

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA**



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LA COLONIZACIÓN NASAL POR *STAPHYLOCOCCUS
AUREUS* EN NIÑOS CON DERMATITIS ATÓPICA**

Memoria de Doctorado
Laura Berbegal De Gracia

Directores de la tesis
Isabel Betloch Mas
José Sánchez Payá

Alicante 2017



D. Francisco Javier Fernández Sánchez, Director del Departamento de Medicina Clínica de la Universidad Miguel Hernández,

AUTORIZA:

Que el trabajo titulado ESTUDIO DE LA COLONIZACIÓN NASAL POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN NIÑOS CON DERMATITIS ATÓPICA realizado por D^a LAURA BERBEGAL DE GRACIA y dirigido por la Dra. Isabel Betlloch Mas y el Dr. D. José Sánchez Payá, sea presentado en este Departamento para ser leído y defendido como Tesis Doctoral ante el Tribunal correspondiente.

Lo que firmo para los efectos oportunos en Sant Joan d'Alacant a dos de mayo de dos mil diecisiete.

Fdo: Prof. Francisco Javier Fernández Sánchez

Director del Dpto. de Medicina Clínica

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ



Doctora **D^a. ISABEL BETLLOCH MAS**, Profesora Asociada del Departamento de Medicina Clínica y Jefa del Servicio de Dermatología del Hospital General Universitario de Alicante y

Doctor **D. JOSÉ SÁNCHEZ PAYÁ**, Profesor Asociado del Departamento de Salud Pública, Historia de la Ciencia y Ginecología, Jefe de Servicio del Servicio de Medicina Preventiva del Hospital General Universitario de Alicante y Director Científico de ISABIAL

HACEN CONSTAR:

Que el Trabajo titulado **“Estudio de la colonización nasal por *Staphylococcus aureus* en niños con dermatitis atópica”** realizado por **D^a LAURA BERBEGAL DE GRACIA** ha sido llevado a cabo bajo nuestra dirección conjunta y se encuentra en condiciones de ser leído y defendido como Tesis Doctoral ante el Tribunal correspondiente en la Universidad Miguel Hernández.

Lo que firmamos para los efectos oportunos en Alicante a dos de mayo de dos mil diecisiete.

Dra. D^a Isabel Betlloch Mas

Directora de la Tesis Doctoral
Doctoral

Dr. D. José Sánchez Payá

Director de la Tesis
Doctoral

Agradecimientos:

A la Dra. Isabel Betlloch Mas por impulsar este proyecto y creer en él todo este tiempo, por su valiosa orientación académica, por enseñarme el mundo de la dermatología pediátrica y hacer que me guste tanto, por dedicarme tiempo en cualquier momento y lugar, y sobretodo por ser como es.

Al Dr. José Sánchez Paya, por su ayuda en el desarrollo del diseño del estudio y en el análisis estadístico, por reservar siempre “un hueco para Laura” en su agenda interminable, por sus correcciones y su apoyo, imprescindibles para la realización de este proyecto.

Al servicio de microbiología del Hospital General de Alicante, por efectuar todos los frotis nasales, y en especial al Dr. Juan Carlos Rodríguez Díaz y a Antonio José Galiana Cabrera por su ayuda en el estudio de la microbiota, por su amabilidad y disposición y por confiar en que los resultados llegarían "a tiempo".

A todos los pacientes que han participado en el estudio por su colaboración y participación desinteresada.

A la fundación FISABIO por la beca concedida en la I Convocatoria de Ayudas a Proyectos de Investigación gracias a la cual hemos podido financiar el estudio de la microbiota.

A todo el equipo que forma parte de los miembros evaluadores y del tribunal de esta tesis, por su esfuerzo en la lectura y calificación de la misma.

A todo el servicio de Dermatología del Hospital General de Alicante, por su apoyo para la realización de esta tesis y su comprensión durante el periodo de recogida de datos, en especial a mi coR Fran sin el que estos cuatro años no hubiesen sido lo mismo. A todos los adjuntos (Isabel, Mar, Pity, Regina, Pepe, Juanfran, Jaime, Jose Carlos), y residentes del servicio (Pilar, Paloma, Maria, Laura, Irene, Angélica, Iris, Patri, David, Belén, Pedro e Inés) que en algún momento durante mi paso por el servicio habéis contribuido con vuestra ayuda y amabilidad. A Maribel, a los

enfermeros y auxiliares que habéis hecho que todo esto pudiese salir adelante (en especial a Miguel, Nuria, José Luis, Mari Carmen, Jose, Loli, Aurora...), ayudándome a recoger las muestras y enviarlas al laboratorio, facilitando que siempre hubiesen frotis preparados en la consulta, pegatinas, teléfonos para poder contactar con los pacientes, y un *“sin fin de lo que necesitase”*...

A la enfermera de pediatría Bienvenida por enseñarme la técnica del aspirado nasofaríngeo. A todas las pediatras que han participado en la recogida de datos, a las residentes que rotaban con nosotros en cada momento, y en especial a la Dra. Maria Teresa Martínez Miravete, por acompañarnos cada martes y hacer que las cosas parezcan más sencillas.

A mis compañeros de Dermatología del Hospital Marina Salud de Dénia, en especial a Mavi, José Luis, y a la Dirección, por crear ambientes y horarios de trabajo que han favorecido la culminación de este trabajo.

A mis amigas, por estar ahí siempre que las necesito y disfrutar de la vida a mi lado, por su apoyo para terminarla, por los viajes y las distracciones cuando me saturó, en especial a María por acogerme cada jueves que me ha hecho falta estos últimos meses y hacer de su casa mi hogar.

A Juanfe, por comprenderme perfectamente en temas doctorales y por apoyarme, pero sobretodo, por querer compartir la vida conmigo.

A mi familia, por su apoyo incondicional y paciencia. A mis tías y abuela, creadoras de *“las cosas no dan igual”* o *“el no ya lo tienes”*, a la mami por enseñarme a ser *“incombustible al desaliento”* y hacerme creer que todo es posible, al papi y a Carmen por sus correcciones y por haberme transmitido *“el gustillo”* del mundo académico y docente, así como por haberme enseñado a mantener la calma cuando hace falta.

Sin vuestra combinación perfecta esto no habría sido posible...

ÍNDICE	1
I.INTRODUCCIÓN	5
I.1. Dermatitis atópica	5
I.1.1. Definición y nomenclatura.....	5
I.1.2. Epidemiología.....	5
I.1.3. Etiopatogenia.....	6
I.1.4. Clínica.....	10
I.1.5. Gravedad.....	11
I.1.6. Calidad de vida.....	11
I.1.7. Diagnóstico.....	12
I.1.8. Tratamiento.....	12
I.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	17
I.2.1. Definición y características microbiológicas.....	17
I.2.2. Relación entre el <i>Staphylococcus aureus</i> y la Dermatitis atópica.....	18
I.2.3. Factores de virulencia del <i>Staphylococcus aureus</i>	19
I.2.4. Colonización por <i>Staphylococcus aureus</i> en la Dermatitis atópica.....	22
I.2.5. <i>Staphylococcus aureus</i> y gravedad de la Dermatitis atópica.....	23
I.2.6. <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina.....	24
I.2.7. <i>Staphylococcus aureus</i> , antibioterapia y resistencias.....	25
I.2.8. Tratamiento del <i>Staphylococcus aureus</i> en la Dermatitis atópica.....	26
I.3. Microbiota	28
I.3.1. Definición y nomenclatura.....	28
I.3.2. Técnicas de secuenciación.....	29
I.3.3. Microbiota de la piel.....	30
I.3.4. Microbiota nasal.....	33
I.3.5. Microbiota y enfermedades dermatológicas.....	35
I.3.6. Microbiota nasal y cutánea en la Dermatitis atópica.....	36
I.3.7. Microbiota como diana terapéutica en la Dermatitis atópica.....	37
I.4. Situación actual del tema	39
II. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	41
III. HIPÓTESIS	43
IV. OBJETIVOS	45
IV.1. Objetivos principales	45
IV.2. Objetivos secundarios	45

<u>V. MATERIAL Y MÉTODOS</u>	47
V.1. Ámbito de estudio	47
V.2. Diseño del estudio	47
V.3. Población a estudio	47
V.3.1. Criterios de inclusión.....	47
V.3.2. Criterios de exclusión.....	47
V.3.3. Tamaño muestral.....	48
V.3.4. Estrategia de reclutamiento de pacientes.....	48
V.4. Descripción de las variables	48
V.4.1. Variables de identificación.....	48
V.4.2. Variables explicativas.....	49
V.4.3. Variables de resultado.....	49
V.5. Recogida de las variables	52
V.6. Análisis de datos	54
V.6.1. Estudio de los objetivos principales.....	54
V.6.2. Estudio de los objetivos secundarios.....	55
<u>VI. RESULTADOS</u>	57
VI.1. Resultados del estudio de los objetivos principales	57
VI.1.1. Estudio de prevalencia la colonización nasal por <i>S. aureus</i> en los casos.....	57
VI.1.2. Alteraciones del sueño asociadas al prurito en los casos.....	57
VI.1.3. Gravedad en los casos según el SCORAD.....	58
VI.1.4. Colonización nasal por <i>S. aureus</i> en los casos clasificados según alteraciones del sueño asociadas al prurito.....	59
VI.1.5. Colonización nasal por <i>S. aureus</i> en los casos clasificados según el SCORAD.....	60
VI.1.6. Características epidemiológicas y sociodemográficas comparando casos y controles.....	60
VI.1.7. Características epidemiológicas y sociodemográficas comparando niños colonizados y no colonizados.....	63
VI.1.8. Análisis Multivariante.....	66
VI.2. Resultados del estudio de los objetivos secundarios	67
VI.2.1. Perfil de resistencia antibiótica en los pacientes colonizados por <i>S. aureus</i>	67

VI.2.2. Estudio de colonización nasal por otros gérmenes potencialmente patógenos diferentes de <i>S. aureus</i> comparando casos y controles.....	68
VI.2.3. Estudio de colonización nasal por otros gérmenes potencialmente patógenos diferentes de <i>S. aureus</i> comparando niños colonizados y no colonizados.....	69
VI.2.4. Resultados del estudio piloto de la microbiota nasofaríngea.....	70
VII. <u>DISCUSIÓN</u>	83
VII.1. Discusión de los resultados de los objetivos principales	83
VII.1.1. Características epidemiológicas y sociodemográficas de los casos ..	83
VII.1.2. Características epidemiológicas y sociodemográficas comparando casos y controles	85
VII.1.3. Características epidemiológicas y sociodemográficas comparando niños con colonización nasal por <i>S. aureus</i> y niños no colonizados.....	88
VII.1.4. Análisis Multivariante.....	90
VII.2. Discusión de los resultados de los objetivos secundarios	91
VII.2.1. Perfil de resistencia antibiótica en los pacientes con colonización nasal por <i>S. aureus</i>	91
VII.2.2. Estudio de colonización nasal por otros gérmenes potencialmente patógenos diferentes de <i>S. aureus</i> comparando casos y controles.....	93
VII.2.3. Estudio de colonización nasal por otros gérmenes potencialmente patógenos diferentes de <i>S. aureus</i> comparando niños colonizados y no colonizados.....	94
VII.2.4. Discusión del estudio piloto de la microbiota nasofaríngea.....	95
VII.3. Aplicabilidad	100
VII.4. Limitaciones del estudio	101
VIII. <u>CONCLUSIONES</u>	103
IX. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	105
X. <u>ANEXOS</u>	121

X.1. Anexo I:SCORAD	121
X.2. Anexo II: Criterios diagnósticos de Hanifin y Rajka	123
X.3. Anexo III: Criterios diagnósticos AAD	125
X.4. Anexo IV: Valores de referencia de IMC	127
X.5. Anexo V: Consentimiento informado del estudio.....	129
X.6. Anexo VI: Hoja de recogida de variables.....	133
X.7. Anexo VII: Consentimiento informado estudio microbiota.....	137
<u>XI RELACIÓN DE GRÁFICOS Y TABLAS.....</u>	141
<u>XII. ABREVIATURAS.....</u>	145



I. INTRODUCCIÓN

I.1. Dermatitis atópica

I.1.1. Definición de dermatitis atópica y atopia

La dermatitis atópica (DA) es una enfermedad inflamatoria de alta prevalencia y amplia distribución en el mundo actual, sobre todo en los países industrializados. Su inicio suele producirse durante la infancia, atenuándose gradualmente con la edad, aunque puede persistir en el adulto e incluso aparecer en esta época de la vida¹. El término DA fue acuñado por Wise y Sulzberger en 1933 para definir una entidad que se caracterizaba por sequedad cutánea, prurito, lesiones eritematosas y curso crónico recidivante². El eccema atópico es un sinónimo que se utiliza con frecuencia para referirnos también a la DA.

La atopia se define como una tendencia personal o familiar a la sensibilización y producción de anticuerpos IgE en respuesta a la exposición a alérgenos comunes en el ambiente, a los que todos los individuos están expuestos pero frente a los cuales la mayoría no desarrollan ninguna respuesta³. Esta tendencia predispone al desarrollo de las llamadas enfermedades atópicas, que afectan hasta un 20% de la población en los países desarrollados⁴. El concepto de marcha atópica hace referencia a la tendencia que tiene la DA en preceder el desarrollo secuencial de asma y rinitis alérgica⁵, lo que sugiere que tiene un papel iniciador del proceso. Recientemente también se ha postulado que las alergias alimentarias podrían formar parte de esta marcha atópica⁶.

I.1.2. Epidemiología

La DA infantil se ha convertido en un problema de salud pública en los países desarrollados, afectando a un 15-30% de los niños, y considerándose la enfermedad crónica más prevalente de la infancia⁷. Es más preponderante en las zonas urbanas que en las rurales dentro de los países desarrollados, y las clases sociales altas se encuentran más afectadas que las sociales bajas. En cuanto a la afectación por sexos, según un estudio realizado en adolescentes de 12 a 16 años se encontró una mayor predominancia en el sexo femenino (25,7%) que en el masculino (17%)⁸. En el 45 % de los casos en

niños el comienzo de la DA se produce durante los primeros 6 meses de vida, en el 60% durante el primer año y en más del 85% antes de los 5 años de edad⁷. Se ha visto que un 30% aproximadamente de los niños con DA desarrollan asma y un 35% síntomas de rinoconjuntivitis⁹.

I.1.3. Etiopatogenia

La etiopatogenia de la DA es compleja; existen numerosos factores implicados, sin embargo, buena parte de ellos todavía no son bien conocidos, como tampoco lo es la relación existente entre los mismos. Entre los factores involucrados encontramos disfunción de la barrera epidérmica, mecanismos inmunológicos y bioquímicos, predisposición genética, y factores ambientales. También se ha implicado al *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y recientemente a la microbiota cutánea en la patogenia de esta enfermedad, apartados que serán desarrollados más adelante en los puntos I.2 y I.3. de la Introducción.

a) Barrera epidérmica y filagrina

¿Es la DA la que da lugar a una disfunción de la barrera epidérmica o es esta disfunción un factor desencadenante para la DA?¹⁰. Existe controversia en la literatura acerca de este tema y aunque tradicionalmente la DA se había considerado un trastorno inmunomediado que se acompañaba de una alteración secundaria de la barrera cutánea, actualmente, predomina la corriente que la entiende como un trastorno primario de la barrera cutánea¹¹. Según este nuevo enfoque, en todos los pacientes con DA existiría un defecto inherente de la barrera, el cual puede producirse por distintos mecanismos moleculares, siendo uno de los más importantes y frecuentes el déficit de la proteína estructural filagrina¹².

El déficit de filagrina va a dar lugar a una alteración en la organización de los filamentos de queratina del citoesqueleto y en la estructura de la envoltura cornificada. Habrá también una disminución de los gránulos de queratohialina, así como una disminución marcada del factor humectante natural (y por lo tanto de la hidratación del estrato córneo), y una alcalinización del pH. Esta elevación del pH da lugar a un aumento de la actividad de ciertas proteasas que promueven la liberación de mediadores

proinflamatorios por parte de los queratinocitos, induciendo una respuesta inflamatoria Th2- mediada incluso en ausencia de alérgenos¹³.

A parte de estos cambios, se ha visto en estudios ultraestructurales que el déficit de filagrina también se asocia a una disminución global de la densidad de corneodesmosomas y de uniones estrechas intercelulares, así como a anomalías en la arquitectura de la matriz lipídica extracelular, hechos que contribuyen notablemente a la alteración de la función barrera. La alteración de lípidos como la ceramida, contribuye a aumentar la pérdida transepidérmica de agua y a la vulnerabilidad de estos pacientes a la colonización por agentes infecciosos¹⁴⁻¹⁵.

b) Mecanismos inmunológicos y bioquímicos

Existen alteraciones inmunológicas implicadas en el desarrollo de la DA, pero persisten controversias en cuanto a la relación causa-efecto, el tipo de anomalías implicadas y la relación entre ellas. Desde el punto de vista inmunológico, la DA se considera bifásica, con una fase aguda fundamentalmente tipo Th2 y una fase crónica Th2/Th1.

En el origen del eccema atópico parece existir un ciclo que se retroalimenta: el prurito y el daño mecánico producido por el rascado inducen la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-18, TNF-alfa, GM-CSF) que reclutan a los leucocitos en la piel. Las distintas poblaciones leucocitarias se activan a través de diferentes procesos; los linfocitos sufren una diferenciación a la vía Th2 inducidos por las células dendríticas; estas células dendríticas muestran asimismo una capacidad aumentada para la presentación de antígenos y se unen a los complejos IgE-antígeno. Los complejos IgE-antígeno inducirán asimismo la agregación y activación de los mastocitos. Además las células Th2 activadas liberan IL-4 e IL-13, que suprimen la producción de péptidos antimicrobianos (como defensinas y catelidicinas). Virus, bacterias y hongos se aprovechan de esta disminución, colonizando la piel y liberando productos proinflamatorios (superantígenos, proteoglicanos y ácido lipoteicoico) que amplificarán la activación leucocitaria. Con esta activación se incrementa la liberación de mediadores inflamatorios, como las proteasas y la IL-31, que perpetúan el prurito¹⁶⁻¹⁷.

El sistema inmune innato de estos pacientes también está alterado, no solo por la disminución de péptidos antimicrobianos sino también por la afectación de los receptores *toll like* (TLR), receptores de reconocimiento de patrones moleculares, que participan contra una gran variedad de microorganismos. En la piel tienen una función muy relevante, ya que este órgano constituye la primera barrera contra diversos agentes. La activación de los TLR induce la producción de citocinas, quimiocinas, péptidos antimicrobianos y aumento en la expresión de las moléculas de adhesión. En la DA la alteración de los TLR2 afecta a la expresión del receptor de vitamina D y de genes de la vitamina D-1 hidroxilasa con disminución en la producción de catelicidina (péptido antimicrobiano), lo que les predispone a un aumento de infecciones¹⁸.

Por otra parte, al igual que ocurre con la psoriasis, la DA también se ha relacionado con la obesidad y otros factores de riesgo cardiovascular¹⁹⁻²⁰. Según un estudio reciente, los pacientes con DA presentan niveles menores de adiponectina, hormona implicada en el metabolismo energético, en que la disminución de sus valores se ha asociado con resistencia a la insulina, obesidad y mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares²¹.

c) Predisposición genética

La asociación familiar de la DA y el elevado nivel de concordancia entre gemelos univitelinos indican una importante implicación de las alteraciones genéticas en su patogenia. Por otra parte, la asociación con asma y rinitis alérgicas señala alteraciones genéticas que se correlacionan con los desequilibrios inmunes de tipo Th2. En este sentido, se ha implicado en la patogenia de la DA a un grupo de genes localizados en el cromosoma 5q31-3326, que regulan la producción de interleuquinas de la vía Th2 como son las IL-3, 4, 5 y 13, así como el GM-CSF. También se han identificado polimorfismos en la región que codifica el receptor de la IL-4 (16q12) y mutaciones en la región promotora del gen RANTES (17q11) que influirían en la expresión de la DA²². Asimismo se han asociado polimorfismos en el gen SPINK5 (afectado en el síndrome de Netherton) en el eccema atópico²³, así como mutaciones en el gen de la filagrina (FLG), implicado en la ictiosis vulgar y con elevada frecuencia de portadores en la población europea²⁴.

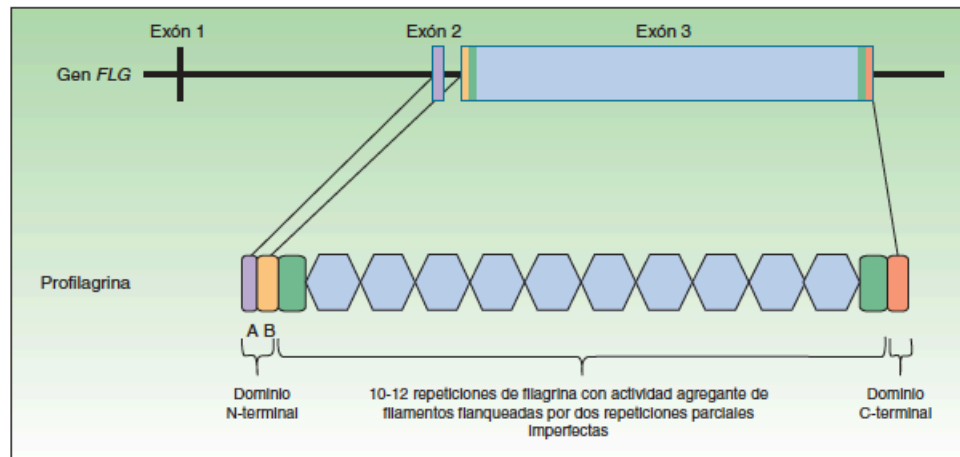


Figura 1 Estructura del gen *FLG* y de la proteína profilagrina.

