



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA DIVISIÓN DE
ESTUDIOS DE POSGRADO**

**INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA
“FUNDACIÓN CONDE DE VALENCIANA”**

**“Sensibilidad y Especificidad en la
Detección de Demodex con Lámpara de Hendidura
en Pacientes con Blefaritis”**

**TESIS DE POSGRADO
PARA OBTENER EL DIPLOMADO
DE ESPECIALIDAD EN
OFTALMOLOGÍA QUE
PRESENTA**

**Dra. Ruth Eskenazi
Betech**

**DIRECTOR DE TESIS
Dr. Alejandro Navas Pérez**

Ciudad de México, México 2022





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.

Tabla de contenido

<u>Introducción.....</u>	<u>3</u>
<u>Marco teórico.....</u>	<u>4</u>
<u>Justificación.....</u>	<u>10</u>
<u>Planteamiento del problema.....</u>	<u>11</u>
<u>Pregunta de investigación.....</u>	<u>11</u>
<u>Hipótesis.....</u>	<u>12</u>
<u>Objetivo de la investigación.....</u>	<u>12</u>
<u>Metodología.....</u>	<u>13</u>
<u>Cálculo del tamaño de la muestra.....</u>	<u>15</u>
<u>Criterios de inclusión y exclusión.....</u>	<u>16</u>
<u>Variables del estudio.....</u>	<u>17</u>
<u>Plan de análisis estadístico.....</u>	<u>18</u>
<u>Cronograma de actividades.....</u>	<u>19</u>
<u>Consideraciones éticas.....</u>	<u>20</u>
<u>Consideraciones de bioseguridad.....</u>	<u>20</u>
<u>Resultados.....</u>	<u>21</u>
<u>Discusión.....</u>	<u>24</u>
<u>Conclusión.....</u>	<u>27</u>
<u>Anexo 1 (Concentimiento informado).....</u>	<u>28</u>
<u>Referencias bibliográficas.....</u>	<u>31</u>

Introducción

Los ácaros de Demodex son los ectoparásitos microscópicos que se encuentran con mayor frecuencia en la piel humana. Se estima que el 64% de la población mayor de 60 años de edad y el 100% por arriba de los 70 años tienen infestación por Demodex. Existen 2 especies diferentes que han sido identificadas en humanos: Demodex folliculorum y Demodex brevis. Demodex folliculorum habita en los folículos de las pestañas y puede causar blefaritis anterior y Demodex brevis se entierra en las glándulas de meibomio y en las glándulas sebáceas ocasionando blefaritis posterior. Estas dos condiciones se observan con alta frecuencia en la práctica diaria del oftalmólogo, causan una sintomatología importante en el paciente que pueden disminuir su calidad de vida.

El diagnóstico de Demodex ocular se basa en la visualización y el conteo del ácaro en las pestañas, existen varios métodos reportados para realizarlo y aunque no existe un consenso acerca de cuál es el estándar de oro; la técnica más utilizada es la de depilación de pestañas y visualización del ácaro bajo microscopía de luz, en la actualidad es la que se realiza en el Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana. Recientemente se publicó un nuevo método que se puede realizar en el consultorio. La técnica consta en depilar dos pestañas con caspa cilíndrica de cada párpado, colocarlas en una laminilla de vidrio con una gota de fluoresceína y cubrirlas con un portaobjetos, se unen las dos laminillas con cinta y posteriormente se une un lente de 90 dioptrías para poder visualizar al parásito bajo la lámpara de hendidura. Este método permite hacer un diagnóstico rápido de infección ocular por Demodex e iniciar tratamiento temprano, así mismo es útil para médicos que no tengan acceso fácil a un laboratorio y le brinda beneficios al paciente en cuanto a tiempo y costo.

Se realizará un estudio prospectivo comparativo en el instituto de oftalmología “Conde de Valenciana” en donde se tomará una muestra de pestañas de paciente con sospecha de Demodex ocular y se analizará con microscopía de luz y la nueva técnica descrita con lámpara de hendidura para determinar si tienen la misma sensibilidad y especificidad.

Marco teórico

La blefaritis es una de las condiciones más comunes a las que el oftalmólogo se enfrenta diariamente. Se trata de una inflamación crónica del margen palpebral cuya etiopatogenia no es muy bien conocida, pero han sido implicados factores como toxinas bacterianas, el ácaro *Demodex* y factores ambientales (1).

Los ácaros de *Demodex* son los ectoparásitos más frecuentes en el humano, se han identificado más de 100 especies, pero solo 2 habitan la dermis humana: *D. folliculorum* y *D. brevis* (2). *D. folliculorum* mide aproximadamente 0.3-0.4 mm de largo y se encuentra principalmente en la raíz y los folículos de las pestañas, por lo que está implicado en la blefaritis anterior. *D. brevis* mide 0.2-0.3 mm de largo y se encuentra en las glándulas sebáceas y en las de meibomio, está más implicado en blefaritis posterior, disfunción de glándulas de meibomio, chalaziones recurrentes y queratoconjuntivitis refractarias a tratamiento (3). Conocer la anatomía del ácaro es importante para poder identificarlo. En su etapa adulta está cubierto por un exoesqueleto y tiene 8 patas cortas articuladas, el ácaro es translúcido, tiene una boca, órganos genitales masculinos y femeninos y una bolsa digestiva, sin embargo, no tiene una apertura terminal para las excreciones, por lo que se piensa que todo el material no digerido se regurgita por la boca (4). *D. Folliculorum* tiene un abdomen (opistosoma) estriado que puede abarcar mas de 7/10 de su longitud total, mientras que el opistosoma de *D. brevis* ocupa hasta 2/3 del total. Estas características morfológicas son relevantes para el diagnóstico diferencial entre ambas especies (5).

Como ya se mencionó *Demodex* reside en los complejos pilosebáceos de la piel, además de en las pestañas y las glándulas del margen palpebral lo podemos encontrar en glándulas sebáceas de la cabeza, cara, tracto del oído externo y con menor frecuencia en el tronco y las extremidades (5). Estos ácaros están fuertemente vinculados con afecciones dermatológicas como rosácea granulomatosa, pitiriasis folliculorum, foliculitis, acné, pigmentación facial e incluso carcinoma basocelular (5,6,7).

La prevalencia reportada de *Demodex* ocular en poblaciones comunitarias sin enfermedad ocular conocida varía desde 16%-70% (2). Se ha reportado que la probabilidad de infestación por *Demodex* aumenta con la edad (8, 9) y que es más común

en pacientes con blefaritis (10, 11). En México se ha reportado una prevalencia de 20% en una población de Oaxaca, en donde se encontró mayor prevalencia en los hombres que en las mujeres (12).

Se sabe que *Demodex* forma parte de la flora habitual del párpado, es un ácaro que podemos encontrar en individuos sanos asintomáticos y en sintomáticos. Durante varios años se ha discutido si juega un papel importante en la fisiopatología y sintomatología asociada a blefaritis. Se ha sugerido que tienen un rol patológico solo cuando se presenta en altas densidades (13).

