup>3</sup> Las estimaciones recientes indican que, la prevalencia de la DA ha aumentado tres veces en los últimos 30 años, afectando actualmente entre el 15-30% de los niños y el 2-10% de los adultos de los países desarrollados.<sup>1,3</sup>

Un 45% de los pacientes con DA inicia con síntomas entre los 3 y 6 meses de edad, el 60% de los pacientes la desarrollan en el primer año de vida y el 90% a los 5 años.<sup>2,10</sup> La mayoría de los individuos afectados presentarán una remisión espontánea antes de la adolescencia, entre el 10% y el 30% no lo hacen. Sólo un pequeño porcentaje debuta en la edad adulta.<sup>2,9</sup>

Existe un ligero predominio de mujeres a hombres, y aproximadamente el 70% de los pacientes tienen antecedentes familiares de enfermedades atópicas, como DA, asma o rinitis alérgica.<sup>7</sup>

#### CLINICA

Las guías clínicas tanto de la ACAAI y como de la AAD coinciden en que la DA se diagnostica clínicamente por la historia clínica del paciente, los hallazgos clínicos característicos en el examen físico y la exclusión de otras dermatosis.<sup>10,11</sup>

Los hallazgos clínicos notables incluyen eritema, edema, xerosis, erosiones, excoriaciones, exudado, formación de costras y liquenificación, pero estos varían según la edad del paciente y la cronicidad de las lesiones.<sup>10</sup> Las guías actuales de la ACAAI establecen el aspecto típico de acuerdo con la cronicidad de las lesiones como pruriginosas, pápulo-vesiculares eritematosas asociadas con excoriación y exudado seroso en el contexto agudo, mientras que los hallazgos de liquenificación, pápulas y excoriaciones puede observarse en pacientes con DA crónica. En contraste, las directrices de la AAD profundizan en criterios estandarizados basados en esquemas diagnósticos revisados de Hanifin y Rajka.<sup>11,12</sup>

#### CRITERIOS DE DIAGNÓSTICO HANIFIN Y RAJKA

Se han desarrollado reuniones internacionales para estandarizar criterios de diagnóstico para DA; uno de los más antiguos y reconocidos son los de Hanifin y Rajka desde 1980 (tabla 1),<sup>11,12</sup> que fueron consensados por el grupo de trabajo del Reino Unido años posteriores, requieren que se cumplan 3 de 4 criterios mayores y 3 de 23 criterios menores.<sup>11</sup> Se encuentran validados y se utilizan a menudo en ensayos clínicos; estos criterios al ser extensos son difíciles de manejar en la práctica clínica.<sup>10</sup>

<b>Tabla 1. CRITERIOS DIAGNÓSTICO DE DERMATITIS ATÓPICA</b>	
Hanifin y Rajka (1980), modificados en 1997 por The Joint Task Force on Practice Parameters. (AAAAI, ACAAI, JCAAI)	
El diagnóstico requiere al menos de tres criterios mayores más tres menores.	
<b>Criterios mayores:</b>	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Prurito</li> <li>2. Lesiones con morfología y distribución típica               <ol style="list-style-type: none"> <li>a. Liquenificación áreas flexoras en adultos</li> <li>b. Afección facial, áreas flexoras y superficies extensoras en los niños y jóvenes</li> </ol> </li> <li>3. Dermatitis crónica o recurrente</li> <li>4. Historia familiar o personal de atopia (asma, rinoconjuntivitis, urticaria contacto, dermatitis atópica) respiratoria o cutánea.</li> </ol>	
<b>Criterios menores:</b>	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Xerosis</li> <li>2. Ictiosis/hiperlinearidad palmar/queratosis pilar</li> <li>3. Reactividad cutánea inmediata (tipo I)</li> <li>4. Elevación de valores séricos de IgE</li> <li>5. Edad de comienzo temprano</li> <li>6. Susceptibilidad a infecciones cutáneas y alteración de la inmunidad celular.</li> </ol>	

7. Dermatitis inespecífica de manos y pies	
8. Eccema de pezón	
9. Queilitis	
10. Conjuntivitis recurrente	
11. Pliegue infraorbitario de Dennie Morgan	
12. Oscurecimiento periorbital	
13. Palidez facial/eritema facial	
14. Pitiriasis alba	
15. Pliegue anterior del cuello	
16. Prurito a la sudoración	
17. Acentuación perifolicular	
18. Dermografismo blanco/blanqueamiento retardado	
19. Queratocono	
20. Catarata subcapsular anterior	
21. Evolución influenciada por factores ambientales o emocionales	
22. Intolerancia a alimentos	
23. Intolerancia a lana y detergentes	

Fuente: Hanifin. Et al.<sup>12</sup>

#### *ESCALAS DE GRAVEDAD DE LA DERMATITIS ATÓPICA*

Para la medición de gravedad de la enfermedad existen 28 escalas diferentes, sin que se haya determinado un estándar de oro. Estas escalas usan varios métodos que incluyen características y extensión objetivas, y algunas escalas incorporan características subjetivas de la DA.<sup>19,20,21</sup> Las escalas de gravedad más utilizadas son el índice SCORAD, el área de eccema y el índice de gravedad (EASI), la evaluación global del investigador (IGA) y el puntaje de gravedad de la dermatitis atópica de seis áreas y seis signos (SASSAD). Estas escalas se utilizan principalmente en la práctica clínica y para ensayos clínicos.<sup>4,21</sup>

#### *ÍNDICE DE SCORAD (Severity Scoring of Atopic Dermatitis)*

El índice SCORAD fue diseñado y aprobado por la European Task Force on Atopic Dermatitis en 1993,<sup>4,12</sup> su uso está basado en la estandarización de los resultados de investigaciones científicas que valoran la gravedad de esta patología.<sup>12,22</sup> El índice SCORAD consiste en la interpretación de tres parámetros que incluyen:

1. El 20% de la puntuación dado por la medición de extensión de la enfermedad usando la “regla de los 9” y según edad (menores y mayores de 2 años).
2. Valoración de 6 signos clínicos (eritema, edema, exudación, excoriación, liquenificación, xerosis) con una escala de valores del 0-3 según la intensidad, los síntomas son medidos en una parte representativa del cuerpo. Corresponde al 60% de total.
3. El 20% restante incluye una escala analógica visual de síntomas subjetivos: prurito y pérdida del sueño; que se promedia en los últimos 3 días o noches. Valorada de 0 a 10.

Es esencial utilizar la lesión más representativa en lugar de la lesión más grave o leve. La enfermedad se clasifica como leve <15, moderada 15-40 o grave >40. La puntuación máxima es 103.<sup>23,24</sup> Ver anexo 2.

### **FISIOPATOLOGÍA**

En la DA se presentan distintos fenotipos, alteraciones de la función de barrera y la desregulación inmunitaria, todas estas alteraciones se relacionan de manera estrecha y no se conoce el orden secuencial del fenómeno primario implicado.<sup>2,7</sup>

La literatura reporta que las tasas de concordancia entre los gemelos monocigóticos son del 77%, en comparación con el 15% de los gemelos dicigóticos, lo que respalda una fuerte contribución genética al desarrollo de esta patología.<sup>7</sup>

El modelo original de patogénesis de la DA atribuyó la enfermedad a un desequilibrio en la respuesta T mediada por células Th1 versus Th2; sin embargo, las teorías continúan evolucionando con un enfoque reciente en nuevas vías inmunológicas y alteraciones de la barrera; esto ha cambiado por la identificación y caracterización de los múltiples agentes implicados en el proceso.<sup>7</sup> Actualmente se describen dos hipótesis importantes; la primera es la llamada teoría de «fuera adentro», en la que se postula que una alteración de la función barrera primaria induciría cambios inmunológicos secundarios. La otra, llamada teoría de «dentro afuera», sostiene que una desregulación inmunitaria inicial conduciría a la aparición de la enfermedad, siendo los cambios de barrera epifenómenos. Estas dos hipótesis no son excluyentes entre sí, sino que podrían explicar vías patogénicas distintas, según el tipo de pacientes. De este modo, la primera teoría se aplicaría a esos pacientes con mutaciones en el gen de la filagrina, entre otros; en cambio, la segunda explica la enfermedad en pacientes con polimorfismos en genes del receptor alfa de la IL-4 y la IL-13, entre otros.<sup>2</sup>

### **DISFUNCIÓN DE LA BARRERA CUTÁNEA**

La piel proporciona una barrera física donde el estrato córneo es parte esencial por su estructura compuesta de queratinocitos diferenciados, proteínas estructurales (filagrina, involucrina y loricina) y lípidos (ceramidas).<sup>2,13</sup> Los filamentos de queratina están estrechamente formados por moléculas de filagrina, y los productos de degradación de la filagrina son una fuente importante no solo de hidratación del estrato córneo, sino también para mantener su pH. Esto es importante, ya que la acidificación por los metabolitos de filagrina (ácido trans-urocánico) ayuda a mantener la integridad de la barrera cutánea.<sup>13</sup>

Las alteraciones y deficiencias en las proteínas y lípidos del estrato córneo que tienen los pacientes atópicos se expresan con una barrera cutánea alterada.<sup>9</sup> En 2006, las primeras mutaciones de pérdida de función en el gen de la filagrina (FLG) se identificaron como principal factor predisponente genético para ictiosis vulgar así como para DA; esto respaldó la hipótesis "fuera a dentro", es decir, que la interrupción funcional de la barrera epidérmica es el proceso patógeno primario, lo que facilita el reconocimiento de alérgenos, irritantes y microorganismos en el inicio de la cascada inflamatoria. La deficiencia de filagrina afecta a numerosas vías, incluida la interrupción de la diferenciación de queratinocitos, alteración de la integridad y cohesión del corneocito, disminución en la retención de agua, formación de lípidos alterada con mayor susceptibilidad a infecciones cutáneas. El aumento de la pérdida de agua transepidérmica se manifiesta en los pacientes con xerosis de manera difusa, incluso cuando el paciente no está en fase inflamatoria.<sup>9</sup> La disminución del factor de hidratación natural aumenta el pH del estrato córneo, normalmente ácido, con un efecto dependiente del alelo afectado, por lo que los portadores de mutación FLG homocigotos tienen los niveles más altos de pH. Esto permite la proliferación de bacterias patógenas,

así como la activación de serinproteasas (KLK5 y KLK7) que degradan los corneodesmosomas y enzimas clave en el metabolismo de los lípidos con activación de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .<sup>2</sup> El manto ácido también es un requisito para la formación de ceramidas, los lípidos más importantes que se encuentra en la matriz intracelular del estrato córneo, lo que influye directamente en la función de la barrera de la piel.<sup>7,13</sup>

Los defectos en las proteínas epidérmicas estructurales descritos anteriormente dan lugar a un sitio para la sensibilización a los antígenos. Las mutaciones de FLG están asociadas con asma atópica, rinitis alérgica, alergia al níquel y alergia a los alimentos, lo que sugiere que conducen a un aumento de la exposición cutánea al alérgeno. De acuerdo con esta hipótesis, la sensibilización cutánea tiene particular interés para alérgenos alimentarios como parte del concepto emergente de la exposición dual, que establece que el antígeno alimentario a través de una barrera cutánea dañada conduce a la sensibilización, mientras que la exposición oral a través del intestino conduce a la tolerancia.<sup>13</sup>

### **FACTORES AMBIENTALES**

Ciertos factores ambientales juegan un papel importante en la alteración de la función de barrera cutánea; cuando ésta se rompe, la exposición al antígeno se ve facilitada por las células presentadoras de antígeno en la epidermis. Esto concluye en que cualquier factor ambiental que tenga un impacto adverso en la integridad de la piel aumenta tanto el riesgo como la gravedad de la DA. El factor ambiental local más importante es el daño mecánico, incluido el rascado constante, grado de cloración del agua, contaminantes industriales, uso de detergentes, exposición al tabaco en la edad prenatal y en la infancia, y la liberación de proteasas exógenas (por ejemplo, ácaros del polvo doméstico).<sup>2,13</sup>

El aseo de la piel también puede contribuir al daño mecánico, generando una controversia para determinar la frecuencia óptima del baño en niños con DA. Tsakok, et al.,<sup>13</sup> menciona que diversos estudios favorecen el baño frecuente versus a los que prefieren recomendarlo de forma infrecuente. Las propiedades inherentes del agua utilizada para el lavado también pueden jugar un papel importante.<sup>13</sup>

Otros factores, como el estrés, inducen cambios en la secreción de glucocorticoides generando inhibición de la síntesis de ceramidas, colesterol y ácidos grasos libres de la piel.<sup>2</sup> Finalmente la prevalencia de DA tiene una estrecha relación con los cambios climáticos, siendo mayor en áreas con alta calefacción interior, menor humedad relativa, temperaturas medias más bajas, mayor precipitación y menor índice UV. Un análisis ecológico mundial utilizando los datos de la Fase III de ISAAC (Estudio Internacional del Asma y Alergias en la Infancia) informó una asociación directamente positiva entre la prevalencia de DA a nivel de país y ciertas medidas de exposición a la radiación ultravioleta (UV), estas asociaciones fueron significativas entre los jóvenes de 13 a 14 años, pero no entre los de 6 a 7 años.<sup>13</sup>

### **DISFUNCIÓN INMUNOLÓGICA**

La piel de un paciente con DA se encuentre o no afectada es anormal, con una inflamación crónica presente incluso entre brotes;<sup>7</sup> esta inflamación cutánea es secuencial y progresiva. Inicialmente, el daño en la estructura y en la función de barrera de la piel permite por un lado la penetración de alérgenos, y por otro pone en riesgo la interacción entre ésta, el microbioma cutáneo y los factores ambientales.<sup>2</sup>

El deterioro en la función de la barrera epidérmica puede desencadenar directamente la respuesta inmunológica, un concepto apoyado por modelos murinos como los ratones deficientes de filagrina que muestran una dermatitis eccematosa espontánea con un aumento de IgE. La deficiencia de filagrina se asocia con una mayor penetración percutánea de microorganismos y alérgenos, con una reducción de los umbrales inflamatorios a irritantes y haptenos. El daño epitelial conduce a la activación inmune innata, incluida la liberación de citoquinas proinflamatorias (TSLP) y quimiocinas por queratinocitos. Se ha planteado la hipótesis de que las células dendríticas dérmicas son el factor de enlace entre la exposición al alérgeno y las lesiones inflamatorias posteriores.<sup>2,13</sup> Estas células dendríticas presentan receptores con mayor afinidad para IgE formando la unión con el antígeno y dan como resultado una cascada inflamatoria, con la posterior presentación de antígenos por células de Langerhans residentes en la piel.<sup>13</sup>

Las células dendríticas interactúan con los linfocitos T para producir quimiocinas que atraen linfocitos adicionales al área y junto a los queratinocitos promueven la diferenciación de las células Th2. Las citocinas producidas por las células Th2 contribuyen a la barrera dañada al inhibir la maduración del estrato córneo, perpetuando un círculo vicioso de daño.<sup>7</sup>

Incluso en zonas de piel no afectadas, los pacientes con DA muestran estas alteraciones con liberación de citoquinas de inmunidad innata. Existe evidencia de una infiltración de células Th2 y Th22, así como un aumento de las citoquinas de la vía Th2 (IL-4, IL-5, IL-13, IL-31, IL-33 y TSLP).<sup>2,13</sup>

La respuesta Th2 parece dominar a lo largo de la evolución de la enfermedad, lo cual se ha demostrado con la buena respuesta a ser tratados con fármacos anti-IL-4 y 13, así como a través de estudios mediante GWAS. No obstante, otros ejes de citoquinas, como el Th17 y el Th22, se han implicado recientemente tanto en la iniciación como en el mantenimiento de la DA.<sup>2</sup>

La piel con DA tiene un número reducido de péptidos antimicrobianos, que se atribuye al aumento de la expresión de las citocinas IL-4 e IL-13. Esta inmunomodulación permite una mayor colonización de *Staphylococcus aureus* y un aumento de las infecciones en la piel; *S. aureus* disminuye aún más la resistencia de la barrera a través de las serin-proteasas degradantes.<sup>7</sup>

En las fases agudas hay un engrosamiento cutáneo con aparición de fibras nerviosas y un denso infiltrado inflamatorio formado por linfocitos Th2, Th22, células dendríticas epidérmicas y, en menor medida, linfocitos Th17. Las citoquinas producidas por estos linfocitos (IL-4, 13, 17 y 22), así como los otros productos (CCL-5, 13 y 18), contribuyen a la inhibición de la diferenciación de los queratinocitos (inhiben el complejo de diferenciación epidérmica, con lo que suprimen la diferenciación terminal de proteínas como la filagrina, loricrina e involucrina), estimulación de serin-proteasas (sobre todo KLK7) y alteración en la producción de lípidos. Por otro lado, se estimula la liberación de más TSLP por parte del queratinocito que amplifican la respuesta Th2 e inhiben la producción de AMP. En esta fase el prurito es importante, dado que los productos de la vía Th2 activan a los mastocitos y a los eosinófilos. Además, una de las interleucinas de



la vía, la IL-31, contribuye de manera relevante a este síntoma, perpetuando aún más la alteración de la barrera.<sup>2</sup>

En la DA crónica, el reclutamiento de los linfocitos Th1 (definido por la producción de interferón- $\gamma$ ) parece dar como resultado un infiltrado mixto menos abundante de Th1, Th2 y en menor medida Th 17 y Th22. Estos linfocitos activados adoptan un fenotipo de células T de memoria residentes en el tejido y su capacidad limitada para recircular fuera de la piel facilitan respuestas de recuperación rápida cuando se vuelven a exponer a antígenos. Los subconjuntos de linfocitos residentes en la piel también pueden tener reactividad cruzada con autoantígenos o antígenos que se encuentran comúnmente en la epidermis (por ejemplo, ácaro del polvo doméstico y *Malassezia furfur*), contribuyendo así a la cronicidad de la enfermedad.<sup>13</sup>

En este punto, las lesiones se caracterizan por hiperqueratosis epidérmica, alteración en la composición de los corneocitos y disminución de los lípidos intercelulares. Las citoquinas de la vía Th22 y Th17 dirigen una remodelación y fibrosis tisular. De hecho, la presencia de IL-22 se ha relacionado con la hiperqueratosis.<sup>2</sup>

Como se mencionó anteriormente, la patogenia de la DA se complica aún más con las respuestas inflamatorias que pueden conducir a cambios secundarios generalizados que contribuyen aún más al fenotipo de estos pacientes, como la supresión de los genes complejos de diferenciación epidérmica, incluido el FLG, por las citoquinas Th2, Th22 y Th1.<sup>13</sup>

Por último, el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) producido por las células Th1 induce la apoptosis de queratinocitos, aumenta el infiltrado inflamatorio, contribuye al daño de la barrera y facilita, además, la entrada del alérgeno y patógeno.<sup>2</sup>

#### **MICROBIOMA**

La piel es un ecosistema que engloba una gran variedad de microorganismos específicos en diferentes partes del cuerpo,<sup>14,15,16</sup> los cuales son críticos para impulsar el desarrollo de la DA y sus brotes.<sup>16,17</sup> La alteración de la barrera cutánea es directamente proporcional con la colonización de *S. aureus*. Actualmente existen estudios que correlacionan el vínculo clínico entre la carga de *S. aureus* y la gravedad de la DA.<sup>13</sup>

En la edad pediátrica se observa que la progresión de esta enfermedad se asocia a cambios (disbiosis) en esta composición como parte de una interacción compleja con la integridad de la barrera cutánea, lo que no ocurre en adultos donde su microbioma no se encuentra bien caracterizado.<sup>13,14</sup> Shi y colaboradores en el año 2016 realizaron un estudio de cohorte donde se identificó que el microbioma de piel con DA tiene diferencias significativas entre niños pequeños y adultos-adolescentes; encontrando mayor prevalencia de *Staphylococcus* y *Streptococcus* a edades más tempranas en contraposición con *Propionibacterium* y *Corynebacterium* en población adulta.<sup>14</sup>

Sigue siendo incierto si la disbiosis bacteriana de la piel desempeña un papel causal en el desarrollo de DA y / o brotes de enfermedad.<sup>15</sup> Se sabe que los antibióticos dirigidos específicamente a *Corynebacterium mastitidis*, *S. aureus* y *Corynebacterium bovis* revierten la disbiosis e impiden la inflamación de la piel.<sup>13</sup> Sin embargo, también es posible que la proliferación de *S. aureus* y la reducción de la diversidad del microbioma

observada en los brotes de DA puedan representar un epifenómeno resultante en una barrera cutánea dañada e inflamada.<sup>13,15</sup> Existen estudios que sustentan que la colonización con estafilococos comensales antes de los 2 meses se relaciona con un menor riesgo de DA al 1er año de vida.<sup>15</sup>

Recientemente, la investigación se ha extendido al posible papel patógeno de los hongos en la DA. El perfil filogenético del microbioma de la piel reveló que los hongos comprenden del 1% al 22% dependiendo de las diferentes topografías en el cuerpo.<sup>16</sup> Uno de estos microorganismos es *Malassezia*, una levadura comensal que domina la microbiota fúngica de la piel, pero también está asociada con una serie de trastornos de la piel, como dermatitis seborreica (DS) y la DA.<sup>1, 17</sup>

La colonización de la piel de neonatos sanos por *Malassezia spp.*, como *M. sympodialis* y *M. globosa*, comienza al nacer y evoluciona durante las primeras semanas de vida. Posteriormente en la infancia se observa que el número de levaduras colonizadoras en piel sana se controla mediante un mecanismo complejo, aún poco conocido. Cuando este equilibrio comensal entre la levadura y el huésped se interrumpe, el crecimiento excesivo de *Malassezia* puede agravar o incluso desencadenar algunas enfermedades comunes de la piel por una serie de mecanismos inmunes, bioquímicos y biofísicos.<sup>18</sup>