Figura 1. Estructura del gen *FLG* y de la proteína profilagrina. Figura extraída del artículo de M. Armengot-Carbo *y cols.*²⁵

Respecto a este último gen, se ha visto que los portadores de mutaciones en *FLG* tienen 4 veces más riesgo de sufrir DA que los no portadores. Pero parece que no solo implica un mayor riesgo, sino también una mayor gravedad²⁶. Además, algunos estudios recientes han demostrado que los portadores de mutación en la *FLG* también tienen un mayor riesgo de progresión de la marcha atópica, encontrándose en ellos un riesgo significativamente superior de desarrollar asma, rinitis alérgica y alergia alimentaria al cacahuete respecto a los no portadores²⁷⁻²⁹. La filagrina no se expresa en mucosa bronquial, nasal ni digestiva y, por lo tanto, no habrá alteración de la función barrera a este nivel^{30,31}. Así pues, el mecanismo por el cual las mutaciones en *FLG* promueven respuestas alérgicas en estas mucosas será a través de una sensibilización sistémica a alérgenos que han penetrado a través de una barrera cutánea alterada, no a través de la mucosa. Esto explica la tendencia de la DA a preceder al resto de trastornos atópicos en la marcha atópica.

También se han encontrado coincidencias en el análisis genético entre DA y psoriasis, en concreto los loci 1q21, 17q25 y 20p, lo que podría indicar algún tipo de relación entre estas dos enfermedades inflamatorias³².

d) Factores ambientales

El incremento que se ha producido en la prevalencia de la DA infantil en los

países desarrollados ha dado lugar a la aparición de múltiples teorías sobre los posibles factores ambientales implicados. Probablemente el incremento observado en la prevalencia de la patología alérgica dependa más de factores ambientales que de otras características del individuo. Dentro de los factores ambientales que pueden exacerbar la enfermedad se incluyen la temperatura, la humedad, los irritantes, los aeroalérgenos, las infecciones, las comidas, la convivencia con animales domésticos y el estrés entre otros.

Alrededor del 33 % de los niños con DA moderada a grave presentan positividad para IgE específica frente a alguna proteína alimentaria, valor mucho más alto que en la población normal; la presencia de alergia a las proteínas del huevo se correlaciona con una mayor gravedad del eccema atópico y con un mayor tiempo de evolución de las lesiones³³. La alimentación con leche materna se ha postulado como factor protector de la DA³⁴.

También resulta interesante destacar la «hipótesis de la higiene» que promulga que en las zonas desarrolladas los niños tienen una exposición menor a gérmenes, lo cual puede dar lugar a una maduración inadecuada del sistema inmunológico. De este modo, una menor incidencia de infecciones en edades tempranas condicionará una mayor probabilidad de padecer DA³⁵. El contacto con animales constituye un motivo de discusión, ya que algunos trabajos no han encontrado diferencias, mientras otros concluyen un efecto preventivo de cara al desarrollo de eccema atópico, e incluso en algún caso con disminución de la concentración de IgE. En este mismo sentido se ha postulado que el crecimiento en el medio rural, especialmente en granjas, podría tener un efecto beneficioso en el desarrollo de la atopia³⁵.

I.1.4. Clínica

Existe un amplio espectro respecto a la presentación clínica de la DA o el eccema atópico, desde mínimas lesiones flexurales hasta eritrodermia. La piel del niño presenta generalmente una intensa xerosis y el prurito es un dato constante. Sobre la superficie cutánea pueden aparecer lesiones en cualquier localización, pero existe un patrón de afectación típico que varía con la edad³⁶. En la DA del lactante (hasta los dos años) las lesiones suelen ser más agudas, con pápulas y vesículas que se erosionan

precozmente. Éstas se localizan con preferencia en la cara, sobre todo en la frente y las mejillas, aunque suelen respetar la zona perioral. También suelen presentarse lesiones en zonas de extensión de los miembros, así como en el cuero cabelludo. A partir de los dos años las lesiones cambian, y suelen hacerse más crónicas, con liquenificación y engrosamiento cutáneo. Además, las zonas donde se localizan se vuelven más específicas, con preferencia por los pliegues antecubitales y poplíteos, caras de flexión de las muñecas, y cara anterior de los pies. Se produce también con frecuencia la afectación labial, en muchos casos empeorada por el chupeteo y la humedad constante de la zona³⁷.

I.1.5. Gravedad

La valoración de la gravedad de la DA ha sido y es motivo de controversia y se han diseñado varios índices para su medición objetiva. El más conocido y utilizado es el SCORAD (**Scoring Atopic Dermatitis**) (*Anexo I*), que combina la medición de la superficie afectada con la regla de los nueve y la presencia de 6 datos clínicos: eritema, edema/pápulas, exudado/costra, excoriación, liquenificación/ prurigo y xerosis. Se añade además una valoración del prurito y de la alteración del sueño. A mayor puntuación, mayor gravedad, estableciéndose tres grados principales: leve con una puntuación menor de 15, moderada entre 15 y 40 y grave por encima de 40³⁸. Este índice ha sido cuestionado sobre todo en su relación con la afectación subjetiva por parte del paciente y sus familiares³⁹.

I.1.6. Calidad de vida

La DA causa un importante impacto en la calidad de vida y en la esfera psicosocial de los pacientes y sus familias. Se ha demostrado que los niños con esta patología tienen un riesgo elevado de desarrollar trastornos de hiperactividad e inatención, y si además del eccema asocian problemas del sueño, desarrollan con mayor frecuencia trastornos emocionales y de conducta³⁸. Son niños que tienen altos niveles de estrés y ansiedad, que a su vez empeoran aún más los síntomas de la DA a través de neuropéptidos como la sustancia P o el neuropéptido Y. Además, no sólo se encuentra afectada la calidad de vida del paciente que sufre la enfermedad, sino también la del entorno familiar. El cuidado de un niño con DA se ha relacionado con alteraciones del

sueño en los padres, que son comparativamente mayores que en los padres de hijos asmáticos. Esta afectación del ritmo del sueño se correlaciona también con un mayor grado de ansiedad y depresión⁴⁰.

I.1.7. Diagnóstico

El diagnóstico de la DA se realiza mediante la clínica, dado que no existe ninguna prueba que ofrezca sensibilidad o especificidad relevantes. A pesar de ser una patología ampliamente estudiada no existe un consenso definitivo para realizar dicho diagnóstico. Existen varios factores que pueden influir en este problema, como son la heterogeneidad clínica de la enfermedad, su variabilidad en el tiempo, la implicación de otras especialidades como alergología, pediatría, etc. Para solucionar este problema se han elaborado diversos criterios diagnósticos, entre los que destacan los de *Hanifin y Rajka*. Constituyen un grupo de signos y síntomas que se agrupan en manifestaciones mayores y menores, debiendo estar presentes al menos 3 de cada grupo⁴¹ (*Anexo II*). En 2003 un grupo de expertos de la Academia Americana de Dermatología (AAD) elaboraron un documento de consenso con los criterios diagnósticos adaptados a considerar en pacientes con DA (*Anexo III*)⁴².

I.1.8. Tratamiento

Partiendo de la base de que no existe ninguna alternativa terapéutica que asegure una “curación” definitiva, actualmente la meta del tratamiento de la DA es el control de los síntomas. El manejo de la DA en la infancia comprende una serie de cuidados generales de la piel atópica fundamentados principalmente en una hidratación correcta y en evitar factores desencadenantes, un tratamiento de “choque” con corticoides o inmunomoduladores y un tratamiento de mantenimiento en momentos menos agudos⁴³,⁴⁴. Por otra parte, no debemos olvidar en el abordaje terapéutico, el cuidado de los aspectos emocionales de la DA, por lo que es recomendable una atención psicológica basada en una intervención educativa e informativa sobre los aspectos clínicos y preventivos de la enfermedad⁴⁵.

En cuanto a los corticoides tópicos, se consideran actualmente la piedra angular en el tratamiento del eccema atópico. La potencia y la formulación empleada

dependerán de la zona a tratar y de la cronicidad de las lesiones, necesitando por ejemplo las zonas liquenificadas una mayor potencia. Una aplicación diaria es suficiente, no presentando ventajas el uso de medicación dos veces al día, lo que sí puede aumentar los efectos secundarios. Se ha visto que la aplicación de glucocorticoides sobre la piel sana dos veces por semana puede reducir la frecuencia de brotes en comparación con el uso de emolientes solos, por lo que puede estar indicado este tratamiento de mantenimiento en casos rápidamente recidivantes o graves^{46,47}. Los efectos secundarios son bien conocidos pero muchas veces sobrestimados por los pacientes y sus familiares, a pesar de que las nuevas formulaciones han demostrado un potencial de atrofia cutánea mucho menor que las antiguas y de que se ha encontrado una incidencia muy baja de complicaciones tanto locales como sistémicas. Además de actuar como antiinflamatorios, los corticoides también han demostrado disminuir la colonización de microorganismos como *S. aureus* en la piel de estos pacientes. Cuando se administran con antibioterapia tópica, el de elección parece ser el ácido fusídico, debido a su baja concentración mínima inhibitoria y a su capacidad de penetración^{48,49}.

El empleo de emolientes es ampliamente reconocido como medida básica en el tratamiento y la prevención de los brotes de DA. Algunos autores han demostrado que su uso combinado con esteroides tópicos acelera la curación y disminuye la cantidad de esteroide necesaria para resolver el brote⁵⁰. Los productos emolientes tópicos ricos en ceramidas o en ácidos grasos esenciales, como por ejemplo el aceite de girasol destilado (que contiene ácido oleico y linoleico), se han propuesto como muy beneficiosos en el cuidado de la piel atópica. Este actúa como ligando de los PPAR (Receptores Activados por Proliferadores de Peroxisomas) estimulando la diferenciación de los queratinocitos, mejorando la función de la barrera epidérmica, reduciendo la inflamación y potenciando el metabolismo lipídico⁵¹.

Los inhibidores tópicos de la calcineurina también han demostrado ser efectivos en el tratamiento de la DA. El tacrolimus tópico presenta una eficacia similar a los corticoides de potencia alta, mientras que el pimecrolimus es sustancialmente menos potente⁵². Tanto el tacrolimus como el pimecrolimus tópicos no producen atrofia cutánea, pero sí presentan otros efectos secundarios; en el momento de su aplicación producen sensación de prurito-quemazón local, lo que supone una molestia añadida en la piel del niño atópico. Al igual que ocurre con los corticoides tópicos existen estudios

que apoyan el empleo tanto de tacrolimus como de pimecrolimus tópicos como terapia de mantenimiento una vez al día mejorado el brote, obteniéndose un tiempo más prolongado de remisión clínica y reduciendo la dosis total de corticoides tópicos total^{53,54}.

Los corticoides sistémicos se recomiendan en pautas cortas para controlar brotes agudos de eccema⁵⁵, teniendo en cuenta que es frecuente el rebrote al suspender el tratamiento. No se aconseja el empleo a largo plazo en niños⁵⁶. Se han empleado diferentes inmunosupresores en el tratamiento de la DA como la ciclosporina, el metotrexate, la azatioprina y el mofetil micofenolato, con resultados bastantes buenos pero no exentos de efectos secundarios⁵⁷. La ciclosporina se ha utilizado clásicamente como rescate en el tratamiento de la DA recalcitrante, desarrollando un papel similar al de los corticoides. Actúa inhibiendo la transcripción de IL-2 y otras citocinas, consiguiendo de esta manera evitar la activación de los linfocitos T. La ciclosporina consigue una respuesta dosis dependiente muy rápida, en menos de 2 semanas, pudiendo variar las dosis de inicio desde los 4, 5 y hasta 7 mg/kg/día. El metotrexate es un antimetabolito del ácido fólico que bloquea la síntesis de ADN, ARN y las purinas, afectando a la función de los linfocitos T. Puede administrarse vía oral pero la administración parenteral tiene mayor biodisponibilidad. La dosis debe individualizarse para alcanzar y mantener el control de la enfermedad, y el tiempo medio hasta conseguir el efecto es de 10 semanas. La azatioprina ha demostrado en diferentes estudios ser un tratamiento efectivo y seguro, a corto y largo plazo, tanto en adultos como en niños. La seguridad es mucho mayor si realizamos la determinación de la enzima tiopuril metil transferasa, que permite un mejor ajuste de dosis para conseguir una máxima eficacia minimizando los efectos adversos. La dosis de inicio se estima en 0,75-2,5 mg/kg/día con una dosis de mantenimiento de 0,7-1,5 mg/kg/día. El problema de la azatioprina es su demora en el inicio de la respuesta terapéutica, que se estima en unos 2 meses como mínimo con una media de 4 meses. Este hecho determina su uso como medicamento estabilizador involucrado en el control de las recidivas más que como fármaco de rescate. El mofetil micofenolato se considera un fármaco eficaz en el tratamiento de la DA moderada-severa, consiguiendo mejorías en 4-8 semanas con buen perfil de seguridad a largo plazo⁵⁷.

La fototerapia puede ser eficaz en el manejo de la DA y se realiza con frecuencia

en adultos, si bien no se recomienda su uso en menores de 12 años, salvo en casos excepcionales⁵⁴. Otros tratamientos como el interferón-gamma o dosis altas de inmunoglobulinas también han demostrado ser eficaces en algunos estudios⁵⁷.

El control del prurito en la DA ha sido motivo de múltiples estudios pero existen pocas evidencias que sustenten el uso de antihistamínicos orales. El empleo de antihistamínicos con efecto sedante puede ayudar al sueño nocturno, aunque no por su efecto antipruriginoso. Por otra parte, el niño puede beneficiarse de estos fármacos en otras manifestaciones de atopia, como la rinoconjuntivitis o el dermatografismo. Se ha observado que el prurito de estos pacientes es independiente de los niveles de citocinas, eosinófilos e IgE libre, y que no se correlaciona con la severidad de la enfermedad. Por el contrario, el factor neurotrófico derivado del cerebro (producido por eosinófilos circulantes) y la sustancia P sí que han sido involucrados en su fisiopatología. Varios estudios experimentales han comprobado que la sustancia P induciría la cascada del ácido araquidónico y produciría un aumento de los leucotrienos. Todo ello explicaría el mal resultado de los antihistamínicos en el control del prurito de estos pacientes y el posible papel beneficioso de los antileucotrienos como el montelukast. Sin embargo, en la literatura existen datos contradictorios con respecto a este último.

La restricción dietética ha demostrado ser eficaz en el caso de los niños con IgE específica frente al huevo⁵⁵. Parece lógico establecer dietas libres de aquellos alimentos a los que se ha demostrado alergia mediante RAST, si bien la prueba más importante sería la de provocación, que en muchos casos no puede realizarse⁵⁶. El empleo de probióticos en el tratamiento y la prevención de la DA había levantado expectativas inicialmente; sin embargo, varios estudios realizados en niños encontraron que la administración de *Lactobacillus* no ofrece ventajas en el tratamiento de los brotes de eccema⁵⁸ ni en la prevención del desarrollo de la DA⁵⁹.

Las nuevas alternativas terapéuticas para esta enfermedad están relacionadas con la aplicación de los nuevos fármacos biológicos que en la actualidad se están ensayando en otros procesos dermatológicos⁶⁰ y el desarrollo de nuevas moléculas específicas. En los últimos años se han intentado aplicar diversas terapias biológicas como los AntiTNF para el tratamiento de la DA severa y recalcitrante. Estas moléculas pretenden frenar la cascada inflamatoria relacionada con la atopia a través del bloqueo selectivo de diversas

dianas moleculares. No existen grandes series de casos que establezcan la eficacia y seguridad de estos medicamentos en la DA. En la mayoría de los casos solo disponemos de casos clínicos aislados y la extrapolación de nuestra experiencia en otras enfermedades inmunológicamente relacionadas⁶¹⁻⁶³.

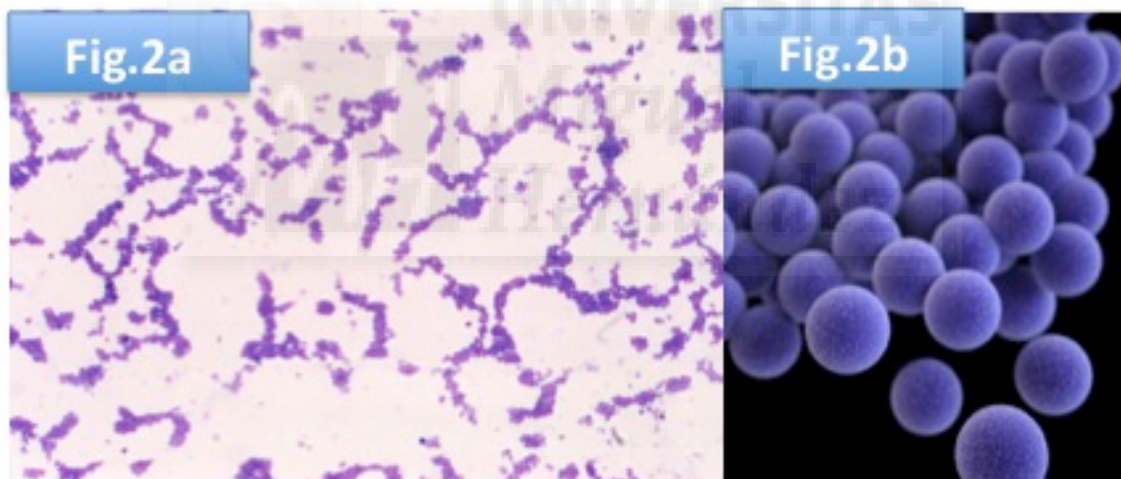
Basados en la posibilidad de que la DA presente un modelo fisiopatológico similar al de la psoriasis, podría plantearse actuar en ella de la misma manera. En este sentido, están en investigación nuevas dianas terapéuticas para la DA como los fármacos antiTh22/IL22, fármacos antiIL23/IL17 e inhibidores de la fosfodiesterasa 4. Recientemente disponemos de un nuevo tratamiento para la DA conocido como dupilumab, se trata de un anticuerpo monoclonal que bloquea las IL4/IL13 y la FDA acaba de aprobar su uso⁶⁴.

Otro anticuerpo monoclonal a destacar es el omalizumab, que se emplea en el tratamiento del asma persistente en mayores de 12 años con función pulmonar reducida y en la urticaria. Existen varias series de casos donde se ha obtenido buena respuesta en pacientes con DA refractaria a otros tratamientos^{65,66}. Sin embargo, también se han publicado tres casos donde se ha empleado sin mejoría⁶⁷. Algunos autores indican que unos niveles de IgE demasiado elevados condicionarían un menor efecto, teniendo este fármaco su hueco en casos donde la elevación de IgE sérica no supere las 7.000 UI/ml⁶⁸.

1.2. *Staphylococcus aureus*

1.2.1. Definición y características microbiológicas

El *S. aureus* está formado por cocos gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5 μm , agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. El nombre de *Staphylococcus*, proviene del griego *staphyle* que significa racimo de uvas. Son bacterias inmóviles, no esporuladas, productoras de coagulasa, catalasa, y anaerobias facultativas que se encuentran ampliamente distribuidas por todo el mundo. Son responsables de un amplio espectro de cuadros clínicos que van desde infecciones en la piel y los tejidos blandos como forúnculos y abscesos subcutáneos, hasta cuadros graves como el síndrome de la piel escaldada, la neumonía necrosante, la sepsis y el síndrome del shock tóxico; tiene gran importancia en la comunidad y está frecuentemente implicado en infecciones nosocomiales⁶⁹.



Figuras 2a y 2b: Imágenes de *S. aureus*: cocos gram positivos dispuestos en cadenas cortas (2a) y formando “racimo de uvas”(2b). Fotos extraídas de internet en *Public Health Image Library*⁷⁰.

Además, un alto porcentaje de individuos está colonizado por *S. aureus*, lo cual constituye un factor de riesgo para su diseminación. El *S. aureus* tiene gran capacidad de adquirir resistencia a los antimicrobianos y en la actualidad se encuentran cepas resistentes a la mayoría de los antibióticos disponibles; en particular, su resistencia a la meticilina, inicialmente en el ambiente hospitalario y posteriormente en la comunidad ha dificultado aún más el control mundial de este microorganismo⁷¹.

I.2.2. Relación entre el *Staphylococcus aureus* y la Dermatitis atópica

La asociación entre el *S. aureus* y la piel atópica es un hecho bien documentado^{72,73}. Sin embargo, no está tan claro cuáles son los mecanismos de interrelación ni el papel que tienen los factores de virulencia. Conocer si la colonización de *S. aureus* en la DA es causa o consecuencia no es fácil, ya que la etiopatogenia de la enfermedad (alteraciones en el sistema inmune, defectos en la integridad cutánea...) contribuye a esta colonización, y a su vez, este microorganismo colabora en agravar la inflamación, perpetuando las lesiones y dificultando su curación.

Por una parte, la alteración del estrato córneo en la DA permite la entrada de alérgenos, los cuales son capturados y procesados por las células de Langerhans de la epidermis. Estas migran a los ganglios linfáticos donde interactúan con las células T y promueven una inmunidad Th2⁷¹. La entrada constante de alérgenos acabará produciendo una polarización de la inmunidad adaptativa hacia Th2, caracterizada por la producción local de citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13), aumento de la producción y activación de eosinófilos y mastocitos, y producción de IgE alérgeno-específicas con aumento de la IgE total⁷⁴. También promueven esta polarización hacia Th2 toda una serie de citocinas liberadas por los queratinocitos alterados, como las IL-1 o la linfopoyetina estromal tímica (TSLP), a consecuencia de una mayor actividad de las proteasas endógenas⁷⁵. Además la acción de proteasas exógenas también puede dar lugar a la liberación de citocinas (como las liberadas por fuentes de alérgenos [como los ácaros del polvo, cucarachas, hongos y pólenes], o las producidas por *S. aureus*).