El ciclo celular de los ácaros *Demodex* es aproximadamente de 14-18 días, estos se alimentan principalmente de sebo, pero se cree que también se alimentan de células epiteliales foliculares y glandulares. La esperanza de vida del ácaro es muy limitada fuera del cuerpo humano, por lo que es necesario un contacto directo para su transmisión (7). *Demodex* puede tener múltiples impactos en la superficie ocular y dañarla de varias formas. Como ya se mencionó *D. folliculorum* reside principalmente en la base de las pestañas donde se alimenta de células epiteliales causando un daño mecánico directo al folículo, las abrasiones epiteliales microscópicas que causa pueden provocar una hiperplasia epitelial y una hiperqueratinización, además el ácaro pone sus huevos en la base de las pestañas causando una distensión folicular y maldirección de las mismas. Todo el material no digerido de los ácaros se acumula con las células epiteliales, la queratina y los huevos para formar depósitos cilíndricos en las pestañas, estos depósitos contienen lipasas y proteasas lo que causa síntomas irritativos (14). Los ácaros *Demodex* son vectores para bacterias como estreptococos y estafilococos, las toxinas producidas por estas bacterias pueden inducir una cascada de inflamación en el individuo. *Bacillus oleronius* es una bacteria que se encuentra dentro del ácaro y puede producir una respuesta inmune (7).

D. brevis está más relacionado a la disfunción de glándulas de meibomio, las excretas de los ácaros causan un bloqueo mecánico del orificio de la glándula, lo que conlleva a una inflamación y crecimiento de la glándula, el exoesqueleto del ácaro actúa como un cuerpo extraño causando una reacción granulomatosa lo que puede resultar en la formación de orzuelo o chalazión (15). La inflamación del margen palpebral puede causar inflamación de la conjuntiva resultando en una blefaroconjuntivitis, incluso puede afectar

la córnea y provocar queratitis punteada superficial, neovascularización de la córnea, infiltrados marginales y estromales, opacidades y hasta perforaciones. Se piensa que *D. brevis* juega un papel mas importante en las alteraciones corneales por su mayor cercanía (16).

Las manifestaciones clínicas pueden ser muy variadas, los síntomas incluyen prurito, ardor, sensación de cuerpo extraño y visión borrosa. Los signos que podemos encontrar son hiperemia del margen palpebral, hipertrofia folicular, presencia de caspa cilíndrica o collarettes, escamas, madarosis, poliosis, triquiasis, disfunción de glándulas de meibomio, blefaroconjuntivitis o blefaroqueratitis (3,7, 4)

El diagnóstico de *Demodex* ocular se basa en la visualización y el conteo del ácaro en las pestañas. Existen varios métodos reportados, todos tienen sus fortalezas y limitaciones por lo que hasta la fecha no existe un consenso universal de cuál es el estándar de oro.

Un método bien descrito es la depilación de las pestañas y observación del ácaro con un microscopio de luz. Este método fue reportado por primera vez en 1967 por Coston (17). El método consiste en quitar aleatoriamente 2-4 pestañas de cada párpado, transferirlas a una laminilla y aplicar una gota de aceite a cada una de ellas, se monta un cubreobjetos y se visualizan los ácaros bajo un microscopio de luz (2). Una de las desventajas de este método es que la depilación aleatoria puede resultar en un conteo bajo de ácaros ya que muchos de ellos se encuentran incrustados en la caspa cilíndrica de las pestañas, para resolver esto se pueden seleccionar y depilar las pestañas con caspa cilíndrica, lo que confiere una mayor probabilidad para detectarlo (18).

Otra desventaja es que la adición de aceite puede provocar un bajo conteo de ácaros ya que los que no están adheridos pueden perderse. Los que se encuentran en la caspa cilíndrica opaca y compacta pueden no ser contados al menos de que se agregue alcohol al 100% para que migren hacia afuera, sin embargo, este puede matar a los parásitos (19). Se han realizado otras modificaciones al método original para aumentar la probabilidad de visualizar los ácaros. Kheirkhah et al (20). demostraron que la adición de solución con fluoresceína a las pestañas depiladas con caspa cilíndrica aumenta la probabilidad de detectar y contar ácaros incrustados en la caspa. Kiuchi demostró que los parásitos se pueden visualizar mejor si se agrega azul de metileno alcalino con la

solución según Löffler y solución con fluoresceína, estas soluciones aumentan el contraste de los parásitos en las pestañas depiladas (21).

Se sabe que muchos parásitos se pueden quedar en el orificio del folículo posterior a la depilación de la pestaña. En el 2013 Mastrota describió una nueva técnica en donde no era necesaria la depilación, reportó que al manipular las pestañas rotándolas in situ con unas pinzas era posible observar las colas de *D. folliculorum* “en forma de cigarro” saliendo de los folículos bajo una lámpara de hendidura (22). Murphy et al. (23) compararon la eficacia de la manipulación de pestañas rotándolas cuatro veces en contra de las manecillas de reloj y 4 veces en sentido de las manecillas de reloj contra la técnica tradicional de depilación y observación bajo un microscopio de luz, concluyeron que la manipulación de las pestañas exhibe una mayor cantidad de *D. folliculorum* que la depilación. Además, mencionan que la manipulación de las pestañas elimina el estrés y malestar de los pacientes relacionado a la depilación. Recientemente Muntz et al. (24) reportaron que retirar la caspa cilíndrica y aplicar tensión lateral estática a las pestañas sin depilarlas resulta en un gran número de ácaros visibles en los folículos por medio de una lámpara de hendidura.

También se ha reportado que una adecuada examinación bajo la lámpara de hendidura con una magnificación de 40x puede identificar la presencia de *D. folliculorum* en la raíz de las pestañas, esto puede ahorrar tiempo al médico y es más costo efectivo para el paciente (25).

La microscopía confocal in vivo (IVCM) es una herramienta moderna no invasiva que permite la visualización rápida de la superficie ocular con una resolución casi histológica. Randon et al. (26) evaluaron la habilidad de la IVCM para identificar *Demodex* y la compararon con el método clásico de depilación y observación con microscopía de luz. Concluyeron que la sensibilidad para diagnosticar *Demodex* con IVCM es similar a la microscopía de luz posterior a depilación, incluso mencionan que es aún mejor para detectar niveles bajos de infestación. Otra ventaja de la IVCM es que permite una examinación detallada de las estructuras del párpado, logrando identificar la presencia de disfunción de glándulas de meibomio o meibomitis, y así ayudar a decidir si tratar o no al paciente. Wang et al. (27) examinaron la presencia de ácaros utilizando IVCM y la compararon con la microscopía de luz, ellos concluyen que la IVCM es mejor que el

método tradicional para detectar Demodex y que tiene una alta sensibilidad y especificidad cuando se realiza por un operador experimentado. Kojima et al. (28) también reportan que la IVCM es una herramienta eficiente para el diagnóstico y seguimiento de Demodex ocular.

También se ha reportado el uso de Smartphone con una lente esférica de 90 dioptrías unido a la cámara para capturar una imagen de Demodex en pacientes con blefaritis (29), y el uso de Smartphone para documentar por medio de video el movimiento del ácaro bajo un microscopio de luz (30).

Recientemente se publicó un nuevo método para el diagnóstico de Demodex en pacientes con blefaritis el cual se realiza en el consultorio sin necesidad de utilizar microscopía de luz. La técnica consta en depilar dos pestañas con caspa cilíndrica de cada párpado, colocarlas en una laminilla de vidrio con una gota de fluoresceína y cubrirlas con un portaobjetos, se unen las dos laminillas con cinta para evitar que se desplacen y posteriormente se une un lente de 90 dioptrías para poder visualizar al parásito bajo la lámpara de hendidura. Se comparó esta técnica con la examinación bajo microscopía de luz. Los autores reportan que la exactitud con la lámpara de hendidura para una única pestaña es de 91.4%, con una sensibilidad de 94%, especificidad de 89% y un valor predictivo negativo de 93%. Ellos concluyen que la infestación de Demodex en pacientes con blefaritis puede confirmarse utilizando únicamente una lámpara de hendidura y equipo que encontramos en los consultorios y que la examinación con microscopía de luz no es necesaria en todos los pacientes (31).