## **MALASSEZIA SPP. Y SU INTERACCIÓN CON LA PIEL EN DERMATITIS ATÓPICA**

*Malassezia spp.* pertenece al phylum *Basidiomycotas* que ocupan un nicho filogenético específico (clase *Malasseziomycetes*, subfilo *Ustilaginomycotina*). Hasta el momento por su caracterización bioquímica y molecular se conocen 18 especies que se han aislado de la piel humana y animal.<sup>18,25</sup> Dentro de las principales descritas en el hombre se encuentran: *Malassezia furfur*, *Malassezia pachydermatis*, *Malassezia japonica*, *Malassezia dermatis*, *Malassezia sympodialis*, *Malassezia globosa*, *Malassezia yamatoensis*, *Malassezia slooffiae*, *Malassezia restricta* y *Malassezia obtusa*.<sup>18,26</sup>

Son levaduras que están limitadas por la incapacidad de sintetizar los lípidos y, por lo tanto, se encuentran principalmente en áreas con alta producción sebácea como piel cabelluda, cara, espalda y región mamaria. Esta gran diversidad de especies se correlaciona con la topografía descrita. Por ejemplo, *M. restricta* se encuentra predominantemente en piel cabelluda y áreas faciales, *M. globosa* se localiza en piel cabelluda, espalda e ingle. Las manos y los brazos tienen proporciones mixtas de *M. globosa*, *M. restricta* y *M. sympodialis*.<sup>8</sup>

Estudios epidemiológicos indican una variación geográfica en la distribución de especies de *Malassezia*, probablemente debido a factores climáticos. Por ejemplo, *M. sympodialis* se ha informado en Canadá, Rusia y Suecia como las especies más frecuentes, mientras que en Japón *M. furfur* fue la especie más común.<sup>1</sup>

La colonización por *Malassezia spp.* descrita como su presencia en la microbiota tanto en piel sana como enferma no ha permitido establecer su papel como comensal o patógeno siendo poco claro y complejo.<sup>1,3</sup> Se ha propuesto que los pacientes con DA, particularmente aquellos con dermatitis localizada en cabeza y cuello (área del cuerpo que se encuentra con mayor colonización por *Malassezia*), reaccionan específicamente a estos organismos, lo que lleva a una inflamación de la piel que puede exacerbar la



dermatitis subyacente e incrementar su gravedad.<sup>27</sup> La interacción que se produce entre *Malassezia spp.* y células del huésped tiene dos hipótesis; primero, la barrera cutánea dañada facilita el contacto entre *Malassezia spp.* y células de la epidermis y dermis, como los queratinocitos, células de Langerhans, células dendríticas dérmicas, células natural killer y los fibroblastos. Un segundo mecanismo es la asociación *Malassezia spp.* — célula humana, algunos autores sugieren que los receptores tipo Toll (TLR) son los mediadores de esta comunicación con sus proteínas inmunogénicas y las células humanas.<sup>1,8</sup>

En pacientes con predisposición genética, *Malassezia spp.* que reside en el microbioma no sólo en la superficie de la piel sino también en las capas superiores de la epidermis y en el infundíbulo del folículo, es reconocido por el TLR 2 con una gran oportunidad de producir una variedad de proteínas inmunogénicas que provocan la producción de anticuerpos IgE específicos y pueden inducir la liberación de citoquinas proinflamatorias. Las células dendríticas de la piel promueven la producción de IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-13 e IL-18.<sup>1,3</sup> Pedrosa y colaboradores encontraron en un estudio realizado en el Centro Hospitalario Universitario São João EPE, Oporto, Portugal que existe una regulación con disminución de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  después de 48 horas de incubación de *M. sympodialis* y *M. furfur* al inocular estas especies en epidermis humana reconstruida, lo que podría representar la capacidad de estas levaduras para suprimir la respuesta inflamatoria y evitar el sistema de defensa de queratinocitos.<sup>28</sup>

*Malassezia spp.* induce células T auto-reactivas de predominio Th2 que reaccionan de forma cruzada entre las proteínas fúngicas y sus homólogos humanos.<sup>1,8</sup> La presencia de reactividad de células T inducida por *Malassezia* también se ha demostrado mediante la prueba de parches epicutáneos modificados, que ha demostrado que el contacto directo con *Malassezia* puede inducir una reacción cutánea eccematosa en pacientes con DA sensibilizados. La prueba de parche produce reacciones cutáneas positivas en pacientes atópicos, pero no en controles normales no atópicos, con respuestas positivas que involucran la activación y proliferación de células T específicas de alérgenos. Esto sugiere que los alérgenos de tipo I tradicionales también pueden participar en la activación de los mecanismos inmunitarios de tipo IV. Estos mecanismos contribuyen a la inflamación de la piel en la DA y, por lo tanto, influyen en el curso de este trastorno.<sup>8,27</sup>

#### SENSIBILIZACIÓN A MALASSEZIA SPP.

La presencia de hipersensibilidad de tipo I mediada por IgE contra *Malassezia* en pacientes con DA ha sido bien documentada.<sup>27</sup> En estudios recientes se establece que la sensibilización a *Malassezia spp.* puede correlacionarse con la gravedad de la DA. Como *Malassezia spp.* forma parte del microbioma en piel sana, interactúa regularmente con células inmunes como las células dendríticas o linfocitos T. Por ello, encontramos que la inmunoglobulina G (IgG) específica para *Malassezia spp.* y los anticuerpos IgM pueden detectarse regularmente en individuos sanos. En contraste, la tasa de sensibilización mediada por IgE para *Malassezia spp.* es muy baja o incluso ausente en población sana y existe una alta proporción de pacientes con DA que están sensibilizados a esta levadura.<sup>16,27</sup>

Esta relación inmunológica se ha estudiado desde hace 20 años y lo que se conoce de investigaciones previas es que la tasa de prevalencia de estos anticuerpos parece variar con la edad, siendo mucho más alta en pacientes mayores de 12 años (43–93%) en

comparación con pacientes de edad más temprana (22–39%). Existen estudios que han demostrado que los anticuerpos IgE específicos contra *Malassezia* son casi inexistentes en individuos sanos y es raro encontrarlos en pacientes con otras enfermedades relacionadas con *Malassezia*, como la dermatitis seborreica y la pitiriasis versicolor.<sup>28,29</sup> Los pacientes con DA que presentan dermatosis en regiones como cabeza y cuello parecen ser más propensos a tener anticuerpos IgE específicos para *Malassezia* en comparación con los pacientes con DA con diferente localización, Devos y colaboradores, en el 2000 realizaron un estudio donde se informó tasas de 100% y 13,6%, respectivamente, en estos subgrupos.<sup>29</sup>

Lo que se obtiene de estudios recientes son tasas más altas de sensibilización por *Malassezia* mediada por IgE entre pacientes con DA grave en comparación con moderada.<sup>17</sup> Es oportuno recordar, que la sensibilización contra *Malassezia spp.* es particularmente más alta en pacientes con DA en topografía de cabeza y cuello. Estas mayores tasas de sensibilización pueden atribuirse a las propiedades lipofílicas y, por lo tanto, a la predilección de esta levadura por las áreas de la piel seborreica, como cabeza y cuello, donde probablemente tengan un papel patógeno.<sup>8,16</sup> En la edad pediátrica secundario a la baja de producción de sebo en la piel, las condiciones de crecimiento para *Malassezia spp.* son difíciles por lo que se ha encontrado con mayor frecuencia sensibilización en adolescentes y adultos.<sup>16</sup>

*Malassezia sympodialis* es una de las especies aisladas más frecuentemente de la piel tanto de pacientes con DA como de individuos sanos. Los mastocitos de pacientes con DA liberan mayores cantidades de IL-6 en respuesta a la exposición de *M. sympodialis*.<sup>1</sup> Mittermann, I. y colaboradores, encontraron por reactividad de células T, Ig E específicas, prueba de parche positiva a *M. Sympodialis* en alrededor del 50% de los pacientes adultos con DA. Estas reacciones se encuentran difícilmente en otras enfermedades alérgicas o trastornos de la piel indicando un vínculo específico entre la DA y *Malassezia* en un subconjunto de pacientes<sup>17</sup> La tabla 2 resume los estudios que anteceden a la presente investigación relacionados con *Malassezia spp.* y DA.

#### INMUNOANÁLISIS PARA DETECCIÓN DE IgE ESPECÍFICA PARA MALASSEZIA SPP.

La detección de IgE sérica específica de *Malassezia spp.* es un método diagnóstico que evalúa su sensibilización; de los kits estandarizados que se conocen se encuentra en el mercado ImmunoCAP m70, Phadia AG, Steinhausen, Suiza para la detección de IgE sérica específica para *Malassezia spp.*, que se basa en la cepa ATCC 42132, y la prueba de ImmunoCAP m227 que contiene los antígenos de varias *Malassezia spp.* y, por lo tanto, es muy sensible.<sup>16</sup> El inmunoanálisis con la técnica de ImmunoCAP m227 tiene una fase sólida que consiste en un derivado de celulosa dentro de una cápsula. El polímero hidrófilo altamente ramificado proporciona un microambiente ideal para los alérgenos, uniéndolos de forma irreversible al mismo tiempo que mantienen su estructura original. El anti-IgE, unido de forma covalente a la fase sólida, reacciona con la IgE total en la muestra de suero del paciente. Después del lavado, los anticuerpos marcados con enzimas contra IgE se añaden para formar una mezcla. Después de detener la reacción, se mide la fluorescencia del fluido. La fluorescencia es directamente proporcional a la concentración de IgE en la muestra de suero. El análisis del IgE circulante aporta una evaluación objetiva de la sensibilización a un alérgeno.<sup>16</sup> ImmunoCAP Specific IgE detecta los anticuerpos IgE en un intervalo de 0 a 100 kUA/;

el resultado es cuantitativo. Normalmente, en la práctica clínica el valor 0,35 kUA /l se ha utilizado como punto de corte. Su sensibilidad oscila entre el 84 y el 95%, y especificidad entre el 85 y el 94%.<sup>16,17</sup>

<b>Tabla 2. Estudios previos</b>						
<b>Autores</b>	<b>Año</b>	<b>Lugar</b>	<b>Muestra</b>	<b>Objetivos</b>	<b>Resultados</b>	<b>Conclusión</b>
Pedrosa y cols.	2019	Portugal	<i>M. sympodialis</i> aislada de pacientes con pitiriasis versicolor y <i>M. furfur</i> de pacientes con dermatitis seborreica.	Evaluar la expresión génica de citosinas y péptidos antimicrobianos provocada por <i>M. sympodialis</i> y <i>M. furfur</i> una vez en contacto con una epidermis humana reconstruida.	Patrón de expresión diferente entre las dos especies, con tendencia a la sobreexpresión de citoquinas pro-inflamatorias.	Posible patrón de respuesta inmune dependiente de la especie de <i>Malassezia</i> .
Mittermann y cols.	2016	Estocolmo	Adultos n=319  Se agruparon según el índice SCORAD, en DA grave (n = 53) y moderada (n = 126).	Caracterizar reactividad de IgE específicas en pacientes con DA a un amplio panel de alérgenos exógenos, incluidos los antígenos microbianos y humanos.  Se evaluó por Phadiatop1, ImmunoCap™	Reactividad de IgE en 92% de los pacientes con DA grave y 83% de los pacientes con DA moderada.  Frecuencia de sensibilización a los alérgenos: gatos, polen de abedul, el polen de gramíneas y <i>M. sympodialis</i> .	Perfil de sensibilización molecular diferente en pacientes con DA grave y moderada.

Hulshof y cols.	2016	Amsterdam	Niños de 0 a 12 años  (Piel del antebrazo lesionada y no lesionada de 53 niños con DA y 50 niños de control)	Examinar la barrera cutánea y los biomarcadores de respuesta inmunitaria en tiras de cinta de estrato córneo de niños con DA con diferentes tipos de piel.	IL1 $\beta$ , IL18, CXCL8, CCL22, CCL17, CXCL10 y CCL2 fueron significativamente (p <0,05) más altas en la piel con DA lesional que en la piel con DA no afectada, mientras que la IL-1 $\alpha$ mostró una tendencia opuesta. CXCL8, CCL2 y CCL17 mostraron asociación con SCORAD. El tipo de piel VI mostró niveles más altos de NMF en la piel con EA no lesional y lesional en comparación con el tipo de piel II. La morfología de los corneocitos fue significativamente diferente en la piel con DA lesionada frente a la no lesionada y la piel sana.	Diferencias entre los niños con DA en piel tipo II y tipo piel VI en los niveles de NMF, lo que sugiere que algunos aspectos de los mecanismos fisiopatológicos pueden diferir en los niños con piel claro versus oscuro.
Zinkeviciene y cols	2011	Revista centroeuropea de Medicina	241 muestras de pacientes con DA (132 niños y 109 adulto), y	Diferenciar la flora cutánea de la levadura por edad y partes del cuerpo de los pacientes con DA.	89 (36.9%) de las muestras positivas: <i>Candida</i> (27,4%), <i>Malassezia</i> (6,6%) y <i>Rhodotorula</i> (2,9%).  La colonización cutánea	El microbioma cutáneo de la levadura y la distribución de las especies dependen significativamente de

			como controles, se tomaron 40 muestras de individuos sanos (20 niños, 20 adultos).		con levaduras fue dos veces mayor en los adultos que en los niños (P <0,0001). La distribución de las especies de levadura dependió de la topografía muestreada: <i>Malassezia</i> predominó en las regiones de cara, cuello y tronco (P = 0,0047); <i>Candida</i> con mayor frecuencia colonizó las manos y las piernas (P = 0.0029).	la edad del paciente con DA y de la topografía afectada.
Yim y cols	2010	Hospital de la Universidad de Konkuk (Seúl)	n=60 Rango: 0-10 años 11-20 años 21-30 años.	Aislar las diferentes especies de <i>Malassezia</i> de pacientes con DA mediante el uso de 26S rDNA (ácido desoxirribonucleico ribosomal) PCR-RFLP e investigar la relación entre un cultivo positivo de <i>Malassezia</i> y la gravedad de DA.	Se aisló <i>Malassezia</i> en 51,7% de los pacientes con DA mediante el análisis 26S rDNA PCR-RFLP. La especie dominante en general fue <i>M. sympodialis</i> (16.3%). <i>M. restricta</i> fue la especie más común en piel cabelluda (30.0%) y mejilla (16.7%). <i>M. sympodialis</i> (28.3%) fue la especie más común en tórax anterior. La tasa de	No se encontró relación entre la especie de <i>Malassezia</i> y gravedad de dermatitis atópica; se cree que no depende de la especie sino de su cantidad.

					cultivo positivo más alta fue para el grupo de edad 11-20 (59.0%) y la piel cabelluda mostró la tasa más alta con 66.7%. No hubo una relación significativa entre las especies de <i>Malassezia</i> y SCORAD.	
Devos y cols	2000	Nijmegen, (Netherlands)	n=586	Establecer si los pacientes con dermatitis atópica desarrollan anticuerpos de inmunoglobulina E contra la levadura <i>Pityrosporum ovale</i> ( <i>Malassezia furfur</i> ).	37 pacientes (6,3%) positivos para el extracto de <i>M. furfur</i> .  Grupo control de 55 sujetos con reacciones negativas.  Subgrupo nivel elevado de IgE específica para <i>M. furfur</i> en el 100,0% de los pacientes con dermatitis en cabeza y cuello, en comparación con el 13,6% en los pacientes con dermatitis atópica con lesiones en cualquier otra localización.	IgE específica para <i>M. furfur</i> fuertemente relacionada con la localización de cabeza y cuello en DA
Nissen y cols	1998		DA n=15 Controles	Investigar la sensibilización de IgE a los hongos en pacientes con DA y	14 pacientes (93%) reaccionaron a uno o varios extractos de	Los pacientes con DA desarrollan anticuerpos IgE

			n=11	comparar la actividad biológica de los cultivos y los extractos celulares de hongos: <i>Candida albicans</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> y <i>Penicillium notatum</i> . Además, se incluyeron los cultivos de <i>Pityrosporum ovale</i> y <i>Trichophyton rubrum</i> en el panel de prueba.	hongos mediante la liberación de histamina.	específicos contra varios hongos, como lo demuestra la inmunotransferencia de IgE.
Wessels y cols	1991	Netherlands	DA n=72  Pacientes atópicos sin DA n=27  Control sano n= 17	Evaluar los anticuerpos IgE séricos dirigidos contra <i>Pityrosporum ovale</i> ( <i>Malassezia furfur</i> ) por ensayo inmunoenzimático (ELISA) en pacientes con DA, pacientes atópicos con enfermedad respiratoria alérgica (rinitis o asma) pero sin eczema y en controles sanos.	IgE para <i>P. ovale</i> se demostró en el 49% (35/72) de los pacientes con DA. IgE de <i>P. ovale</i> se encontró en solo uno de los 27 controles atópicos sin eccema; Todos los controles sanos fueron negativos.	La producción de anticuerpos IgE contra <i>P. ovale</i> ocurre con mucha frecuencia en la DA, y rara vez en pacientes con enfermedad atópica sin afectación de la piel.  No se encontró relación con la gravedad.



### MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE MALASSEZIA SPP.

En la actualidad, el género *Malassezia* comprende 18 especies que pueden aislarse en parte mediante ensayos microbiológicos y fisiológicos (crecimiento en medios selectivos, prueba de difusión de Tween, prueba de catalasa, actividad de  $\beta$ -glucosidasa, capacidad de producir pigmento y fluorocromos en presencia de triptófano).<sup>25,30</sup>

La mayoría de las especies de *Malassezia* carecen de genes que codifican para ácido graso citosólico sintasa y, por lo tanto, no puede sintetizar ácidos grasos esenciales como el palmitato que es el precursor de la cadena más larga de éstos. Todas las levaduras *Malassezia*, excepto *M. pachydermatis*, necesitan medios de cultivo suplementados con ácido oleico o aceite de oliva para el crecimiento *in vitro*; mientras que *in vivo* dependen de los ácidos grasos del sebo.<sup>18,25</sup> Solo *M. pachydermatis* es capaz de crecer efectivamente *in vitro* sin la adición de lípidos en el medio de cultivo, aunque se ha encontrado inconsistentemente la dependencia de los lípidos en algunas cepas de esta especie. Las levaduras de *Malassezia* metabolizan ácidos grasos saturados e insaturados para sintetizar los lípidos que necesitan para el mantenimiento de la función de la membrana de la célula fúngica y la protección de la fagocitosis por parte del huésped;<sup>18</sup> los niveles de estos lípidos son, hasta cierto punto, específicos de la especie.<sup>28</sup>

Al examen directo generalmente, las células de *Malassezia* (varían de 1.5 a 10  $\mu\text{m}$  de tamaño) son unipolares y de forma redonda a ovoide; aunque existen diferencias morfológicas entre muchas especies, su identificación debe estar respaldada por características fisiológicas como la reacción de la catalasa y la capacidad de las especies para utilizar diferentes Tweens (T20, T40, T60 y T80) como suplementos entre otros (Ver tabla 3).<sup>30</sup>

La identificación definitiva de las especies de *Malassezia* y de los subtipos dentro de las especies, por lo general requiere técnicas basadas en el ADN, como el polimorfismo de la longitud del fragmento amplificado, el análisis del polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción, el ADN polimórfico amplificado al azar y el análisis de la secuencia del ADN.<sup>18,28</sup> El número de secuencias genómicas disponibles de las especies de *Malassezia* está aumentando rápidamente y ofrece un recurso valioso para el desarrollo de diagnósticos específicos basados en ácidos nucleicos.<sup>25</sup>

**Tabla 3. Características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de las especies de *Malassezia* en humanos.**

Especie	Grupo Taxonómico	Morfolo- gía	S D A	TDT				Cromó- foro	Cata- lasa	Trip- tófan- o	β- gucosi- dasa	Crecimiento en agar Dixon		
				20	40	60	80					32 °C	37 °C	40 °C
<i>M. furfur</i>	A	G E C	-	+ (-)	+ (-)	+ (-)	+ (-)	+(-)	+(-)	+	- o +	+	+	+
<i>M. obtusa</i>	A	E C	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	- o ±	-
<i>M. japónica</i>	A	G	-	-	±	+	-	?	+	?	?	+	+	-
<i>M. yamatensis</i>	A	E	-	+	+	+	+	?	+	?	?	+	+	-
<i>M. globosa</i>	B1	G	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	- o ±	-
<i>M. restricta</i>	B1	G E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+ o -	-
<i>M. sympodialis</i>	B2	E	-	- o ±	+	+	+	- o ±	+	-	+	+	+	+
<i>M. dermatitis</i>	B2	G E	-	+	+	+	+	± o +	+	?	-	+	+	+
<i>M. pachydermatis</i>	B2	E	+ o ±	+	+	+	+	+	+ o ±	-	+ (-)	+	+	+
<i>M. slooffiae</i>	C	EC	-	+ o ± (-)	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+

Fuente: Cafarchia. et al.<sup>30</sup> Globular (G); elipsoidal (E); cilíndrica (C); Sabouraud dextrosa agar (SDA); débilmente positivo (±); desviación rara del patrón usual (-); desconocido (?). Prueba de difusión de tween (TDT).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La dermatitis atópica es un trastorno inflamatorio recurrente crónico que va incrementando su prevalencia a nivel mundial con mayor predisposición para la edad pediátrica; un 45% de los pacientes inicia antes de los 6 meses de vida, un 60% durante el primer año y hasta un 85% antes de los 5 años, correspondiendo a una causa frecuente de consulta dermatológica.<sup>3,8</sup>

En la edad pediátrica se observa que la progresión de DA se asocia a cambios del microbioma (disbiosis) como parte de una interacción compleja con la integridad de la barrera cutánea,<sup>13</sup> se conoce extensamente la asociación con bacterias comensales; y, lo que ha descrito la literatura con respecto a los hongos es que estos pacientes reaccionan específicamente a *Malassezia spp.*, lo que lleva a una inflamación de la piel que puede exacerbar la dermatitis subyacente.<sup>1,8</sup>

No existen estudios en pacientes pediátricos mexicanos que describan la asociación de *Malassezia spp.* con dermatitis atópica. Los estudios actuales no son concluyentes para explicar si la colonización para *Malassezia spp.* desempeña un papel patogénico en DA o si se relaciona con la gravedad.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuál es la frecuencia de *Malassezia spp.* en pacientes con dermatitis atópica comparado con niños sin este diagnóstico y la relación del aislamiento microbiológico con la gravedad de la dermatitis atópica?.