Además de este aumento de la respuesta de los linfocitos Th2, en la DA también existe una alteración del sistema inmune innato como ya se ha comentado previamente, con descenso del nivel de péptidos antiestafilocócicos, como la b-defensina y las catelicidinas^{76,77}. Junto a esto, también encontramos disminución de la vitamina D que tiene actividad antimicrobiana⁷⁸⁻⁸⁰ y alteraciones en los TLR. Entre estos, los TLR2 se han asociado más específicamente con el reconocimiento de los componentes de la pared celular de las bacterias grampositivas (ácidos lipoteicoicos y posiblemente peptidoglucanos) incluyendo *S. aureus*, y de hecho se ha constatado que algunos de los polimorfismos de los TLR2 se asocian con subgrupos de pacientes con formas más graves de DA.

Por otra parte, la piel de los pacientes con DA tiene defectos en la diferenciación de los queratinocitos, particularmente en la expresión de la filagrina. Esto va a condicionar una mayor colonización por *S. aureus* no solo alterando la barrera cutánea sino también aumentando la expresión bacteriana de proteínas de adhesión, al provocar una alcalinización del pH córneo y una disminución de los niveles de ácido transurocánico (UCA) y ácido pirilidona-5-carboxílico (PCA), los cuales son capaces de inhibir la expresión de proteínas en la superficie bacteriana. Además la expresión de la filagrina puede modular la sensibilidad de los queratinocitos al *S. aureus*, haciendo que estos sean más vulnerables a la acción de sus toxinas. Esto se debe a que las células que no expresan filagrina tienen también una expresión disminuida de esfingomielinasa, lo que se traduce en un aumento de esfingomielina, un lípido de la membrana plasmática que sirve de receptor para toxinas⁸¹. De hecho, se ha observado que los pacientes con DA portadores de la mutación de la filagrina (comparados con los no portadores) tienen 7 veces más riesgo de sufrir más de 4 episodios al año de infección cutánea susceptible de requerir tratamiento antibiótico⁸².

I.2.3. Factores de virulencia del *Staphylococcus aureus*

La interrelación entre los factores de virulencia del *S. aureus* y el eccema atópico es muy compleja. Por un lado, encontramos los componentes propiamente celulares o estructurales (factores de superficie celular o componentes de la pared celular), y por otro lado, sustancias secretadas como exotoxinas y enzimas⁶⁶. Además para mejorar su capacidad patógena, los estafilococos han desarrollado sistemas de *quorum-sensing* (QS) o percepción del quórum, que establecen comunicaciones entre las células y que son capaces de regular múltiples factores de colonización y virulencia. En los estafilococos, el sistema QS es el llamado agr (gen accesorio regulador), y su expresión parece contribuir a la patogénesis estafilocócica⁸³.

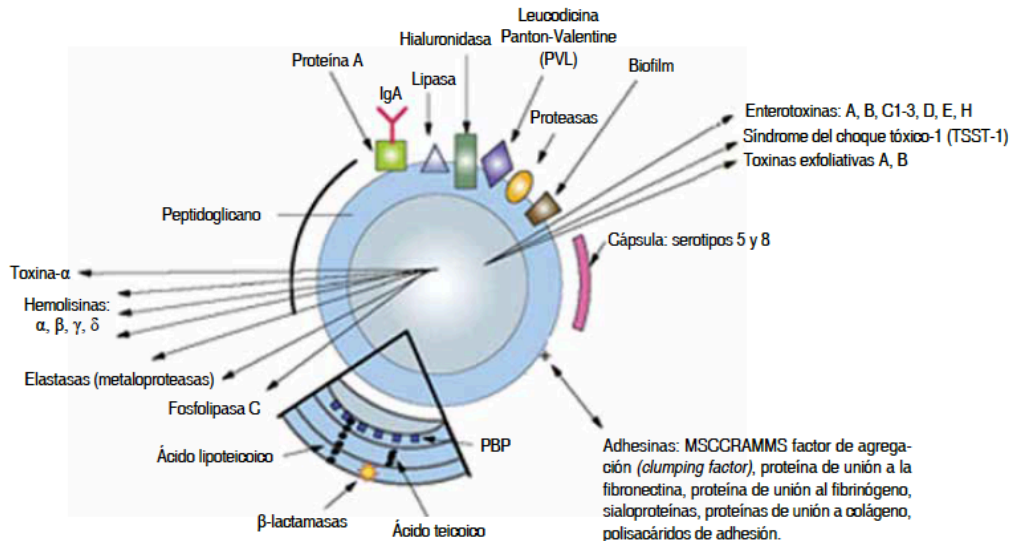


Figura 3. Factores de virulencia del *S. aureus*. Figura extraída del artículo de Cervantes-García E y cols.⁶⁹

a) Componentes de superficie celular y pared celular

Biofilm (biopelícula). Algunas cepas de *S. aureus* producen una capa polisacárida extracelular denominada biofilm o biopelícula. Ésta es una red extracelular que ayuda a la comunidad bacteriana a adherirse a diferentes superficies⁶⁹.

Cápsula. Otro factor importante en el *S. aureus* es la cápsula de naturaleza polisacárida que facilita la adherencia de las bacterias a diversas células, además de tener capacidad antifagocitaria⁶⁹.

Pared celular. Tiene dos componentes el ácido lipoteicoico y el peptidoglicano. La parte hidrofóbica del ácido lipoteicoico juega un papel en la adherencia, mientras que la parte covalente del peptidoglicano se une a las proteínas con función de adhesinas⁶⁹.

Proteínas de superficie. Además de ser la clave en las funciones del metabolismo de la pared celular de la bacteria, sirven para ligarse a los tejidos del huésped, facilitar la internalización y la evasión del sistema inmune⁶⁹.

B) Enzimas y toxinas

Enzimas. Existen proteínas, como se mencionó anteriormente, que se pueden unir a la capa externa del peptidoglicano mediante enlaces covalentes que favorecen la adhesión del microorganismo. Entre ellas encontramos a la proteína fijadora al colágeno, la proteína fijadora de fibronectina, el factor de agregación (clumping factor) y la

coagulasa ligada a la célula que se une al fibrinógeno, facilitando la agregación bacteriana, y la proteína A, que activa el complemento y bloquea la fracción Fc de las IgG, por lo que previene la eliminación del microorganismo mediada por anticuerpos inhibiendo la opsonización y la fagocitosis⁶⁹.

Toxinas. Algunas cepas de *S. aureus* son capaces de sintetizar proteínas extracelulares adicionales que producen su acción en zonas distantes del foco infeccioso. Su expresión está regulada por el gen accesorio regulador de proteínas agr, que pueden ser codificadas por DNA cromosómico o por plásmidos^{84, 85}. Entre las más importantes están:

*Las hemolisinas. Se han identificado cuatro hemolisinas como: alfa, beta, gamma, delta, que son sintetizadas por la mayoría de las cepas de *S. aureus*, y tienen capacidad hemolítica y citolítica, actuando sobre determinadas células del huésped, como leucocitos, plaquetas, macrófagos y fibroblastos.

*La toxina Panton-Valentine (PVL) es una toxina citolítica formadora de poros; su presencia está asociada con un incremento de la virulencia de ciertas cepas de *S. aureus* que destruyen los leucocitos y producen necrosis de los tejidos. Está codificada por los genes LukS/LukF.

*Toxinas exfoliativas (ET) o epidermolíticas: La prevalencia de cepas productoras de estas toxinas varía geográficamente. Se han identificado dos serotipos: A y B (ETA y ETB). Ambas pueden producir el síndrome de la piel escaldada.

*Superantígenos. La toxina del síndrome del *shock* tóxico (TSST-1) y las enterotoxinas estafilocócicas son el paradigma de una gran familia de exotoxinas pirógenas llamadas superantígenos. Los superantígenos son proteínas que no activan el sistema inmune a través de un contacto normal entre las células presentadoras del antígeno y los linfocitos. Las enterotoxinas estafilocócicas son producidas por 30 a 50% de las cepas de *S. aureus*, de las que se han descrito 15 diferentes enterotoxinas estafilocócicas (SE) : A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, siendo el serotipo A el más frecuente. Un aspecto que parece importante en los mecanismos patogénicos de las enterotoxinas estafilocócicas en la DA es la producción de IgE específicas frente a las enterotoxinas estafilocócicas A y B (SEA y SEB) por el huésped. De este modo, aquellos pacientes con DA que presenten niveles elevados de estos anticuerpos se caracterizan por ser niños de mayor edad (escolares), con DA más graves y que presentan exacerbación en el verano. Incluso algunos trabajos encuentran una correlación directa entre títulos más elevados de anticuerpos IgE específicos frente a la enterotoxina A y la gravedad de la DA^{84, 86}.

I.2.4. Colonización por *Staphylococcus aureus* en la Dermatitis atópica

S. aureus coloniza la piel y las mucosas de los seres humanos. La colonización puede tener lugar en múltiples zonas (piel, periné, faringe, tracto gastrointestinal, vagina y axilas), y el principal reservorio son las fosas nasales. Cuando las barreras se alteran, esta bacteria puede alcanzar tejidos más profundos y producir enfermedades. Los pacientes con infecciones por *S. aureus* suelen infectarse con la misma cepa que coloniza sus fosas nasales; la colonización también permite la transmisión tanto entre individuos del hospital como de la comunidad.

Aproximadamente el 20% de la población está permanentemente colonizada, otro 30% está colonizada intermitentemente, y el 50% parece no ser susceptible⁷⁹. Se ha visto que la prevalencia de portadores en niños sanos es mayor que en adultos, llegando a tasas de hasta un 35,7%⁸⁷. Diferentes trabajos han puesto de manifiesto que los niños con DA están más frecuentemente colonizados que los niños sanos. También se ha visto mayor prevalencia de portadores nasales de *S. aureus* en contactos estrechos de pacientes con DA que en contactos cercanos de pacientes sin DA⁸⁸. El porcentaje de colonización en niños con DA es muy variable entre diferentes países o grupos de población y, aunque se suelen dar cifras tan altas como el 90%⁷ (sobre todo en la colonización cutánea) basadas en resultados de hace décadas, en estudios más recientes las cifras son bastante menores. En un estudio publicado en 2014 por la Dra. Gilaberte y cols.⁷⁸ en España, se encontraron tasas de colonización de *S. aureus* en un 28,3% de muestras de la piel y en un 23,5% de muestras nasales de niños con DA.

Además cuando analizamos la microbiota de las fosas nasales mediante cultivo, nos podemos encontrar con otros microorganismos diferentes a *S. aureus* que también residen en ellas. Sin embargo, no hay consenso en cuanto a qué se considera microbiota normal, existiendo pocos estudios que la han descrito, siendo éstos diferentes en sus resultados, debido en gran parte a que ésta varía en función de diferentes factores como la exposición ambiental, el humo de tabaco, la estación del año, y de las características microbiológicas y epidemiológicas de cada país. En el año 2006, Konno y cols.⁸⁹ describieron como portación nasal normal a *Streptococcus viridans* (*S. viridan*), *S. aureus*, *Staphylococcus coagulasa negativa* como *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) y *Corynebacterium*, considerando como punto de corte para asumir su

estado como colonización normal su presencia en más del 10% de los participantes. A su vez, *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*), *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), *Haemophilus influenzae* (*H. Influenzae*) y *Moxarella catarrhalis* (*M. Catarrhalis*) fueron clasificados como patógenos⁸⁹.

Para establecerse en su reservorio, las fosas nasales, el *S. aureus* tiene que competir con estos microorganismos. De hecho, se piensa que esta competición entre *S. aureus* y las otras comunidades microbianas influye en la prevalencia de colonización nasal por *S. aureus*. En este sentido, varios estudios sugieren que ser portador de microorganismos como *Corynebacteria*, *S. epidermidis* y *S. pneumoniae*, tiene una relación negativa con ser portador de *S. aureus*, ya que estimulan la producción de péptidos antimicrobianos que impiden el establecimiento del *S. aureus* en su reservorio. Por ejemplo el *S. epidermidis* induce la producción de beta-defensinas y modulinas solubles en fenol, con actividad antimicrobiana, mejorando así la inmunidad del huésped⁹⁰.

Recientemente se ha publicado que otra bacteria, el *Staphylococcus lugdunensis* (*S. lugdunensis*), también podría estar implicada en la inhibición del crecimiento del *S. aureus* en su reservorio nasal. Los autores descubrieron que, en una muestra de 187 pacientes hospitalarios, los que albergaban de forma natural esta bacteria en la nariz tenían una probabilidad seis veces inferior de presentar *S. aureus*, en comparación con los que carecían de ella, debido a la producción de una molécula llamada lugdunina⁹¹.

1.2.5. *Staphylococcus aureus* y gravedad de la Dermatitis atópica

Debido al sobrecrecimiento de *S. aureus* y a las toxinas de este microorganismo que pueden actuar como superantígenos, los pacientes con DA pueden tener exacerbación de su enfermedad⁹². Varios estudios describen la asociación entre la colonización cutánea y nasal por *S. aureus* y la severidad del score del eczema⁹³⁻⁹⁵, aunque en esta última localización con más controversia. También se ha asociado la gravedad de la DA con la colonización de otras bacterias como *Streptococcus* y bacterias gram negativas⁹⁶, así como con niveles elevados de IgE y con niveles bajos de vitamina D⁷⁵.

1.2.6. *Stapylococcus aureus* resistente a la meticilina

El uso excesivo e inadecuado de los antibióticos en la sociedad actual está provocando una aceleración en la aparición y propagación de bacterias resistentes a dichos medicamentos, lo que representa una problemática creciente. El *S.aureus* es un patógeno humano versátil que se adapta a los antimicrobianos, siendo capaz de generar mecanismos de resistencia eficientes. Al igual que ha aumentado el número de infecciones estafilocócicas, tanto a nivel comunitario como nosocomial, también lo han hecho de forma significativa las infecciones causadas por *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM).

El SARM fue aislado por primera vez en un cultivo en 1961, dos años después de la introducción de la meticilina como tratamiento en la práctica clínica. Esto inicialmente ocurría a nivel hospitalario, pero el SARM se encuentra cada vez con más frecuencia adquirido en la comunidad, suponiendo un problema de salud pública, ya que dificulta cada vez más el tratamiento de las infecciones, y hace necesario tomar medidas eficaces para prevenirlas. Clínicamente no existen criterios que ayuden a diferenciar las infecciones cutáneas producidas por *S. aureus* sensible a meticilina de las causadas por SARM, si bien en estas últimas son más frecuentes el fracaso terapéutico y la formación de abscesos y necrosis con costra superficial negruzca.

En España, la prevalencia de SARM parece ser más baja de la esperada, algunos estudios sobre población pediátrica estiman una frecuencia de resistencia a la meticilina en *S. aureus* de entre el 9 y el 14,8%⁹⁷. Aunque se considera que la colonización por *S. aureus* en las narinas de los pacientes con DA es mayor que en la población general parece que no ocurre lo mismo con el SARM⁹⁸.

La baja incidencia actual de SARM adquirido en la comunidad en nuestro medio no justifica el cambio de las pautas de antibioterapia empírica. Sin embargo, hay circunstancias en las que debe considerarse, como en el caso de una celulitis extensa, abscesificada o necrosante, presencia de abscesos recurrentes en el niño y sus convivientes, mala respuesta al tratamiento convencional, procedencia del paciente de zonas de alta endemia (Asia, América o Europa del Este) o convivencia con portadores conocidos⁹⁹.

I.2.7. *Staphylococcus aureus*, antibioterapia y resistencias.

En la actualidad, no solo encontramos el problema de la resistencia del *S. aureus* a la metilcilina, sino que este microorganismo puede adquirir resistencia a la mayoría de los antibióticos disponibles; por ejemplo hay estudios que cifran la tasa de resistencias de *S. aureus* a tetraciclinas y eritromicina del 25%¹⁰⁰. En un estudio realizado en *S. aureus* colonizando la piel de pacientes con DA, encuentran tasas de resistencia frente a meticilina, amoxicilina/ácido-clavulánico, cefalexina y cefuroxima del 3%, frente a tetraciclina del 17%, frente a gentamicina del 16% y frente a cotrimoxazol del 23%, frente a levofloxacino del 23%, frente a ácido fusídico del 25%, frente a fosfomicina del 12% y frente a rifampicina del 16%, frente a eritromicina y clindamicina del 21%¹⁰¹. En este sentido, es importante conocer que la mayor parte de las cepas de *S. aureus* que son resistentes a macrólidos lo son también a las lincosamidas. Esto es codificado por el gen *erm* que induce la metilación de la subunidad 23S ribosomal lo que conlleva a la modificación del sitio de unión de estos antibióticos^{102, 103}.

A la hora de pautar el tratamiento, en las infecciones menores no supuradas (impétigo, sobreinfección leve de heridas, etc.), suele ser suficiente el tratamiento tópico con mupirocina o ácido fusídico. Cuando es necesario el tratamiento antibiótico, la cloxacilina es con frecuencia la primera línea de tratamiento. Si bien sus características farmacológicas (administración cada 6 horas, baja biodisponibilidad y mal sabor) hacen que sean preferibles la amoxicilina-ácido clavulánico y las cefalosporinas de primera generación (cefadroxilo o cefalexina). En caso de contraindicación de los betalactámicos o en áreas con altos niveles de SARM, se recomienda tomar muestras para el cultivo e iniciar tratamiento empírico con clindamicina, doxiciclina, o trimetropin-sulfametoxazol hasta conocer los del antibiograma. El cotrimoxazol es una alternativa eficaz, sobretudo en regiones donde haya alta resistencia a la clindamicina o en caso de intolerancia a esta. Si el tratamiento empírico se inicia con alguno de estos fármacos, se recomienda cambiar a un betalactámico tan pronto como se demuestre su sensibilidad en los estudios microbiológicos^{104, 105}.

I.2.7. Tratamiento del *Staphylococcus aureus* en la Dermatitis atópica

La sobreinfección bacteriana de las lesiones cutáneas por *S.aureus* es la complicación más frecuente en la DA y suele estar presente en los brotes. A nivel terapéutico, estos datos apoyan la necesidad de tomar medidas que reduzcan la colonización por *S.aureus*¹⁰⁶. Los antibióticos tópicos y orales más adecuados para la decolonización de *S.aureus* nasal parecen ser la mupirocina, el ácido fusídico, la rifampicina, y el cotrimoxazol¹⁰⁵. Sin embargo, aunque el tratamiento antibacteriano puede tener implicaciones terapéuticas mejorando la severidad y las infecciones secundarias, debemos tener en cuenta que los beneficios con la antibioterapia aparecen de forma transitoria, y el inicio de la resistencia antibiótica representa un serio problema emergente en la terapia a largo plazo. Por tanto, es conveniente un adecuado análisis microbiológico tanto de piel como de reservorios nasales con estudio de la sensibilidad antimicrobiana para una terapia efectiva y adecuada¹⁰⁶.

Además, en la literatura también existe controversia sobre la utilización de terapia antiestafilocócica para la DA. Para disminuir la colonización, el uso de antibióticos intranasales puede ser útil, así como los antisépticos tópicos, los cuales tienen la ventaja de disminuir la colonización de *S.aureus* sin inducir resistencia antibiótica como ocurre con los antibióticos tópicos¹⁰⁷. Existen nuevas intervenciones antiestafilocócicas que pueden formar parte del armamento dermatológico en esta enfermedad. Un estudio examinó la eficacia de los baños con peróxido de hidrógeno (lejía), más mupirocina intranasal obteniendo una mejoría de la severidad de la DA comparado con placebo¹⁰⁸. El estudio fue llevado a cabo en 31 pacientes de edades comprendidas entre los 6 meses y los 17 años con DA moderada-severa y signos clínicos de sobreinfección bacteriana secundaria. Al cabo de 3 meses de tratamiento observaron diferencias clínicas estadísticamente significativas entre los 2 grupos. Además, al comparar en un mismo paciente las zonas sumergidas en los baños de lejía con las no sumergidas también observaron diferencias. Sin embargo, este estudio fue duramente criticado posteriormente considerándose que las diferencias encontradas entre los 2 grupos eran debidas a diferencias basales en la severidad de los pacientes, a utilización de cotratamientos durante el estudio y a un sesgo por intención de tratar¹⁰⁹. Más tarde, a finales del 2010 se publicó un riguroso artículo de revisión¹⁰⁶ en el que se revisa toda la literatura desde 1980 hasta marzo de 2009 sobre medidas reductoras de la

superpoblación de *S. aureus* en los pacientes con DA. Los autores concluyeron que aunque diferentes intervenciones, entre las que se incluyen los baños con lejía y la mupirocina intranasal, hubieran demostrado reducir el número de *S. aureus*, no existía evidencia suficiente que apoyase la utilización de agentes antiestafilocócicos en lesiones sin signos de sobreinfección¹¹⁰.

Por otra parte, debido a que la vitamina D3 tiene un papel en la inducción de la expresión de catelicidinas, algunos centros recomiendan su utilización en el tratamiento para aumentar la resistencia bacteriana de la barrera epidérmica¹¹¹. Además en estudios recientes se ha encontrado que algunas especies comensales pueden actuar como agentes antiinflamatorios¹¹². Por tanto, la terapia antimicrobiana debe enfocarse a las especies patógenas y a no a eliminar la flora comensal, lo cual se desarrollará de forma más exhaustiva en el próximo apartado de la introducción.



I.3. Microbiota

I.3.1. Definición y nomenclatura

Desde hace un tiempo sabemos que en nuestro cuerpo humano existe un mundo microscópico que está compuesto por millones de microorganismos, y que hoy en día es considerado como un “nuevo órgano”. También es bien conocido que los microorganismos del intestino desempeñan un papel importante en el mantenimiento de nuestra salud, sin embargo, se sabe menos acerca de los microorganismos que habitan en la piel y en las fosas nasales. De hecho, hasta hace poco años no existían publicaciones que relacionasen la influencia de la flora cutánea en la salud de la piel y su respuesta inmune, y los trabajos publicados se centraban solamente en los microorganismos patógenos¹¹³.