Existen varias estrategias terapéuticas para erradicar o disminuir la densidad de Demodex, estas incluyen higiene de párpados, compresas calientes, tratamientos tópicos con aceite de árbol de té, azufre, óxido de mercurio, pilocarpina, soluciones yodadas, metronidazol y permetrina, tratamientos sistémicos con ivermectina o metronidazol y luz pulsada intensa (32).

El aceite de árbol de té es uno de los tratamientos mas prescritos para blefaritis por Demodex, este aceite esencial proviene de las hojas del árbol australiano *Melaleuca arctunifolia*, aunque este aceite tiene mas de 100 componentes, el terpinen-4-ol es el mas activo. El aceite de árbol de té es tóxico para Demodex, tiene propiedades antiinflamatorias, antibacterianas y antifúngicas (2). El aceite de árbol de té se prescribe

en varias presentaciones y en concentraciones diferentes (5%-50%). Aunque estudios han publicado que el tratamiento con aceite de árbol de té es efectivo para eliminar al ácaro y para mejorar la sintomatología de los pacientes (33, 34) un metaanálisis publicado recientemente reportó que la evidencia de que el aceite de árbol de té disminuye el número de parásitos es baja y moderada en cuanto a la mejoría de los síntomas (32).

Otra estrategia terapéutica es el uso de agentes antiparasitarios vía oral y tópicos. La ivermectina es segura y efectiva, su acción antiparasitaria se debe a su alta afinidad a los canales de cloro dependientes de glutamato que se encuentran en el sistema nervioso periférico de los invertebrados, los humanos no presentan efectos adversos a nivel de sistema nervioso central ya que el fármaco no cruza la barrera hematoencefálica. La ivermectina ha mostrado ser eficiente como tratamiento de blefaritis administrando 200 microgramos/kg en dos dosis separadas por una semana y su efectividad es superior cuando se combina con metronidazol vía oral (250 mg 3 veces al día por 2 semanas) (35). Ávila et al (36) recientemente demostraron en un ensayo clínico aleatorizado que la aplicación tópica de un gel con ivermectina (0.1%) y metronidazol (1%) controla satisfactoriamente la infección por Demodex en pacientes con blefaritis y logra una disminución significativa de los signos inflamatorios.

La permetrina es un insecticida que actúa contra los ácaros interrumpiendo la polarización de su membrana celular, su principal uso es en el tratamiento de escabiosis. El tratamiento de blefaritis por Demodex con permetrina en crema al 5% disminuye la carga de ácaros en las pestañas y mejora los signos y síntomas de los pacientes (37).

Se ha reportado la capacidad de la luz pulsada intensa (IPL) para tratar afecciones oculares por Demodex, se cree que este ácaro contiene un cromóforo que lo hace vulnerable a la energía liberada por la IPL, también se ha propuesto que su exoesqueleto absorbe la energía acumulada ocasionando una necrosis coagulativa. Zhang et al. (38) evaluaron la eficacia clínica de la IPL en la reducción de la infestación por Demodex en las pestañas y lo compararon con una solución que contenía aceite de árbol de té y jalea de petróleo. Reportaron que no hubo diferencia significativa entre los dos grupos en cuanto a el conteo de Demodex en las pestañas, las anomalías del margen palpebral, hiperemia conjuntival, la tinción corneal con fluoresceína y la producción de

lagrimea, pero reportan que la tasa de erradicación fue más completa con la IPL (100%) a comparación del grupo control (75%), por lo que concluyen que la IPL tiene potencial terapéutico para la infección ocular por Demodex.

Justificación

La blefaritis es una de las patologías que más comúnmente tratamos como oftalmólogos. El ácaro de Demodex es una causa frecuente de blefaritis crónica que no responde al tratamiento convencional. Actualmente el único método diagnóstico disponible en la institución para la detección de Demodex es la visualización del ácaro bajo un microscopio de luz, esto requiere que el paciente vaya al laboratorio para tomar la muestra y esperar unos días para el resultado, lo que puede retrasar el tratamiento y elevar sus costos. Esta nueva técnica descrita con lámpara de hendidura permite al oftalmólogo hacer el diagnóstico de Demodex en el consultorio con el mismo equipo que utiliza de manera habitual, y así poder iniciar tratamiento específico esa misma visita.

Planteamiento del problema

Los ácaros de Demodex son los ectoparásitos más frecuentes en el humano, existen más de 100 especies, pero sólo 2 habitan la dermis humana: D. folliculorum y D. brevis (2), el primero está implicado en blefaritis anterior y el segundo en la disfunción de glándulas de meibomio (3). La probabilidad de tener una infestación por Demodex incrementa con la edad, se ha reportado que afecta al 84% de la población por arriba de 60 años y al 100% por arriba de 70 años de edad (31). Las manifestaciones clínicas de esta patología pueden ser muy variadas, pero afectan de manera importante la calidad de vida del paciente. Existen varios tratamientos tópicos que son eficientes para tratar la blefaritis por Demodex como el aceite de árbol de té, azufre, óxido de mercurio, pilocarpina, soluciones yodadas, metronidazol y permetrina y tratamientos sistémicos con ivermectina o metronidazol y luz pulsada intensa (32). Para iniciar estos tratamientos es conveniente confirmar la presencia del ácaro en pacientes con sospecha de infestación. Existen varios métodos diagnósticos para confirmar la presencia del ácaro en las pestañas del paciente, en la actualidad el más utilizado y el que se considera el estándar de oro por muchos autores es la visualización de D. folliculorum o D. brevis en las pestañas depiladas bajo un microscopio de luz (7). En ocasiones muchos médicos no tienen acceso rápido a este método diagnóstico por lo que sería de gran utilidad que se pueda realizar la detección del ácaro en el consultorio. La importancia de este estudio está en definir si esta técnica que se realiza en el consultorio con una lámpara de hendidura tiene la misma sensibilidad y especificidad que la microscopía de luz.

Pregunta de investigación

¿Cuál es la sensibilidad y especificidad en la detección D. folliculorum y D. brevis en pacientes con blefaritis con lámpara de hendidura?

Hipótesis

La detección de *D. folliculorum* y *D. brevis* en pacientes con blefaritis con lámpara de hendidura tiene una sensibilidad y especificidad no inferior a la microscopía de luz.

Objetivos de la investigación

Objetivo general:

- Evaluar la sensibilidad y especificidad en la detección de Demodex con lámpara de hendidura en pacientes con blefaritis.

Objetivos específicos

- Evaluar el valor predictivo negativo y positivo de la detección de Demodex con lámpara de hendidura en pacientes con blefaritis
- Reportar los datos demográficos como edad, sexo, ocupación y lugar de residencia de los pacientes incluidos en el estudio

Metodología

Se realizará un estudio prospectivo comparativo en el Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana en pacientes que tengan sospecha de blefaritis por *D. folliculorum* o *D. brevis*.

En el grupo de estudio se incluirán pacientes que tengan blefaritis con datos sugestivos de *Demodex* como escamas y collaretes y en el grupo control se incluirán pacientes sin datos de blefaritis. A estos pacientes se les realizarán 2 técnicas de detección de *Demodex* que consisten en lo siguiente:

1. Se depilan dos pestañas con caspa cilíndrica o collaretes de cada párpado de ambos ojos obteniendo una muestra de 8 pestañas por paciente. La toma de pestañas se realizará con una pinza de joyero, sujetando la pestaña a 3-5 mm de su base y realizando movimientos oscilatorios previamente a desprenderla.
2. Se colocan las pestañas en una laminilla de vidrio con una gota de solución salina.
3. Se cubren con un portaobjetos.
4. Se unen las dos laminillas con cinta para evitar que se desplacen.
5. Se coloca la laminilla en una tira de papel blanca para que sirva de fondo claro.
6. Se une una lente de 90 dioptrías para una mejor visualización.
7. Se examina en una lámpara de hendidura (Haag-Streit BM 900 con magnificación 25x) y se cuentan los ácaros por pestaña y por paciente.
8. Posteriormente se enviarán estas mismas laminillas a laboratorio para que sean observadas bajo el microscopio de luz (magnificación de 20x y 40x) y se cuenten los ácaros presentes en cada pestaña.