## **JUSTIFICACIÓN**

Actualmente existen pocos datos en la literatura que describan el papel de *Malassezia spp.* en DA, por lo que, se consideran necesarios los estudios que aporten información sobre la participación de esta levadura en el desarrollo de la enfermedad cuando existe colonización y establecer su relación con la gravedad.

## **OBJETIVOS DEL ESTUDIO**

### **OBJETIVO GENERAL**

Describir la asociación de *Malassezia spp.* (colonización e identificación) en pacientes pediátricos con DA.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Describir las características demográficas de los pacientes con DA y de los niños sanos.
2. Describir la frecuencia de aislamiento *Malassezia spp.* en los diferentes grupos de edad de los pacientes pediátricos con DA.
3. Evaluar asociación entre frecuencia de *Malassezia spp.* con la topografía afectada en pacientes pediátricos con DA.
4. Determinar la asociación entre los estadios de la escala del SCORAD (leve, moderado y grave) y la colonización a *Malassezia spp.*

5. Determinar la asociación entre los estadios de la escala del SCORAD (leve, moderado y grave) y la especie de *Malassezia*.
6. Identificar las especies de *Malassezia* en individuos sin DA vs pacientes con DA.

## **HIPÓTESIS**

El 49% de los pacientes con DA presentará colonización a *Malassezia spp.*; mientras que en pacientes sin esta entidad clínica se espera que la colonización por *Malassezia spp.* sea menor.

En los pacientes con dermatitis atópica encontraremos una correlación positiva entre la gravedad de la DA y *Malassezia spp.*

## **METODOLOGÍA**

Diseño de estudio: Prospectivo, transversal comparativo, observacional.

Población: pacientes pediátricos con diagnóstico de dermatitis atópica de 3 meses a 18 años, de ambos sexos y controles sin DA del mismo grupo de edad.

Procedimiento:

1. Se reclutaron pacientes que cumplieron los criterios de selección.
2. Firmaron el consentimiento informado los padres y asentimiento el menor cuando fue mayor de 8 años.
3. Se realizó el llenado de historia clínica completa.
4. Se aplicó SCORAD a todos los pacientes.
5. Técnica para detección de IgE: Se tomó una muestra de sangre periférica empleando los procedimientos estándar en tubo rojo (se puede usar suero o plasma) para aplicación de ImmunoCAP® m227, se almacenó a una temperatura -20 °C.
6. Examen directo y cultivos: Se tomó por raspado directo de la piel muestra de escama de la topografía afectada de una superficie de 3x3cm<sup>2</sup> en portaobjetos y cultivo Dixon modificado, se realizó el traslado de muestras a la Unidad de Micología de la UNAM donde se procesaron
7. Análisis de patrones de restricción: De las colonias aisladas y puras se realizó extracción de DNA, se colocó gel para posterior procesamiento de reacción en cadena de polimerasa, se purificaron los fragmentos y tras verificar la amplificación de los mismo se procedió a la digestión enzimática y el análisis correspondiente de los resultados obtenidos por bandas en los geles de 50 pb.
8. Se realizó el llenado de hoja de recolección de datos.

Período de estudio: Desde noviembre del dos mil diecinueve hasta mayo del dos mil veinte.

## **CRITERIOS DE SELECCIÓN**

Criterios de inclusión en grupo de pacientes con DA:

1. Femenino o masculino
2. Mayores de 3 meses y menores de 18 años al momento del diagnóstico.

3. Diagnóstico de DA de acuerdo con los criterios de Hanifin y Rajka.
4. Pacientes que firmen consentimiento y asentimiento en caso de requerir para participar en el estudio.

Criterios de inclusión en grupo de pacientes sin DA:

1. Femenino o masculino
2. Mayores de 3 meses y menores de 18 años al momento de iniciar protocolo.
3. Sin criterios de Hanifin y Rajka para DA.
4. Pacientes que firmen consentimiento y asentimiento en caso de requerir para participar en el estudio.

Características del grupo control:

1. Se realizó selección de pacientes de la misma edad y sexo que el grupo con DA.
2. La muestra de escama de piel se tomó de la misma topografía del paciente con DA con quién se iba a realizar la comparación.

Criterios de exclusión:

1. Pacientes con alguna dermatosis agregada que impida la valoración clínica de la DA.
2. Pacientes en los que no se pueda tomar la muestra sanguínea para la prueba de sensibilización.
3. Pacientes con tratamiento antifúngico al momento de la toma de muestra de escama de piel

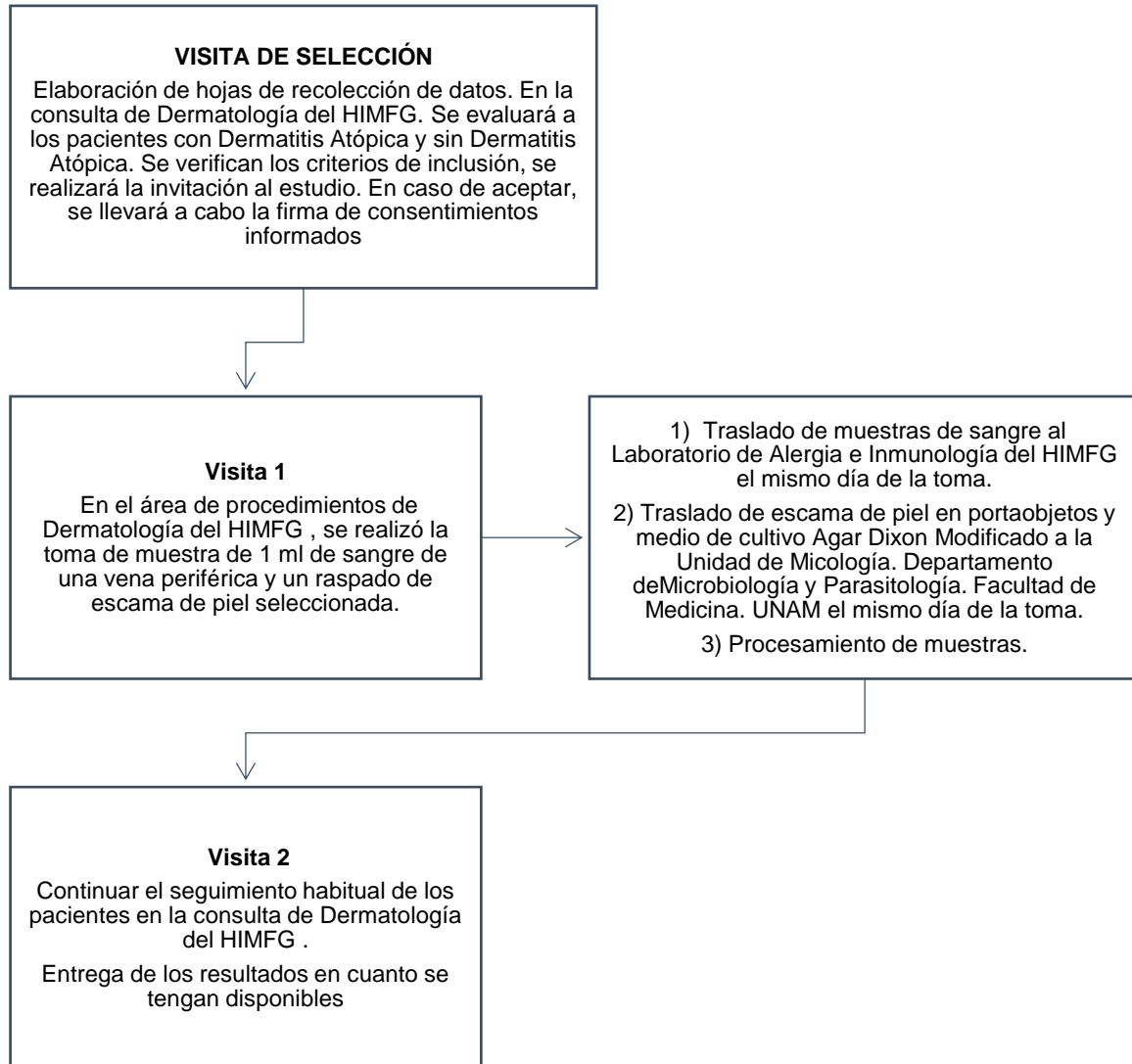
Criterios de eliminación

1. Muestra sanguínea insuficiente para realizar la prueba de sensibilización

Los pacientes que no aceptaron participar en el protocolo de estudio continuaron con el seguimiento habitual, en el servicio de Dermatología del Hospital Infantil de México Federico Gómez, sin que su decisión afecte dicho seguimiento.

Los pacientes que cumplieron con los criterios de selección y aceptaron participar en el protocolo de estudio realizaron la firma de consentimientos informados fueron programados y citados para toma de muestras en el área de Procedimientos del Servicio de Dermatología del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

**Procedimiento:  
Flujograma 1.**



**Descripción general del estudio:**

1. Se identificaron a los pacientes con diagnóstico de dermatitis atópica al servicio de dermatología hasta mayo 2020, así mismo se incluirán como pacientes control pacientes sin dermatitis atópica; se citarán a la Consulta de Dermatología de Hospital Infantil de México.
2. A los pacientes que cumplieron los criterios de selección se les realizó una historia clínica, revisión dermatológica, evaluación de SCORAD, se envió la solicitud de IgE específica a *Malassezia spp.* con Inmmucocap 227 para el Laboratorio de Alergia e Inmunología.
3. Se programó la cita para la toma de una muestra de 1 ml de sangre de una vena periférica.
4. La muestra sanguínea se tomó por parte del personal médico del servicio de Dermatología del Hospital Infantil de México Federico Gómez, en el área de

- procedimientos del servicio o en el Laboratorio de Alergia e Inmunología según disponibilidad, de acuerdo con el manual de procedimientos.
5. Las muestras fueron trasladadas el mismo día de la toma al Laboratorio de Alergia e Inmunología del Hospital Infantil de México para almacenarse a una temperatura -20 °C.
  6. Antes del inicio de tratamiento se tomó una muestra por raspado en piel de 3x3 cm<sup>2</sup> de la topografía afectada en portaobjetos y para cultivo Agar Dixon Modificado para trasladarlas a la Unidad de Micología de la UNAM, donde se incubaron a 32°C, se realizó la lectura periódica y se verificó el crecimiento de colonias para las pruebas bioquímicas y moleculares de identificación de las diferentes especies de *Malassezia*.
  7. El examen directo de la escama se realizó con tintura de azul de algodón con microscopio de luz a 40 y 100x el mismo día de la toma de muestra para identificación de levaduras en la Unidad de Micología de la UNAM.
  8. Al obtener crecimiento de colonias en los cultivos se reportaron sus características macroscópicas, se toman fotografías y se procedió a realizar tinción de Gram para identificación de microorganismo. Al identificar *Malassezia spp.* se realizó resiembra en medio de cultivo Agar Dixon Modificado.
  9. Cuando hubo crecimiento de la resiembra (mínimo 7 días) se procedió a realizar aislamiento por la técnica usando perlas para su separación con el objetivo de obtener colonias puras.
  10. Seleccionamos 1 colonia del aislamiento para siembra masiva en cultivo Agar Dixon Modificado.
  11. Se procedió a realizar de la siembra masiva extracción de DNA con kit Gene All para cuantificación de PCR (Reacción en Cadena de Polimerasa).
  12. Se realizó Gel de Agarosa del DNA extraído para visualizar con lámpara de luz ultravioleta.
  13. Se realizó el cálculo de condiciones de PCR para obtener un volumen de 50 uL de solución: Agua 22.5 uL + Buffer 10x 5 uL + Cl<sub>2</sub>Mg 25mM 3 uL + DNTPs 10 mM 1 uL de cada uno + PRIMER 2 mM 5 uL de cada uno + DNA 10 ng/uL 5 uL de cada uno + Taq polimerasa 5UI/uL 0.5 uL.
  14. Se procesó PCR de control negativo y de mix obtenido de cada DNA diluido para obtener 30 ciclos de PCR basados en la repetición de desnaturalización, hibridación y extensión de DNA polimerasa para su amplificación exponencial.
  15. La detección del producto de PCR se realizó mediante corrido de electroforesis, usando gel de agarosa con posterior visualización en lámpara de luz ultravioleta.
  16. Se realizó proceso de extracción de enzimas de restricción HhaI y BTSC1 por 2 horas a incubación de 37°C y 65°C respectivamente, luego se realizó gel de agarosa al 2.7% usando un marcador de 50 pb y se procedió a lectura de bandas encontradas.
  17. Análisis de resultados para determinar especie de *Malassezia spp.*
  18. Los pacientes continúan con su seguimiento habitual en el servicio de Dermatología Pediátrica del Hospital Infantil de México Federico Gómez y en cuanto se tenga el resultado del análisis serán explicados ampliamente a los padres y/o tutores y al paciente.

## **FACTIBILIDAD**

**Recursos Humanos:** Investigadores participantes del proyecto (Hospital Infantil de México Federico Gómez y Unidad de Micología de la Universidad Nacional Autónoma de México).

**Investigador responsable:** Dra. Adriana María Valencia Herrera (Médico Dermatólogo Peditra Adscrito al Departamento de Dermatología del HIMFG).

**Investigador suplente:** M. en C. Mirna Eréndira Toledo Bahena (Médico Dermatólogo Peditra Adscrito al Departamento de Dermatología del HIMFG).

**Investigadores participantes:**

Dra. Karina Marianela Landín Romero (Médico Peditra Residente de Dermatología Pediátrica del HIMFG)

Dr. Carlos Alfredo Mena Cedillos (Médico Dermatólogo Peditra Jefe del Departamento de Dermatología del HIMFG).

Dr. Omar Josué Saucedo Ramírez (Médico Alergólogo e Inmunólogo Peditra Adscrito al Departamento de Alergia e Inmunología del HIMFG)

Dra. Francisca Hernández Hernández (Jefa de Laboratorio de Micología Médica Molecular. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México).

QFB. Brianda Stephanie Herrera Ramírez (Unidad de Micología. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México).

M. en C. Alexandro Bonifaz Trujillo (Departamento de Micología del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”)

**Recursos materiales:** Las instalaciones para diagnóstico y seguimiento de pacientes con dermatitis atópica, el equipo para la toma de muestras y el equipo de laboratorio para procesamiento de éstas, se encuentran en las instalaciones del HIMFG y en la Unidad de Micología. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## **CONSIDERACIONES ÉTICAS**

### **Aprobación**

La versión final del protocolo, autorizada por el investigador principal del HIMFG fue sometida a las autoridades aplicables, según las regulaciones locales. Si éstas exigen cualquier alteración del protocolo, las mismas solo podrán ponerse en marcha con el acuerdo escrito del investigador científico y el médico de investigación clínica.

No se permitió iniciar el estudio hasta que el protocolo recibiera la aprobación/opinión favorable por escrito por parte del Comité de Ética y las autoridades del HIMFG con número de protocolo HIM 2019-083.

### **Información para el sujeto y consentimiento**

Al paciente se le proporcionó información adecuada, tanto oral como por escrito y se obtuvo el consentimiento por escrito antes de la inclusión en el estudio.

El investigador o una persona designada por el investigador, informó completamente al paciente, al padre/madre o tutor legal de todos los aspectos relativos al estudio,



incluyendo la información escrita que tiene la aprobación/opinión favorable del Comité de Ética y las autoridades del HIMFG.

Al paciente se le informó del propósito del estudio en un lenguaje no ambiguo, fácilmente comprensible. La participación del paciente fue voluntaria. El paciente puede retirar su consentimiento en cualquier momento sin que ello influya en sus cuidados o tratamiento en el futuro. Los pacientes fueron informados acerca de los procedimientos principales que se usaron para garantizar su anonimato, especialmente durante el análisis de datos personales. El paciente tuvo la oportunidad de hacer todas las preguntas que deseará acerca del estudio y de recibir todas las respuestas pertinentes.

Tras haber recibido información exhaustiva sobre los objetivos, el carácter y riesgos del estudio y haber tenido tiempo suficiente para considerarlo, el padre/madre o tutor del paciente otorgó su consentimiento escrito mediante la firma y fecha del formulario de consentimiento informado. Para los pacientes mayores de 8 años se obtuvo el asentimiento del paciente. Se exigió la firma de dos testigos, el testigo firmó y escribió la fecha personalmente en el consentimiento una vez que firmó el paciente.

Este formulario fue asimismo firmado y fechado por el investigador o la persona que obtuvo el consentimiento informado y posteriormente se retuvo por parte del investigador. La obtención del consentimiento informado se confinó en la historia médica del paciente y en la Hoja de Registro de Reporte Caso.

Se firmaron dos copias del formulario de consentimiento informado. El padre/madre o tutor del paciente recibió una y la otra se archivó para el estudio en el expediente clínico de la institución. El padre/madre o tutor del paciente puede retirar su consentimiento para participar en el estudio, en cualquier momento.

Finalmente, observando los artículos 5º, 6º, 7º y 10º del Código Sanitario y los artículos 7º y 12º del Reglamento Interior del Consejo de Salubridad General de los Estados Unidos Mexicanos, se pondrá especial cuidado en los siguientes aspectos:

#### Integridad de la información

La información obtenida no debe ser utilizada en detrimento de las personas que lo han dado.

#### Confidencialidad del paciente

La confidencialidad del paciente se respetará en todo momento.

Todo el personal participante en la investigación está (investigadores científicos y los miembros del Comité de Aprobación del protocolo) obligado a respetar el secreto médico y abstenerse de desvelar la identidad de los pacientes o cualquier otra información personal de la cual pudieran tener conocimiento fortuitamente. Los registros médicos y el Formato de Reporte de Caso se manejarán siguiendo los estándares profesionales y las leyes existentes.

La formulación y desarrollo de este proyecto sigue principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos estatificados en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial adoptada en 1964 y enmendada hasta 2008.

La Ley General de Salud en materia de investigación en el artículo 17 clasifica el riesgo de la investigación clínica y al tratarse de procedimientos como son la toma de 5 ml de sangre de una vena periférica y la realización de un raspado de piel, se clasifica como RIESGO MÍNIMO.

Con base en el principalismo médico:

- Autonomía: Se realizó carta de consentimiento y asentimiento informado para los procedimientos y confidencialidad de la información. Los pacientes fueron analizados de forma anónima.
- Justicia: Todos los pacientes del Servicio de Dermatología Pediátrica en el HIMFG fueron candidatos para incluirse en el estudio, y la decisión de participación se respeta en el punto previo.
- Beneficencia: Cuando se encontraron datos relevantes con el diagnóstico se realizó las medidas pertinentes para canalizar y tratar las situaciones clínicas en función de una mejoría en la evolución del paciente.
- No maleficencia: la extracción de sangre y toma de escama de piel es una práctica segura, realizada por personal capacitado y con seguridad comprobada. La información proporcionada por los pacientes y los datos recabados fueron confidenciales.

#### **CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD**

**CÓMO:** Los pacientes se citaron para la toma de muestra en el área de procedimientos del servicio de Dermatología del Hospital Infantil de México, por parte de la Dra. Karina Marianela Landín Romero residente de 6to año de Dermatología Pediátrica, se tomó una muestra de sangre venosa periférica y de escama de piel.

La toma de la muestra sanguínea fue de 1 ml de sangre venosa periférica, que se realizó mediante extracción con vacutainer, y fue recolectada en un tubo con tapón rojo (correspondiente a nuestro recipiente primario), se colocó posteriormente en una gradilla y así subsecuentemente dentro de una caja de unicel acompañado de aire comprimido como aislante y sanitas como material absorbente, la caja fue identificada con el signo de riesgo biológico, para su traslado al laboratorio de Alergia e Inmunología del HIMFG.

Con respecto al raspado de piel, éste corresponde a una muestra de escama en una superficie de 3x3 cm<sup>2</sup>, realizada de manera convencional como dicta el manual de procedimientos del servicio, la muestra se colocó en porta objetos y en el cultivo Dixon modificado que se sellaron con parafina y cinta adhesiva; colocándose posteriormente dentro de una caja de unicel acompañado de aire comprimido como aislante, la caja fue identificada con el signo de riesgo biológico, para su traslado a la Unidad de Micología de la UNAM y su posterior procesamiento.

Con respecto a la separación de los residuos derivados de los procedimientos, los implementos punzocortantes utilizados para la toma de muestras de sangre periférica (jeringas, agujas) fueron recolectados en contenedores plásticos rígidos, con cierre hermético, de color rojo destinados específicamente para ello. El material que entró en contacto con sangre en cantidad considerable (algodón, gasas con sangre, jeringas sin aguja) fue depositado en bolsas de polietileno de color rojo, en contenedores destinados para ello. El material que no tuvo contacto con sangre periférica utilizado en la toma de muestras (algodón, gasas sin sangre, cubrebocas, jeringas sin aguja) fue depositado en bolsas de polietileno de color transparente, en contenedores destinados para ello.

**QUIEN:** La toma y transporte de la muestra de escama fue responsabilidad de la Dra. Karina Marianela Landín Romero, residente de sexto año de Dermatología Pediátrica.

**PERIODICIDAD:** La periodicidad estuvo relacionada con la frecuencia que se presentaron los pacientes. Las muestras fueron trasladadas al Laboratorio Alergia e Inmunología del HIMFG y a la Unidad de Micología el mismo día de la toma.