El reciente desarrollo de técnicas de biología molecular y el análisis metagenómico han supuesto una revolución microbiológica en dermatología, surgiendo por ello múltiples publicaciones en los últimos años al respecto. Gracias al avance en el conocimiento de la composición de la microbiota, actualmente sabemos que muchas enfermedades no son provocadas por un solo microorganismo, sino por el resultado de un desequilibrio en la microbiota. Por ello, es importante conocer cómo se estructura la comunidad microbiana¹¹⁴.

En cuanto a los términos utilizados en este ámbito, se denomina microbiota de la piel al conjunto de microorganismos residentes en la piel del cuerpo humano y el microbioma corresponde al conjunto de genomas de esta microbiota. El término metagenoma hace referencia al conjunto del genoma de las comunidades bacterianas complejas y el ADN humano¹¹⁴.

Para la identificación y clasificación de las especies se utilizan las Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs), unidades que agrupan secuencias similares, las cuales se pueden comparar en bases de datos. Además de la identificación de especies es importante conocer la riqueza (nº de OTUs o biomasa), la abundancia (proporción relativa de diferentes OTUs), y variabilidad-diversidad (grado de heterogeneidad en la microbiota). Se ha visto que cuanto más diversidad, mejor, ya que promueve el estado

de salud. Cuando se produce un desequilibrio en la diversidad de la microbiota se conoce con el nombre de disbiosis¹¹⁴.

En la práctica clínica, se han relacionado varias patologías con una disminución en la diversidad de la microbiota, incluidas enfermedades dermatológicas. De hecho, algunas de estas técnicas ya han empezado a aplicarse en el estudio de muestras de pacientes con DA, bien de forma específica para patógenos claves como *S.aureus*, o abarcando un alto número de microorganismos, para la identificación del microbioma.

I.3.2. Técnicas de secuenciación

Hasta la fecha la composición microbiana de nuestra piel era desconocida ya que los microorganismos no cultivables representan el 99% de la comunidad microbiana. Gracias al diseño de nuevas técnicas moleculares hemos conseguido conocer gran parte de esta composición. En concreto la técnica de secuenciación del gen ARNr 16S, ha demostrado ser de gran utilidad para identificar y clasificar las comunidades microbianas. Se trata de un gen altamente conservado en procariontes que permite establecer relaciones filogenéticas y taxonómicas entre bacterias e identificar especies¹¹⁵.

Además el continuo avance en las técnicas de secuenciación, ha permitido el desarrollo de la metagenómica y la construcción de bases de datos a través de la secuenciación directa del ADN. Los sistemas de secuenciación han evolucionado en los últimos años, desde estrategias de secuenciación específica como *SANGER* que solo permitían la secuenciación de fragmentos pequeños del genoma bacteriano (500-100nt), hasta técnicas de secuenciación de nueva generación o secuenciación masiva, entre las que destaca *ILUMINA*. Estas técnicas de secuenciación masiva son capaces de paralelizar muchas operaciones de secuenciación, y proporcionan un método válido para cuantificar el número absoluto y relativo de especies en la muestra, así como la diversidad de especies¹¹⁶.

El análisis de la diversidad de especies se lleva a cabo a través de índices como el de Shannon-Wiener (riqueza de especies de una comunidad particular a la que consideramos homogénea) o Chao 1 (estima el número de especies esperadas considerando la relación entre el número de especies representadas por un individuo y el

número de especies representadas por dos individuos en las muestras)¹¹⁷.

I.3.3. Microbiota de la piel

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano y supone una barrera fundamental en la protección de infecciones. Antes del nacimiento, la piel es completamente estéril; posteriormente, en el momento de nacimiento empieza la exposición a microorganismos. La microbiota fecal y vaginal de la madre (parto vaginal) y la microbiota cutánea de la madre (parto por cesárea), enseguida colonizan la piel de los niños. Rápidamente también se colonizan con los microorganismos presentes en el entorno¹¹⁷.

Los métodos de identificación independientes del cultivo muestran que la microbiota de la piel del ser humano supone una estructura compleja, albergando múltiples comunidades de microorganismos, principalmente bacterias, que son a las que nos solemos referir cuando hablamos de la microbiota de la piel. Sin embargo, es importante recordar que también residen otros organismos en ella, como virus, arqueas, parásitos y hongos. De hecho comparado con otras partes del cuerpo como por ejemplo el intestino, la piel tiene una mayor representación de virus y hongos¹¹⁸.

Desde el punto de vista bacteriológico la piel puede considerarse un medio de cultivo. Cada centímetro cuadrado de piel contiene un billón de bacterias aproximadamente, siendo la superficie corporal donde más bacterias habitan. Pero a pesar de que en ella encontramos muchas especies de bacterias distintas, existen cuatro troncos principales que se conocen como los *phyla* predominantes: *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes*¹¹⁷.

Dentro de la microbiota de la piel es importante diferenciar dos grupos. Por un lado están los microorganismos residentes, que son el grupo más numeroso y que está constantemente presente en la superficie cutánea. Se consideran comensales y están en una relación de “simbiosis-mutualismo” con el huésped, donde ambos se benefician, ya que la piel supone un hábitat para ellos mientras que estos contribuyen en la respuesta inmune con la producción de moléculas de defensa para prevenir la colonización por otros patógenos. Algunos ejemplos de especies comensales que previenen el

crecimiento de patógenos con la producción de moléculas antimicrobianas y contribuyen al bienestar de las comunidades residentes son el *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) y *S. epidermidis*. Ambos juegan un papel en el control del crecimiento de patógenos como *S. pyogenes* o *S. aureus*. Por otro lado están los microorganismos transitorios “turistas”, que no son permanentes, sino que más bien surgen del ambiente y colonizan temporalmente la piel (horas o días), pero que son incapaces de estar mucho tiempo en ella debido a la competición con la flora residente. Bajo condiciones normales (barrera cutánea intacta, respuesta inmune normal...), estos dos grupos no son patógenos¹¹⁹.

Desde el punto de vista anatómico, la composición de la microbiota de la piel es sitio-específica, ya que cada nicho proporciona un ecosistema distinto para que su comunidad microbiana residente se adapte. En la piel humana podemos encontrar tres tipos principales de microambientes¹¹⁸:

- Húmedos (axilas, pliegue inguinal, ombligo, fosa nasal, huecos antecubitales, hueso poplíteo, pliegue glúteo, espacios interdigitales, talón, ombligo).
- Sebáceos (región glabellar, ala nasal, conducto auditivo externo, región occipital, región anterior del tórax, espalda) .
- Secos (antebrazos, nalgas, región hipotenar de la palma de la mano).

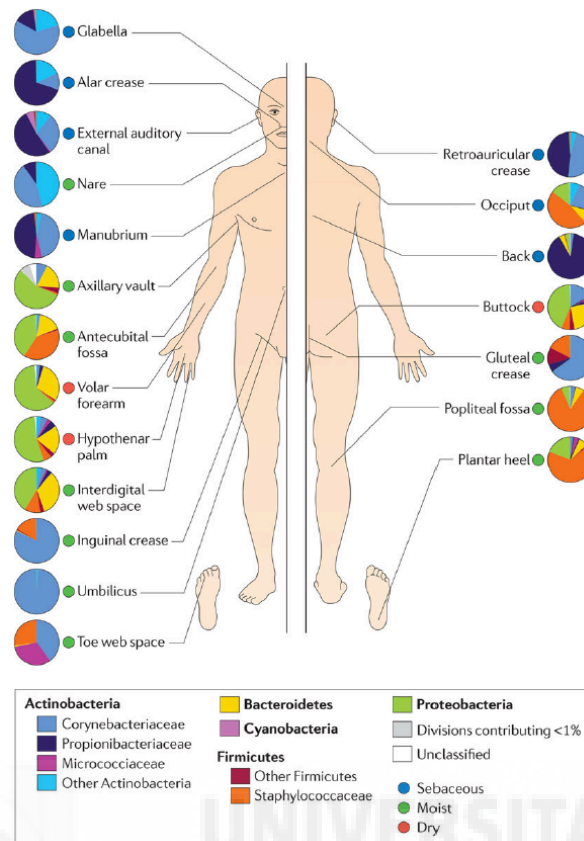


Figura 4: Distribución topográfica de la microbiota en los diferentes nichos de la piel.

Figura extraída del artículo de Grice EA y cols.¹²⁰

Cada comunidad microbiana tiene su hábitat preferido en los diferentes microambientes de la piel; por ejemplo en regiones húmedas encontramos sobretodo especies de *Staphylococcus* y *Corynebacterias*. En las zonas sebáceas hay más bacterias lipofílicas, ya que el sebo es una sustancia que promueve el crecimiento de facultativos anaerobios como *P. acnes*. En los lugares secos predominan varias comunidades bacterianas, entre ellas especies como *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Enhydrobacter* y *Streptococcus*¹¹⁸.

También existen variaciones en la composición de la microbiota de la piel según la edad, siendo diferente en niños y adultos debido sobretodo a las diferencias en su estructura y función. En niños predominan *Firmicutes* (incluidos *Staphylococcus* y *Streptococcus*), *Bacteroidetes*, y *Proteobacteria* (incluidas bacterias gram negativas como *Moraxella*, *Haemophilus* y *Neisseria*). En adultos predominan *Actinobacterias* (*Corynebacteria* y *Propionibacteria*), bacterias más lipofílicas asociadas a que con la edad, aumenta la concentración de sebo y el metabolismo lipídico reduce el pH de la

piel, lo cual inhibe el crecimiento de especies como *Streptococcus* y *Staphylococcus*^{121,122}.

Además de las variaciones anatómicas intrapersonales que encontramos de la microbiota, la diversidad y la abundancia de la flora microbiana también varía en función de otros muchos factores, encontrándose una alta variabilidad y diversidad, y tratándose por tanto de un ecosistema dinámico. La composición de la microbiota de la piel y las narinas va a depender tanto de factores del huésped (genética, sexo, edad, estilo de vida, estado de salud o enfermedad...) como de factores ambientales (dieta, área geográfica donde se vive, clima o estación del año, fármacos, estrés...)¹¹⁹.

I.3.4. Microbiota nasal

Junto con la piel, las fosas nasales han sido uno de los hábitats estudiados. Aunque esta región es tradicionalmente reconocida por sus funciones olfatorias, también es un componente fundamental del sistema inmune y respiratorio. Las fosas nasales pueden albergar especies potencialmente patógenas como el *S. aureus*, el cual está presente en un 20-30% de la población como portadores. Para establecerse en este reservorio, el *S. aureus* tiene que convivir y competir con muchos otros microorganismos, según se ha observado en recientes publicaciones¹²³⁻¹²⁷.

En un estudio realizado en la Universidad de Stanford Yan y cols.¹²³ comparan muestras de tres microambientes dentro de las fosas nasales en 12 personas: las narinas anteriores (con epitelio escamoso), la mucosa del meato medio (MM) y la mucosa del receso esfeno-etmoidal (RS), (con epitelios ciliados pseudoestratificados). En él encuentran que 96,2% de las secuencias fueron filiadas en tres *phyla*: *Actinobacteria* (50.7%), *Firmicutes* (24.7%) y *Proteobacteria* (20.7%). A excepción de *Bacteroidetes* (2.5%), el resto de *phyla* fueron representados con menos del 0,1% del total. En las tres localizaciones el *phyla* dominante fue *Actinobacteria*. La composición del MM y SR fue prácticamente idéntica mientras que la composición de las narinas anteriores mostró mayor proporción de *Actinobacteria* y *Firmicutes* y menor proporción de *Proteobacteria* y otros *phyla*. Tanto en portadores persistentes como en portadores no persistentes de *S. aureus*, *Actinobacteria* fue el grupo con mayor representación (57.3% en portadores persistentes y 46.2% portadores no persistentes). La proporción de

Proteobacteria fue mayor en las muestras de los portadores no persistentes que en las de los portadores persistentes (30% frente al 16,1%). *Firmicutes* fue similar en ambos grupos (21.9% en portadores persistentes frente a 19.8% en portadores no persistentes). Dos especies de *Corynebacterium* se asociaron con el estado portador de *S. aureus*. Se encontró una mayor proporción relativa de *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* (*C. Pseudodiphtheriticum*) en pacientes con escasez o ausencia de *S.aureus*, mientras que se encontró una mayor proporción relativa de *Corynebacterium accolens* (*C. accolens*) en pacientes con una porcentaje mayor de *S. aureus*, sugiriendo una posible interacción cooperativa entre *S. aureus* y *C. accolens* y una posible interacción competitiva entre *S.aureus* y *C. Pseudodiphtheriticum*¹²³.

En otro estudio realizado en la universidad de Michigan por Bassis y cols.¹²⁴, comparan microbiota de la cavidad nasal a nivel de la fosa posterior (donde el epitelio cambia respecto al de las narinas transformándose en un epitelio ciliado pseudoestratificado) como el de la cavidad oral. Los *phyla* predominantes fueron *Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Proteobacteria*. Dentro de las *Actinobacterias* las *corynebacterias* y *propionibacterias* fueron los más abundantes; en la cavidad oral se encontró menor proporción de *Actinobacterias* a expensas de las familias *Micrococcaceae* y *Actinomycetaceae*. Respecto al *phyla Firmicutes*, se encontraron diferencias entre las dos localizaciones, con mayor proporción de *Staphylococcus* en la cavidad nasal que en la cavidad oral. En la cavidad oral el *Streptococo* fue la especie predominante en la familia *Firmicutes*¹²⁴.

También existen publicaciones que comparan la microbiota nasal en pacientes hospitalizados con controles sanos. En uno realizado en la Universidad de Colorado¹²² encuentran que los pacientes sanos presentan colonización principalmente del *phyla Actinobacteria* (*Propionibacterium spp* y *Corynebacterium spp*), con menor proporción de otros *phyla*, incluyendo *Firmicutes* (*Staphylococcus spp*) y *Proteobacteria* (*Enterobacter spp*). En los pacientes donde en la microbiota nasal predominaban los *Firmicutes* (*S. aureus* o *S. epidermidis*), disminuía el grupo de *Actinobacteria* (sobre todo *P. acnes*). En los pacientes donde la colonización por *S. aureus* fue negativa, se correlacionó con colonización por muchos grupos microbianos incluido *S. epidermidis*¹²⁵.

A nivel nasal también existen cambios en la composición de la microbiota en función de la edad. En este sentido, un estudio realizado en Suiza por *Mika M et al.*¹²⁶ donde estudian la microbiota nasal en niños durante el primer año de vida, observan que con la edad aumenta la densidad y disminuye la diversidad, sobretodo en el último mes del primer año. Además nombran a la estación del año junto con la edad, como los principales factores implicados en los cambios dinámicos de la microbiota nasal¹²⁶. En otro estudio realizado en Canadá¹²⁷, encuentran que en la microbiota nasal de los niños predominan *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, y *Dolosigranulum*, mientras que en adultos, predominan *Propionibacterium* y *Corynebacterium*.

I.3.5. Microbiota y enfermedades dermatológicas

En dermatología también se ha visto implicada la microbiota en la patogenia de varias enfermedades inflamatorias de la piel¹²⁸⁻¹³⁰. La barrera cutánea y la microbiota actúan protegiendo al cuerpo de agresiones externas. Normalmente existe un equilibrio entre el huésped y las poblaciones bacterianas residentes y transitorias. Sin embargo, este balance puede verse afectado por factores intrínsecos (huésped) y extrínsecos (ambientales) que alteran la composición de la microbiota cutánea y la función barrera de la piel. Esta disbiosis puede cambiar la abundancia y diversidad de las especies comensales de la piel y empeorar enfermedades cutáneas crónicas como la DA¹²⁸, la psoriasis^{129,130}, el vitíligo¹³¹ o el acné¹³². De hecho, al igual que la microbiota tiene unos microambientes diferentes según las diferentes localizaciones topográficas del cuerpo humano; también estos trastornos dermatológicos se presentan en lugares estereotipados como son las rodillas y los codos en la psoriasis o los huecos antecubitales y poplíteos en la DA.

En un estudio donde comparan la microbiota de las lesiones de psoriasis con las de DA encuentran que en las lesiones de los pacientes con psoriasis hay mayor proporción de *Proteobacteria* y menor proporción de *Firmicutes*. En los pacientes con DA se observa más proporción de *S.aureus* que en los pacientes con psoriasis. Por otra parte, encuentran que la composición de la microbiota en las muestras de piel no lesional de pacientes con psoriasis y con DA es muy similar a la composición bacteriana de las muestras de piel de los controles sanos¹³⁰.

I.3.6. Microbiota nasal y cutánea en la Dermatitis atópica

En diferentes estudios se ha encontrado que los pacientes con DA presentan mayor colonización nasal y cutánea por *S. aureus* que los controles sanos. También se han implicado otros microorganismos en la exacerbación de la DA como la *Malassezia*. Sin embargo todavía no está claro el papel exacto que juega la microbiota nasal y cutánea en esta patología y si los cambios observados son causa o consecuencia de las alteraciones en la barrera cutánea^{133,134}.

Por una parte, parece que los cambios madurativos en la microbiota de las narinas pueden ser relevantes en el curso de la DA, trastorno donde la incidencia y severidad de la enfermedad es diferente conforme los individuos maduran fisiológicamente, mejorando normalmente tras la pubertad y en la edad adulta. En este sentido, tras la adolescencia los *Staphylococcus* y *Streptococcus* de las narinas tienden a ser sustituidos por bacterias lipofílicas, lo cual podría explicar la disminución de incidencia de DA y colonización nasal por *S. aureus* con la edad.

Por otra parte, se ha visto que la microbiota de la piel puede cambiar durante los brotes de DA, dependiendo de la presencia o ausencia de tratamientos recientes, así como de la respuesta inflamatoria del huésped, entre otros. En un artículo publicado en 2012 por Kong y col.¹³³ encuentran que existe asociación entre los brotes de la DA y la disminución de la diversidad de la microbiota de la piel. De hecho, se ha observado que la proporción de *Staphylococcus* aumenta y que la diversidad de la microbiota disminuye previamente al empeoramiento de la severidad de la DA. Por el contrario, el tratamiento activo con antiinflamatorios conduce a controlar la enfermedad, lo que conlleva a la restauración de la diversidad de la microbiota (especialmente poblaciones de *Streptococcus*, *Propionebacterias* y *Corynebacterias*), y a disminuir los niveles de *Staphylococcus*, en el estado de “post-brote” tras la terapia^{135, 136}. Incluso también se ha visto que los tratamientos con emolientes pueden reducir la proporción de *S. aureus* y aumentar la diversidad de la microbiota¹³⁷.

Además, para sustentar la posible implicación de la disbiosis en la fisiopatología del eccema atópico, se ha relacionado este desequilibrio del microbioma en otras patologías inflamatorias que también cursan con eccema. La enfermedad de Netherton o

el síndrome hiperIgE, producido por mutaciones en SPINK5 y STAT3 respectivamente, son enfermedades que pueden manifestarse clínicamente de forma idéntica a la DA¹³⁸⁻¹⁴⁰. El *S.aureus* es un patógeno que con frecuencia se ha aislado en la piel de ambas enfermedades, y se ha visto que existe una alteración del microbioma en la piel inflamada de estos pacientes¹⁴¹.

Así mismo, también se ha aislado *S.aureus*, en el *rash* eccematoso con pústulas que presentan pacientes oncológicos tratados con EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico)¹⁴²⁻¹⁴⁵. En otro trastorno genético descubierto recientemente, el déficit de ADAM 17 (*A disintegrin and metalloproteinase domain 17*), se ha observado que cursa con dermatitis eccematosa y lesiones pustulosas, así como con tendencia a infecciones por *S.aureus*. ADAM 17 es una proteína transmembrana que juega un papel importante en vías de señalización del TNFalfa y del EGFR. En el estudio se ve como los ratones con déficit de ADAM 17 presentan una disbiosis de la microbiota y que además en los ratones tratados con antibióticos aumenta la diversidad de la microbiota y se reduce la proporción de *S.aureus*, indicando que el tratamiento de la disbiosis puede tener efectos terapéuticos¹⁴⁶.

I.3.7. Microbiota como diana terapéutica en la Dermatitis atópica

Ya se ha comentado previamente que parece existir relación entre la gravedad clínica del eccema atópico y la colonización por *S.aureus*, por lo que diferentes autores han intentado erradicarlo como estrategia terapéutica en esta enfermedad. Sin embargo, la sobreutilización de antibióticos ha dado lugar a la aparición de resistencias, y también puede producir desequilibrios en la microbiota, por esa razón deben evitarse cuando no son necesarios. De hecho, en una revisión acerca del manejo de *S.aureus*, los autores no encuentran suficiente soporte bibliográfico para respaldar un beneficio clínico en el uso de agentes antiestafilocócicos si no existen signos de sobreinfección¹¹⁰.

Con el mayor conocimiento del microbioma nasal y cutáneo, probablemente sea más acertado pensar que solo determinados pacientes pueden beneficiarse de un tratamiento individualizado. En este sentido, sería interesante estudiar la microbiota pretratamiento y postratamiento antibiótico. Por tanto, elucidar toda la base del

microbioma cutáneo y nasal puede suponer en el futuro un importante cambio terapéutico en las enfermedades de la piel, entre ellas la DA.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, recientemente se ha creado una nueva generación de emolientes útiles en el manejo de enfermedades dermatológicas como el eccema atópico, para restaurar la barrera cutánea y mantener un equilibrio en la microbiota de la piel, ayudando a controlar así la respuesta inmune¹⁴⁷. Por ejemplo, se han utilizado extractos de bacterias como *Vitreoscilla filiformis* o *Aquaphilus dolomiae*, actuando como probióticos tópicos en cremas. *Vitreoscilla filiformis* es una bacteria no patógena que puede activar a los Receptores Toll-like 2 y ejercer un impacto en la expresión de la superóxido dismutasa 2 o los péptidos antimicrobianos (beta defensina 2 y proteína S100A7), por tanto puede estimular a componentes importantes del sistema inmune de la piel¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. *Aquaphilus dolomiae* ejerce un papel inmunosupresor induciendo la secreción de citocinas antiinflamatorias como IL-10, y reduciendo la activación de los linfocitos T CD4+ inducidos por el *S. aureus*¹⁵¹.