Todas las muestras se analizarán mediante la misma persona en la lámpara de hendidura y en el microscopio de luz el mismo día de su obtención con menos de 1 hora de diferencia entre ambos métodos, las muestras se tomarán por otra persona para evitar sesgos. Los ácaros se van a reconocer por sus características morfológicas y sus patrones de movimiento en los dos métodos.

Los resultados se van a evaluar por pestaña y por paciente y se van a expresar tanto en número de ácaros visualizados y en positivo (al menos 1 ácaro) o negativo (ningún ácaro).

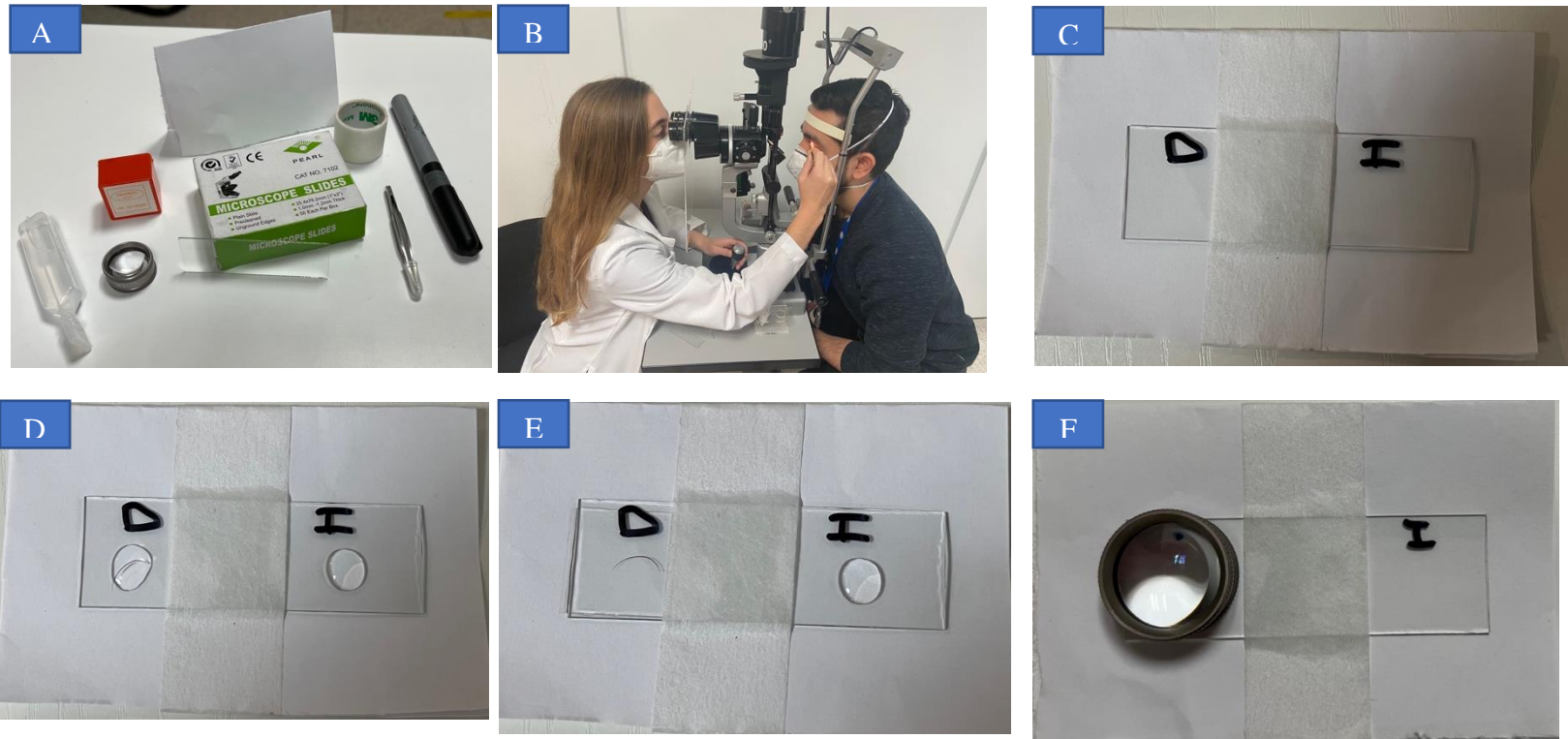


Figura 1: A, Material necesario: Portaobjetos, cubreobjetos, pinzas, cinta adhesiva, plumón, solución salina, papel blanco y lupa de 90D. B, C, D, E y F, preparación de la muestra

Cálculo del tamaño de la muestra

La muestra incluirá hombres y mujeres mayores de 18 años de edad que tengan datos sugestivos de blefaritis por Demodex como escamas y collarettes en el Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana. Con base en la incidencia de Demodex reportada en una población de Oaxaca en México por el autor Vargas-Arzola (12) del 20% con un α de 0.05 y un poder del 80% el tamaño de muestra por grupo resulta en 22.

$$N = \frac{p_0 q_0 \{ z_{1-\alpha/2} + z_{1-\beta} \}^2 (p_1 - p_0)^2 q_0 = 1 - p_0 q_1 = 1 - p_1}{2(p_1 - p_0)^2} N = 0.5 * 0.5 \{ 1.96 + 0.84 \}^2 \frac{0.2 * 0.80}{0.5 * 0.5} = 44$$

p_0 = proporción (incidencia) de la población (20%)

p_1 = proporción (incidencia) del grupo de estudio (60%)

N = tamaño de muestra para el grupo de estudio

α = probabilidad de error tipo I (usualmente 0.05)

β = probabilidad de error tipo II (usualmente 0.2)

z = valor crítico de Z para la α o β dadas

Criterios de inclusión y exclusión

Inclusión:

- Pacientes mayores de 18 años con datos sugestivos de blefaritis por Demodex como escamas y collaretes

Exclusión:

- Pacientes que estén recibiendo o que hayan recibido en el último año tratamiento específico para blefaritis por Demodex
- Pacientes que hayan recibido en el último mes cualquier tipo de tratamiento para blefaritis oral o tópico
- Pacientes que no quieran firmar el consentimiento informado

Variables del estudio

Variable	Definición	Unidad de medición	Instrumento
Demodex por pestaña	Ectoparásito presente en la dermis humana y que es capaz de causar patologías como blefaritis cuando existe infestación	Número de ácaros por pestaña	Microscopio de luz y lámpara de hendidura
Demodex por paciente	Ectoparásito presente en la dermis humana y que es capaz de causar patologías como blefaritis cuando existe infestación	Número de ácaros por muestra Positivo (por lo menos un ácaro) / negativo (ningún ácaro)	Microscopio de luz y lámpara de hendidura
Edad	Tiempo que ha vivido una persona contando desde su nacimiento	Años	Historia clínica
Sexo	Condición orgánica que distingue a los machos de las hembras	Femenino/masculino	Historia clínica
Ocupación	Hace referencia a lo que se dedica una persona, su trabajo, empleo, actividad o profesión	Tipo de ocupación	Historia clínica
Lugar de residencia	Lugar en el que la persona vive al momento del interrogatorio	Ciudad	Historia clínica

Plan de análisis estadístico

El análisis estadístico se realizará con el Paquete Estadístico para Ciencias Sociales versión 17 (SPSS v.17). Se realizará la prueba de correlación de Pearson para comparar la cuenta de Demodex en la lámpara de hendidura y el microscopio de luz. La prueba de Chi-cuadrada se utilizará para comparar los resultados positivos y negativos. Se considerará como estadísticamente significativo una P con un valor < 0.05 .