El servicio de Dermatología cuenta con un área de procedimientos destinada a la toma de muestras conforme a la normatividad del servicio y del HIMFG. De igual manera los sitios a donde se transportarán las muestras (Laboratorio Alergia e Inmunología del HIMFG y Unidad de Micología de la UNAM), cuentan con áreas de procesamiento de muestras, pruebas bioquímicas y moleculares; así como con botes, bolsas y recipientes, debidamente etiquetados, para los desechos que se generen y que se describen en los apartados anteriores.

En dichas áreas se realizó la clasificación de los residuos RPBI por color de bolsa y tipo de contenedor. Los residuos fueron separados y colocados en los recipientes correspondientes y fueron recogidos del área con una periodicidad no mayor de 2 a 7 días por el personal capacitado del hospital (área de control del medio ambiente), quienes recogieron las bolsas de los contenedores y recolectores y los entregaron a la empresa autorizada para el tratamiento y disposición final de los residuos.

#### **PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

**Estadística descriptiva:** Las variables cualitativas se expresaron en frecuencias absolutas y porcentajes, las cuantitativas (de acuerdo con la distribución de los datos) en medidas de tendencia central (media o mediana) y dispersión (desviación estándar o rangos intercuartilares).

**Estadística inferencial:** Las variables cuantitativas de estudio se registraron en una base de datos utilizando el programa estadístico SPSS versión 24. Se realizó un análisis estadístico mediante chi cuadrada.

**DESCRIPCIÓN DE VARIABLES**

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN
EDAD	Tiempo de vida a partir del nacimiento.	Tiempo de vida a partir del nacimiento en años.	Cuantitativa discontinua	Edad en años
SEXO	Distinción de sexo masculino o femenino.	Distinción de sexo	Cualitativa nominal	Masculino Femenino
EDAD AL DIAGNÓSTICO DE DA	Tiempo de vida en años al momento del diagnóstico de DA.	Tiempo de vida al momento del diagnóstico de DA.	Cuantitativa discontinua	Edad en años
DIAGNÓSTICO DE DA	Pacientes que cumplan los criterios de Hanifin y Rajka.	Pacientes que cumplan al menos tres criterios mayores más tres menores de los criterios de Hanifin y Rajka.	Cualitativa nominal	Si No
GRAVEDAD DE DA	Clasificación de gravedad de DA por SCORAD.	Puntuación de SCORAD	Cuantitativa ordinal	< 25 leve 25-40 moderada > 40 grave
TOPOGRAFÍA	Localización anatómica por segmentos.	Localización anatómica por segmentos de toma de muestra.	Cualitativa	Cabeza Tronco Extremidades superiores Extremidades inferiores
SENSIBILIZACIÓN POR <i>Malassezia spp.</i>	Hipersensibilidad de tipo I mediada por IgE para <i>Malassezia spp.</i>	ImmunoCAP® m227 positivo IgE específica para <i>Malassezia</i> . Valores menores a 0,35 kUA /l se considerarán NEGATIVOS. Valores mayores a 0,35 kUA /l se considerarán POSITIVOS.	Cualitativa dicotómica	Positivo Negativo

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN
COLONIZACIÓN	Crecimiento de colonias de <i>Malassezia</i> en medio de cultivo Agar Dixon modificado.	Identificación de levaduras de <i>Malassezia</i> en medio de cultivo Agar Dixon modificado.	Cualitativa nominal	Positivo Negativo
MORFOLOGÍA DE EXAMEN DIRECTO	Forma de las levaduras de <i>Malassezia</i> observadas a la microscopía de luz.	Forma de las levaduras de <i>Malassezia</i> observadas a la microscopía de luz.	Cualitativa nominal	Esférica Ovoide Cilíndrica
NÚMERO DE COLONIAS	Cantidad de agrupaciones de levaduras formadas a partir de una unidad común en un medio de cultivo sólido.	Cantidad de agrupaciones de levaduras	Cuantitativa continua	Números ordinales
COLOR DE COLONIAS	Color determinado por el pigmento de las colonias aisladas.	Color de las colonias aisladas.	Cualitativa nominal	Blancas Beige Amarillas
SUPERFICIE DE COLONIAS	Aspecto externo de las colonias de <i>Malassezia</i> .	Aspecto externo de las colonias de <i>Malassezia</i> .	Cualitativa nominal	Rugosa Lisa Plegada
ASPECTO DE COLONIAS	Apariencia transmitida por las características ópticas de las colonias.	Apariencia transmitida por las características ópticas de las colonias.	Cualitativa nominal	Brillante Mate
MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA DE COLONIAS	Forma de las levaduras de <i>Malassezia</i> observadas a la microscopía de luz.	Forma de las levaduras de <i>Malassezia</i> observadas a la microscopía de luz.	Cualitativa nominal	Globular Elipsoidal Cilíndricas

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN
PRUEBA DE CATALASA	Prueba bioquímica a través de la cual se expresa la presencia o ausencia de catalasa producida por un microorganismo.	Prueba bioquímica para identificar la presencia o ausencia de catalasa.	Cualitativa nominal	Positivo Negativo Débilmente positivo
ESPECIES DE <i>Malassezia</i>	Grupo de microorganismos pertenecientes a un nicho filogenético específico por caracterización bioquímica y molecular.	Especie de <i>Malassezia</i> identificada por pruebas bioquímicas y estudio molecular.	Cualitativa nominal	<i>Malassezia globosa</i> <i>Malassezia restricta</i> <i>Malassezia sympodialis</i> <i>Malassezia furfur</i> <i>Malassezia obtusa</i> <i>Malassezia dermatis</i> Otras especies

## RESULTADOS

Se reclutó un total de 69 pacientes, de los cuales 56 cumplieron criterios diagnósticos de acuerdo con Hanifin y Rajka para DA y 13 pacientes se incluyeron en el grupo control. Se les contactó para acudir a la valoración en el servicio de consulta externa de dermatología del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Las características de la población se describen en la tabla 4, del total de pacientes el rango de edad es de 3 a 17 años 9 meses con una media de 8 años; de estos los que corresponden al grupo con diagnóstico de DA se encontraron dentro de un rango de edad entre 6 y 17 años 9 meses, con una media de 8 años 1 mes. En el grupo control el rango de edad es de 3 a 17 años, con una media de 14 años. La mayoría de ellos son escolares y adolescentes. Con respecto al sexo existe una proporción de la población total 1.37:1 a favor del sexo femenino.

**Tabla 4. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ACUERDO CON EL GRUPO AL QUE PERTENECEN**

	Grupo con DA (n=56)	Grupo control (n=13)	Población total (n=69)
<b>Edad</b>	8 años	14 años	8 años
<b>Sexo</b>			
<b>Femenino</b>	34 (60.7%)	6 (46.2%)	40 (58%)
<b>Masculino</b>	22 (39.3%)	7 (53.8%)	29 (42%)
<b>Procedencia</b>			
<b>Estado de México</b>	30 (53.6%)	8 (61.5%)	38 (55.1%)
<b>Ciudad de México</b>	19 (33.9%)	2 (15.4%)	21 (30.4%)
<b>Veracruz</b>	2 (3.6%)	1 (7.7%)	3 (4.3%)
<b>Puebla</b>	1 (1.8%)	1 (7.7%)	2 (2.9%)
<b>Guerrero</b>	1 (1.8%)	-	1 (1.4%)
<b>Guanajuato</b>	1 (1.8%)	-	1 (1.4%)
<b>Tabasco</b>	1 (1.8%)	-	1 (1.4%)
<b>Oaxaca</b>	-	1 (7.7%)	1 (1.4%)
<b>AHF de atopia</b>			
<b>Dermatitis atópica</b>	18 (32.1%)	-	18 (26.1 %)
<b>Alergia alimentaria</b>	1 (1.8%)	-	1 (1.4%)
<b>Alergia a medicamentos</b>	1 (1.8%)	-	1 (1.4%)
<b>Rinitis alérgica</b>	13 (23.2%)	1 (7.7%)	14 (20.3%)
<b>Asma</b>	17 (30.5%)	2 (15.4%)	19 (27.5%)
<b>APP de atopia</b>			
<b>Alergia a factores ambientales</b>	11 (19.6%)	-	11 (15.9%)
<b>Alergia alimentaria</b>	18 (32.1%)	-	18 (26.1%)
<b>Alergia a medicamentos</b>	5 (8.9%)	1 (7.7%)	6 (8.7%)
<b>Rinitis alérgica</b>	17 (30.3%)	-	17 (24.6%)
<b>Conjuntivitis alérgica</b>	5 (8.9%)	-	5 (7.2%)
<b>Asma</b>	12 (21.4%)	-	12 (17.4)

Fototipos			
Fototipo I	-	1 (7.7%)	1 (1.4%)
Fototipo II	5 (8.9%)	1 (7.7%)	6 (8.7%)
Fototipo III	17 (30.3%)	3 (23%)	20 (30%)
Fototipo IV	34 (60.7%)	8 (61.5%)	42 (60.9%)
Fototipo V	-	-	-
Fototipo VI	-	-	-

\*AHF: Antecedentes heredofamiliares. APP: Antecedentes patológicos personales.

p>0.05

De los antecedentes heredofamiliares no relacionados con atopia el 75.4% (n=52) presentó antecedente familiar de DM2, el 52.2% (n=36) de HAS, el 4.3% (n=3) de disfunción tiroidea, el 2.9% (n=2) relacionado con trastornos psiquiátricos y el 24.6% (n=17) con algún tipo de cáncer en la familia.

En nuestra población, los fototipos de piel más frecuentemente observados fueron el fototipo IV con el 60.9% (n=42) y el fototipos III con el 29% (n=20) en ambos grupos estudiados (ver tabla 4).

En la exploración física todos los pacientes del grupo de DA y control presentaron apariencia normal, 13% (n=9) del grupo de DA tenían rinorrea hialina, en la valoración cardiorrespiratoria 1 paciente presentó soplo cardíaco por atresia pulmonar, 1 paciente tos seca y 1 paciente estertores gruesos por movilización de secreciones en el grupo de DA. Cuello, abdomen, genitales y extremidades sin alteraciones en el 100% (n=69) de la población total. El 5.8% (n=4) en el grupo de DA tenían retraso del desarrollo psicomotor (ver fotografías clínicas en anexo 4).

Dentro de otras manifestaciones en piel 17 de los pacientes en el grupo de DA tenían diagnóstico de alopecia areata, acantosis nigricans, manchas café con leche, fibromas blandos, foliculitis, miliaria, acné, prurigo por insectos, vitiligo, manchas postinflamatorias, pitiriasis alba y 11 en el grupo control malformación vascular capilar, queratoris pilar, prurigo actínico, albinismo oculocutáneo y nevos melanocíticos pequeños.

En el anexo 14, la gráfica 1 representa los criterios de Hanifin Rajka que cumplieron los pacientes del grupo de DA (n=56); de los criterios mayores los 3 más frecuentes fueron: prurito 98.2% (n=55), morfología típica para la edad el 100% (n=56) y cronicidad de la dermatosis el 100% (n=56). Con respecto a los criterios menores los más importantes fueron xerosis 100% (n=56), ictiosis/hiperlinealidad palmar/queratosis pilar 35.7% (n=20), edad de comienzo temprano 85.71% (n=48), pliegue infraorbitario de Dennie Morgan 91% (n=51), oscurecimiento periorbital 62.5% (n=35), prurito al sudor 37.5 % (n=21), dermatografismo blanco 53.6% (n=30), evolución influenciada por factores ambientales o emocionales 71.4% (n=40), intolerancia a alimentos 30.4% (n=17) e intolerancia a lanas y detergentes 78.6% (n=44) (ver gráfica 2).

La puntuación del SCORAD objetivo en el grupo DA (n=56) se encontró entre los rangos de 7.6 a 47.3 con un SCORAD medio de 20.12. Mientras el SCORAD subjetivo iba



desde 9 a 67.34 con una media de 54.52. La clasificación de gravedad por porcentaje se observa en la gráfica 3.

De los 69 pacientes la topografía más afectada de donde se tomó la muestra en los pacientes se determinó por segmentos y corresponde a cabeza 7.2 % (n=5) grupo DA, tronco 27.5% (n=19) grupo DA y 8.7% (n=6) grupo control, extremidades superiores 34.8% (n=24) grupo DA y 8.7% (n=6) grupo control; y extremidades inferiores 11.6% (n=8) grupo DA y 1.4 % (n=1) en el grupo control (ver fotografías clínicas en anexo 4).

De los pacientes que no recibían tratamiento previo en el grupo DA fueron el 36.2% (n=25) y en el grupo control 17.4% (n=12). En la gráfica 4 se distribuyen por frecuencia los tratamientos que recibieron los pacientes del grupo de DA. En el grupo control solo 1 paciente usó ivermectina.

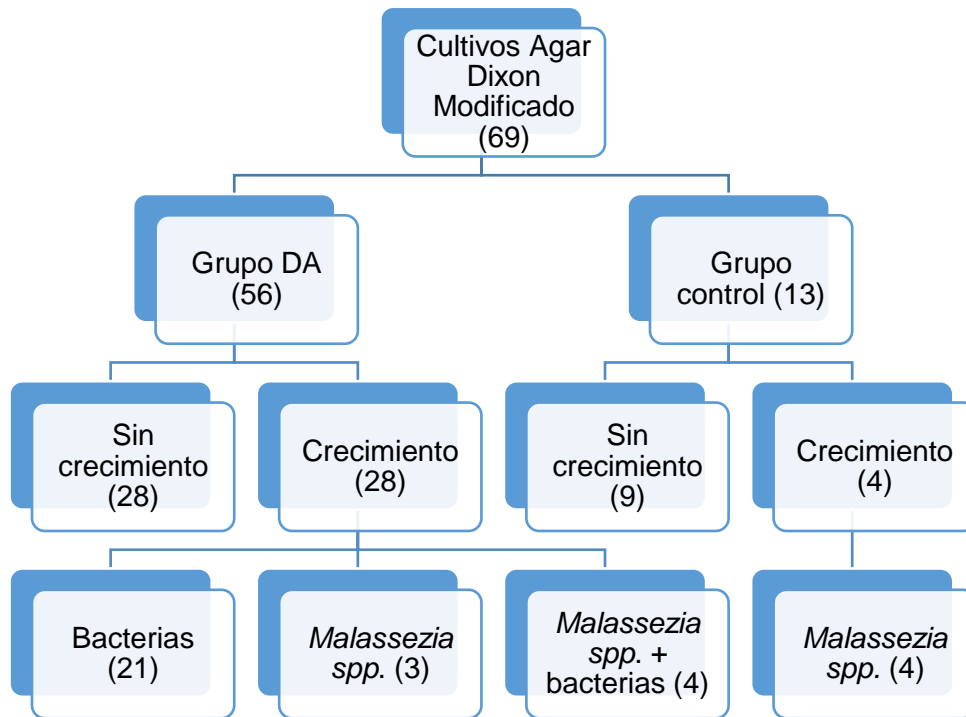
En la tabla 5 se muestran los resultados del examen directo con microscopio de luz de la escama de piel de los pacientes con azul de toluidina en un campo de 100x'. En la gráfica 5 del anexo 14 se distribuyen los reportes por morfología y número de levaduras por campo en el grupo con DA. En el grupo control 12 de las 13 muestras fueron negativas y en 1 se observaron levaduras ++, la cual presentó morfología ovoide (ver fotografías en anexo 5).

<b>Tabla 5. RESULTADOS DE EXAMEN DIRECTO</b>			
	<b>EXAMEN DIRECTO</b>	<b>FRECUENCIA</b>	<b>PORCENTAJE</b>
<b>GRUPO CON DA</b>	Positivo	23	33.33%
	Negativo	33	47.83%
<b>GRUPO CONTROL</b>	Positivo	1	1.5%
	Negativo	12	17.39%
		69	100%

p<0.05

Se estudiaron 69 cultivos agar dixon modificado (ADM) del total de la muestra y realizando lecturas de estos los días 7, 15 y 30 (ver Tabla 6 y 7, Flujograma 2, Gráfica 5, 6 y 7,8).

**FLUJOGRAMA 2. DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES DE ACUERDO CON EL GRUPO Y CULTIVOS**



**TABLA 6. DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES DE ACUERDO CON EL GRUPO Y COLONIZACIÓN DE *MALASSEZIA SPP.***

	NEGATIVO	POSITIVO	TOTAL
<b>DERMATITIS ATÓPICA</b>	49(87.5%)	7(12.5%)	56
<b>CONTROL SANO</b>	9 (69.23%)	4(30.77%)	13

p>0.05

**TABLA 7. DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES DE ACUERDO AL GRUPO Y AL RESULTADO DEL CULTIVO PARA BACTERIAS**

	NEGATIVO	POSITIVO	TOTAL
<b>DERMATITIS ATÓPICA</b>	31(55.36%)	25(44.64%)	56
<b>CONTROL SANO</b>	13(100%)	0 (0%)	13

p<0.05

En 21 cultivos crecieron exclusivamente bacterias y en 4 *Malassezia spp.* más bacterias; de éstos 25 cultivos con crecimiento bacteriano en todos se identificaron cocos Gram positivos, 4 de éstos tuvieron además cocos Gram negativos y 1 cultivo bacilos Gram negativos (ver anexo 6).

Se realizó una correlación de Spermán a la colonización de *Malassezia spp.* y gravedad, donde se encontró un porcentaje mayor de cultivos positivos en los pacientes que tenían DA leve con una p no significativa (0.0405) (ver tabla 8); los cultivos donde existió crecimiento de bacterias fueron más frecuentes en DA leve con una significancia estadística de 0.001 (ver tabla 9).

**TABLA 8. DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES DE ACUERDO CON CULTIVO POSITIVOS A MALASSEZIA SPP. Y LA GRAVEDAD DE LA DERMATITIS ATÓPICA**

	SANO	%	LEVE	%	MODERADA	%	GRAVE	%
NEGATIVO	9	69,2	27	84.4	15	93.8	7	87.5
POSITIVO	4	30.6	5	15.6	1	6.5	1	12.5
TOTAL	13	100	32	100	16	100	8	100

p 0.405

**TABLA 9. DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES DE ACUERDO CON CULTIVOS POSITIVOS A BACTERIAS Y LA GRAVEDAD DE LA DA**

	SANO	%	LEVE	%	MODERADA	%	GRAVE	%
NEGATIVO	13	100	22	68.8	5	31.5	4	50
POSITIVO	0	0.00	10	31.3	11	68.8	4	50
TOTAL	13	100	32	100	16	100	8	100

p<0.05

Se realizó prueba de catalasa a las 11 muestras donde se identificó *Malassezia spp.* siendo el 100% con resultado positivo (ver fotografías en anexo 7).

Se tomó muestra con un asa bacteriológica de los 11 crecimientos de *Malassezia spp.*, se fijaron en un portaobjetos y se les realizó tinción de Gram; al visualizarse por microscopía de luz en los lentes de 40x y 100x las morfologías microscópicas reportadas fueron 5 esféricas, 4 ovoides y 2 cilíndricas (ver anexo 8).

Después del aislamiento para obtener colonias puras se lograron identificar 9 de las 11 especies de *Malassezia* con extracción de DNA, amplificación por técnica de PCR, purificación de PCR y restricción enzimática. Los geles de agarosa correspondientes a cada una de estas técnicas se encuentran en los anexos 9, 10, 11 y 12.

Para el análisis por lectura de bandas de 50 pares de bases una vez obtenido el gel con las reacciones enzimáticas de Hhal y BTSC1 se cuenta con una guía que contiene los

puntos de corte, amplificación y tamaño de fragmentos en cada una de ellas en la Tabla 9 (ver anexo 13). Obteniendo de esta forma en las muestras del grupo con DA 5 *Malassezia furfur* y 1 *Malassezia globosa*; en el grupo control 2 *Malassezia furfur* y 1 *Malassezia globosa* (ver tabla 10).

**TABLA 10. DISTRIBUCIÓN DE LA TOPOGRAFÍA DE ACUERDO CON EL GRUPO Y AL RESULTADO DE *MALASSEZIA SPP.***

	GRUPO DA		GRUPO CONTROL		TOTAL
	<i>Malassezia furfur</i>	<i>Malassezia globosa</i>	<i>Malassezia furfur</i>	<i>Malassezia globosa</i>	
<b>Cabeza</b>	3	1	0	0	4
<b>Tronco</b>	1	0	1	1	3
<b>Extremidades superiores</b>	1	0	1	0	2
<b>Extremidades inferiores</b>	0	0	0	0	0
<b>TOTAL</b>	5	1	2	1	9

## DISCUSIÓN

DA es una enfermedad inflamatoria crónica, recurrente y pruriginosa que afecta con mayor frecuencia a niños y con un ligero predominio en mujeres;<sup>4,7</sup> en nuestro estudio incluimos pacientes pediátricos desde los 3 meses hasta los 17 años con 11 meses con una media de edad de 8 años, se encontró mayor prevalencia de sexo femenino. En cuanto al lugar de procedencia la mayoría son de la Ciudad de México y el Estado de México; esto se debe a la cercanía a nuestra Institución, ya que esta enfermedad requiere valoraciones clínicas frecuentes para prevención de brotes, control y tratamiento en presentaciones recalcitrantes al mismo; sin embargo el Hospital Infantil de México Federico Gómez es un centro de referencia de todos los estados de país, por ello tenemos reporte de pacientes que acuden desde Puebla, Guerrero, Veracruz, Oaxaca entre otros.