Sin embargo, todavía queda mucho campo por descubrir sobre nuestros huéspedes microbianos en esta nueva y fascinante era dermatológica. Hacen falta más estudios para conocer bien las interacciones entre el huésped y el microbioma que dan lugar a un desequilibrio en el ecosistema de nuestra piel. Las terapias para mantener una microbiota sana de la piel deben ir dirigidas no solo a inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, sino también al crecimiento de bacterias comensales. En un futuro no lejano, podría adaptarse el modelo intestinal al cutáneo, y por ejemplo dar combinaciones de antibióticos para erradicar la colonización de *S.aureus*, como ocurre con el *Helicobacter pylori*.

I.4. Situación actual del tema

La microbiología y la dermatología son especialidades íntimamente relacionadas. Ambos campos han demostrado que en la superficie cutánea habitan microorganismos que pueden estar directamente relacionados con el estado de salud y enfermedad, y ha sido motivo de recientes publicaciones.

Muchas veces nos preguntamos si el *S.aureus* es una alteración primaria en la patogenia de la producción del eccema atópico o es consecuencia de la inflamación, pero sea como fuere, parece que lo que está claro es su participación de alguna manera en la DA. En este sentido, en la literatura existen varios estudios epidemiológicos que han sido útiles para reflejar la colonización nasal por *S.aureus* en la DA y para estudiar como esta puede influenciar en la patogenia o la gravedad de la enfermedad.

Además, en los últimos años estamos asistiendo a un aumento en la incidencia de la DA, convirtiéndose en un problema de salud pública en los países desarrollados, con una prevalencia entre el 20 y 30%, considerándose la enfermedad crónica más prevalente de la infancia. También están cambiando los patrones de resistencia antimicrobiana, lo cual ha renovado su interés por el uso de nuevos antibióticos. Por todo ello, es importante constatar la colonización nasal por *S.aureus* en estos pacientes, así como su perfil de sensibilidad, ya que podría tener implicaciones terapéuticas importantes.

Por otra parte, además de estos estudios que tienen como objetivo la colonización por este microorganismo, encontramos otros trabajos centrados más específicamente en el resto de flora microbiana (tanto patógenos como comensales) que habita también a nivel cutáneo y nasal de estos pacientes y que puede tener un papel significativo en la salud. Esto ha sido posible gracias al desarrollo de técnicas de biología molecular en los últimos años que han permitido la identificación de microorganismos no cultivables con las técnicas microbiológicas habituales.

Cuando analizamos la prevalencia de colonización por *S.aureus* en niños con DA en los diferentes estudios, nos encontramos con patrones variables de colonización, existiendo datos discordantes en la literatura. De hecho, en función de los diferentes

grupos de población y los distintos países, encontramos cifras de colonización nasal que van desde un 90% hasta un 23%⁷⁸.

Respecto a la situación de la microbiota, todavía hay pocos estudios que permitan establecer las interacciones entre el huésped y el microbioma que dan lugar a un desequilibrio en el ecosistema en la DA. Las terapias que modulen esta disbiosis pueden ser útiles en el manejo de estos pacientes, pero todavía queda camino por recorrer. Por tanto, la realización de nuevos estudios como el presente, donde podamos conocer mejor la microbiota de la piel y las narinas podría contribuir a un mejor conocimiento en la patogenia, diagnóstico, prevención y tratamiento de la DA.



II. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

¿Es el *S. aureus* causa o consecuencia de la DA?. Existen muchos estudios que han intentado dar respuesta a esta pregunta, pero es difícil elucidar la relación de este microorganismo con la enfermedad. Además parece no ser el único implicado en su patogenia. De hecho, hasta hace unos años no conocíamos la importancia que tenían los millones de microorganismos que residían en nuestro cuerpo, pero... ¿Cómo puede el *S. aureus* y la diversidad microbiana contribuir al estado de salud y enfermedad?, ¿Cómo pueden las prácticas dermatológicas alterar la diversidad microbiana?. Todavía hacen falta más estudios y mayor progreso en este ámbito para poder establecer bien las relaciones entre la microbiota y el cuerpo humano, así como las variaciones de estas relaciones en caso de enfermedad, ya que todo ello podría tener una aplicabilidad clínica en beneficio de los pacientes con DA. De hecho se piensa que en la medicina personalizada del futuro la microbiota representará un componente clave.

El papel del *S. aureus* nasal en los pacientes con DA, es un punto clave a la vez que controvertido. La escasez de estudios epidemiológicos sobre la colonización nasal por *S. aureus* nasal en niños con DA, hacen particularmente interesante el abordaje de su estudio, motivo por cual hemos considerado de interés plantear su determinación en niños con DA y niños sanos del área de salud Alicante-Hospital General Universitario, dónde en nuestro conocimiento no existen datos al respecto, y que son el motivo de la presente tesis doctoral. Aunque existen algunos estudios en otras poblaciones de niños con DA, la imposibilidad de extrapolar los resultados en las distintas regiones, hace interesante nuestra aportación. Adicionalmente, nos ha parecido de interés realizar un estudio piloto comparativo de la microbiota nasal en 8 niños con DA y 10 niños sanos, ya que en nuestro conocimiento en nuestro país no existen datos al respecto, lo que puede suponer una aportación pionera en este campo.

Nuestro propósito ha sido conocer mejor el perfil de colonización nasal de la población pediátrica de nuestro ámbito, documentar la mayor prevalencia de colonización por *S. aureus* en niños con DA e intentar buscar factores que puedan estar influyendo en la misma. Consideramos que este trabajo puede ayudar a los dermatólogos y pediatras a enfrentarse al difícil manejo diagnóstico y terapéutico que plantean los niños con DA.



III. HIPÓTESIS

- Puesto que en la DA existe una alteración de la barrera cutánea y del sistema inmune, la colonización nasal por *S. aureus* de estos pacientes es mayor comparada con la de los niños sanos.
- La asociación entre la DA y la colonización nasal por *S. aureus* es independiente de otras variables que también se asocian a la enfermedad o a la colonización propiamente dicha.
- Los resultados del estudio microbiológico nasal en pacientes con DA pueden condicionar la elección del tratamiento.
- Debido a que el *S. aureus* compite en su reservorio con otros microorganismos alterando el microbioma, en la DA encontramos una disbiosis de la microbiota nasal, con mayor proporción de *Staphylococcus* y menor representación de otros gérmenes comensales.



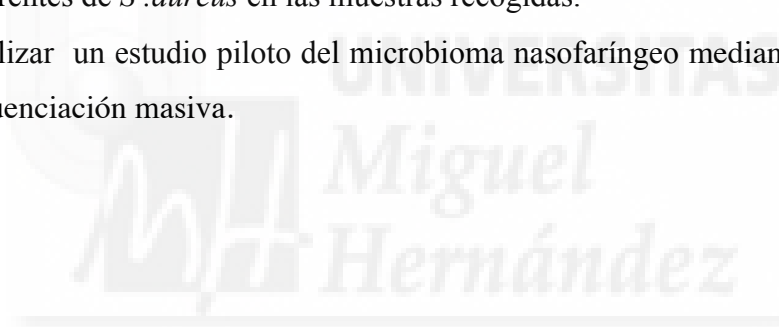
IV. OBJETIVOS

IV.1. Objetivos principales

- Estudiar la prevalencia de colonización nasal por *S. aureus* en pacientes con DA y su asociación con la gravedad.
- Conocer la magnitud de la asociación entre la DA y la colonización nasal por *S. aureus*.

IV.2. Objetivos secundarios

- Caracterizar la sensibilidad antimicrobiana de las cepas aisladas de *S. aureus*.
- Estudiar la frecuencia de otros colonizadores potencialmente patógenos diferentes de *S. aureus* en las muestras recogidas.
- Realizar un estudio piloto del microbioma nasofaríngeo mediante técnicas de secuenciación masiva.





V. MATERIAL Y MÉTODOS

V.1. Ámbito de estudio

El estudio incluyó a niños con edades comprendidas entre 6 meses y 16 años, que acudieron a la consulta de Dermatología Pediátrica del Hospital General Universitario de Alicante (HGUA), del Departamento de Salud 19, en el periodo comprendido entre el 1 de Junio de 2013 y 30 de Mayo de 2016.

V.2. Diseño del estudio

El diseño elegido para la realización de este trabajo fue un estudio analítico observacional de tipo casos (niños con DA) y controles (niños sin DA).

V.3 Población a estudio

V.3.1 Criterios de inclusión

Para los casos incluimos a todos aquellos niños de 6 meses a 16 años de edad diagnosticados de DA en la consulta de Dermatología Pediátrica del HGUA durante el período comprendido entre Junio 2013 y Mayo 2016. El diagnóstico de DA se basó en en los criterios de la conferencia de consenso de la AAD (*Anexo III*)⁴².

Los controles incluidos fueron niños comprendidos en el mismo rango de edad, que acudieron a la consulta de Dermatología Pediátrica del HGUA durante el mismo período de tiempo, que no presentaran DA ni enfermedades infecciosas o dermatológicas que pudieran inducir a confusión diagnóstica como por ejemplo dermatitis de contacto, escabiosis o dermatitis friccional infantil.

V.3.2 Criterios de exclusión

Se excluyeron aquellos pacientes que tenían otra enfermedad sistémica, historia reciente de haber estado en tratamiento con antibióticos o inmunosupresores

el mes anterior al estudio, o que presentasen historia de infecciones como erisipela o celulitis.

V.3.3. Tamaño muestral

Teniendo en cuenta que en la literatura la prevalencia de colonización nasal por *S. aureus* es del 20-30% y que la prevalencia de DA en niños ha aumentado en los países industrializados hasta cifras de casi un tercio de los ellos (1:2)⁷; y partiendo de la asunción de que los niños con DA tienen mayor colonización nasal por *S. aureus* (aproximadamente un 32%) que los niños sanos (aproximadamente de 20%), se estimó con un error alfa del 5% y una potencia del 80%, que el número de sujetos necesarios a incluir en el estudio para encontrar estas diferencias era de 154 casos y 308 controles (total: 452 niños).

Finalmente para el estudio pudimos recoger un tamaño muestral final de 157 casos y 314 controles (proporción 1:2), con un total de 471 niños.

V.3.4. Estrategia de reclutamiento de pacientes

Durante el período comprendido entre Junio 2013-Mayo 2016, se fueron reclutando a los niños que acudían a la consulta de Dermatología Pediátrica del HGUA con DA para los casos y a niños sin DA para los controles, que cumplieran los criterios de inclusión descritos previamente y que aceptasen participar en el estudio.

Los casos se recogieron de forma consecutiva hasta llegar a 157 sujetos, y los controles se recogieron de forma consecutiva hasta llegar a 314 sujetos, con una proporción 1:2, y con un tamaño muestral final de 471 niños.

V.4. Descripción de las variables

V.4.1. Variable de identificación

- **Número de registro:** cada vez que se introdujo un paciente en la base de datos se le asignó un número.

V.4.2. Variables explicativas

V.4.2.1. Variable explicativa principal

- **Tipo:** Esta variable se categorizó en función de si el niño presentaba o no dermatitis atópica (1: Caso-niño con dermatitis atópica; 2: Control- niño sin dermatitis atópica)

V.4.2.2. Variables explicativas secundarias

- **SCORAD:** Se recogió de forma numéricas según los criterios de gravedad que definen esta escala (*Anexo I*).
- **SCORAD 2:** Se categorizó en cuatro grupos (1 pacientes sin dermatitis atópica; 2 SCORAD leve (0-14 puntos); 3 SCORAD moderado (15-40 puntos); 4 SCORAD grave (>40 puntos).
- **Variables demográficas: sexo y edad.**
 - Sexo: se refiere al sexo biológico de los niños y fue categorizada en masculino y femenino.
 - Edad: se recogió de forma numérica en años cumplidos a excepción de los niños de 6 a 12 meses que se consideraron con valor de un año; posteriormente fueron recodificados en 4 grupos de edad: < o = a 2 años/ de 3 a 5 años/ de 6 a 9 años/ = o > a 10 años)
- **Variables antropométricas: talle, peso e IMC.**
 - Talla: número de centímetros que mide el niño de altura.
 - Peso: número de kilogramos que pesa el niño.
 - IMC: se recogió de forma numérica según la formula $\text{peso}/\text{talla}^2$.
 - IMC2: se categorizó en función de IMC ajustado a sexo y edad en 4 valores (1: peso inferior al normal, 2: peso ideal; 3: sobrepeso; 4: obesidad), basado en las tablas de referencia de la Organización Mundial de la Salud (*Anexo IV*).

-
- **Variables asociadas a antecedentes familiares de atopia:** Se categorizaron en presencia o ausencia de antecedentes de atopia en madres, padres o hermanos en si/no.
 - Antecedentes familiares de rinitis (si/no)
 - Antecedentes familiares de asma (si/no)
 - Antecedentes familiares de dermatitis atópica (si/no)

- **Variables asociadas a antecedentes personales de atopia:** Se categorizaron en presencia o ausencia de antecedentes personales de atopia en el paciente a estudio en si/no.
 - Antecedentes personales de rinitis (si/no)
 - Antecedentes personales de asma (si/no)
 - Alergias inhaladas a pólenes (si/no)
 - Alergias inhaladas a ácaros (si/no)
 - Alergias inhaladas a pelos de animales (si/no)
 - Alergias alimentarias a huevo (si/no)
 - Alergias alimentarias a frutos secos (si/no)
 - Alergias alimentarias a melocotón (si/no)
 - Alergias alimentarias a kiwi (si/no)
 - Alergias alimentarias a proteínas de leche de vaca (si/no)
 - Alergias alimentarias a marisco (si/no)
 - Antecedentes personales de celiaquía (si/no)
 - Alteraciones del sueño (si/no)

V.4.3. Variables de resultado

V.4.3.1. Variable de resultado principal

- **Colonización nasal por *S.aureus* :** se categorizó en función de la presencia o ausencia de *S.aureus* en el cultivo nasal (si/no).

V.4.3.2. Variables de resultado secundarias

- **Sensibilidad antibiótica de las cepas de *S.aureus*.** Se categorizó en cuatro categorías (1: sensible; 2: resistente; 3: no recogido; 4: no aplicable por cultivo negativo), para cada uno de los antibióticos estudiados)
 - Meticilina (1: sensible; 2: resistente; 3: no recogido; 4: no aplicable)
 - Amoxicilina/ácido clavulánico (1: sensible; 2: resistente; 3: no recogido; 4: no aplicable)
 - Penicilina (1: sensible; 2: resistente; 3: no recogido; 4: no aplicable)
 - Tetraciclina (1: sensible; 2: resistente; 3: no recogido; 4: no aplicable)
 - Eritromicina (1: sensible; 2: resistente; 3: no recogido; 4: no aplicable)
 - Clindamicina (1: sensible; 2: resistente; 3: no recogido; 4: no aplicable)
 - Gentamicina (1: sensible; 2: resistente; 3: no recogido; 4: no aplicable)
 - Tobramicina (1: sensible; 2: resistente; 3: no recogido; 4: no aplicable)
 - Amikacina (1: sensible; 2: resistente; 3: no recogido; 4: no aplicable)
 - Ciprofloxacino (1: sensible; 2: resistente; 3: no recogido; 4: no aplicable)
 - Levofloxacino (1: sensible; 2: resistente; 3: no recogido; 4: no aplicable)
 - Cotrimoxazol (1: sensible; 2: resistente; 3: no recogido; 4: no aplicable)
 - Rifampicina (1: sensible; 2: resistente; 3: no recogido; 4: no aplicable)
 - Vancomicina (1: sensible; 2: resistente; 3: no recogido; 4: no aplicable)

- **Colonización nasal por otras bacterias gram positivas potencialmente patógenas:** se categorizó en función de la presencia o ausencia de otras bacterias gram positivas en cultivo nasal diferentes a *S.aureus* en (si/no).
 - *Streptococcus Pneumoniae* (si/no).
 - *Streptococcus Pyogenes* (si/no).

- **Colonización nasal por otras bacterias gram negativas potencialmente patógenas:** se categorizó en función de la presencia o ausencia de bacterias gram negativas en cultivo nasal en (si/no).
 - *Moraxella catarrhalis* (si/no).
 - *Haemophilus influenza* (si/no).
 - *Enterobacterias spp* (si/no).

- *Pseudomonas spp* (si/no).
- *Acinetobacter spp* (si/no).

- **Estudio microbioma nasofaríngeo:** se categorizó en función de si se había o no realizado (si/no).

V.5. Recogida de las variables

Tras solicitar el consentimiento informado del padre/madre o representante legal del niño (**Anexo V**), para su inclusión en el estudio, se recogieron las variables durante la consulta de dermatología pediátrica a través de una hoja diseñada para tal efecto (**Anexo VI**).

Para ello, se realizaba una exploración antropométrica y cutánea (peso, talla, SCORAD), así como una historia clínica del paciente que recogiera todas las variables estudiadas (edad, antecedentes personales o familiares de atopia, alergias a alimentos, alteraciones del sueño...). La exploración se realizaba siempre en condiciones similares de luz y temperatura puesto que todos los niños se exploraban en la misma consulta, y el SCORAD era calculado por el mismo médico especialista en dermatología pediátrica (Dra. Betlloch). La anotación de las variables en la hoja diseñada para tal efecto, así como la extracción de las muestras de los frotis nasales era realizada por el médico interno residente de dermatología o pediatría que estuviese rotando en la consulta. Posteriormente las muestras eran enviadas y procesadas en el Laboratorio de Microbiología del HGUA. Los pacientes con cultivo positivo para *S. aureus* fueron citados tras obtener el resultado a fin de pautarles el tratamiento adecuado.

La toma de muestras del vestíbulo de ambas fosas nasales para cultivo se realizó mediante un hisopo estéril. Las muestras se sembraron en una placa de agar sangre, agar chocolate, agar MacConkey y un medio selectivo para *S. aureus* resistente a meticilina (SARM). Tras incubación durante 48 h en una estufa de CO₂ al 5% a 37 °C, se consideraron cultivos positivos aquellos en los que detectó la presencia de:

- *Staphylococcus aureus* sensibles o resistentes a meticilina
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Moraxella catarrhalis*
- *Haemophilus influenzae*
- *Acinetobacter baumannii* u otras especies del género
- Enterobacterias en número abundante
- *Pseudomonas aeruginosa* u otras especies del género

La identificación de cada aislamiento se llevó a cabo por las características de la colonia bacteriana, la tinción de Gram y la espectrometría de masas (MALDI TOF) mediante el sistema comercializado por Bruker (Alemania). En todos los aislamientos de *S. aureus* se realizaron ensayos de sensibilidad mediante el método de microdilución automatizada en caldo mediante el sistema comercial Walk Away (Siemens, Alemania).

Además a 12 casos y 12 controles se les ofreció la oportunidad de participar en un segundo estudio del microbioma nasofaríngeo. Finalmente fueron 8 casos y 10 controles debido a que en 4 casos y en 2 controles la muestra recogida fue insuficiente para su procesado y análisis. Para este estudio, se tomaron muestras de aspirado nasofaríngeo mediante el método de asistido por vacío y posteriormente se analizaron con la técnica de secuenciación masiva para detectar la presencia del gen ribosomal 16 S. Para ello, se realizó la extracción y purificación del ADN bacteriano mediante el sistema comercializado por Molzym: MolYsisTM. Posteriormente para enriquecer la cantidad de DNA bacteriano existente en cada muestra se realizó la amplificación por desplazamiento, técnica que permite la amplificación eficiente y representativa de genomas. Una vez preparado el material en el laboratorio de Microbiología del HGUA, las muestras se enviaron a secuenciar por el sistema Illumina MiSeq con 250 bp pair-ends en el Centro Superior de Investigación en Salud Pública (CSISP; Valencia). Una vez recibidas las secuencias, se analizaron usando los programas ssu-align y meta-rna. Finalmente las secuencias se compararon mediante BLAST con las bases de datos GreenGenes¹⁵² y RDP¹⁵³. La comparación de las muestras entre sí, se realizó mediante el programa Unifrac, especialmente desarrollado por el Consorcio

del Microbioma Humano para análisis de genes ribosomales de microorganismos procedentes de tejidos humanos. Mediante el programa Qiime v 1.8.0. se determinó la abundancia absoluta y relativa de especies, la dominancia y la composición de las comunidades bacterianas de las muestras obtenidas, así como el estudio de biodiversidad y el análisis de componentes principales.

Para la realización de este otro estudio se requirió el consentimiento informado del padre/madre o representante legal del niño (**Anexo VII**), mediante el cual se autorizó que las muestras recogidas, así como los datos facilitados pudiesen ser incorporados de forma anónima al estudio de investigación.

Los datos fueron almacenados en una base de datos (programa SPSS versión 22) con la codificación de las diferentes variables e introducidos con procedimientos de anonimización. El estudio ha sido aprobado por el Comité de Ético del HGUA. Además este proyecto ha contado con una financiación concedida en la I Convocatoria de Ayudas a Proyectos de Investigación FISABIO-Alicante, que ha sido destinada al estudio del microbioma nasofaríngeo mediante secuenciación masiva, ya que esta técnica no forma parte de la práctica clínica habitual.

V.6. Análisis de los datos

V.6.1. Estudio de los objetivos principales

Para el estudio del primer objetivo principal se calculó la prevalencia de colonización nasal en los casos (niños con DA) con su Intervalo de confianza (IC) al 95% (**gráfico 1**). A continuación se calculó la prevalencia de colonización nasal en los casos según las alteraciones del sueño debidas al prurito y según la gravedad de la DA mediante el SCORAD, con su IC al 95% (**gráficos 2-5**).

Para el estudio del segundo objetivo principal se comparó la prevalencia de la colonización nasal en casos y en controles (**tabla 2**). Además se midió la frecuencia de exposición en casos y en controles de diferentes variables clínicas y epidemiológicas (edad, sexo, IMC, antecedentes familiares de atópica, antecedentes personales de atopia, alergias inhaladas y alimentarias, así como enfermedad celiaca).