La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo se van a calcular en base a una tabla de contingencia. En esta tabla hay 2 columnas que indican la condición actual del sujeto, enfermo o no enfermo, en el estudio se considera como enfermos a los pacientes con datos de blefaritis por Demodex como collaretes y escamas en el borde de las pestañas y no enfermos a los pacientes con ausencia de estos datos. Las dos filas indican los resultados del estudio, positivo o negativo, en este estudio se considera como resultado positivo la presencia de un ácaro por muestra y negativo ausencia de ácaros en la muestra.

	Enfermos (número)	No enfermos (número)	Total (número)
Positivo (número)	A (Verdadero positivo)	B (Falso positivo)	T pruebas positivas
Negativo (número)	C (Falso negativo)	D (Verdadero negativo)	T pruebas negativas
	T enfermos	T no enfermos	

Sensibilidad: La sensibilidad es la probabilidad que la prueba indique “enfermedad” en los pacientes realmente enfermos: $A/(A+C) \times 100$

Especificidad: La especificidad es la fracción de los que no tienen la enfermedad que tendrán una prueba negativa: $D/(D+B) \times 100$

La sensibilidad y especificidad son características de la prueba, la población no afecta los resultados.

El valor predictivo positivo y negativo están influenciados por la prevalencia de la enfermedad de la población en estudio.

Valor predictivo positivo: $A/(A+B) \times 100$

Valor predictivo negativo: $D/(D+C) \times 100$

Cronograma de actividades

Actividad	Mayo-junio 2021	Julio-septiembre 2021	Octubre-diciembre 2021
Evaluación por Comité de Investigación y Ética			
Ajustes según las recomendaciones por los comités			
Reclutamiento de pacientes con datos sugestivos de blefaritis por Demodex y grupo control			
Toma de muestras			
Análisis de datos			
Redacción de artículo para publicación			
Obtención de grado			

Consideraciones éticas

Este protocolo de estudio se apega a la declaración de Helsinki y las normas establecidas por el Comité de Investigación y Ética del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”, así como a las normas nacionales e internacionales. Se realizará, registrará y reportará en cumplimiento de los principios de las buenas prácticas clínicas.

Consideraciones bioseguridad

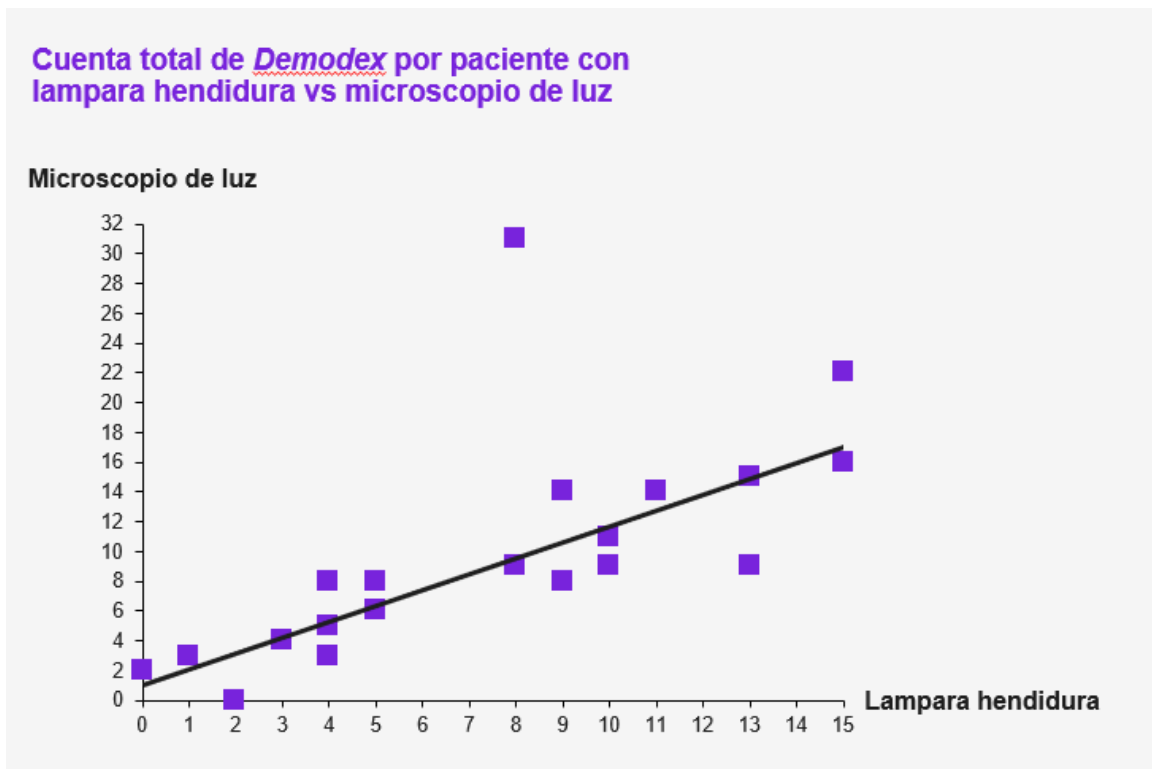
La ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente, define como residuos peligrosos a todos aquellos residuos que, por sus características corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamables o biológicas-infecciosas representan un peligro para el equilibrio ecológico o el ambiente; los residuos que se deriven serán manejados en términos de la propia ley, su reglamento y normas oficiales mexicanas que espida la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, previa opinión de diversas dependencias que tengan alguna injerencia en la materia correspondiéndole a la citada SEMARNAT su regulación y control.

Los residuos peligrosos biológicos-infecciosos (RPBI) serán manejados de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

Las muestras de las pestañas en el portaobjetos se desechará en el contenedor rígido rojo de RPBI.

Resultados

Se incluyeron 22 pacientes en el estudio de los cuales 11 (50%) fueron hombres y 11 (50%) mujeres. El promedio de edad fue de 54.8 años de edad (rango de 28-74 años). El 73% de los pacientes eran de la Ciudad de México, el 23% del Estado de México y el 5% de Guerrero. Se examinaron un total de 176 pestañas. La media de Demodex por pestaña fue de 0.9 +/- 1.3 ácaros en la examinación con lámpara de hendidura y 1.22 +/- 1.73 ácaros en el microscopio de luz. La media de Demodex por paciente fue de 7.3 +/- 4.4 ácaros en la lámpara de hendidura y de 9.7 +/- 7.18 en el microscopio de luz. La correlación de la cuenta de Demodex por paciente utilizando la lámpara de hendidura y el microscopio de luz fue positiva (moderada) y estadísticamente significativa (8 pestañas, $r=0.69$, $P=0.0003$).



El análisis de los resultados positivos/negativos mostró 76 pestañas (43.2%) con un resultado positivo en la lámpara de hendidura y 91 pestañas (51.7%) en el microscopio de luz.

La sensibilidad tanto en la lámpara de hendidura como en el microscopio de luz fue de 95% y la especificidad del 100%.