La literatura describe que aproximadamente el 70% de los pacientes tienen antecedentes familiares de enfermedades atópicas.<sup>7</sup> Al realizar el análisis de nuestra base de datos encontramos que en el grupo de pacientes con DA el 26.1 % tienen antecedente familiar de primer grado con dermatitis atópica, 20.3% rinitis alérgica y 27.5% asma; en menor proporción alergia alimentaria y a medicamentos; por otro lado, en el grupo control no se observa esta incidencia. Lo mismo sucede en cuanto a los antecedentes personales patológicos relacionados con atopia en el grupo de DA un 32.1% presenta alergia alimentaria, 30.3% rinitis alérgica y 21.4% asma, entre otros; en cambio en el grupo control solo 1 paciente tenía antecedente de alergia a medicamentos que es lo esperado en la población general y coincide con lo descrito.<sup>7</sup>

Hanifin y Rajka en 1980 establecieron criterios diagnósticos para DA que hasta la actualidad tienen validación para su aplicación en estudios científicos a pesar de las nuevas revisiones y modificaciones que se han intentado;<sup>12</sup> se dividen en criterios mayores que incluyen:

1. Prurito que se reporta en el 98.2% del grupo con DA.
2. Morfología y distribución típica de acuerdo con la edad en el 100% de pacientes con DA.
3. Cronicidad igualmente en el 100% de nuestro estudio y,
4. Antecedente personal o familiar de atopia descritos por Hanifin y Rajka en el 50% historia personal y el 70% antecedente familiar<sup>12</sup>; nosotros reportamos un 80.36% de prevalencia de este criterio en la población estudiada.

Con respecto a los criterios menores Hanifin y Rajka describen 23 de los cuales indican que xerosis es altamente sugestiva de DA,<sup>12</sup> siendo el único signo que se presenta en el 100% de nuestros pacientes con DA, seguido por el 85.71% que corresponden a edad de comienzo temprano justificada porque estudios previos describen que hasta el 95% se diagnostica antes de los 5 años de edad<sup>12</sup>, intolerancia a lana y detergentes en el 78.6% puntualizada por los autores como una característica muy común, el 71.4% presenta evolución influenciada por factores ambientales o emocionales, 62.5% oscurecimiento periorbital y un 53.6% dermatografismo blanco dentro de las más frecuentes en nuestro grupo.

Figueras y cols. establecen la importancia del daño en la estructura y en la función barrera cutánea que permite por un lado la penetración de alérgenos, y por otro pone en riesgo la interacción entre esta, el microbioma cutáneo y los factores ambientales.<sup>2</sup> Por ello es importante incluir los tratamientos previos que se usaron en el grupo de DA que son emolientes, esteroides tópicos y sistémicos, inhibidores de calcineurina así como inmunomoduladores sistémicos y factor de transferencia; si bien durante la toma de la muestra se verificó que la piel está limpia sin medicación para el brote actual el consumo periódico de estos pueden modificar el microambiente causando una disbiosis cutánea que se debe tener en cuenta al momento de analizar los resultados.

Al visualizar la escama de piel con azul de toluidina a la microscopía de luz obtuvimos que resultaron positivos los exámenes directos en el 33.33% del grupo con DA y solo el 1.5% en el grupo control con una  $p < 0.05\%$ , este estudio es evaluador dependiente por lo que no es sugestivo de presencia de *Malassezia* solo indica levaduras sin definir su etiología clara lo que puede corresponder a la microbiota esperada en piel; de estas levaduras la mayor proporción es de 5 a 10 por campo y de morfología esférica. Por tal razón se esperó al crecimiento de cultivos. De la revisión de estudios previos existe una gran controversia ya que, aunque hay quienes encuentran una relación directa entre la colonización de *Malassezia spp.*, de acuerdo con su topografía y su gravedad; así como quienes no revelan diferencia en la frecuencia de colonización de pacientes sanos vs DA. En contraposición Yim y cols. hallaron menos individuos con cultivos de *Malassezia*

positivos entre los pacientes con DA. También se confirmó que la prevalencia de un cultivo de *Malassezia* positivo no se correlacionó con la gravedad de la DA.<sup>4</sup>

Esta hipótesis se confirma en nuestro grupo de pacientes donde el 12.5% del grupo de DA vs el 30.8% del grupo control tuvo crecimiento de *Malassezia spp.* en los cultivos con una  $p > 0.05\%$ ; además de que al correlacionar gravedad se encontró colonización más frecuente en DA leve con un  $p > 0.05\%$ .

Es relevante también indicar que en el grupo de DA más del 40% de los cultivos tuvieron crecimiento de colonias donde se identificó por tinción de Gram presencia de bacterias y las cuales fueron más frecuentes en el grupo de DA leve con una  $p < 0.05\%$  esto relacionado directamente con la disbiosis producto de la alteración de la barrera cutánea que caracteriza a estos pacientes.

Apres y cols han propuesto que los pacientes con DA, particularmente aquellos con dermatitis localizada en cabeza y cuello (área del cuerpo que se encuentra con mayor colonización por *Malassezia*), reaccionan específicamente a estos organismos, lo que lleva a una inflamación de la piel que puede exacerbar la dermatitis subyacente e incrementar su gravedad.<sup>27</sup> Encontramos que los pacientes que presentaron cultivos positivos a *Malassezia spp.* la localización más frecuente es cabeza en el grupo DA mientras en el grupo control se aislaron en tronco relacionado con la predilección por áreas seboreicas de este microorganismo. La topografía de donde obtuvimos las muestras en su mayoría fue tronco que incluye cuello y extremidades al ser las áreas que más afectadas en nuestros pacientes.

En la presente investigación para valorar gravedad aplicamos el índice de SCORAD obteniendo que el 57% se clasifican como DA leve (puntuación menor a  $< 25$ ); con una media del índice subjetivo 54.52 que se corresponde con DA grave.

La microbiota fúngica de la piel sana comprende casi exclusivamente *Malassezia spp* y está ampliamente descrita su predilección por áreas seboreicas. De las diferentes especies descritas *M. globosa* y *M. restricta*, predominan en la piel humana y se identifican en casi todos los individuos y sitios del cuerpo; lo que puede variar de acuerdo con la distribución geográfica.<sup>1</sup> En nuestra muestra se aislaron *M. furfur* y *M. globosa* en ambos grupos sin diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0.05\%$ ).

## CONCLUSIÓN

El papel de *Malassezia spp.* continúa siendo muy controvertido en DA., en nuestra muestra no se logró establecer una correlación entre la gravedad de dermatitis atópica y la colonización de *Malassezia spp.* comparando pacientes con esta enfermedad y pacientes sanos, se aislaron *M. furfur* y *M. globosa* en ambos grupos sin diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0.05\%$ ), lo que puede corresponder a la microbiota fúngica esperada. La topografía más frecuente de colonización fueron cabeza y tronco lo que se justifica por la predilección de áreas seboreicas del microorganismo.

Como es ampliamente conocido el papel de la disbiosis en esta entidad clínica se corroboró con el crecimiento bacteriano en el 40% de los cultivos de estos pacientes mientras que en el grupo control no se reportó ningún crecimiento con una p estadísticamente significativa.

Se requiere estudios que incluyan IgE específica para establecer la respuesta inmunológica de estos pacientes a *Malassezia spp.* como alérgeno que pueda agravar la DA.

**CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES**

	1 OCTUBRE 2018 DICIEMBRE 2018	ENERO 2019 ABRIL 2019	MAYO 2019 SEPTIEMB 2019	OCTUB 2019 FEB 2020	MARZO 2020 DIC 2020	ENERO 2021 Feb 2021
Elaboración y aprobación de anteproyecto.						
Revisión bibliográfica de artículos relacionados.						
Toma de muestras						
Procesamiento de pruebas bioquímicas y moleculares.						
Llenado y revisión de base de datos de pacientes y variables que se incluirán en el estudio						
Revisión de resultados y recolección final de datos.						
Análisis de resultados						
Redacción de protocolo						
Revisión por tutores						
Versión final de protocolo de investigación						



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Glatz M, Bosshard P, Hoetzenecker W, Schmid-Grendelmeier P. The role of *Malassezia* spp. in atopic dermatitis. *J Clin Med*. 2015; 4:1217–28.
2. Figueras I, Bonfillet M. Update on atopic dermatitis pathogenesis and treatment. *PIEL (Barc)*. 2018; 33:457–71.
3. Valencia A, Toledo M, Ramírez E, et al. Association of *Malassezia* to atopic dermatitis. *Curr Fungal Infect Rep*. 2018. <https://doi.org/10.1007/s12281-018-0330-0>
4. Yim SM, Kim JY, Ko JH, Lee YW, Choe YB, Ahn KJ. Molecular analysis of malassezia microflora on the skin of the patients with atopic dermatitis. *Ann Dermatol*. 2010;22(1):41-7.
5. De Benedetto A, Kubo A, Beck LA. Skin barrier disruption: a requirement for allergen sensitization? *J Invest Dermatol*. 2012; 132:949–63.
6. Hulshof L, Hack D, Hasnoe Q, et al. Stratum corneum analysis provide a minimal invasive tool to study immune response and skin barrier in atopic dermatitis children. *Br J Dermatol*. 2018. doi: 10.1111/bjd.16994.
7. Sullivan M, Silverberg N. Current and emerging concepts in atopic dermatitis pathogenesis. *Clin Dermatol*. 2017; 35:349–353.
8. Grice E, Dawson A. Host–microbe interactions: *Malassezia* and human skin. *Curr Opin Microbiol*. 2017; 40:81–87.
9. Weidinger S, Novak N. Atopic dermatitis. *Lancet*. 2016; 387:1109–22.
10. Eichenfield L, Tom W, Chamlin S, et al. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 1. Diagnosis and assessment of atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*. 2014; 70:338-51.
11. Eichenfield L, Ahluwalia J, Waldman A, et al. Current guidelines for the evaluation and management of atopic dermatitis: A comparison of the Joint Task Force Practice Parameter and American Academy of Dermatology guidelines. *J Allergy Clin Immunol*. 2017; 139:S49-57.
12. Hanifin J.M, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 1980; 92:44–47.
13. Tsakok T, Woolf R, Smith C, Weidinger S, Flohr C. Atopic dermatitis: the skin barrier and beyond. 2018. doi: 10.1111/bjd.16934
14. Shi B, Bangayan NJ, Curd E, et al. The skin microbiome is different in pediatric versus adult atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2016; 138(4):1233-1236.
15. Kennedy E, Connolly J, Hourihane J, et al. Skin microbiome before development of atopic dermatitis: Early colonization with commensal staphylococci at 2 months is associated with a lower risk of atopic dermatitis at 1 year. *J Allergy Clin Immunol*. 2017; 139:166-72.
16. Glatz M, Bosshard P, Schmid-Grendelmeier P. The role of fungi in atopic dermatitis. *Immunol Allergy Clin N Am*. 2017; 37:63–74.
17. Mittermann I, Wikberg G, Johansson C, et al. IgE Sensitization profiles differ between adult patients with severe and moderate atopic dermatitis. *PLoS ONE*. 2016; 11(5): e0156077. doi:10.1371/journal.pone.0156077.
18. Petrokilidou, C., Pavlou, E., Gaitanis, G., et al. The lipid profile of three *Malassezia* species assessed by Raman spectroscopy and discriminant analysis. *Molecular and Cellular Probes*. 2019. doi:10.1016/j.mcp.2019.06.006.
19. Rehal B, Armstrong AW. Health outcome measures in atopic dermatitis: a systematic review of trends in disease severity and quality-of-life instruments 1985-2010. *PLoS ONE* 2011; 6:e17520. doi: 10.1371/journal.pone.0017520.
20. Holm EA, Jemec GB. Time spent on treatment of atopic dermatitis: a new method of measuring pediatric morbidity?. *Pediatr Dermatol*. 2004; 21:623-7.

21. Krafchik BR, Jacob S, Bieber T, et al. Eczematous dermatitis. In: Schachner L, Hansen R, editors. *Pediatric Dermatol. USA*: Mosby; 2011: 851–78.
22. Williams HC, Burney PG, Strachan D, Hay RJ. The UK Working Party's diagnostic criteria for atopic dermatitis. II. Observer variation of clinical diagnosis and signs of atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 1994; 131: 397-405.
23. European Task Force on atopic dermatitis. Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD Index (consensus report of the European Task Force on atopic dermatitis). *Dermatology* 1993; 186:23–31.
24. Oranje AP, Glazenburg EJ, Wolkerstorfer A, de Waard-van der Spek FB. Practical issues on interpretation of scoring atopic dermatitis: The SCORAD index, objective SCORAD and the three-item severity score. *Br J Dermatol*. 2007; 157(4):645–648.
25. Theelen, B., Cafarchia, C., Gaitanis, G., Bassukas, et al. *Malassezia* ecology, pathophysiology, and treatment. *Medical Mycology*, 2018; 56(1): S10–S25. doi:10.1093/mmy/myx134.
26. Hong C, Sussman G, Turchin I, et al. Approach to the assessment and management of adult patients with atopic dermatitis: A consensus. Document. *J Cutan Med Surg*. 2018; 22:17–20.
27. Aspres N, Anderson C. *Malassezia* yeasts in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Australas J Dermatol*. 2004; 45(4):199–207.
28. Pedrosa, A. F., Lisboa, C., Branco, et al. *Malassezia* interaction with a reconstructed human epidermis: keratinocyte immune response. *Mycoses*. 2019. doi:10.1111/myc.12965.
29. Devos SA, van der Valk PG. The relevance of skin prick tests for *Pityrosporum ovale* in patients with head and neck dermatitis. *Allergy* 2000; 55: 1056–8.
30. Cafarchia C, Gasser RB, Figueredo LA, et al. Advances in the identification of *Malassezia*. *Mol Cell Probes*. 2011; 25(1): 1-7. doi: 10.1016/j.mcp.2010.12.003.
31. Wessels MW, Doekes G, Van Ieperen-Van Kijk AG, et al. IgE antibodies to *Pityrosporum ovale* in atopic dermatitis. *Br J Dermatol*. 1991 Sep;125(3):227-32.

**LIMITACIÓN DEL ESTUDIO**

El servicio de Dermatología Pediátrica del Hospital Infantil de México atiende a un aproximado de 25 pacientes por mes con diagnóstico de dermatitis atópica, población suficiente para lograr el número mínimo requerido para una muestra significativa del estudio. La Unidad de Micología cuentan con la infraestructura y los recursos humanos para el procesamiento de muestras.

El laboratorio de Alergia e Inmunología requiere conservar las muestras hasta la disponibilidad de reactivos por lo que no se pudo procesar las muestras para IgE específica.

Los costos del presente se cubrirán con el fondo de investigación del servicio de Dermatología.

Al tratarse de un estudio transversal aportará información en una línea determinada de tiempo.

**ANEXO 1**

Número de pacientes: \_\_\_\_\_

**SELECCIONE LOS CRITERIOS QUE CUMPLE EL PACIENTE**

<p><b>CRITERIOS DIAGNÓSTICO DE DERMATITIS ATÓPICA</b>  <i>Hanifin y Rajka (1980), modificados en 1997 por The Joint Task Force on Practice Parameters. (AAAAI, ACAAI, JCAAI)</i></p>	
<p><b>Criterios mayores:</b></p> <p>1. Prurito _____</p> <p>2. Lesiones con morfología y distribución típica _____</p> <p style="margin-left: 20px;">a. Liquenificación áreas flexoras en adultos</p> <p style="margin-left: 20px;">b. Afección facial, áreas flexoras y superficies extensoras en los niños y jóvenes</p> <p>3. Dermatitis crónica o recurrente _____</p> <p>4. Historia familiar o personal de atopia _____</p>	
<p><b>Criterios menores:</b></p> <p>1. Xerosis _____</p> <p>2. Ictiosis/hiperlinealidad palmar/queratosis pilar _____</p> <p>3. Reactividad cutánea inmediata (tipo I) _____</p> <p>4. Elevación de valores séricos de IgE _____</p> <p>5. Edad de comienzo temprano _____</p> <p>6. Susceptibilidad a infecciones cutáneas y alteración de la inmunidad celular.</p> <p>_____</p> <p>7. Dermatitis inespecífica de manos y pies _____</p> <p>8. Eccema de pezón _____</p> <p>9. Queilitis _____</p> <p>10. Conjuntivitis recurrente _____</p> <p>11. Pliegue infraorbitario de Dennie Morgan _____</p> <p>12. Oscurecimiento periorbital _____</p> <p>13. Palidez facial/eritema facial _____</p> <p>14. Pitiriasis alba _____</p> <p>15. Pliegue anterior del cuello _____</p> <p>16. Prurito a la sudoración _____</p> <p>17. Acentuación perifolicular _____</p> <p>18. Dermografismo blanco/blanqueamiento retardado _____</p> <p>19. Queratocono _____</p> <p>20. Catarata subcapsular anterior _____</p> <p>21. Evolución influenciada por factores ambientales o emocionales _____</p> <p>22. Intolerancia a alimentos _____</p> <p>23. Intolerancia a lana y detergentes _____</p>	

Cumple al menos tres criterios mayores más tres menores.

SI \_\_\_\_\_

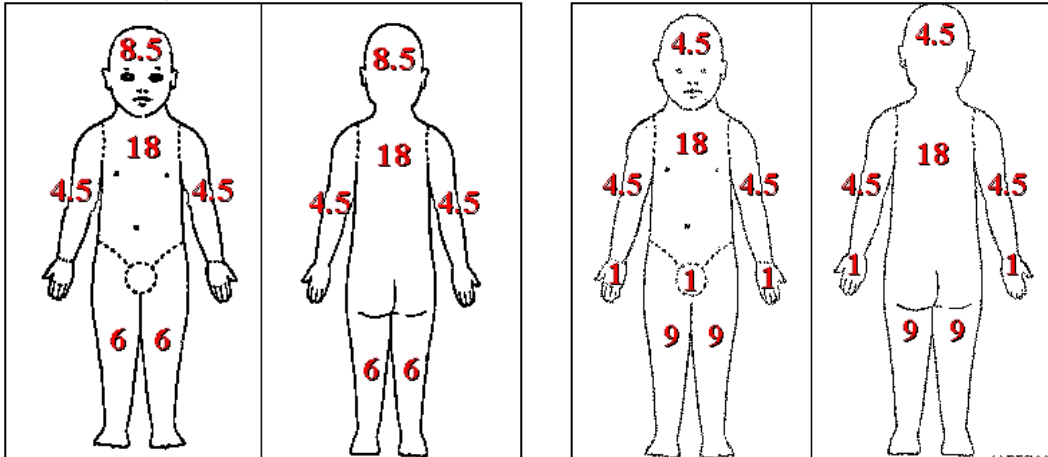
NO \_\_\_\_\_

**ANEXO 2**

**Puntaje de gravedad del índice de dermatitis atópica (SCORAD)**

**A. Extensión**

Calcula un porcentaje de la superficie corporal involucrada, se califica con 100 puntos.



Niños menores de 2 años

Niños mayores de 2 años.

**B. Intensidad**

Criterio	Ausente (0)	Leve (1)	Moderado (2)	Grave (3)
Eritema				
Pápulas/edema				
Exudado/costras				
Excoriación				
Liquenificación				
Sequedad en la piel en áreas no involucradas				

**C. Síntomas subjetivos**

0 es sin síntomas y 10 es el peor de los síntomas, promedio de las últimas tres noches.

Prurito 0 ..... 10

Alteración del sueño 0

10

Total, SCORAD  $A/5 + 7B/2 = A/5 + 7B/2 + C =$

**Leve < 25, Moderado >25 <40, Grave >40**

**ANEXO 3**

**Hospital Infantil de México Federico Gómez  
Dermatología Pediátrica  
Asociación de *Malassezia spp.* con dermatitis atópica en pacientes pediátricos**

Nombre: \_\_\_\_\_ Registro: \_\_\_\_\_

Sexo: M \_\_\_ F \_\_\_ Residencia: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Fecha de nacimiento: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_

Teléfonos: \_\_\_\_\_

Antecedentes heredo-familiares:

Madre: \_\_\_\_\_

Padre: \_\_\_\_\_

Hermanos: \_\_\_\_\_

Rama materna: \_\_\_\_\_

Rama paterna: \_\_\_\_\_

Antecedentes personales patológicos:

Quirúrgicos: \_\_\_\_\_

Alérgicos: \_\_\_\_\_

Transfusionales: \_\_\_\_\_

Exantemáticas: \_\_\_\_\_

Hospitalizaciones: \_\_\_\_\_

Dermatológico además de DA: \_\_\_\_\_

Otros: \_\_\_\_\_

**Exploración física:** Peso: \_\_\_\_\_ Kg Talla: \_\_\_\_\_ cm

FC \_\_\_ x' FR \_\_\_ x' T° \_\_\_ °C TA \_\_\_/\_\_\_ mmHg Fototipo: \_\_\_\_\_

	<b>Normal</b>	<b>Anormal</b>	<b>Observaciones</b>
Aspecto general			
Oído, nariz y garganta			
Cuello			
Cardiorespiratorio			

Abdomen			
Genitales			
Extremidades			
Neurológico			
Piel además de DA			

**Criterios de Hanifin y Rajka**

Cumple al menos 3 criterios mayores y tres criterios menores: SI \_\_\_ NO \_\_\_

Edad de inicio de DA: \_\_\_ años \_\_\_ meses

Número de exacerbaciones en los últimos 6 meses: \_\_\_\_\_

Promedio de la duración de exacerbaciones: \_\_\_\_\_

**SCORAD:** Leve < 25 \_\_\_ Moderado 25-40 \_\_\_ Grave >40 \_\_\_

**Tratamiento actual:** \_\_\_\_\_

**Tiempo de tratamiento:** \_\_\_\_\_

**IgE específica para *Malassezia spp.***

ImmunoCAP® m227: Positivo \_\_\_ Negativo \_\_\_ Valor: \_\_\_\_\_

**Topografía de piel estudiada:** Cabeza \_\_\_ Tronco \_\_\_ Extremidades superiores \_\_\_ Extremidades inferiores \_\_\_\_\_.