Se analizó si existían diferencias significativas (p) entre los dos grupos mediante la prueba de Ji cuadrado (χ^2) o test exacto de Fisher, dependiendo de sus condiciones de aplicación. Se calculó la magnitud de la asociación mediante la Odds Ratio (OR) con su IC al 95% para cada una de las variables (**tablas 3-7**).

Tras este estudio de comparación caso control, se hizo un estudio de homogeneidad comparando las mismas variables clínicas y epidemiológicas en pacientes colonizados y no colonizados (**tabla 8**). Se analizó si existían diferencias significativas (p) entre los dos grupos mediante la prueba de Ji cuadrado (χ^2) o test exacto de Fisher, dependiendo de sus condiciones de aplicación. Se calculó la magnitud de la asociación mediante la Odds Ratio (OR) con su IC al 95% para cada una de las variables.

Más tarde se realizó un estudio multivariante del tipo modelo de regresión logística con las diferentes variables para conocer si la asociación entre la DA y la colonización nasal estaba influenciada por alguna de ellas (**tabla 9**). Se excluyeron el sexo, los antecedentes familiares de rinitis, las alergias alimentarias y la enfermedad celíaca (que no se asociaron significativamente y/o con OR incalculable).

V.6.2. Estudio de los objetivos secundarios

Para el estudio de la sensibilidad antimicrobiana de las cepas aisladas de *S. aureus* se estudió la prevalencia de resistencia para cada uno de los antibióticos recogidos en los casos, en los controles y en el total de pacientes (**tabla 10**). Las variables cualitativas se expresaron como frecuencia absoluta y relativa (en porcentaje) de cada uno de los valores de las distintas variables. Se analizó si existían diferencias significativas entre los dos grupos mediante la χ^2 o test exacto de Fisher, dependiendo de sus condiciones de aplicación. Se ha calculado la OR con su IC al 95% para cada una de las variables.

Para el análisis de la flora nasal potencialmente patógena diferente de *S. aureus* en las muestras recogidas, se determinó la prevalencia de colonización nasal para cada uno de los microorganismos recogidos comparando por una parte casos y

controles (**tabla 11**), y por otra parte, comparando colonizados y no colonizados (**tabla 12**). Las variables cualitativas se expresaron como frecuencia absoluta y relativa (en porcentaje) de cada uno de los valores de las distintas variables. Se analizó si existían diferencias significativas entre los dos grupos mediante la prueba de Ji cuadrado o test exacto de Fisher, dependiendo de sus condiciones de aplicación. Se ha calculado la OR con un IC del 95% para cada una de las variables.

Para el estudio de la microbiota nasofaríngea se realizó un análisis bioinformático de los datos obtenidos por secuenciación masiva para calcular la abundancia relativa de las especies en las muestras recibidas. Por una parte se determinaron los porcentajes de los *phylum* y de los géneros para cada una de las muestras recogidas de forma individual (**gráficos 6-9, tablas 14-17**). Por otra parte, se compararon los géneros de forma agrupada en casos y controles (**tabla 18**) y se realizó un análisis de significación estadística con ANOVA (**tabla 19**). También se compararon los *phylum* de forma agrupada en casos y controles (**gráfico 10 y tabla 20**). Además a través de los índice de Shannon Wiener y Chao 1 se estudió la diversidad de especies en las muestras de cada grupo (**tabla 21**). Por último, también se hizo un análisis de los componentes principales para poder agrupar las muestras que tuviesen un microbioma similar (**gráficos 11-13**).

VI. RESULTADOS

VI.1. Resultados del estudio de los objetivos principales

VI.1.1. Estudio de prevalencia de la colonización nasal por *S. aureus* en casos

De todos los niños con DA recogidos en el estudio (157), 51 presentaron colonización nasal por *S. aureus*, lo que supone un porcentaje de un 32,5% (24,8%-40,1%) (**gráfico 1**).

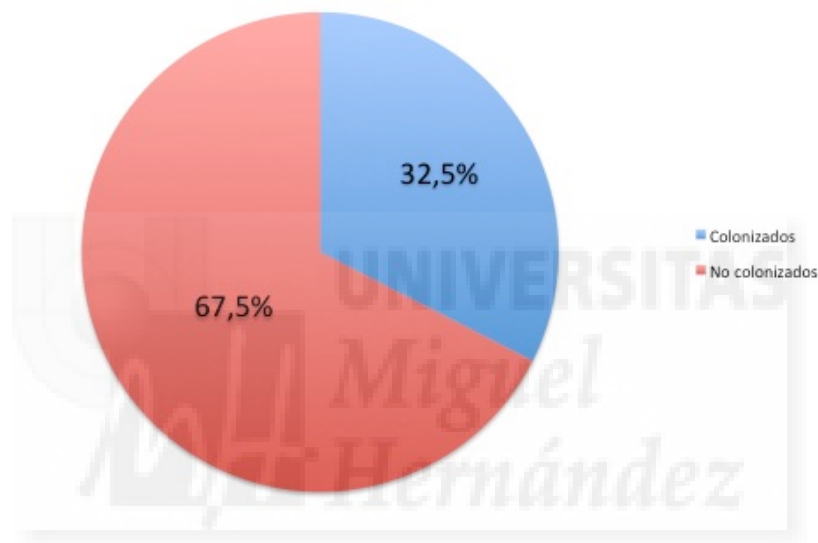


Gráfico 1. Análisis de prevalencia de la colonización nasal por *S. aureus* en los casos

VI.1.2. Alteraciones del sueño asociadas al prurito en los casos .

En el **gráfico 2** se recoge la proporción de casos que presentaba alteraciones del sueño asociadas al prurito 46,5% (73/157) frente a los casos que no presentaban este problema un 53,5% (84/157).

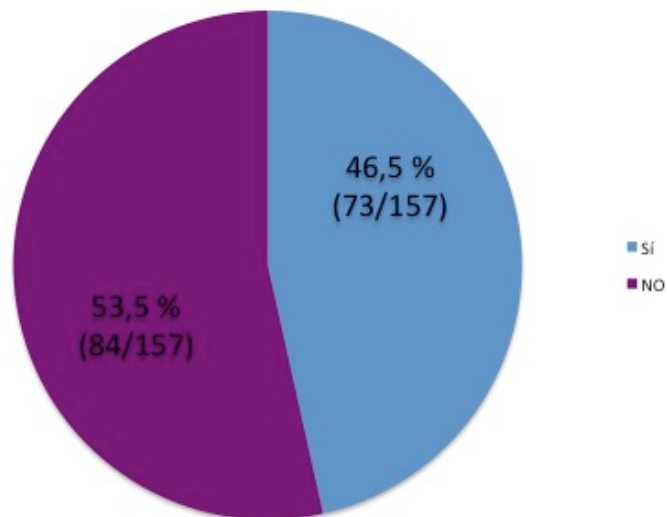


Gráfico 2. Prevalencia de las alteraciones del sueño asociadas al prurito en los casos.

VI.1.3. Gravedad en los casos según el SCORAD.

En la **gráfico 3** se muestra la distribución de casos según la gravedad con un 35,0% (55/157) de casos leves, un 48,4% (76/157) de casos moderados y un 16,6% (26/157) de casos graves.

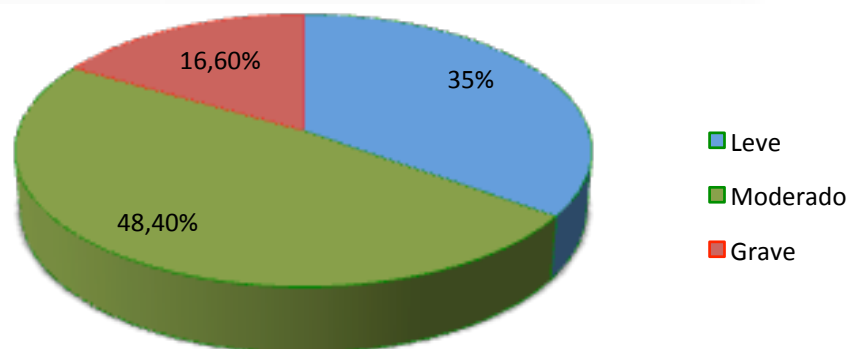


Gráfico 3. Gravedad en los casos según SCORAD

En la **tabla 1** se muestra como se distribuyeron las edades en los tres grupos de gravedad según el SCORAD.

Tabla 1. Distribución de la edad en los casos según el SCORAD

Edad	Leves (n=55)		Moderados (n=76)		Graves (n=26)	
	%	(n)	%	(n)	%	(n)
< = 2 años	30,9	(17)	23,7	(18)	26,9	(7)
3-5 años	27,3	(15)	31,6	(24)	23,1	(6)
6-9 años	21,8	(12)	23,7	(18)	23,1	(6)
= > 10 años	20,0	(11)	21,1	(16)	26,9	(7)

VI.1.4. Colonización nasal por *S. aureus* en los casos clasificados según alteraciones del sueño asociadas al prurito.

En el **gráfico 4** se recoge la proporción de casos colonizados clasificados según las alteraciones del sueño asociadas al prurito con un porcentaje de colonización nasal por *S. aureus* del 38% en los niños sin alteraciones del sueño asociadas al prurito y del 26% en los niños con alteraciones del sueño asociadas al prurito .

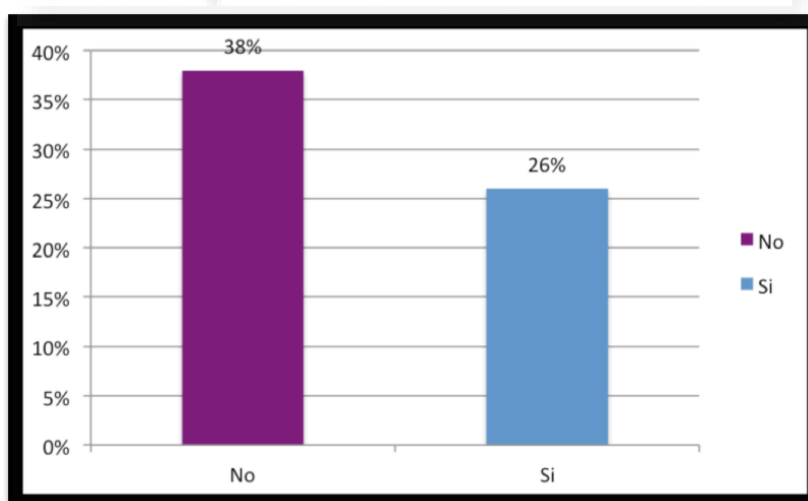


Gráfico 4. Prevalencia de colonización nasal por *S. aureus* en los casos clasificados según alteraciones del sueño asociadas al prurito

VI.1.5. Colonización nasal por *S. aureus* en los casos clasificados según el SCORAD

La proporción de casos colonizados por *S. aureus* según la gravedad del SCORAD fue de un 45,5% (25/55) en los casos leves, de un 22,4% (17/76) en los casos moderados y de un 34,6% (9/26) en los casos graves (**gráfico 5**).

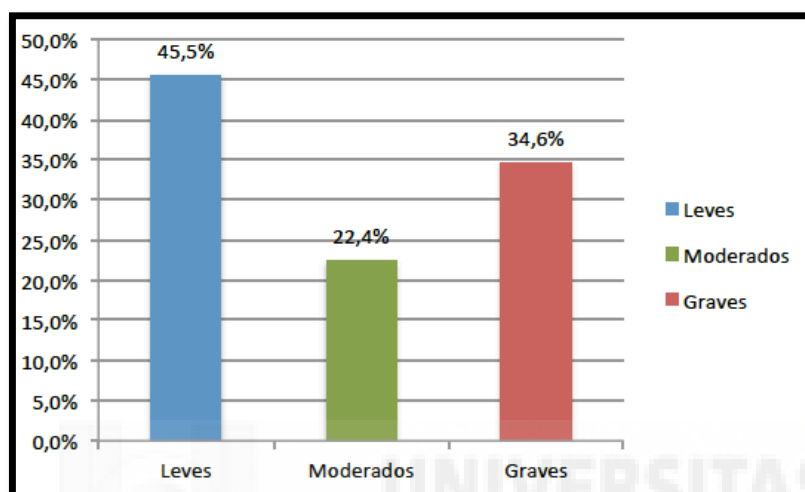


Gráfico 5. Prevalencia de colonización nasal por *S. aureus* en los casos clasificados según el SCORAD

VI.1.6. Características epidemiológicas y sociodemográficas comparando casos y controles.

En la **tabla 2** se compara la colonización nasal por *S. aureus* de los casos con la de los controles. Un 32,5% de los casos estudiados presentaron colonización nasal por *S. aureus* frente a un 23,9% de los controles, con una OR 1,5 (1,0-2,3) y significación estadística (p: 0,047).

Tabla 2. Prevalencia de colonización nasal en casos y en controles

	Caso (n=157)		Control (n=314)		OR (IC95%)	P
	%	(n)	%	(n)		
Col nasal <i>S.aureus</i>	32,5	(51)	23,9	(75)	1,5 (1,0-2,3)	0,047

OR: Odds Ratio ; IC95%: Intervalo de Confianza al 95%; P: nivel de significación estadística; Col nasal *S. aureus*: Colonización nasal por *S. aureus*.

En la **tabla 3** se muestra la distribución de los niños estudiados por sexo y por edad en casos y controles. Dentro de los casos un 54,8% (86) fueron niños y un 45,2% (71) niñas. En los controles el 51,6% (162) fueron niños y el 48,4% (152) niñas, con una OR 1,1 (0,8-1,7) sin significación estadística (P: 0,514). Las edades se agruparon en cuatro grupos y la edad media fue de 6 años (DE 4,05).

Tabla 3. Distribución de los niños estudiados por edad y sexo en casos y en controles.

	Caso (n=157)		Control (n=314)		OR (IC95%)	P
	%	(n)	%	(n)		
Edad						
< = 2 años	26,8	(42)	27,1	(85)	1,1 (0,6-1,9)	0,722
3-5 años	28,7	(45)	19,1	(60)	1,7 (1,0-2,9)	0,070
6-9 años	22,9	(36)	29,6	(93)	0,9 (0,5-1,5)	0,611
=> 10 años	21,7	(34)	24,2	(76)	1	
Sexo (Hombre)	54,8	(86)	51,6	(162)	1,1 (0,8-1,7)	0,514

OR: Odds Ratio ; IC95%: Intervalo de Confianza al 95%; P: nivel de significación estadística.

En la **tabla 4** se muestra la distribución de los niños estudiados por IMC en casos y controles. Dentro de los casos un 33,1% tenía sobrepeso u obesidad mientras que de los controles un 44,3% tenían sobrepeso u obesidad.

Tabla 4. Distribución de los niños estudiados por IMC en casos y en controles.

	Caso (n=157)		Control (n=314)		OR (IC95%)	P
	%	(n)	%	(n)		
IMC						
Inferior	7,6	(12)	5,1	(16)	2,6 (1,1-6,2)	0,035
Ideal	59,2	(93)	50,6	(159)	2,0 (1,2-3,4)	0,010
Sobrepeso	18,5	(29)	19,1	(60)	1,7 (0,9-3,2)	0,122
Obeso	14,6	(23)	25,2	(79)	1	

OR: Odds Ratio ; IC95%: Intervalo de Confianza al 95%; P: nivel de significación estadística; IMC: Índice de masa corporal.

En la **tabla 5** quedan recogidos los antecedentes familiares de atopía en casos y en controles. En los casos, el 16,6% tenía antecedentes familiares de rinitis y en los

controles el 13,7%, con una OR 1,3 (0,7-2,1), sin significación estadística (0,407). El 14% y el 25,5% de los casos tenía antecedentes familiares de asma y DA respectivamente; mientras que de los controles el 4,1% y el 5,1% tenía antecedentes familiares de asma y DA respectivamente, con unas OR de 3,8 (1,8-7,7) y 6,4 (3,4-11,8), con significación estadística ($p < 0,001$).

Tabla 5. Antecedentes familiares de atopia en los niños estudiados comparando casos y controles.

	Caso (n=157)		Control (n=314)		OR (IC95%)	P
	%	(n)	%	(n)		
ATCD fam Rinitis	16,6	(26)	13,7	(43)	1,3 (0,7-2,1)	0,407
ATCD fam Asma	14,0	(22)	4,1	(13)	3,8 (1,8-7,7)	<0,001
ATCD fam DA	25,5	(40)	5,1	(16)	6,4 (3,4-11,8)	<0,001

OR: Odds Ratio ; IC95%: Intervalo de Confianza al 95%; P: nivel de significación estadística; Antecedentes familiares.

En la **tabla 6** se muestran los antecedentes personales de atopia en casos y en controles. Los casos presentaron mayor proporción de antecedentes de rinitis OR 9,0 (4,2-19,4), asma OR 8,8 (3,7-20,7), así como de alergias inhaladas a pólenes OR 10,9 (3,2-34,8), pelo de animales OR 14,1 (3,1-63,2), y ácaros del polvo OR 12,0 (4,0-35,5), todos ellos con significación estadística ($p < 0,001$)

Tabla 6. Antecedentes personales de atopia en los niños estudiados comparando casos y controles.

	Caso (n=157)		Control (n=314)		OR (IC95%)	P
	%	(n)	%	(n)		
ATCD per Rinitis	21,0	(33)	2,9	(9)	9,0 (4,2-19,4)	<0,001
ATCD per Asma	16,7	(26)	2,2	(7)	8,8 (3,7-20,7)	<0,001
AI Pólenes	9,6	(15)	1,0	(3)	10,9 (3,1-38,4)	<0,001
AI Pelo animales	8,3	(13)	0,6	(2)	14,1 (3,1-63,2)	<0,001
AI Ácaros	13,4	(21)	1,3	(4)	12,0 (4,0-35,5)	<0,001

OR: Odds Ratio ; IC95%: Intervalo de Confianza al 95%; P: nivel de significación estadística; ATCD per: Antecedentes personales; AI: Alergias Inhaladas.

Respecto a las alergias alimentarias, en los casos el 12,7% (20) tenía alergia al huevo, el 9,6% (15) tenía alergia a los frutos secos, el 4,5% (7) tenía alergia al melocotón, el 2,5% (4) tenía alergia al kiwi, el 4,5% (7) a las proteínas de leche de vaca, y el 1,9% (3) tenía alergia al marisco. El 2,5% (4) padecían de enfermedad celiaca (**tabla 7**). En los controles el 0,3% (1) tenía alergia al huevo y el 0,3% (1) tenía alergia al marisco. No se encontraron alergias alimentarias a frutos secos, melocotón, kiwi o proteínas de leche de vaca en los controles. El 0,6% (2) padecían de enfermedad celiaca (**tabla 7**).

Tabla 7. Antecedentes de alergias alimentarias en los niños estudiados comparando casos y controles.

	Caso (n=157)		Control (n=314)		OR (IC95%)	P
	%	(n)	%	(n)		
AA Huevo	12,7	(20)	0,3	(1)	45,7 (6,1- 343,9)	<0,001
AA Frutos secos	9,6	(15)	0,0	(0)	Incalculable	<0,001
AA Melocotón	4,5	(7)	0,0	(0)	Incalculable	<0,001
AA Kiwi	2,5	(4)	0,0	(0)	Incalculable	0,012
AA PLV	4,5	(7)	0,0	(0)	Incalculable	<0,001
AA Marisco	1,9	(3)	0,3	(1)	6,1 (0,6-59,1)	0,110
Enfermedad celiaca	2,5	(4)	0,6	(2)	4,1(0,7-22,5)	0,099

OR: Odds Ratio ; IC95%: Intervalo de Confianza al 95%; P: nivel de significación estadística; IMC: Índice de masa corporal; AA: Alergia Alimentaria.

VI.1.7. Características epidemiológicas y sociodemográficas comparando niños colonizados y no colonizados.

Las características epidemiológicas y sociodemográficas de los niños colonizados y no colonizados quedan recogidas en el **tabla 8**. De los 471 niños estudiados, 126 estaban colonizados por *S. aureus* y 345 no estaban colonizados. De los niños colonizados un 50,8% fueron chicos y un 71,5% tenía 6 o más años. En los niños no colonizados un 53,3% fueron chicos y un 55,8% tenía menos de seis años.

Según la talla y el peso, se calculó el IMC y los niños se distribuyeron de la siguiente manera: En los pacientes colonizados el 6,3% (8) eran niños con peso

inferior al ideal. El 50,8% (64) tenían peso ideal, el 27,8% (35) tenían sobrepeso y el 15,1% (19) tenían obesidad. En los pacientes no colonizados el 5,8% (20) eran niños con peso inferior al ideal. El 54,5% (188) tenían peso ideal, el 15,7% (54) tenían sobrepeso y el 24,1% (83) tenían obesidad.

Respecto a los antecedentes familiares de atopia (rinitis, asma, DA) no se encontraron diferencias con significación estadística entre los niños colonizados y no colonizados. En cuanto a los antecedentes personales de atopia se encontraron más antecedentes personales de rinitis, alergias inhaladas a pólenes y a ácaros del polvo, con significación estadística, en los niños colonizados que en los no colonizados.

Las alergias alimentarias se distribuyeron de la siguiente forma: En los pacientes colonizados el 6,3% (8) tenía alergia al huevo, el 4,0% (5) tenía alergia a los frutos secos, el 3,2% (4) tenía alergia al melocotón, y el 2,4% (3) a las proteínas de leche de vaca. El 1,6% (2) padecían de enfermedad celiaca. No se encontraron alergias alimentarias a kiwi ni a marisco en los pacientes colonizados. En los pacientes no colonizados el 3,8% (13) tenía alergia al huevo y el 2,9% (10) tenía alergia a los frutos secos, el 0,9% (3) tenía alergia al melocotón, el 1,2% (4) tenía alergia al kiwi, el 1,2% (4) a las proteínas de leche de vaca, y el 1,2% (4) tenía alergia al marisco. El 1,2% (4) padecían de enfermedad celiaca.