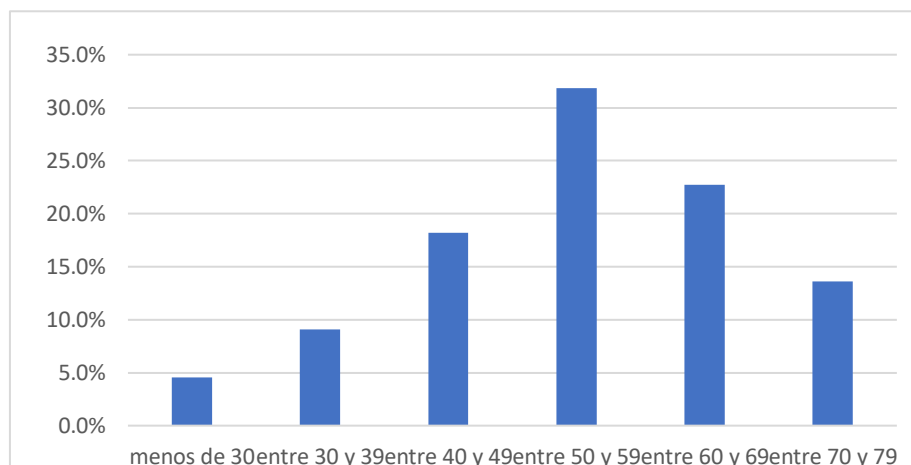
El valor predictivo positivo tanto en lámpara de hendidura como en microscopio de luz fue de 100% y el valor predictivo negativo es de 96%.

Se analizaron también los datos demográficos de la muestra, los resultados se encuentran en las siguientes tablas.

Tabla 1: Frecuencia de ocupaciones o profesiones

Actividad	Frecuencia
Hogar	31,8%
Empleada	18,2%
Limpieza	9,1%
Administrativo	9,1%
Chofer	4,5%
Campesino	4,5%
Computación	4,5%
Desempleado	4,5%
Jubilado	4,5%
Ingeniero	4,5%
Secretaria	4,5%

Grafica 1: Distribución de la muestra por edad



Se analizaron las diferencias de resultado positivo/negativo según la edad, género y residencia, los resultados se encuentran en las siguientes tablas.

Tabla 2. Positivo/negativo por género

	Positivo / Negativo (Lámpara de hendidura)			Positivo / Negativo (Microscopio de luz)		
	Hombre	Mujer	Total	Hombre	Mujer	Total
(-)	0	1	1	0	1	1
(+)	11	10	21	11	10	21
	11	11	22	11	11	22

Tabla 3. Positivo/ negativo por residencia

	Positivo / Negativo (Lámpara de hendidura)				Positivo / Negativo (Microscopio de luz)			
	CDMX	EDOMEX	Guerrero	Total	CDMX	EDOMEX	Guerrero	Total
(-)	1	0	0	1	0	1	0	1
(+)	15	5	1	21	16	4	1	21
Total	16	5	1	22	16	5	1	22

Tabla 4. Positivo/negativo por edad

Total por paciente (L)	Tabla cruzada Total por paciente (Lámpara de hendidura)*Edad						
	menos de 30	entre 30 y 39	entre 40 y 49	entre 50 y 59	entre 60 y 69	entre 70 y 79	Total
(-)	0	0	0	1	0	0	1
(+)	1	2	4	6	5	3	21
Total por paciente (L)	Tabla cruzada Total por paciente (Microscopio de luz)*Edad						
	menos de 30	entre 30 y 39	entre 40 y 49	entre 50 y 59	entre 60 y 69	entre 70 y 79	Total
(-)	0	0	1	0	0	0	1
(+)	1	2	3	7	5	3	21

Discusión

En este estudio se contaron el número de ácaros de Demodex por pestaña y por paciente en paciente con blefaritis con datos sugestivos de infestación por Demodex como son los collaretes y la caspa cilíndrica, y se compararon los resultados obtenidos mediante la observación de los ácaros en la lámpara de hendidura con los de microscopía de luz. *Peles et al* (31) publicaron por primera vez en el 2020 la técnica descrita en este estudio, ellos analizaron una muestra de 16 pacientes, menor a la de este estudio, pero con resultados similares. Encontraron una media de conteo de ácaros de 1.5 +/- 2.1 por pestaña y 2 +/- 2.9 por paciente. Reportaron una sensibilidad de 94%, especificidad de 89% y un valor predictivo negativo de 93%. La sensibilidad reportada en este estudio fue de 95% y la especificidad del 100%, el diferente valor de especificidad se debe a los errores falsos positivos que ellos obtuvieron en su estudio (5.5%), y nosotros no tuvimos ninguno. Esto se explica ya que ellos reportan que inicialmente confundían la caspa cilíndrica con ácaros hasta que aprendieron a distinguirlos con una curva de aprendizaje, a diferencia de ellos nosotros realizamos esa curva de aprendizaje antes de iniciar con el conteo de ácaros de las muestras de la población de nuestro estudio, lo que disminuyó la probabilidad de confundir caspa cilíndrica o collaretes con ácaros, además de que en el grupo control se incluyeron puros pacientes sanos sin presencia de blefaritis con escamas o collaretes.

En este estudio encontramos una diferencia entre el número de ácaros por pestaña entre la lámpara de hendidura y el microscopio de luz, esto se puede explicar ya que notamos que en ocasiones es difícil contar el número exacto de ácaros en la lámpara de hendidura cuando hay muchos juntos en racimo (imagen 1), a diferencia con el microscopio de luz donde es más fácil identificar cada uno de ellos, incluso cuando hay uno detrás del otro. Otra de las razones se debe a que cuando hay ácaros escondidos detrás de la caspa se vuelve más complicado identificar a los ácaros mediante la lámpara de hendidura por la falta de contraste entre los mismos, situación que sucede menos en la examinación bajo un microscopio de luz.

Uno de los errores que notamos del presente estudio fue el tiempo que transcurrió entre la examinación de la lámpara de hendidura y el microscopio de luz, si se espera mucho

tiempo entre las dos examinaciones los ácaros pueden desplazarse de lugar, pierden sus características morfológicas típicas e incluso se pueden perder de la muestra, situación que también podría explicar la diferencia de número de ácaros entre ambos métodos.

A pesar de la diferencia en el número de ácaros entre la lámpara de hendidura y el microscopio de luz, únicamente tuvimos un paciente que consideramos como negativo por no tener ningún ácaro en ninguna pestaña examinadas bajo la lámpara de hendidura pero que al realizar la examinación con el microscopio de luz si encontramos 2 ácaros en una pestaña.