**Examen directo:** Positivo \_\_\_ Negativo \_\_\_ Morfología: \_\_\_\_\_

**Cultivo:** \_\_\_\_\_ # \_\_\_\_\_

Número de colonias: \_\_\_\_\_

Color: \_\_\_\_\_

Superficie: verrugosa \_\_\_ lisa \_\_\_ otro \_\_\_\_\_

Aspecto: brillante \_\_\_ mate \_\_\_ otro \_\_\_\_\_

Bordes: bien definidos \_\_\_\_\_ irregulares \_\_\_\_\_

Precipitados: Si \_\_\_ No \_\_\_

**Resiembr:** \_\_\_\_\_ # \_\_\_\_\_

Color: \_\_\_\_\_

Superficie: verrugosa \_\_\_ lisa \_\_\_ otro \_\_\_\_\_

Aspecto: brillante \_\_\_ mate \_\_\_ otro \_\_\_\_\_

Bordes: bien definidos \_\_\_\_\_ irregulares \_\_\_\_\_

Precipitados: Si \_\_\_\_ No \_\_\_\_

Forma de las colonias: Globular \_\_\_\_ Elipsoidal \_\_\_\_ Cilíndrica \_\_\_\_

**Catalasa:** Positivo \_\_\_\_ Negativo \_\_\_\_ **Débilmente positivo:** \_\_\_\_

**Análisis de patrón de restricción:** \_\_\_\_\_

**Secuenciación:** Si \_\_\_\_ No \_\_\_\_ **Reporte:** \_\_\_\_\_



#### ANEXO 4

#### Fotografías clínicas



Imagen 1. Fotografías de pacientes con diagnóstico de dermatitis atópica con afectación en segmento corporal cabeza: mejillas y periorbitaria y mentón.



Imagen 2. Fotografías de pacientes con diagnóstico de dermatitis atópica con afectación en segmento corporal tronco: cuello y tórax anterior.



Imagen 3. Fotografías de pacientes con diagnóstico de dermatitis atópica con afectación en segmento corporal extremidades superiores: dorso de mano y pliegue cubital.



Imagen 4. Fotografías de pacientes con diagnóstico de dermatitis atópica con afectación en segmento corporal extremidades inferiores: piernas y pliegue poplíteo.



Imagen 5. Fotografías de pacientes del grupo control con piel sin lesiones. Segmento: cabeza



Imagen 6. Fotografías de pacientes del grupo control con piel sin lesiones. Segmento: tronco



Imagen 7. Fotografías de pacientes del grupo control con piel sin lesiones. Segmento: extremidad superior.



Imagen 8. Fotografías de pacientes del grupo control con piel sin lesiones. Segmento: extremidad inferior.

## ANEXO 5

Examen directo de escamas



Imagen 10. Examen directo de escamas de piel contrastado con azul de toluidina. No se observan levaduras. Microscopia de luz 10x.

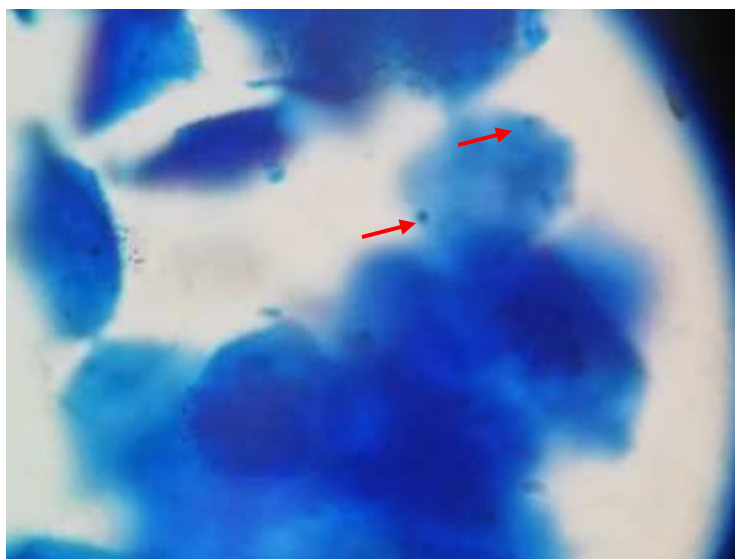


Imagen 11. Microscopia de luz 100x, azul de toluidina. Se observan pocas levaduras esféricas (+).



## ANEXO 6

Morfología macroscópica y microscópica de cultivos originales agar Dixon modificado



Imagen 12. Aspecto de las colonias de *Malassezia* crecida de la muestra 032, después de 7 días de incubación en Adm a 32°C. Aspecto cremoso, color blanco-amarillento, de aspecto mate, superficie lisa.



Imagen 13. Examen microscópico de *Malassezia spp.* Teñida con Gram. Se observan levaduras predominantemente Gram-positivas y ovoides, con gemación, de 2.47 x 1.64 micras. (100X)



Imagen 14. Aspecto de las colonias de bacterias crecida de la muestra 008, después de 3 días de incubación en Adm a 32°C. Aspecto cremoso, color blanco-amarillento, de aspecto brillante, superficie lisa, bordes definidos sin precipitados.

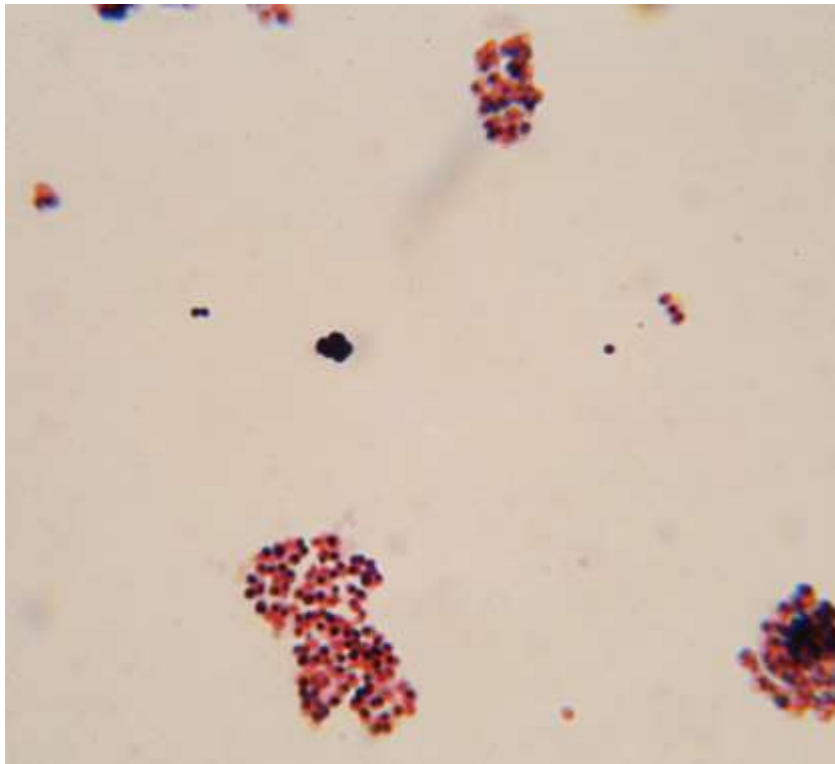


Imagen 15. Examen microscópico de cultivo de muestra 008. Tinción de Gram se observan bacterias cocos Gram-positivos que miden menos de 1 micra.

ANEXO 7

Prueba de catalasa



Imagen 16. Fotografías de prueba de catalasa positiva de las 11 muestras que evidenciaron presencia de *Malassezia spp.*



## ANEXO 8

Morfología microscópica de aislamientos de *Malassezia spp.*

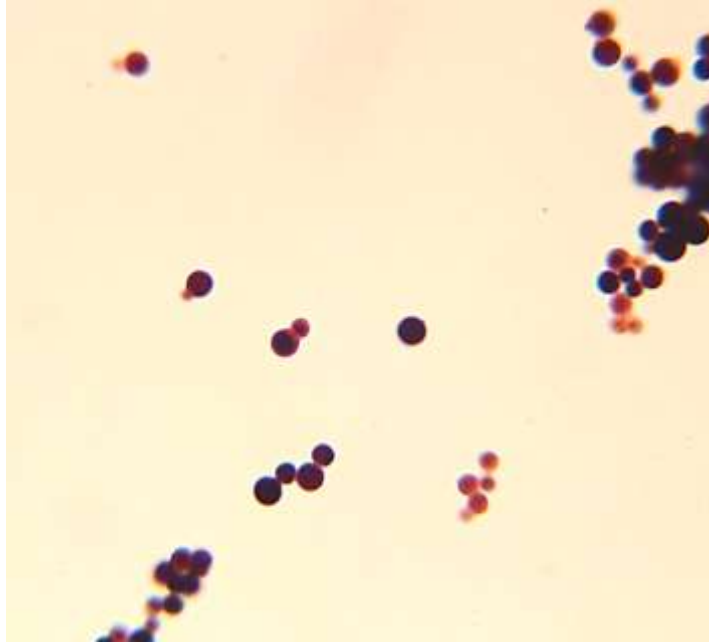


Imagen 17. Examen microscópico de *Malassezia spp.* Teñida con Gram. Se observan levaduras Gram-positivas y esféricas, con gemación, de 3.64 x 4.87 micras. (100X).

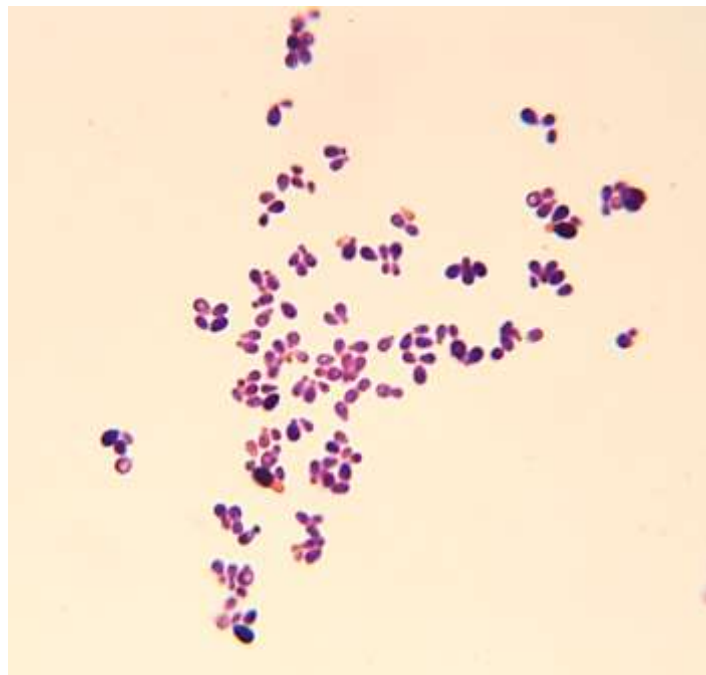


Imagen 18. Examen microscópico de *Malassezia spp.* Teñida con Gram. Se observan levaduras Gram-positivas y ovoides, con gemación, de 3.29 x 1.64 micras. (100X).

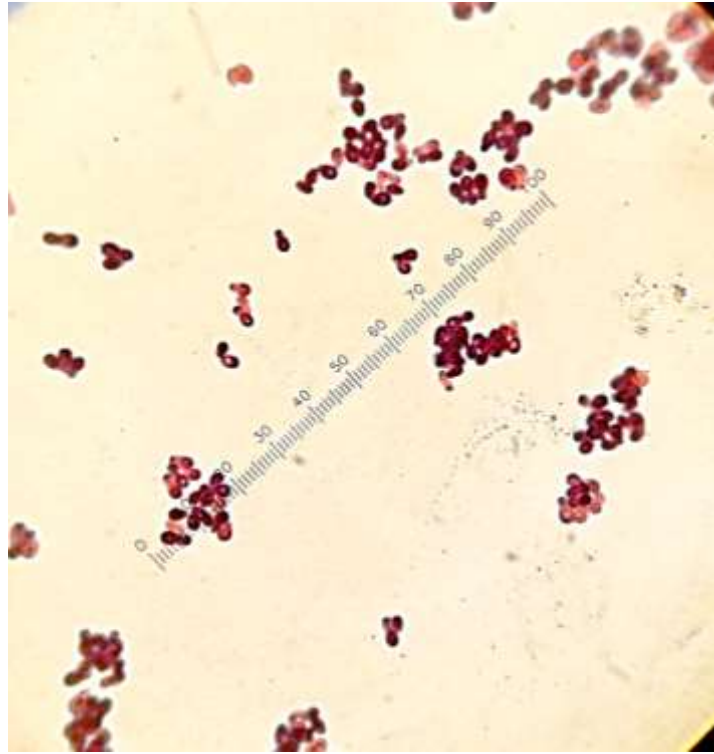


Imagen 19. Examen microscópico de *Malassezia spp.* Teñida con Gram. Se observan levaduras Gram-positivas y cilíndricas, con gemación, de 2.64 x 1.64 micras. (100X).

ANEXO 9

Geles de agarosa de extracción de DNA

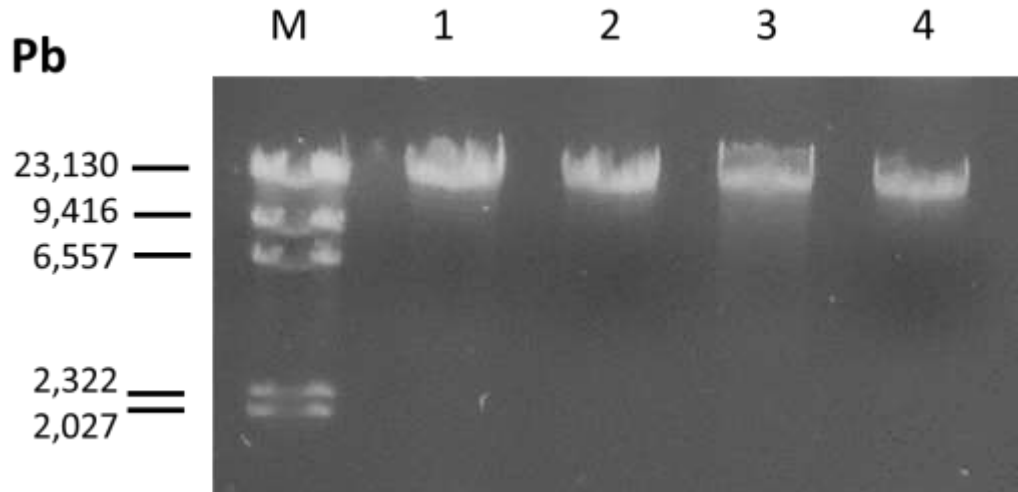


Imagen 20. DNA corrido en un gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE 1X, correspondiente a las muestras 14 y 46. Pb: pares de bases. M: marcador Lambda DNA/Hind III. 1: muestra 14, primera elución; 2: muestra 14, segunda elución; 3: muestra 43, primera elución; 4: muestra 43, segunda elución. Este DNA muestra buena cantidad y calidad.

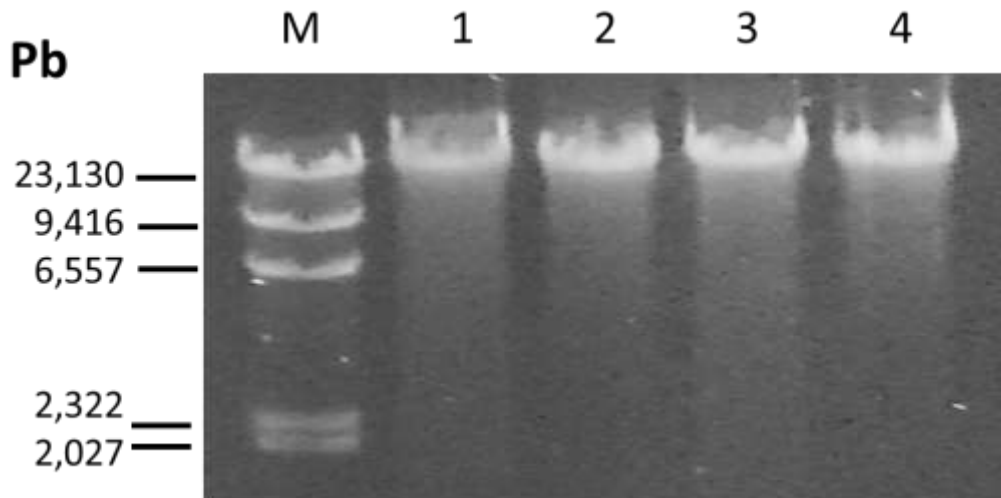


Imagen 21. DNA corrido en un gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE 1X, correspondiente a las muestras 66.1 y 66.2. Pb: pares de bases. M: marcador Lambda DNA/Hind III. 1: muestra 66.1, primera elución; 2: muestra 66.1, segunda elución; 3: muestra 66.2, primera elución; 4: muestra 66.2, segunda elución. Este DNA muestra buena cantidad y calidad.

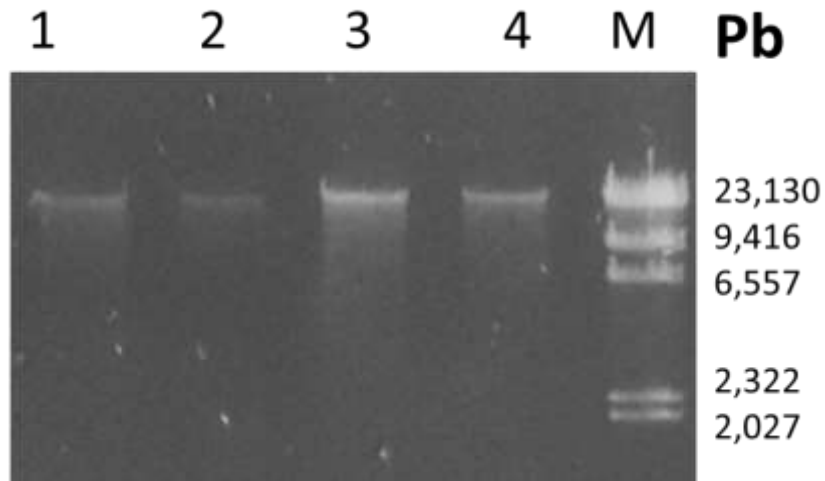


Imagen 22. DNA corrido en un gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE 1X, correspondiente a las muestras 33 y 59 Pb: pares de bases. M: marcador Lambda DNA/Hind III. 1: muestra 33, primera elución; 2: muestra 33, segunda elución; 3: muestra 59, primera elución; 4: muestra 59, segunda elución. Este DNA muestra buena cantidad y calidad.

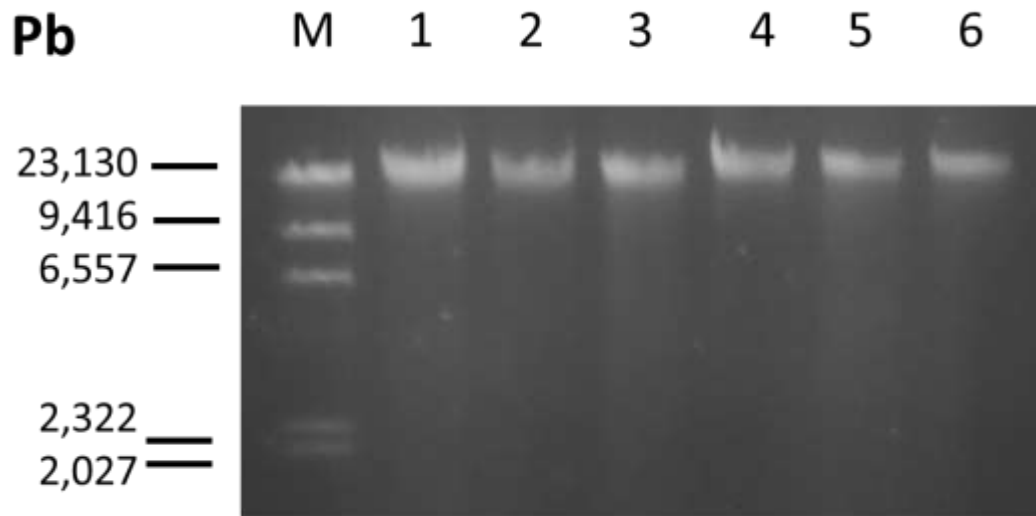


Imagen 23. DNA corrido en un gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE 1X, correspondiente a la muestra 67 Pb: pares de bases. M: marcador Lambda DNA/Hind III. 1: muestra 67.1, primera elución; 2: muestra 67.1, segunda elución; 3: muestra 67.2.1, primera elución; 4: muestra 67.2.1, segunda elución; 5: muestra 67.2.2, primera elución; 6: muestra 67.2.2, segunda elución. Este DNA muestra buena cantidad y calidad.

**ANEXO 10**

Geles de agarosa de PCR

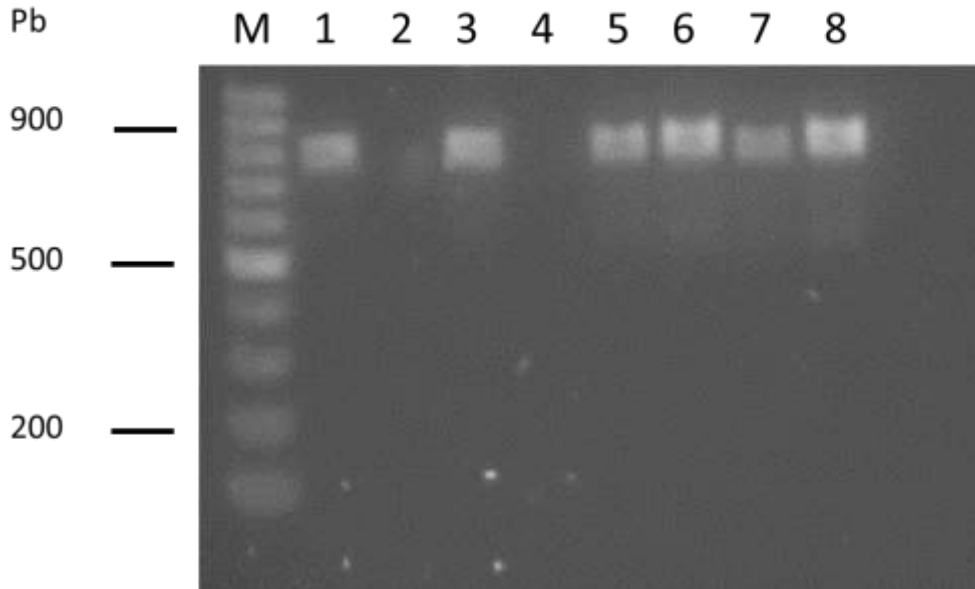


Imagen 24. Productos de PCR corridos en un gel de agarosa al 1,5% contrastado con GelRed. Pb: pares de bases. M: marcador de 100 pb. 1: muestra 14.1; 2: sin muestra; 3: muestra 43.2; 4: control negativo; 5: muestra 32.2; 6: muestra 32.3; 7: muestra 33; 8: muestra 59.