Tabla 8. Comparación de las características clínicas y epidemiológicas en niños colonizados y niños no colonizados

	Colonizados (n=126)		No colonizados(n=345)		OR (IC95%)	P
	%	(n)	%	(n)		
Edad						
< = 2 años	10,3	(13)	33,0	(114)	0,2 (0,1-0,4)	<0,001
3-5 años	18,3	(23)	23,8	(82)	1,5 (0,3-0,9)	0,030
6-9 años	40,5	(51)	22,6	(78)	1,2 (0,7-2,0)	0,517
= > 10 años	31,0	(39)	20,6	(71)	1	
Sexo (Hombre)	50,8	(64)	53,3	(184)	0,9 (0,6-1,4)	0,625
IMC						
Inferior	6,3	(8)	5,8	(20)	1,7 (0,7-4,6)	0,254
Ideal	50,8	(64)	54,5	(188)	1,5 (0,8-2,6)	0,175
Sobrepeso	27,8	(35)	15,7	(54)	2,8 (1,5-5,5)	0,002
Obeso	15,1	(19)	24,1	(83)	1	
ATCD fam Rinitis	16,7	(21)	13,9	(48)	1,2 (0,7-2,1)	0,454
ATCD fam Asma	7,1	(9)	7,5	(26)	0,9 (0,4-2,1)	0,885
ATCD fam DA	13,5	(17)	11,3	(39)	1,2 (0,7-2,3)	0,516
ATCD per Rinitis	15,1	(19)	6,7	(23)	2,5 (1,3-4,7)	0,005
ATCD per Asma	9,5	(12)	6,1	(21)	1,6 (0,8-3,4)	0,199
AI Pólenes	7,1	(9)	2,6	(9)	2,9 (1,1-7,4)	0,030
AI Pelo animales	4,8	(6)	2,6	(9)	1,9 (0,7-5,4)	0,244
AI Ácaros	9,5	(12)	3,8	(13)	2,7 (1,2-6,1)	0,014
AA Huevo	6,3	(8)	3,8	(13)	1,7 (0,7- 4,3)	0,230
AA Frutos secos	4,0	(5)	2,9	(10)	1,4 (0,5-4,1)	0,559
AA Melocotón	3,2	(4)	0,9	(3)	3,7 (0,8-16,9)	0,086
AA Kiwi	0,0	(0)	1,2	(4)	-	0,578
AA PLV	2,4	(3)	1,2	(4)	2,1 (0,5-9,4)	0,391
AA Marisco	0,0	(0)	1,2	(4)	-	0,578
Enfermedad celiaca	1,6	(2)	1,2	(4)	1,4 (0,2-7,6)	0,661

OR: Odds Ratio; IC95%: Intervalo de Confianza al 95%; P: nivel de significación estadística; IMC: Índice de masa corporal; ATCD fam: Antecedentes familiares; ATCD per: Antecedentes personales; AI: Alergias Inhaladas; AA: Alergia Alimentaria

VI.1.8. Análisis Multivariante.

En la **tabla 9** queda recogido el análisis multivariante, donde no se han incluido los antecedentes familiares de rinitis, las alergias alimentarias, la enfermedad celiaca ni el sexo. La colonización nasal por *S. aureus* era de un 32,5% en los casos y de un 23,9% en los controles con una $p=0,047$ y una OR calculada de 1,5 (1,0-2,3); al realizar el análisis multivariante la OR ajustada continúa siendo de 1,5 (0,9-2,6) con una $p=0,110$.

Tabla 9. Análisis multivariante

	ORc (IC95%)	P	ORa (IC95%)	P
Col nasal <i>S.aureus</i>	1,5 (1,0-2,3)	0,047	1,5(0,9-2,6)	0,110
Edad				
<= 2 años	1,1 (0,6-1,9)	0,722	1,5(0,8-3,0)	0,207
3-5 años	1,7 (1,0-2,9)	0,070	2,3(1,1-4,5)	0,018
6-9 años	0,9 (0,5-1,5)	0,611	0,8(0,4-1,6)	0,589
=> 10 años	1			
IMC				
Inferior	2,6 (1,1-6,2)	0,035	2,2(0,8-6,0)	0,107
Ideal	2,0 (1,2-3,4)	0,010	2,2(1,2-4,0)	0,015
Sobrepeso	1,7 (0,9-3,2)	0,122	1,6(0,8-3,5)	0,216
Obeso	1			
ATCD fam Asma	3,8 (1,8-7,7)	<0,001	2,0(0,8-4,8)	0,118
ATCD fam DA	6,4 (3,4-11,8)	<0,001	5,5(2,8-10,8)	<0,001
ATCD per Rinitis	9,0 (4,2-19,4)	<0,001	4,1(1,115,4)	0,040
ATCD per Asma	8,8 (3,7-20,7)	<0,001	4,7(1,7-13,0)	0,003
Al Pólenes	10,9 (3,1-38,4)	<0,001	1,9(0,2-7,1)	0,772
Al Pelo animales	14,1 (3,1-63,2)	<0,001	2,1(0,3-13,8)	0,454
Al Ácaros	12,0 (4,0-35,5)	<0,001	2,2(0,5-10,3)	0,310

ORc: Odds Ratio cruda ; Ora: Odds Ratio ajustada; IC95%: Intervalo de Confianza al 95%; P: nivel de significación estadística; Col nasal *S.aureus*: Colonización nasal por *S.aureus*; IMC: Índice de masa corporal; ATCD fam: Antecedentes familiares; ATCD per: Antecedentes personales; Al: Alergias Inhaladas.

VI.2. Resultados del estudio de los objetivos secundarios

VI.2.1. Perfil de resistencia antibiótica en los pacientes colonizados por *S.aureus*.

En la **tabla 10** queda recogido el perfil de resistencia antibiótica de los pacientes colonizados a *S. aureus*. Respecto a los meticilin resistentes, se encontró un 15,1% de SARM de todos los pacientes colonizados, un 16,3% de SARM en los casos colonizados y un 14,3% de SARM en los controles colonizados OR:1,2 (0,4-3,2); $p=0,760$. Las tasas de resistencia a la amoxicilina-ácido clavulánico fueron de 15,4% en los pacientes colonizados, de un 18,8% en los casos colonizados y de un 13,0% en los controles colonizados OR:1,5 (0,6-4,2); $p=0,400$. Las tasas de resistencia a la tetraciclina fueron de 3,9% en los pacientes colonizados, de un 9,3% en los casos colonizados y de un 0,0% en los controles colonizados (OR incalculable; $p=0,028$).

En cuanto a la mupirocina, se encontraron tasas de resistencia del 15,9% en los pacientes colonizados, 11,9% en los casos colonizados y 18,5 en los controles colonizados OR:0,6 (0,2-1,8); $p=0,365$. Las tasas de resistencia al ácido fusídico fueron de un 7,1% en los pacientes colonizados, tanto en los casos colonizados como en los controles colonizados OR:1,0 (0,8-12,1); $p=1,000$. Las tasas de resistencia a la clindamicina y la eritromicina fueron de 42,7% y 31,1% en los pacientes colonizados, de un 46,5% y un 34,9% en los casos colonizados y de un 40,0% y un 28,3% en los controles colonizados respectivamente OR:1,3 (0,6-2,9) y 1,4 (0,6-3,1); $p=0,510$ y 0,479 respectivamente).

Las tasas de resistencia a la gentamicina, tobramicina y amikacina fueron del 11,7% y 9,8% y 1,8% en los pacientes colonizados, de un 16,3%, 14,0%, y un 4,5% en los casos colonizados y de un 8,3%, 6,8% y un 0,0% en los controles colonizados respectivamente OR 2,1 (0,6-7,3), OR 2,2 (0,6-7,3) y OR incalculable; $p=0,215$, 0,315 y 0,386 respectivamente. Las tasas de resistencia al ciprofloxacino y levofloxacino fueron del 2,0% y 1,9% en los pacientes colonizados, de un 4,8% y un 4,7% en los casos colonizados respectivamente, y no se encontraron cepas resistentes a estos antibióticos en los controles colonizados (OR incalculables; $p=0,167$ y 0,172).

respectivamente). No se encontraron cepas resistentes a cotrimoxazol, rifampicina ni vancomicina en los pacientes colonizados a *S. aureus*, incluyendo casos y controles.

Tabla 10. Tabla de resistencias antibióticas en pacientes colonizados a *S.aureus*.

	TOTAL (n=126) % (n)	Casos (n=51) % (n)	Control (n=75) % (n)	OR (IC95%)	P
Meticilina	15,1 (18/119)	16,3 (8/49)	14,3 (10/70)	1,2 (0,4-3,2)	0,760
Amoxicilina-clavulánico	15,4 (18/117)	18,8 (9/48)	13,0 (9/69)	1,5 (0,6-4,2)	0,400
Tetraciclina	3,9 (4/103)	9,3 (4/43)	0,0 (0/60)	Incalculable	0,028
Mupirocina	15,9 (17/107)	11,9 (5/42)	18,5 (12/65)	0,6 (0,2-1,8)	0,365
Ácido Fusídico	7,1 (3/42)	7,1 (1/14)	7,1 (2/28)	1,0 (0,8-12,1)	1,000
Clindamicina	42,7 (44/103)	46,5 (20/43)	40,0 (24/60)	1,3 (0,6-2,9)	0,510
Eritromicina	31,1 (32/103)	34,9 (15/43)	28,3 (17/60)	1,4 (0,6-3,1)	0,479
Gentamicina	11,7 (12/103)	16,3 (7/43)	8,3 (5/60)	2,1(0,6-7,3)	0,215
Tobramicina	9,8 (10/102)	14,0 (6/43)	6,8 (4/59)	2,2 (0,6-8,4)	0,315
Amikacina	1,8 (1/57)	4,5 (1/22)	0,0 (0/35)	Incalculable	0,386
Ciprofloxacino	2,0 (2/102)	4,8 (2/42)	0,0 (0/60)	Incalculable	0,167
Levofloxacino	1,9 (2/103)	4,7 (2/43)	0,0 (0/60)	Incalculable	0,172
Cotrimoxazol	0,0 (0/103)	0,0 (0/43)	0,0 (0/60)	Incalculable	-
Rifampicina	0,0 (0/53)	0,0 (0/18)	0,0 (0/35)	Incalculable	-
Vancomicina	0,0 (0/103)	0,0 (0/43)	0,0 (0/60)	Incalculable	-

OR: Odds Ratio; IC95%: Intervalo de Confianza al 95%; P: nivel de significación estadística;

*Nota: La n no coincide con el valor total porque en algunos casos no se realizó el estudio de resistencia antibiótica correspondiente.

VI.2.2. Estudio de colonización nasal por otros gérmenes potencialmente patógenos diferentes de *S. aureus* comparando casos y controles.

En la **tabla 11** se describe la prevalencia de pacientes colonizados a otros gérmenes potencialmente patógenos diferentes de *S. aureus* comparando casos y controles. En total, se encontró colonización por otros gérmenes gram positivos en un 3,8% de pacientes (18/471) y por gérmenes gram negativos en un 13,8% (65/471) de pacientes. En los casos, se encontró que un 3,8% (6/157) estaban colonizados por gram positivos (un 3,2% por *S. pneumoniae* y un 0,6% por *S. pyogenes*), y un 19,1% (30/157) por gram negativos (un 1,9% por *M. Catharralis*, un 12,7% *H. Influenza*, un 1,3% por *Acinetobacter spp*, un 1,3% por *Pseudomona spp* y un 1,9% por

Enterobacterias spp). En los controles se observó que un 3,8% (12/314) estaban colonizados por gram positivos (el 3,8% por *Strep.pneumoniae*), y un 11,1% (35/314) por gram negativos (un 2,2% por *M. Catharralis*, un 8,0% *H. Influenza*, un 0,3% por *Pseudomona spp* y un 0,6% por *Enterobacterias spp*).

Tabla 11. Prevalencia de pacientes colonizados por otros gérmenes potencialmente patógenos diferentes de *S.aureus* comparando casos y controles

	TOTAL (n=471)		Casos (n=157)		Control (n=314)		OR (IC95%)	P
	%	(n)	%	(n)	%	(n)		
Gram +	3,8	(18)	3,8	(6)	3,8	(12)	1,0 (0,4 -2,7)	1,000
- <i>Strep.Pneumoniae</i>	3,6	(17)	3,2	(5)	3,8	(12)	0,8 (0,3- 2,4)	0,737
- <i>Strep.Pyogenes</i>	0,2	(1)	0,6	(1)	0,0	(0)	Incalculable	0,333
Gram-	13,8	(65)	19,1	(30)	11,1	(35)	1,7 (1,0-2,9)	0,057
- <i>M.catarrhalis</i>	2,1	(10)	1,9	(3)	2,2	(7)	0,9 (0,3-3,4)	1,000
- <i>H.influenza</i>	9,6	(45)	12,7	(20)	8,0	(25)	1,7 (0,9-3,1)	0,096
- <i>Acinetobacter spp</i>	0,4	(2)	1,3	(2)	0,0	(0)	Incalculable	0,111
- <i>Pseudomona spp</i>	0,6	(3)	1,3	(2)	0,3	(1)	4,0 (0,4-44,9)	0,259
- <i>Enterobacterias spp</i>	1,1	(5)	1,9	(3)	0,6	(2)	3,0 (0,5-18,4)	0,339

OR: Odds Ratio; IC95%: Intervalo de Confianza al 95%; P: nivel de significación estadística;
Strep.Pneumoniae: *Streptococco Pneumoniae*; *Strep.Pyogenes*: *Streptococco Pyogenes*;
M.catarrhalis: *Moraxella catarrhalis*; *H.influenza*: *Haemophilus influenza*

VI.2.3. Estudio de colonización nasal por otros gérmenes potencialmente patógenos diferentes de *S. aureus* comparando pacientes colonizados y no colonizados.

En la **tabla 12** se describe la prevalencia de pacientes colonizados a otros gérmenes potencialmente patógenos diferentes de *S. aureus* en pacientes colonizados y no colonizados. Por un lado, de los pacientes colonizados por *S. aureus* un 1,6% (2/126) estaban colonizados a su vez por otros gram positivos (1,6% de *S. pneumoniae*), mientras que de los pacientes no colonizados por *S. aureus* un 4,6% (16/345) estaban colonizados por otros gram positivos (un 4,3% por *S. pneumoniae* y un 0,3% por *S. pyogenes*). Por otro lado, de los pacientes colonizados por *S. aureus* un 4,8% (6/126) estaban colonizados a su vez por gram negativos (un 1,6% por *M. Catharralis*, un 1,6% *H. Influenza*, un 0,8% por *Acinetobacter spp* y un 0,8% por *Pseudomona spp*), mientras que de los pacientes no colonizados por *S. aureus* un 17,1% (59/345) estaban colonizados por gram negativos (un 2,3% por *M. Catharralis*,

un 12,5% *H. Influenza*, un 0,3% por *Acinetobacter spp*, un 0,9% por *Pseudomona spp* y un 1,2% por *Enterobacterias spp*).

Tabla 12. Prevalencia de pacientes colonizados por otros gérmenes potencialmente patógenos diferentes de *S. aureus* comparando niños colonizados y niños no colonizados

	Colonizados(n=126)		No colonizados (n=345)		OR (IC95%)	P
	%	(n)	%	(n)		
Gram +	1,6	(2)	4,6	(16)	0,3 (0,1 -1,4)	0,175
- <i>Strep.Pneumoniae</i>	1,6	(2)	4,3	(15)	0,4 (0,1- 1,6)	0,262
- <i>Strep.Pyogenes</i>	0,0	(0)	0,3	(1)	Incalculable	1,000
Gram-	4,8	(6)	17,1	(59)	0,2 (0,1-0,5)	<0,001
- <i>M.catarrhalis</i>	1,6	(2)	2,3	(8)	0,7 (0,1-3,2)	1,000
- <i>H.influenza</i>	1,6	(2)	12,5	(43)	0,1 (0,0-0,5)	<0,001
- <i>Acinetobacter spp</i>	0,8	(1)	0,3	(1)	2,8 (0,2-44,3)	0,464
- <i>Pseudomona spp</i>	0,0	(0)	0,9	(3)	Incalculable	0,568
- <i>Enterobacterias spp</i>	0,8	(1)	1,2	(4)	0,7 (0,1-16,2)	1,000

OR: Odds Ratio; IC95%: Intervalo de Confianza al 95%; P: nivel de significación estadística;
Strep.Pneumoniae: *Streptococco Pneumoniae*; *Strep.Pyogenes*: *Streptococco Pyogenes*;
M.catarrhalis: *Moraxella catarrhalis*; *H.influenza*: *Haemophilus influenza*

VI.2.4. Resultados del estudio de la microbiota nasofaríngea

Los datos del estudio de la microbiota nasofaríngea que vamos a exponer a continuación corresponde a 8 casos y 10 controles de los niños estudiados debido a que en 4 casos y en 2 controles la muestra recogida fue insuficiente para su procesado y análisis. Se trata de los casos 6, 8, 9, 12, 16, 17, 19, 21 y de los controles 5, 7, 10, 13, 14, 15, 18, 20, 22 y 23 (**tabla 13**).

Tabla 13: Variables de los pacientes a los que se les ha realizado estudio del microbioma

PACIENTE	SEXO	EDAD	IMC	FAMIRIN	FAMAS	FAMDA	PERRI	PERAS	PERPO	PERANI	PERAC	HUEV	FSEC	MEL	KIWI	PLV	MARI	CEL	SUEÑO	SCORAD	SCORAD 2			
CONTROL 5	M	6	PESO IDEAL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	1		
CASO 6	M	3	PESO IDEAL	2	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2	2	1	33	3	
CONTROL 7	M	1	OBESIDAD	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	1	
CASO 8	F	6	PESO IDEAL	1	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	36	3
CASO 9	M	12	PESO IDEAL	1	2	2	1	1	1	2	1	2	1	1	2	2	2	2	2	2	1	1	60	4
CONTROL 10	F	8	SOBREPESO	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	1	
CASO 12	M	3	PESO IDEAL	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	42	4	
CONTROL 13	F	5	PESO IDEAL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	1	
CONTROL 14	F	15	PESO IDEAL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	1	
CONTROL 15	F	11	SOBREPESO	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	1	
CASO 16	F	12	OBESIDAD	2	2	2	1	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	36	3	
CASO 17	M	3	PESO IDEAL	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	27	3	
CONTROL 18	M	11	OBESIDAD	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	1	
CASO 19	M	4	SOBREPESO	2	2	1	1	1	1	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	42	4	
CONTROL 20	F	8	PESO IDEAL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	1	
CASO 21	M	8	PESO IDEAL	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	5	2	
CONTROL 22	F	11	PESO IDEAL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	1	
CONTROL 23	F	9	SOBREPESO	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	1	

1: sí; 2: No; IMC: Índice de Masa Corporal; FAMIRIN=Antecedentes familiares de rinitis, FAMAS=Antecedentes familiares de ASMA; FAMDA=Antecedentes familiares de dermatitis atópica; PERRI=Antecedentes personales de rinitis; PERAS=Antecedentes personales de asma; PERPO= Antecedentes personales de Alergias inhaladas a pólenes; PERANI= Antecedentes personales de Alergias inhaladas a epitelio de animales; PERAC= Antecedentes personales de Alergias inhalada ácaros del polvo; HUEV: = Alergia al huevo; FSEC= Alergia a frutos secos; MEL= Alergia a melocotón; KIWI= Alergia al kiwi; PLV= Alergia a proteínas de leche de vaca; MARI= Alergia al marisco; CEL= Antecedentes de enfermedad celiaca; SUEÑO= alteraciones del sueño; SCORAD: escala de gravedad según puntuación; SCORAD 2=1:no, 2: leve, 3: moderada, 4:grave.

En el **gráfico 6** y la **tabla 14** queda recogida la abundancia relativa de los géneros en los casos de forma individualizada. Respecto al género *Staphylococcus* estuvo presente en la mitad de los casos (4/8), en uno de ellos de forma predominante (caso 21), con un abundancia relativa del 41,7%.

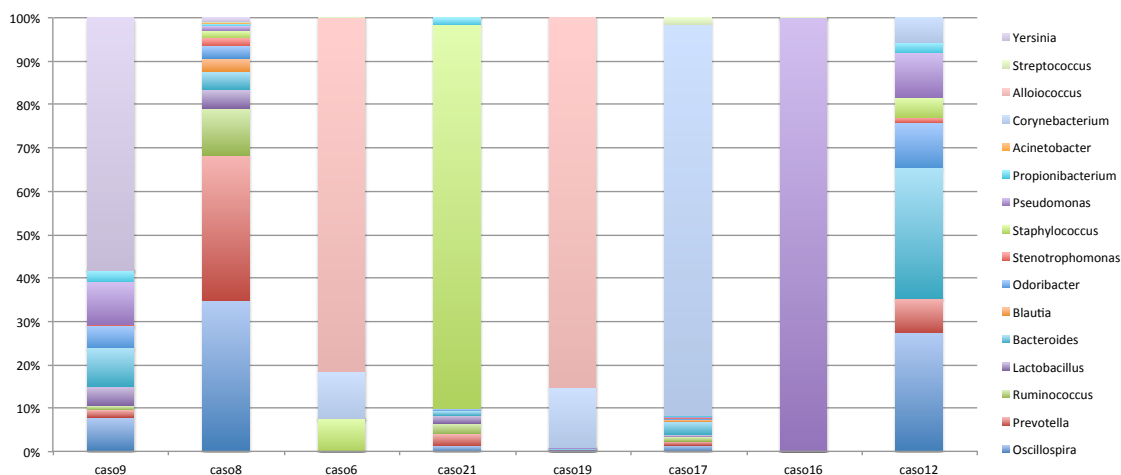


Gráfico 6: Histograma donde se representa gráficamente la abundancia relativa de los diferentes géneros en cada caso estudiado.