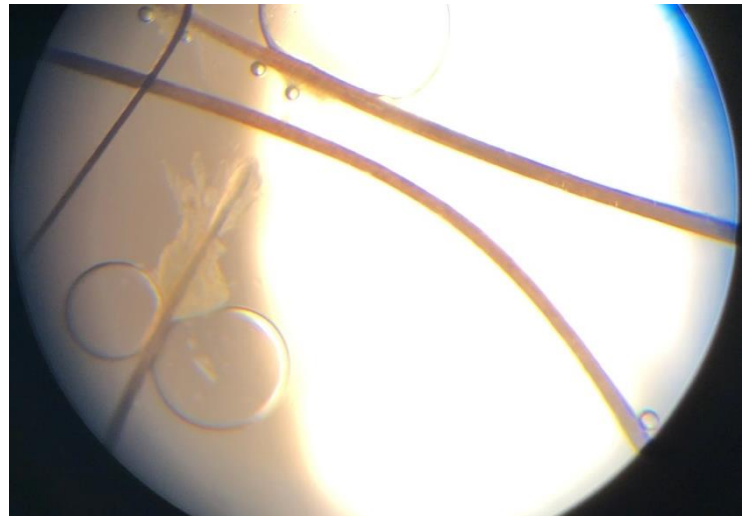
Imagen 1: Racimo de Demodex visualizados con microscopio de luz



Imagen 2: Fotografía de una pestaña con el microscopio de luz (A), misma pestaña en la lámpara de hendidura (B)



A

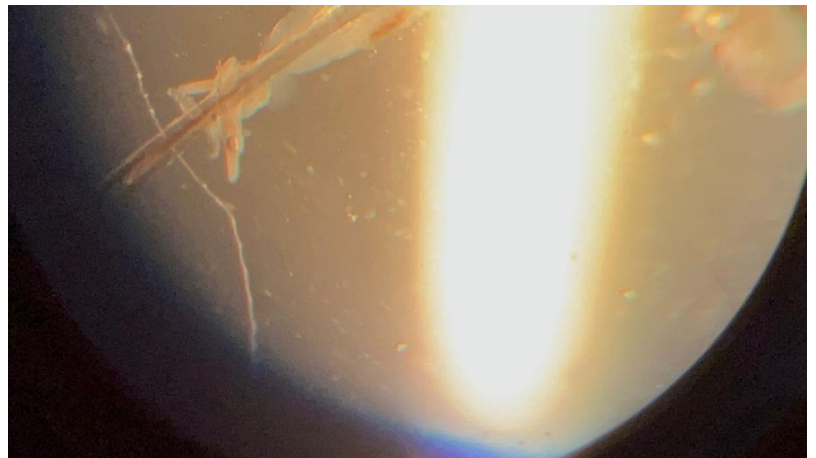


B

Imagen 3: Fotografía de una pestaña con el microscopio de luz (A), misma pestaña en la lámpara de hendidura (B)



A



B

Conclusión

El número exacto de ácaros de Demodex por pestaña o por paciente tiene poca relevancia clínica en el diagnóstico de pacientes con blefaritis con datos característicos, el resultado más relevante es si está positivo o negativo para decidir si se da un tratamiento específico para la infección. En base a los resultados obtenidos en este estudio podemos concluir que la técnica diagnóstica con lámpara de hendidura es segura para decidir el inicio de tratamiento en pacientes con sospecha de blefaritis por Demodex ya que tiene una sensibilidad y especificidad similar a la microscopía de luz la cual es el estándar de oro para el diagnóstico. La examinación de los ácaros bajo la lámpara de hendidura requiere una curva de aprendizaje mayor que la del microscopio de luz para poder distinguir los ácaros adecuadamente por su morfología y patrones de movimiento y así evitar resultados falsos positivos o falsos negativos.

Se demostró que se puede realizar el diagnóstico de blefaritis por Demodex utilizando equipo que comúnmente se encuentra en el consultorio del oftalmólogo, esto beneficia al paciente ya que se ahorra tiempo y costos en realizar la toma de muestra en un laboratorio con microscopio, se puede iniciar un tratamiento temprano y realizar seguimiento en el mismo consultorio.

Anexo 1 Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO **PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN MÉDICA**

Título del protocolo: ***“Sensibilidad y especificidad en la detección de Demodex con lámpara de hendidura en pacientes con blefaritis”***

Investigador principal: Dra. Ruth Eskenazi Betch

Lugar donde se realizará el estudio: Instituto de Oftalmología “Fundación Conde de Valenciana IAP”

Nombre del paciente: _____

A usted se le invita a participar en este estudio de investigación médica. Antes de tomar una decisión debe conocer y comprender cada uno de los apartados en este documento. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad de preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido esta información y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento informado, del cual se le entregará una copia firmada y fechada

1.- JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO:

La blefaritis por Demodex es una enfermedad que frecuente que puede interferir con la calidad de vida de los pacientes. Actualmente el único método diagnóstico disponible en la institución para la detección de Demodex es la visualización del ácaro bajo un microscopio de luz, esto requiere que el paciente vaya al laboratorio para tomar la muestra y esperar unos días para obtener el resultado, lo que puede retrasar el tratamiento y elevar los costos. Existe una nueva técnica descrita con lámpara de hendidura que permite al oftalmólogo hacer el diagnóstico de Demodex en el consultorio con el mismo equipo que utiliza todos los días para poder iniciar tratamiento específico en esa misma visita.

2.- OBJETIVO DEL ESTUDIO:

- A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación que tiene como objetivo Evaluar la sensibilidad y especificidad en la detección de Demodex con lámpara de hendidura en pacientes con blefaritis.

3.- PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO:

En caso de aceptar participar en el estudio se le harán algunas preguntas sobre datos generales, se le realizará una exploración oftalmológica completa y posteriormente se tomarán dos pestañas de cada párpado de ambos ojos para buscar el ácaro Demodex bajo un microscopio de luz y con lámpara de hendidura.

4.- MOLESTIAS O RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO:

Este estudio consta de los siguientes pasos:

- Se realizará una exploración oftalmológica con lámpara de hendidura, al momento de exploración puede presentar sensibilidad a la luz y ardor en los ojos.

- La muestra se realizará depilando 2 pestañas de cada párpado en ambos ojos, puede sentir ligero dolor al momento de la depilación.
- No existe ningún riesgo durante la exploración oftalmológica ni con la depilación de las pestañas.

5.- BENEFICIOS QUE PUEDE OBTENER DEL ESTUDIO:

Con este estudio se conocerá si la detección de Demodex con lámpara de hendidura tiene la misma sensibilidad y especificidad que la microscopia de luz, de ser así el paciente se beneficiaría ya que el tratamiento podría iniciarse de manera más temprana y disminuirían los costos del estudio.

6.- ACLARACIONES:

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria
- Durante el estudio usted podrá solicitar información sobre cualquier pregunta y/o aclaración de cualquier duda acerca de riesgos y beneficios. Si requiere ampliar información sobre su participación en el estudio puede comunicarse con el investigador responsable del estudio, (Dra. Ruth Eskenazi Betech 55 32 22 42 06) o dirigirse al Comité de Ética en Investigación, al teléfono 54421700 ext. 3212.
- Si decide participar en el estudio usted puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo manifestar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad. Sin que esto cree perjuicios para continuar su cuidado y tratamiento.
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.
- El investigador tiene la obligación de proporcionar información actualizada sobre los avances del estudio.
- No recibirá pago por su participación
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación a participar en este estudio.
- Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

7. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Acuerdo en participar en este estudio de investigación, entiendo que tengo derecho a retirarme de la investigación, sin perder mis derechos como paciente de este hospital.

Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Nombre del participante:

Firma del participante: _____

No. telefónico: _____

Domicilio: _____

Fecha: _____

Testigo 1

Nombre del testigo: _____ Parentesco:

Firma del testigo: _____ No. telefónico: _____

Domicilio:

Fecha: _____

Testigo 2

Nombre del testigo: _____ Parentesco:

Firma del testigo: _____ No. telefónico: _____

Domicilio:

Fecha: _____

Esta parte debe ser completada por el Investigador (o su representante):

He explicado al Sr(a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he informado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Nombre _____ del _____ investigador _____ responsable:

Firma del investigador: _____ No. telefónico: _____

Domicilio: _____ Fecha:

Referencias bibliográficas

1. Kabataş N, Doğan AŞ, Kabataş EU, Acar M, Biçer T, Gürdal C. The Effect of Demodex Infestation on Blepharitis and the Ocular Symptoms. *Eye Contact Lens*. 2017;43(1):64-67.
2. Zhang AC, Muntz A, Wang MTM, Craig JP, Downie LE. Ocular Demodex: a systematic review of the clinical literature. *Ophthalmic Physiol Opt*. 2020;40(4):389-432.
3. Cheng AM, Sheha H, Tseng SC. Recent advances on ocular Demodex infestation. *Curr Opin Ophthalmol*. 2015;26(4):295-300.
4. Nicholls SG, Oakley CL, Tan A, Vote BJ. Demodex species in human ocular disease: new clinicopathological aspects. *Int Ophthalmol*. 2017;37(1):303-312.
5. Mongi F, Laconte L, Casero RD. Ácaros del género Demodex: ¿parásitos colonizadores de personas sanas o asociados a patología ocular? *Rev Argent Microbiol*. 2018;50(4):369-373.
6. Aumond S, Bitton E. Palpebral and facial skin infestation by Demodex folliculorum. *Cont Lens Anterior Eye*. 2020;43(2):115-122.
7. Liu J, Sheha H, Tseng SC. Pathogenic role of Demodex mites in blepharitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2010;10(5):505-510.
8. Wesolowska M, Knysz B, Reich A, et al. Prevalence of Demodex spp. in eyelash follicles in different populations. *Arch Med Sci*. 2014;10(2):319-324.
9. López-Ponce D, Zuazo F, Cartes C, et al. High prevalence of Demodex spp. infestation among patients with posterior blepharitis: correlation with age and cylindrical dandruff. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2017;92(9):412-418.
10. Biernat MM, Rusiecka-Ziółkowska J, Piątkowska E, Helemejko I, Biernat P, Gościński G. Occurrence of Demodex species in patients with blepharitis and in healthy individuals: a 10-year observational study. *Jpn J Ophthalmol*. 2018;62(6):628-633.
11. Bhandari V, Reddy JK. Blepharitis: always remember Demodex. *Middle East Afr J Ophthalmol*. 2014;21(4):317-320.
12. Vargas-Arzola J, Reyes-Velasco L, Segura-Salvador A, Márquez-Navarro A, Díaz-Chiguer DL, Noguera-Torres B. Prevalence of Demodex mites in eyelashes among people of Oaxaca, México. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2012;59(2):257-262.
13. Hirsch-Hoffmann S, Kaufmann C, Bänninger PB, Thiel MA. Treatment options for Demodex blepharitis: patient choice and efficacy. *Klin Monbl Augenheilkd*. 2015;232(4):384-387.
14. Fromstein SR, Harthan JS, Patel J, Opitz DL. Demodex blepharitis: clinical perspectives. *Clin Optom (Auckl)*. 2018;10:57-63.
15. Yam JC, Tang BS, Chan TM, Cheng AC. Ocular demodicidosis as a risk factor of adult recurrent chalazion. *Eur J Ophthalmol*. 2014;24(2):159-163.
16. Kheirkhah A, Casas V, Li W, Raju VK, Tseng SC. Corneal manifestations of ocular Demodex infestation. *Am J Ophthalmol*. 2007;143(5): 743–749.
17. Coston TO. Demodex folliculorum blepharitis. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1967; 65: 361–392.

18. Gao YY, Di Pascuale MA, Li W et al. High prevalence of Demodex in eyelashes with cylindrical dandruff. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46: 3089–3094.
19. Gao YY, Di Pascuale MA, Li W, et al. In vitro and in vivo killing of ocular Demodex by tea tree oil. *Br J Ophthalmol*. 2005;89(11):1468-1473.
20. Kheirkhah A, Blanco G, Casas V, Tseng SC. Fluorescein dye improves microscopic evaluation and counting of Demodex in blepharitis with cylindrical dandruff. *Cornea*. 2007;26(6):697-700.
21. Kiuchi K. Better detection of *Demodex* mites by Löffler's alkaline methylene blue staining in patients with blepharitis. *Clin Ophthalmol*. 2018;12:727-731.
22. Mastrota KM. Method to identify Demodex in the eyelash follicle without epilation. *Optom Vis Sci*. 2013;90(6):e172-e174.
23. Murphy O, O'Dwyer V & Lloyd-McKernan A. The clinical use of eyelash manipulation in the diagnosis of Demodex folliculorum blepharitis. *Eye Contact Lens* 2019; 46: S33– S38.
24. Muntz A, Purslow C, Wolffsohn JS, Craig JP. Improved Demodex diagnosis in the clinical setting using a novel in situ technique. *Cont Lens Anterior Eye*. 2020;43(4):345-349.
25. Tanriverdi C, Balci O, Demirci G, Odabasi M, Ozsutcu M, Nurozler Tabakcı B. Comparison of Biomicroscopy and Light Microscopy Findings in Demodex Diagnosis in Patients With Chronic Blepharitis. *Eye Contact Lens*. 2019;10: 1-4.
26. Randon M, Liang H, El Hamdaoui M, et al. In vivo confocal microscopy as a novel and reliable tool for the diagnosis of Demodex eyelid infestation. *Br J Ophthalmol*. 2015;99(3):336-341.
27. Wang YJ, Ke M, Chen XM. Prospective Study of the Diagnostic Accuracy of the In Vivo Laser Scanning Confocal Microscopy for Ocular Demodicosis. *Am J Ophthalmol*. 2019;203:46-52.
28. Kojima T, Ishida R, Sato EA, et al. In vivo evaluation of ocular demodicosis using laser scanning confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(1):565-569.
29. Kaya A, Gürdal C. Office-Based Diagnosis of Demodex Using Smartphone. *Eye Contact Lens*. 2018;44(6):e25-e26.
30. Vahedi M, Davis G, Coleman MJ, Garrett BS, Eghrari AO. Smartphone-based Video of Demodex folliculorum In Biopsied Human Eyelash Follicles. *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol*. 2015;4(2):36-38.
31. Man Peles I, Zahavi A, Chemodanova E, Vardizer Y. Novel In-Office Technique for Visual Confirmation of Demodex Infestation in Blepharitic Patients. *Cornea*. 2020;39(7):858-861.
32. Savla K, Le JT, Pucker AD. Tea tree oil for Demodex blepharitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020;6(6)
33. Koo H, Kim TH, Kim KW, Wee SW, Chun YS, Kim JC. Ocular surface discomfort and Demodex: effect of tea tree oil eyelid scrub in Demodex blepharitis. *J Korean Med Sci*. 2012;27(12):1574-1579.
34. Murphy O, O'Dwyer V, Lloyd-McKernan A. The efficacy of tea tree face wash, 1, 2-Octanediol and microblepharoexfoliation in treating Demodex folliculorum blepharitis. *Cont Lens Anterior Eye*. 2018;41(1):77-82.

35. Salem DA, El-Shazly A, Nabih N, El-Bayoumy Y, Saleh S. Evaluation of the efficacy of oral ivermectin in comparison with ivermectin-metronidazole combined therapy in the treatment of ocular and skin lesions of *Demodex folliculorum*. *Int J Infect Dis*. 2013;17(5):e343-e347.
36. Ávila MY, Martínez-Pulgarín DF, Rizo Madrid C. Topical ivermectin-metronidazole gel therapy in the treatment of blepharitis caused by *Demodex* spp.: A randomized clinical trial [published online ahead of print, 2020 May 24]. *Cont Lens Anterior Eye*. 2020;S1367-0484(20)30084-9.
37. Hecht I, Melzer-Golik A, Sadi Szyper N, Kaiserman I. Permethrin Cream for the Treatment of *Demodex* Blepharitis. *Cornea*. 2019;38(12):1513-1518.
38. Zhang X, Song N, Gong L. Therapeutic Effect of Intense Pulsed Light on Ocular Demodicosis. *Curr Eye Res*. 2019;44(3):250-256.