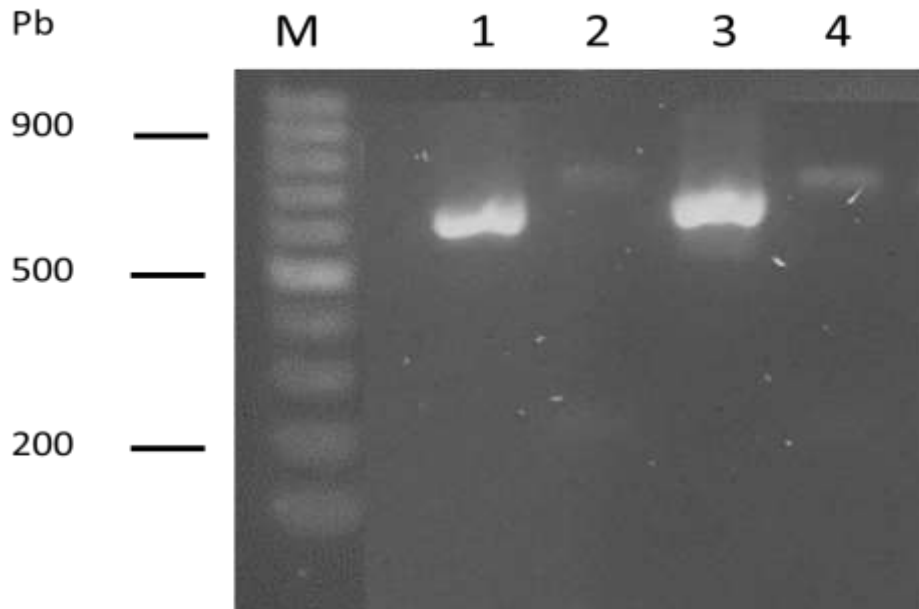


Imagen 25. Productos de PCR corridos en un gel de agarosa al 1,5% contrastado con GelRed. Pb: pares de bases. M: marcador de 100 pb. 1: muestra 36; 2: muestra 43; 3: muestra 66.1; 4: 66.2.

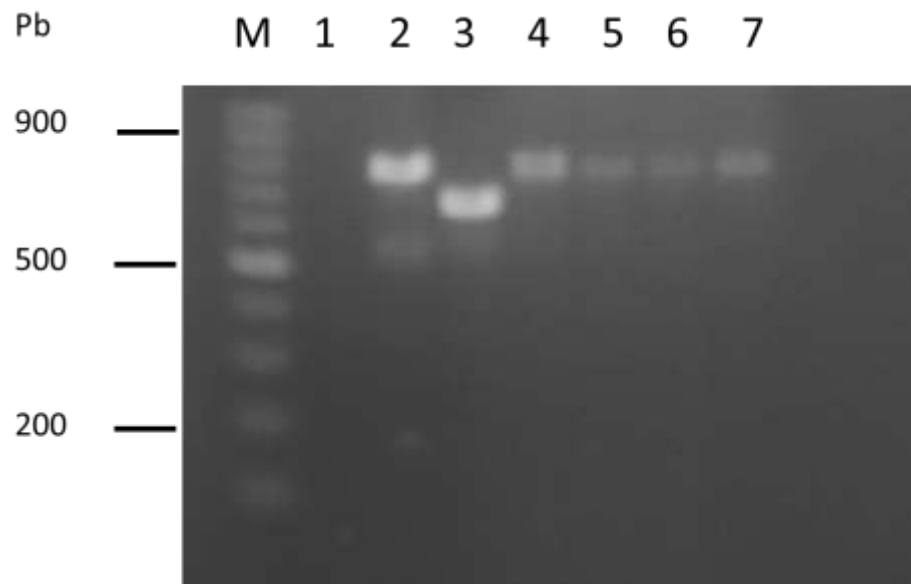


Imagen 26. Productos de PCR corridos en un gel de agarosa al 1,5% contrastado con GelRed. Pb: pares de bases. M: marcador de 100 pb. 1: control negativo; 2: muestra 33; 3: muestra 33; 4: muestra 66.1; 5: muestra 66.1; 6: muestra 66.2; 7: muestra 66.2.

ANEXO 11

Geles de agarosa de purificado de PCR

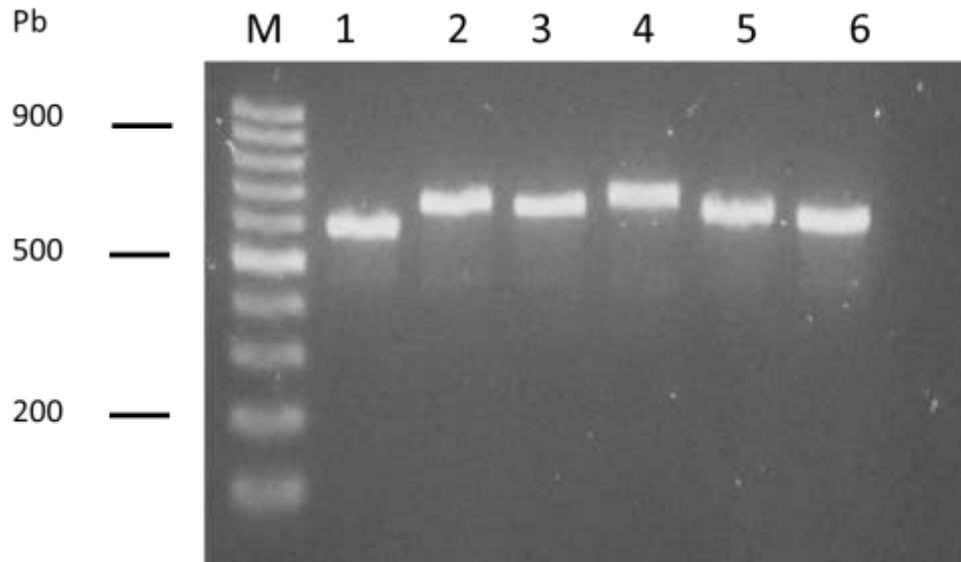


Imagen 27. Productos de PCR purificados corridos en un gel de agarosa al 1,5% contrastado con GelRed. Pb: pares de bases. M: marcador de 100 pb. 1: muestra 14; 2: muestra 32.2; 3: muestra 32.3; 4: muestra 33; 5: muestra 43; 6: muestra 59. Este PCR purificado muestra buena cantidad y calidad.

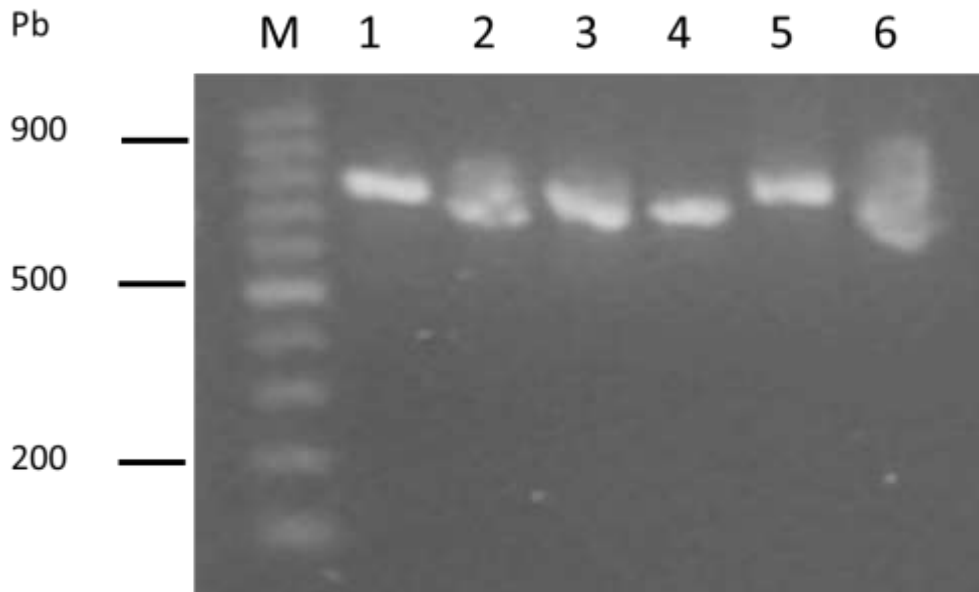


Imagen 28. Productos de PCR purificados corridos en un gel de agarosa al 1,5% contrastado con GelRed. Pb: pares de bases. M: marcador de 100 pb. 1: muestra 36; 2: muestra 67.1; 3: muestra 67.2.1; 4: muestra 67.2.2; 5: muestra 69.1; 6: muestra 69.2. Este PCR purificado se muestra de mala calidad.

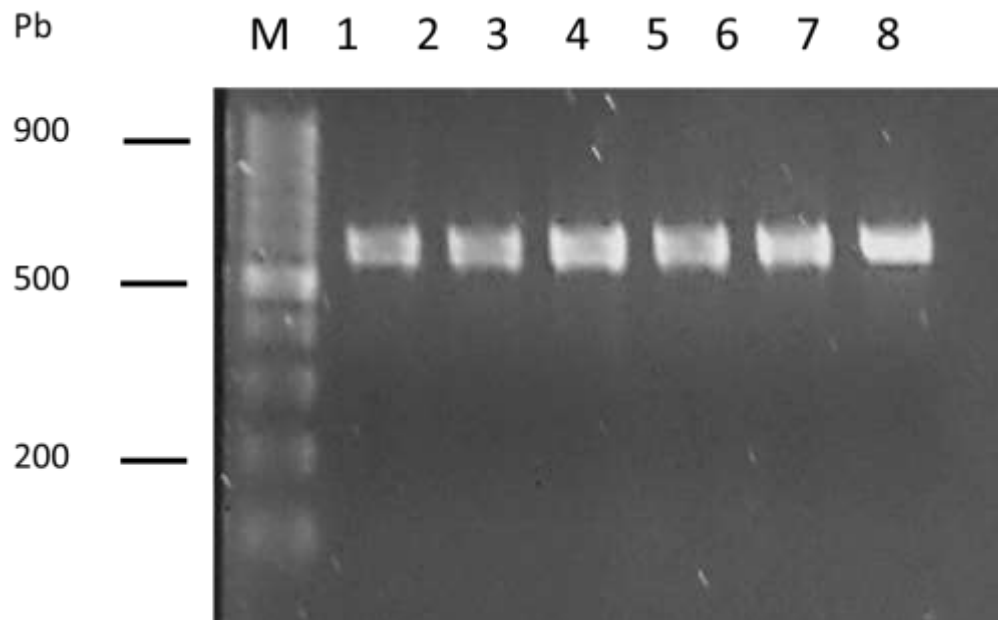


Imagen 29. Productos de PCR purificados corridos en un gel de agarosa al 1,5% contrastado con GelRed. Pb: pares de bases. M: marcador de 100 pb. 1: muestra 36; 2: muestra 67.1; 3: muestra 67.2.1; 4: muestra 67.2.2; 5: muestra 69.1; 6: muestra 69.2. Este PCR purificado muestra buena cantidad y calidad.



ANEXO 12

Gel de agarosa de restricción enzimática



Imagen 30. Restricción enzimática corrida en un gel de agarosa al 2.7% en buffer TAE 1X, correspondientes a las muestras 14 (*Malassezia furfur*), 32 (*Malassezia globosa*) y 33 (*Malassezia furfur*). Pb: pares de bases. M: marcador de 50 pares de bases. 1: muestra 14 de PCR purificado con corte en 580; 2: muestra 14 de reacción enzimática de HhaI con cortes en 250, 120 y 80; 3: muestra 14 de reacción enzimática BTSC1 con cortes en 400 y 175; 4: muestra 32.2 de PCR purificado con corte en 600; 5: muestra 32.2 de reacción enzimática de HhaI con cortes en 450 y 140; 6: muestra 32.2 de reacción enzimática BTSC1 con cortes en 600; 7: muestra 32.3 de PCR purificado con corte en 600; 8: muestra 32.3 de reacción enzimática de HhaI con cortes en 450 y 140; 9: muestra 32.3 de reacción enzimática BTSC1 con cortes en 600; 10: muestra 33 de PCR purificado con corte en 600; 11: muestra 33 de reacción enzimática de HhaI con cortes en 320 y 150; 12: muestra 33 de reacción enzimática BTSC1 con cortes en 450 y 180.

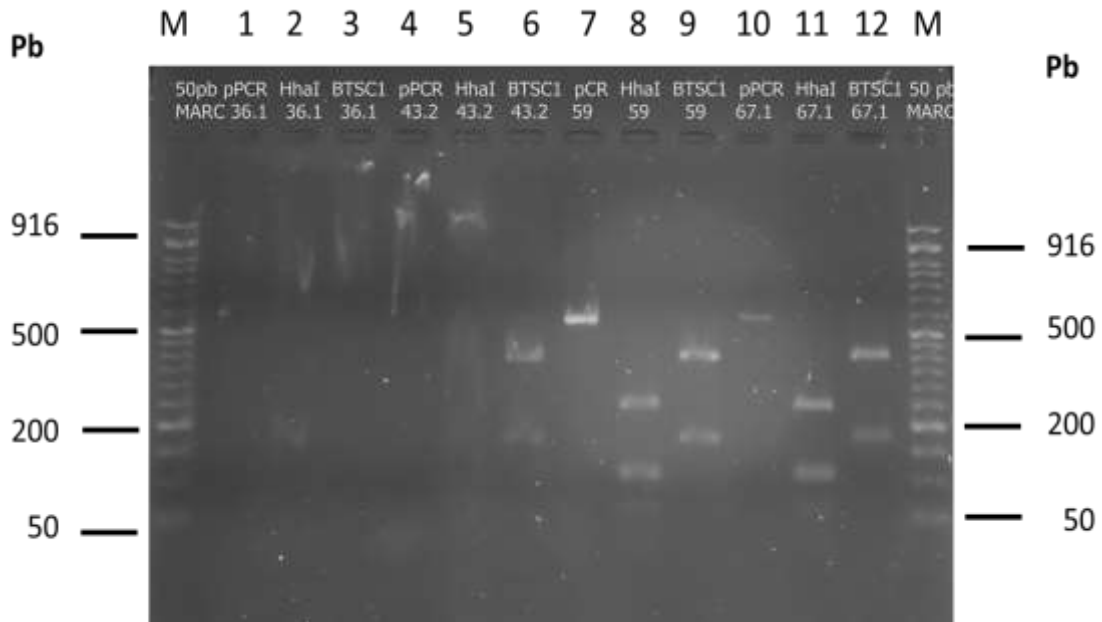


Imagen 31. Restricción enzimática corrida en un gel de agarosa al 2.7% en buffer TAE 1X, correspondientes a las muestras 36, 43, 59 (*Malassezia furfur*) y 67 (*Malassezia furfur*). Pb: pares de bases. M: marcador de 50 pares de bases. 1: muestra 36 de PCR purificado degradada; 2: muestra 36 de reacción enzimática de HhaI degradada; 3: muestra 14 de reacción enzimática BTSC1 degradada; 4: muestra 43 de PCR purificado degradada; 5: muestra 43 de reacción enzimática de HhaI degradada; 6: muestra 43 de reacción enzimática BTSC1 degradada; 7: muestra 59 de PCR purificado con corte en 600; 8: muestra 59 de reacción enzimática de HhaI con cortes en 250, 110-120 y 70; 9: muestra 59 de reacción enzimática BTSC1 con cortes en 400 y 180; 10: muestra 67 de PCR purificado con corte en 600; 11: muestra 67 de reacción enzimática de HhaI con cortes en 250 y 110-120; 12: muestra 67 de reacción enzimática BTSC1 con cortes en 400 y 180.

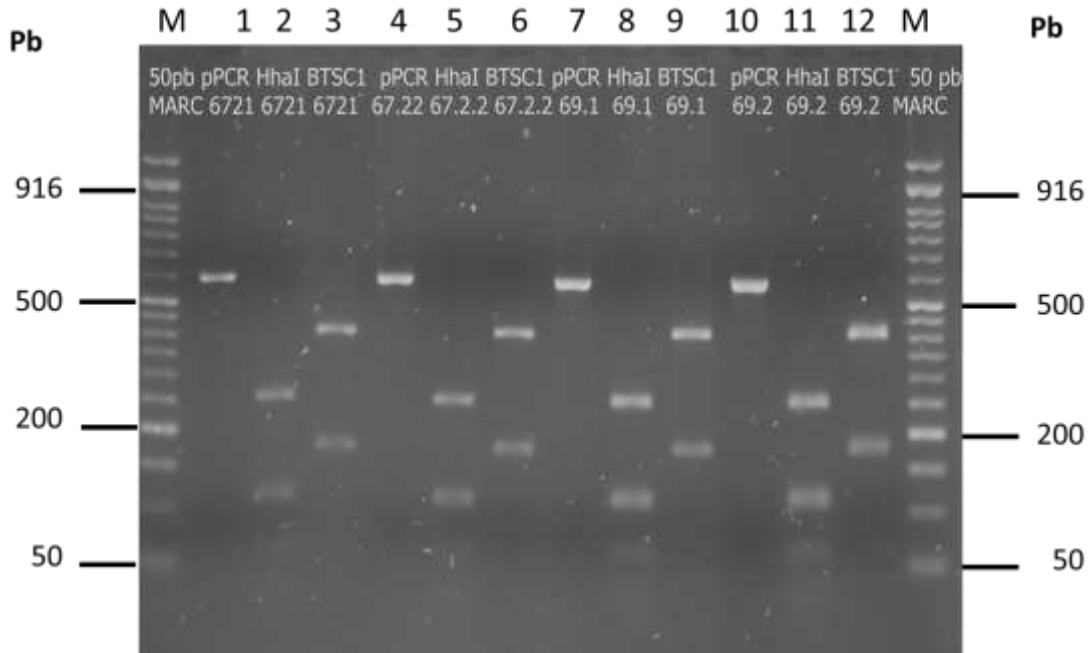


Imagen 32. Restricción enzimática corrida en un gel de agarosa al 2.7% en buffer TAE 1X, correspondientes a las muestras 67 (*Malassezia furfur*) y 69 (*Malassezia furfur*). Pb: pares de bases. M: marcador de 50 pares de bases. 1: muestra 67.2.1 de PCR purificado con corte en 600; 2: muestra 67.2.1 de reacción enzimática de HhaI con cortes en 250 y 110-120; 3: muestra 67.2.1 de reacción enzimática BTSC1 con cortes en 420 y 180; 4: muestra 67.2.2 de PCR purificado con corte en 600; 5: muestra 67.2.2 de reacción enzimática de HhaI con cortes en 250 y 110-120; 6: muestra 67.2.2 de reacción enzimática BTSC1 con cortes en 420 y 180; 7: muestra 69.1 de PCR purificado con corte en 600; 8: muestra 69.1 de reacción enzimática de HhaI con cortes en 250, 110-120 y 70; 9: muestra 69.1 de reacción enzimática BTSC1 con cortes en 420 y 180; 10: muestra 69.2 de PCR purificado con corte en 600; 11: muestra 69.2 de reacción enzimática de HhaI con cortes en 250 y 110-120; 12: muestra 69.2 de reacción enzimática BTSC1 con cortes en 420 y 180.

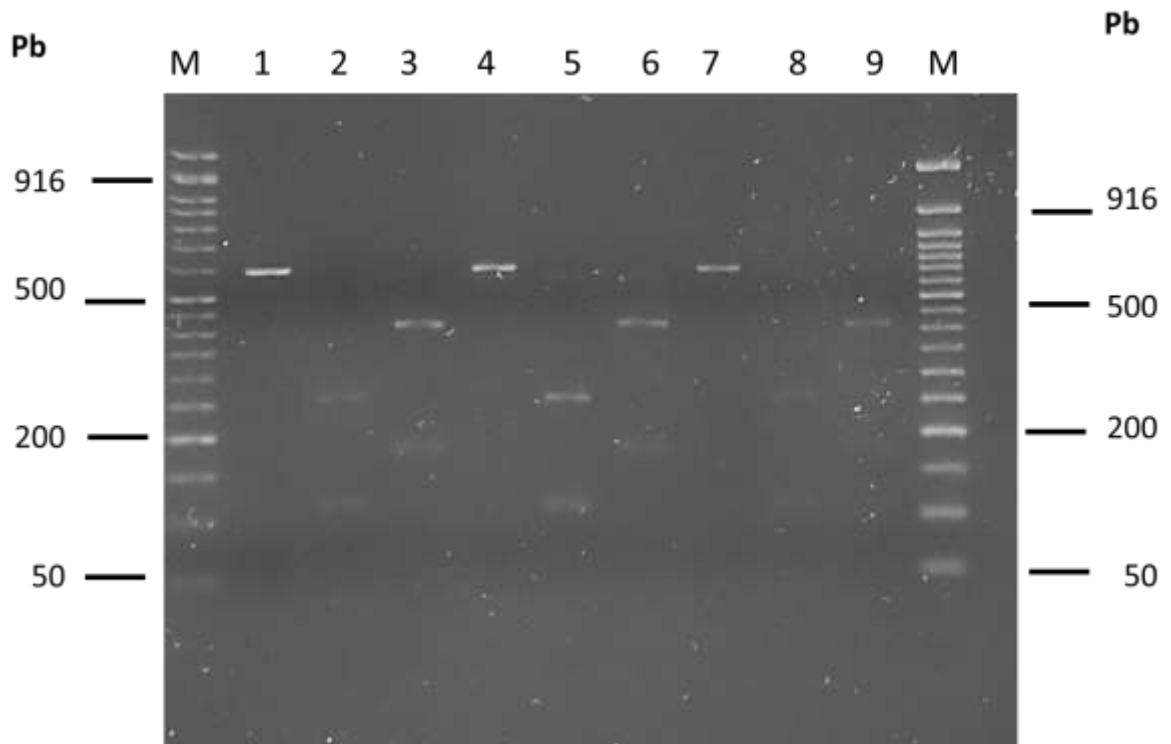


Imagen 33. Restricción enzimática corrida en un gel de agarosa al 2.7% en buffer TAE 1X, correspondientes a las muestras 33 (*Malassezia furfur*) y 66 (*Malassezia furfur*). Pb: pares de bases. M: marcador de 50 pares de bases. 1: muestra 33 de PCR purificado con corte en 600; 2: muestra 33 de reacción enzimática de HhaI con cortes en 250, 110-120 y 60-70; 3: muestra 33 de reacción enzimática BTSC1 con cortes en 420 y 180; 4: muestra 66.1 de PCR purificado con corte en 600; 5: muestra 66.1 de reacción enzimática de HhaI con cortes en 250 y 110-120; 6: muestra 66.1 de reacción enzimática BTSC1 con cortes en 420 y 180; 7: muestra 66.2 de PCR purificado con corte en 600; 8: muestra 66.2 de reacción enzimática de HhaI con cortes en 250, 110-120 y 70; 9: muestra 66.2 de reacción enzimática BTSC1 con cortes en 420 y 180.

**ANEXO 13**

**Tabla 9.** Guía de tamaño de ampliación, puntos de corte y tamaño de los fragmentos por las enzimas HhaI y BTSC1 para lectura de bandas e identificación de *Malassezia spp*

is	580 pb (KU313708.1; KU313707.1; KU313706.1; KU313705.1)	109, 359	109, 221, 250	172, 480, 569	9,89,172, 308
	640 pb (KJ610822.1; KJ610827.1; KJ610826.1; KJ610825.1; KJ610825.1; KJ610824.1; KJ610821.1; KJ610820.1; KJ610819.1; KJ610818.1; KJ610817.1; KJ610816.1; KJ610815.1; KJ610814.1)	137, 387	137,253, 250	200, 508, 597	43, 89, 200, 308
Malassezia restricta	581	NO CORTA	581	480, 570	11, 90, 480
	582	NO CORTA	582	480, 570	12, 90, 480
	584	NO CORTA	584	480, 570	13, 90, 480
	625	398	398, 227	519, 609	519, 90, 16
	686	318, 475	318,	407, 418	407, 11, 268
Malassezia globosa	649 pb (KL597270.1; KX378149.1)	492	157, 492	608	41, 608
	649 pb (KT239998.1; KT239960.1)	488	161, 488	604	45, 604
	647 pb (KT239964.1)	487	160, 487	602	45, 602
	647 pb (KT2399658.1)	486	161, 486	602	45, 602
	661 pB (KT240003.1; KT240041.1)	487	174, 487	11, 40, 605	56, 565, 29, 11
Malassezia obtusa	580 pb (AJ249954; AY743629.1)	109, 359, 377, 330, 332, 561	19, 29, 2, 153, 18, 250, 109	569	11, 569
	623pb (AF064027.1; KT239957.1)	146, 396, 599	24, 203, 250, 146	607	16, 607
	573 pb (GU291285.1)	113, 363, 381, 534, 536, 566	7, 30, 2, 153, 18, 250, 113	NO CORTA	573

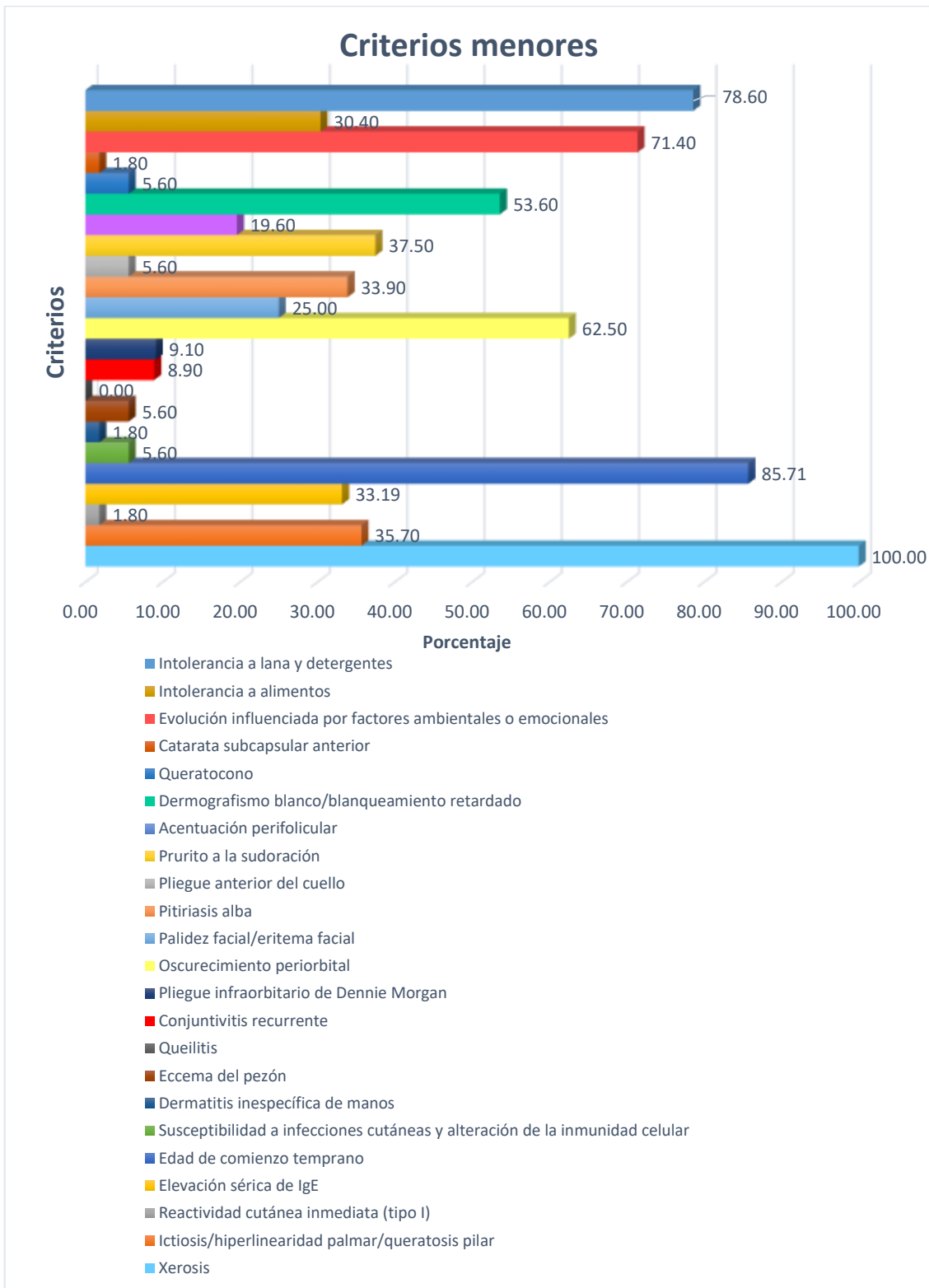
Malassezia slooffiae	584 pb (AJ249956.1; AY743606.1)	109, 359, 496, 510	74, 14, 137, 250, 109	573	11, 573
	51 pb (GU291288)	88, 338, 425, 489	92, 64, 87, 250	552	29, 552
	632 (GU687505.1)	127, 377, 464, 528	104, 64, 91, 250	591	41, 591
	627 pb (EU687507.1)	124, 374, 461, 525	102, 64, 87, 250, 124	588	39, 588
	622 pb (EU687509.1)	124, 374, 461, 525	97, 64, 87, 250, 124	588	36, 588
	624 pb (EU687508.1)	124, 374, 461, 525	99, 64, 87, 250, 124	589	36, 560
	623 pb (AF064028.1)	146, 396, 599	24, 203, 250, 146	607	16, 607
	647 pb (KU597272.1)	139, 389, 476, 540	107, 64, 87, 250, 139	603	44, 603
	644 pb (KC415104)	137, 387, 474, 538	106, 64, 87, 250, 137	601	43, 601
647 pb (KX378150.1)	139, 389, 476, 540	107, 64, 87, 250, 139	603	44, 603	
Malassezia dermatis	584 pb (AB070361.1; AB070365.1; AB070364.1; AB070363.1; AB070362.1)	359, 380	359, 21, 204	172, 400, 568	172, 168, 16, 228
Malassezia japonica	586 pb (KX839613)	87, 92, 342, 516	70, 147, 250, 5, 87	155, 554	32, 400, 155
	587 pb (KX839608.1)	88, 93, 434, 517	70, 174, 250, 5, 88	156, 555	32, 399, 156
	591 pb (K839572.1)	77, 82, 332, 506	85, 174, 250, 5, 77	145	446, 145
	722 pb (KT239954)	172, 177, 429, 614	108, 185, 252, 5, 172	241, 652	70, 411, 242
Malassezia yamatoensis	622 pb (KP780459.1)	136, 221, 386, 499, 558, 560, 590	32, 30, 2, 59, 113, 165, 85, 136	199, 598	24, 399, 199
Malassezia arunalokei	606 pb (KM235689.2)	444	444, 162	469, 560	106, 91, 469
	624 pb (KM235688.2)	459	165, 459	484, 575	49, 91, 484
	597 pb (KM235687.2)	433	433, 160	459, 551	46, 92, 459
	651 pb (KJ847248.2)	488	163, 488	513, 604	47, 91, 513
	677 pb (KJ847247.2)	438, 629	48, 191, 438	463, 554	123, 91, 463

**ANEXO 14**

**Gráfica 1. DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES DEL GRUPO CON DA DE ACUERDO CON LOS CRITERIOS MAYORES DE HANIFIN RAJKA.**



**Gráfica 2. DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES DEL GRUPO CON DA DE ACUERDO CON LOS CRITERIOS MENORES DE HANIFIN RAJKA.**

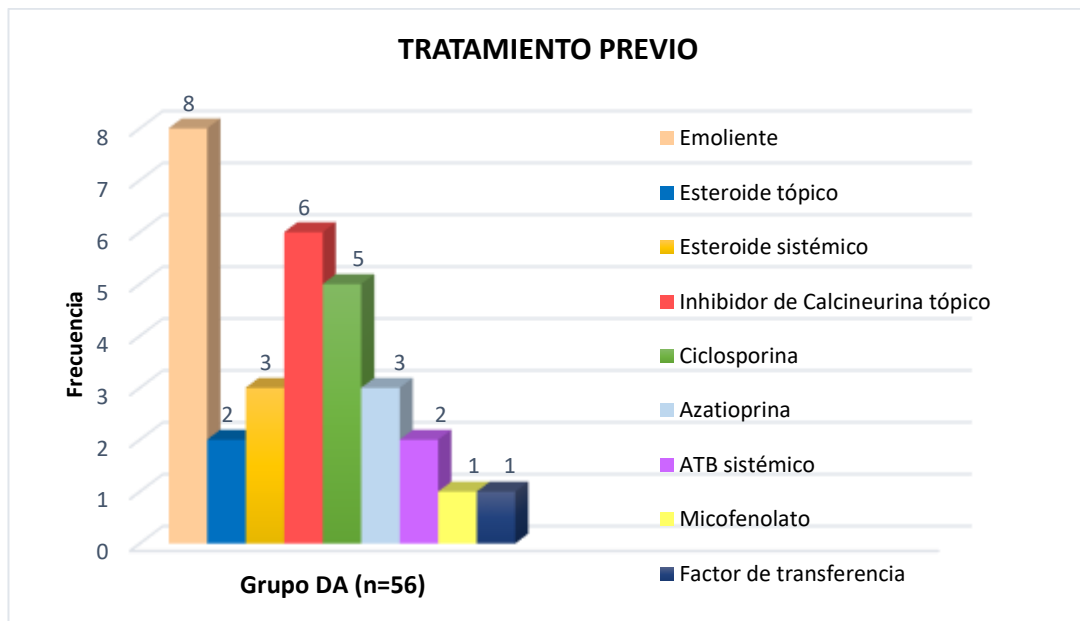




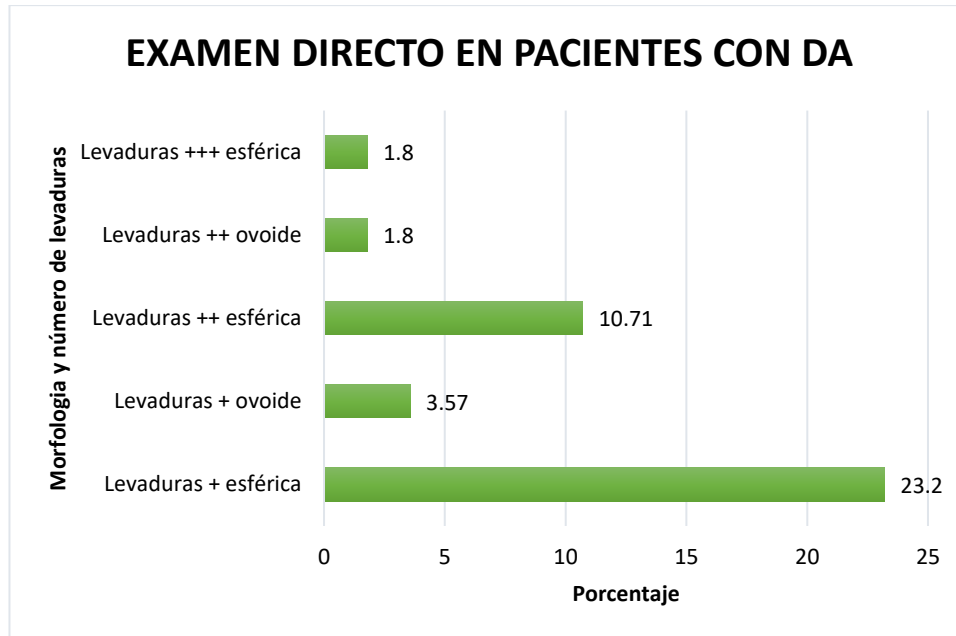
**Gráfica 3. DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES DEL GRUPO CON DA DE ACUERDO CON A LA GRAVEDAD POR INDICE SCORAD.**



**Gráfica 4. DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES DEL GRUPO CON DA DE ACUERDO CON TRATAMIENTO PREVIO.**

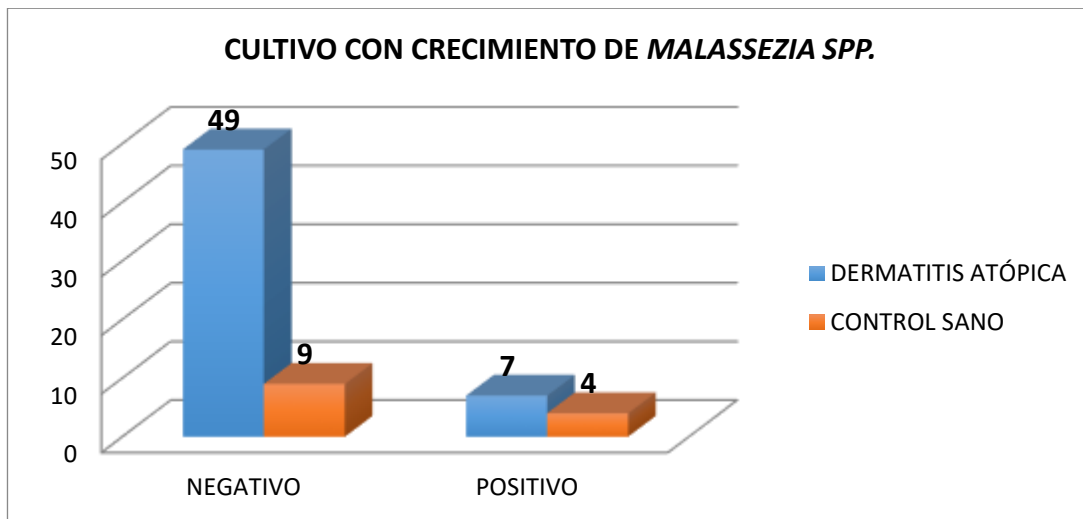


**Gráfica 5. DISTRIBUCIÓN DE EXÁMENES DIRECTOS POR MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA Y NÚMERO DE LEVADURAS EN LOS PACIENTES DEL GRUPO CON DA.**

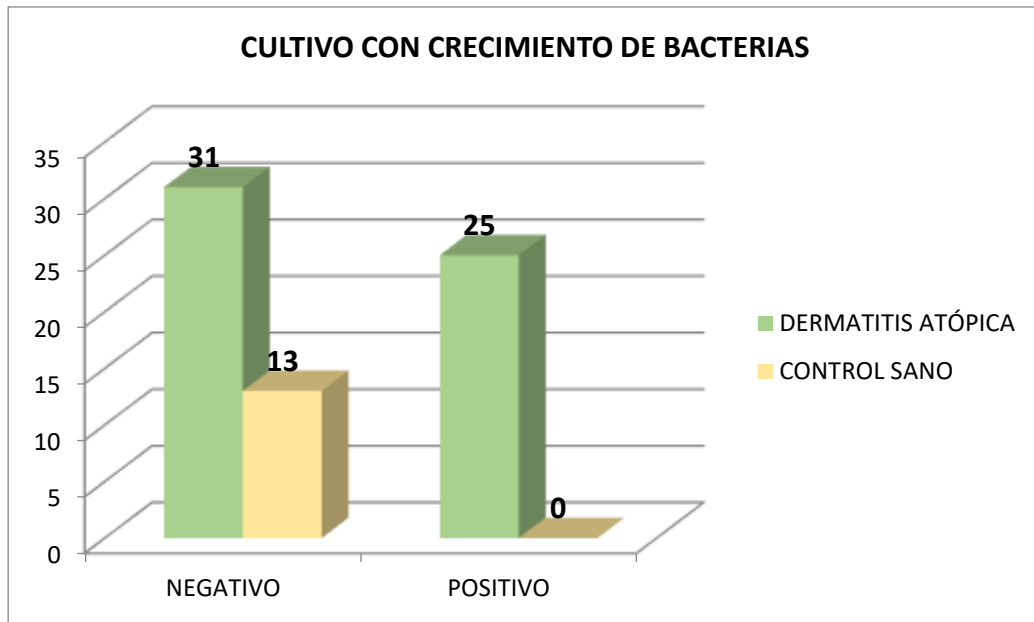


**Gráfica 5.** Levaduras +: menos de 5 por campo 100x'. Levaduras ++: 5 a 10 por campo 100x'. Levaduras +++: más de 10 por campo 100x'.

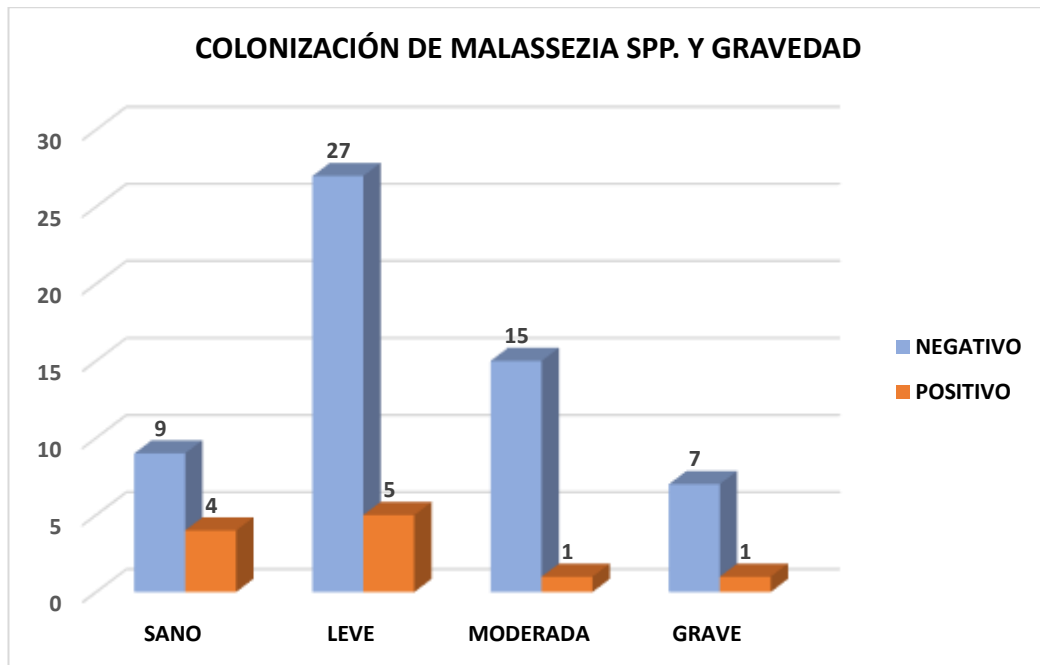
**GRÁFICA 6. DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES DE ACUERDO AL GRUPO Y RESULTADO DEL CULTIVO PARA *MALASSEZIA***



**GRÁFICA 7. DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES DE ACUERDO CON EL GRUPO Y RESULTADO DEL CULTIVO PARA BACTERIAS**



**GRÁFICA 9. DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES DE ACUERDO CON EL CULTIVO DE *MALASSEZIA SPP.* Y LA GRAVEDAD DE DA**



**GRÁFICA 10. DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES DE ACUERDO CON CULTIVO DE BACTERIAS Y LA GRAVEDAD DE DA.**