Tabla 14: Tabla con los valores expresados en tanto por uno de la abundancia relativa de los diferentes géneros en cada caso estudiado

Taxon	caso9	caso8	caso6	caso21	caso19	caso17	caso16	caso12
Oscillospira	0,039303091	0,04613632	0	0,006474025	5,46E-05	0,009440104	8,76E-05	0,042366479
Prevotella	0,00842001	0,044554142	2,16E-05	0,012474341	0,000218221	0,005859375	0	0,012436799
Ruminococcus	0,004574192	0,014302892	0	0,011526922	0	0,006510417	0	0
Lactobacillus	0,022171722	0,005759129	0	0,008526765	5,46E-05	0,002848307	0	0
Bacteroides	0,043993823	0,005505981	0	0,005210801	0,000272777	0,020263672	4,38E-05	0,046608938
Blautia	0	0,004240238	0	0	0	0,003011068	4,38E-05	0
Odoribacter	0,025813594	0,003733941	0	0,002210643	5,46E-05	0,001220703	0	0,016214331
Stenotrophomonas	0,000932319	0,002468198	0	0	0	0,001302083	0	0,001859708
Staphylococcus	0	0,002151763	0,073617906	0,417653561	0	0	0	0,007032022
Pseudomonas	0,048626286	0,001455604	0	0	0,000218221	0,002115885	0,588044668	0,015923752
Propionibacterium	0,013256417	0,000759446	6,49E-05	0,007579346	0	0,001139323	0	0,003835648
Acinetobacter	0	0,000316436	0	0	0	8,14E-05	0	0
Corynebacterium	0,00011654	6,33E-05	0,104809732	0	0,013311511	0,585123698	0	0,008717382
Alloiooccus	0	6,33E-05	0,796917615	0	0,081833061	0	0	0
Streptococcus	0	6,33E-05	2,16E-05	0	0	0,010498047	0,000262755	0
Yersinia	0,28898989	0,001265743	0	0	0	0	0	0

En el **gráfico 7** y la **tabla 15** se muestra la abundancia relativa de los géneros en los controles de forma individualizada. Respecto al género *Staphylococcus* estuvo presente en la mitad de los controles (5/10), en dos de ellos de forma predominante (casos 7 y 10 con un abundancia relativa del 66,4% y del 48,9% respectivamente).

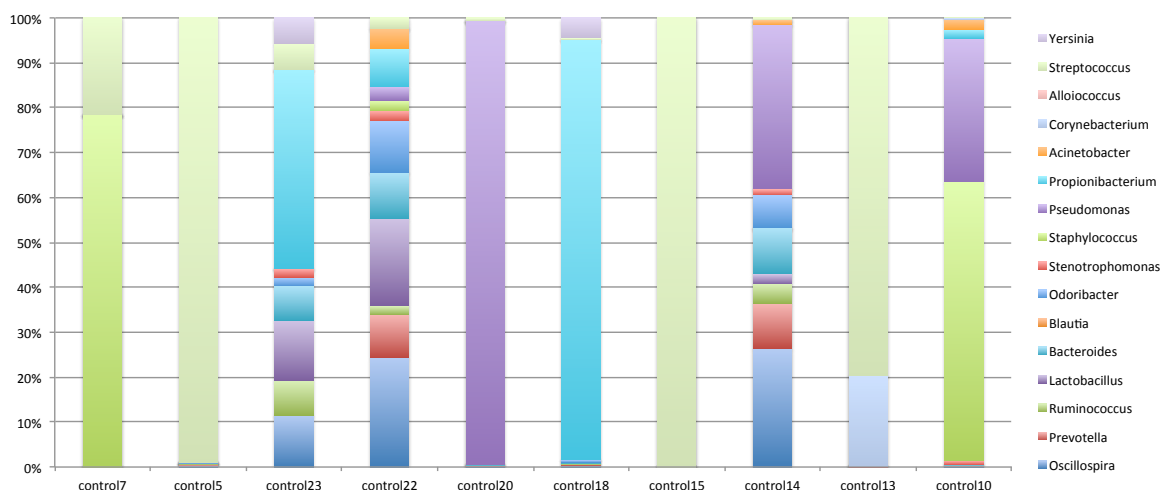


Gráfico 7: Histograma donde se representa gráficamente la abundancia relativa de los diferentes géneros en cada control estudiado

Tabla 15: Tabla con los valores expresados en tanto por uno de la abundancia relativa de los diferentes géneros en cada control estudiado

Taxon	control7	control5	control23	control22	control20	control18	control15	control14	control13	control10
Oscillospira	0	0,002489368	0,001433349	0,004854737	0,000477286	0,003625232	0	0,009802646	0	0,000240471
Prevotella	0	0,003163572	0	0,001896382	0,00216948	0,001530653	0	0,00373021	3,06E-05	0,001803535
Ruminococcus	0	0,002074474	0,000955566	0,000379276	0,000260338	0,001772335	0	0,001604858	0	0,000120236
Lactobacillus	0	0	0,001672241	0,003868619	0,000694234	0,000805607	0	0,000824116	3,06E-05	0,000360707
Bacteroides	0	0	0,000955566	0,002048092	0,00104135	0,00112785	0	0,003816959	6,11E-05	0,002044006
Blautia	0	0	0	0	0,000390506	0,001208411	0	0	0	0
Odoribacter	0	0,00140027	0,000238892	0,002275658	4,34E-05	0,004833642	0	0,002732596	0	0
Stenotrophomonas	0	0	0,000238892	0,000455132	0	0	0	0,00047712	0	0,007454611
Staphylococcus	0,664276808	0	0	0,000455132	0,000130169	0	0	4,34E-05	0	0,488998437
Pseudomonas	0	0	0	0,000606842	0,951273485	0,000966728	0	0,013532856	0	0,252013947
Propionibacterium	0	0,000881651	0,005494505	0,001668816	8,68E-05	0,844759526	2,30E-05	0	6,11E-05	0,015750872
Acinetobacter	0	0,000103724	0	0,000910263	0	0,000241682	0	0,000390371	0	0,017313935
Corynebacterium	0	0	0	0	0	0,000161121	0	0	0,031836236	0,002524949
Alloiococcus	0	5,19E-05	0	0	0	0	0	0	0	0
Streptococcus	0,182564422	0,934809667	0,000716675	0,000455132	0,00637827	0,002980746	0,53713918	0,000173498	0,125145127	0,000120236
Yersinia	0	0	0,000716675	0	0	0,040441473	0	0	0	0

En el **gráfico 8** y la **tabla 16** queda recogida la abundancia relativa de los *phyllum* en los casos de forma individualizada. Los *phyllum* predominantes fueron *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria*.

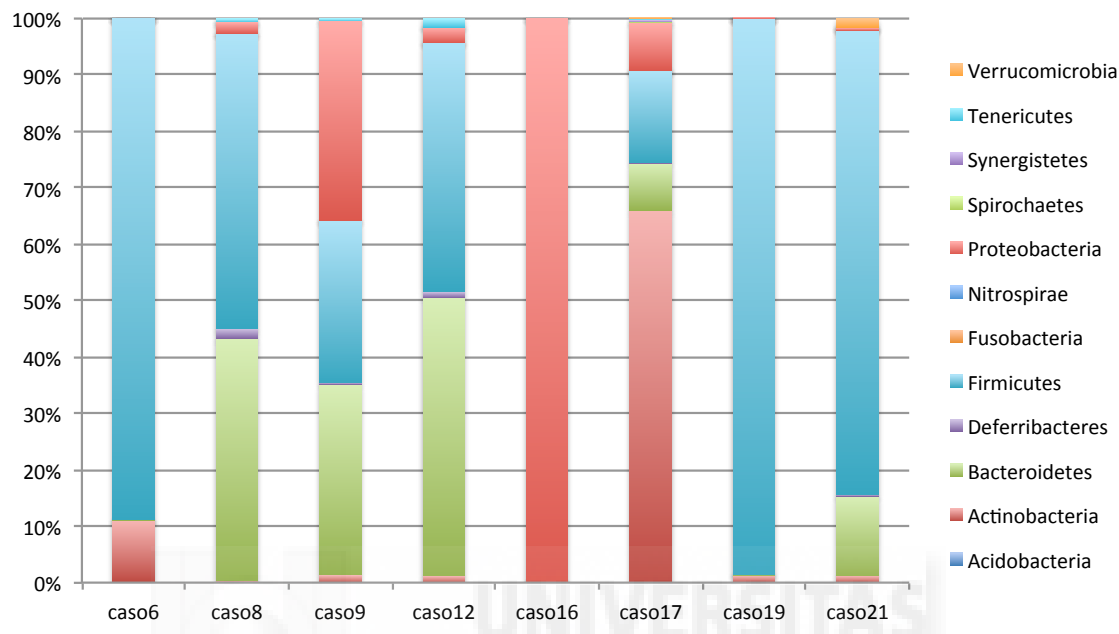


Gráfico 8: Histograma donde se representa gráficamente la abundancia relativa de los diferentes *phyllum* en cada caso estudiado

Tabla 16: Tabla con los valores expresados en tanto por uno de la abundancia relativa de los diferentes *phyllum* en cada caso estudiado

Taxon	caso6	caso8	caso9	caso12	caso16	caso17	caso19	caso21
Acidobacteria	0	0	0	0	0	0	0	0
Actinobacteria	0,110784017	0,002847921	0,013372957	0,012553031	0	0,59358724	0,013366067	0,009632086
Bacteroidetes	0,00010823	0,421112588	0,331556099	0,49026559	0,000262755	0,075927734	0,001800327	0,102952787
Deferribacteres	2,16E-05	0,018226695	0,002971768	0,011100134	0	0,001871745	5,46E-05	0,001736934
Firmicutes	0,887376077	0,511992912	0,28161874	0,438658685	0,000963433	0,146647135	0,984015276	0,604452866
Fusobacteria	0	0	0	0	0	0	0	0
Nitrospirae	0	0	0	0	0	0,000244141	0	0
Proteobacteria	0	0,020251883	0,34728899	0,027488813	0,989927743	0,076009115	0,000218221	0,00363177
Spirochaetes	0	0	0	0	0	0,000895182	0	0
Synergistetes	0	0	0	0	0	0,003092448	0	0
Tenericutes	0	0,005569268	0,003641873	0,014935782	0	0,001871745	0	0
Verrucomicrobia	0	0	0	0	0	0,000325521	0	0,011526922

En el **gráfico 9** y la **tabla 17** queda reflejada la abundancia relativa de los *phyllum* en los controles de forma individualizada. Los *phyllum* predominantes fueron *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria*.

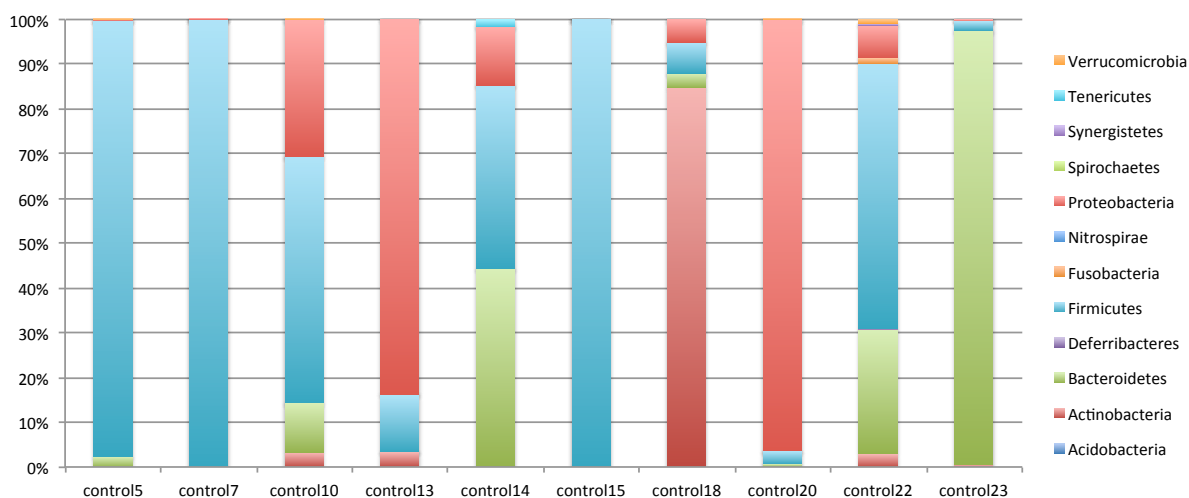


Gráfico 9: Histograma donde se representa gráficamente la abundancia relativa de los diferentes *phyllum* en cada control estudiado

Tabla 17: Tabla con los valores expresados en tanto por uno de la abundancia relativa de los diferentes *phyllum* en cada control estudiado

Taxon	control5	control7	control10	control13	control14	control15	control18	control20	control22	control23
Acidobacteria	0	02	03	04	05	06	07	4,34E-05	08	09
Actinobacteria	0,000881651	0	0,030539858	0,033852734	0	2,30E-05	0,845001208	0,001431857	0,004020329	0,005733397
Bacteroidetes	0,022611762	0,000103907	0,102681255	0,000397189	0,06211234	4,60E-05	0,031579795	0,006031154	0,037927634	0,920210225
Deferribacteres	0,00057048	0	0,000601178	0	0	0	0	4,34E-05	0,000379276	0
Firmicutes	0,967067732	0,999792186	0,508837321	0,127742133	0,057341141	0,999793161	0,068315476	0,028116458	0,080785861	0,019827998
Fusobacteria	0	0	0	0	0	0	0	0,000130169	0,001820526	0
Nitrospirae	0	0	0	0	0	0	0,000402804	0	0	0
Proteobacteria	0,001555855	0,000103907	0,283635926	0,834280477	0,018260681	0	0,050350439	0,956480236	0,00993704	0,00310559
Spirochaetes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Synergistetes	0	0	0	0	0	0	0	4,34E-05	0,000606842	0
Tenericutes	0	0	0,000601178	0	0,002298851	0	0	0	0	0
Verrucomicrobia	0,000985375	0	0,000120236	0	0	0	0	0,000303727	0,001137829	0

En la **tabla 18** se recoge la abundancia relativa expresada en tanto por uno de los géneros agrupados en casos y controles. La abundancia relativa de los géneros *Corynebacterium*, *Oscillospira*, *Pediococcus*, y *Yersinia* fue mayor en casos que en controles.

Tabla 18: Tabla con los valores expresados en tanto por uno de la abundancia relativa de los diferentes géneros comparando casos y controles

Taxon	caso	control
Abiotrophia	9,23E-05	0,091238929
Corynebacterium	0,073178894	0,005962535
Elizabethkingia	2,31E-05	0,003533158
Flexibacteria	0	0,01934523
Neisseria	3,46E-05	0,143956398
Oscillospira	0,017124888	0,002123064
Pediococcus	0,002579119	0,001991032
Propionibacterium	0,003450365	0,056424909
Pseudomonas	0,089103655	0,128614358
Staphylococcus	0,035778784	0,055305283
Streptococcus	0,00073854	0,250283867
Yersinia	0,05734645	0,002667033

En la **tabla 19** se muestra el análisis estadístico con ANOVA de los géneros donde se observó significación estadística y del género *Staphylococcus*. La probabilidad de encontrar el género *Oscillospira* en los casos es mayor (0,003479172) que en los controles (8,94E-05) con una p valor de 0,034; mientras que las diferencias encontradas en la abundancia relativa de *Staphylococcus* no fueron estadísticamente significativas (p: 0,547).

Tabla 19: Tabla con análisis Anova de los géneros con significación estadística entre casos y controles y del género *Staphylococcus*.

OTU	prob	Bonferroni_corrected	FDR_corrected	control_mean	caso_mean
g_Oscillospira	0,034922876	3,422441866	0,570406978	8,94E-05	0,003479172
g_Anaerotruncus	0,037258675	3,651350125	0,456418766	0,000167136	0,002502317
g_Prevotella	0,045155386	4,42522778	0,402293435	6,94E-05	0,001303852
g_Ruminococcus	0,051511803	5,048156691	0,336543779	0,000269687	0,002569657
g_Bacteroides	0,057341295	5,619446893	0,3305557	0,00045043	0,011242874
g_Staphylococcus	0,547278361	53,63327937	0,609469084	0,09651963	0,044780481

En el **gráfico 10** y en la **tabla 20** vemos reflejados los *phyllum* agrupados en casos y controles. En los casos la abundancia relativa de los *phyllum* más frecuentes fue la siguiente: *Firmicutes* 51,9%, *Proteobacterias* 20,9%, *Bacteroidetes* 16,2% y *Actinobacterias* 7,7%, mientras que en los controles la abundancia relativa de los *phyllum* predominantes fue la siguiente: *Firmicutes* 44,4%, *Proteobacterias* 27,9%, *Bacteroidetes* 4,0% y *Actinobacterias* 6,3%.

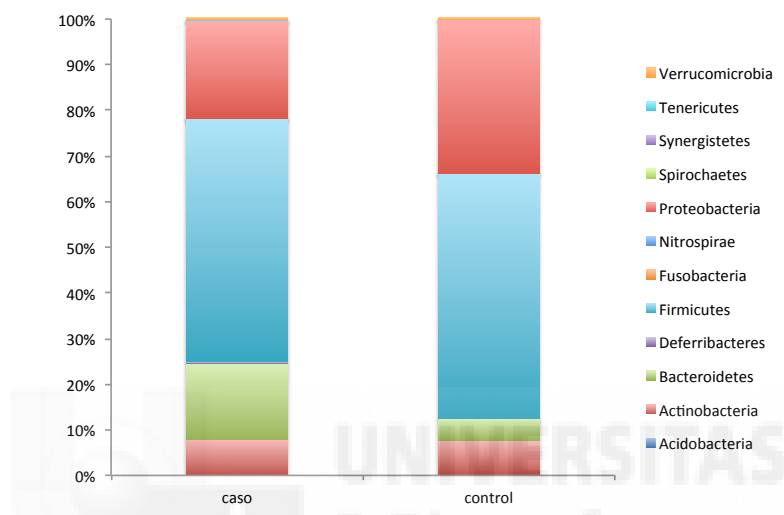


Gráfico 10: Histograma donde se representa gráficamente la abundancia de *Phyllum* comparando casos y controles

Tabla 20: Tabla con los valores expresados en tanto por uno de la abundancia relativa de los diferentes *phyllum* comparando casos y controles

Taxon	caso	control
Acidobacteria	0	5,28E-06
Actinobacteria	0,077535124	0,063264131
Bacteroidetes	0,162126763	0,04024843
Deferribacteres	0,003559992	0,000116188
Firmicutes	0,519216456	0,444422733
Fusobacteria	0	0,000142594
Nitrospirae	1,73E-05	2,64E-05
Proteobacteria	0,209324063	0,279536728
Spirochaetes	6,35E-05	0
Synergistetes	0,000219254	4,75E-05
Tenericutes	0,002844532	0,000306313
Verrucomicrobia	0,000444278	0,000221813

Según los índices de biodiversidad de Chao1 y Shannon (**tabla 21**), se observó que había más diversidad en las muestras de los casos que en las de los controles (51vs 34 y 3,29 vs 1,14 respectivamente), pero sin ser estas diferencias estadísticamente significativas (p: 0.23 y p: 0,37 respectivamente).

Tabla 21: Índices de biodiversidad Chao1 y Shannon comparando en casos y controles

Sample	Chao1	Shannon
caso12	48	5,3213
caso16	13	1,7295
caso17	106	3,3362
caso19	4	0,5744
caso21	69	3,9377
caso6	14	1,3171
caso8	81	5,5440
caso9	73	4,5933
control10	41	3,0615
control13	5	0,8811
control14	22	2,4426
control15	9	1,6162
control18	30	0,8493
control20	29	0,4398
control22	111	1,8522
control23	36	1,0736
control5	46	0,2835
control7	16	1,6924

	Chao1	Shannon
Caso	51	3,2942
Control	34	1,4192

En los **Gráficos 11-13** encontramos representado el análisis de los componentes principales donde se observa que existe un *cluster* de pacientes que tienen una microbiota parecida, se trata de los casos 8, 9, 12 y de los controles 14,18, 22 y 23 .

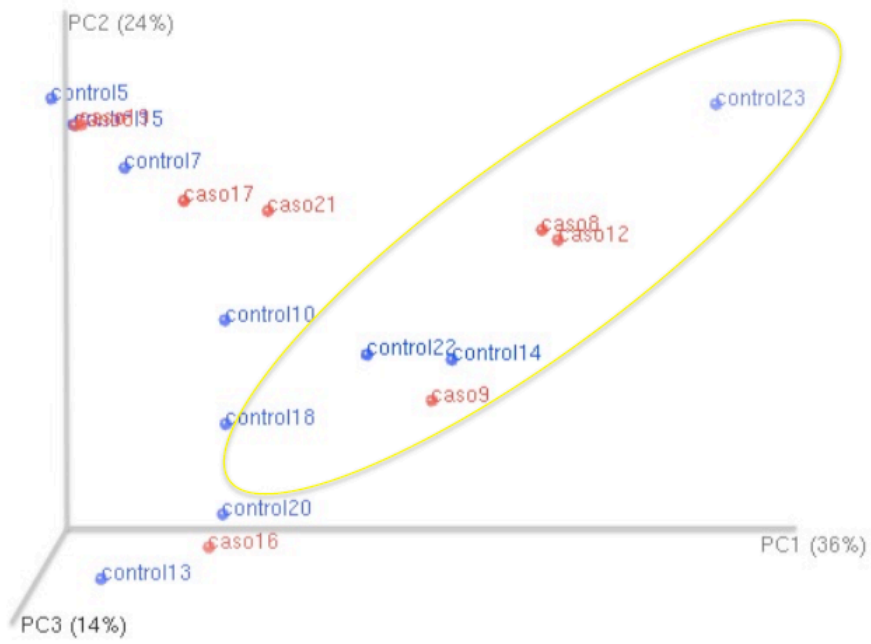
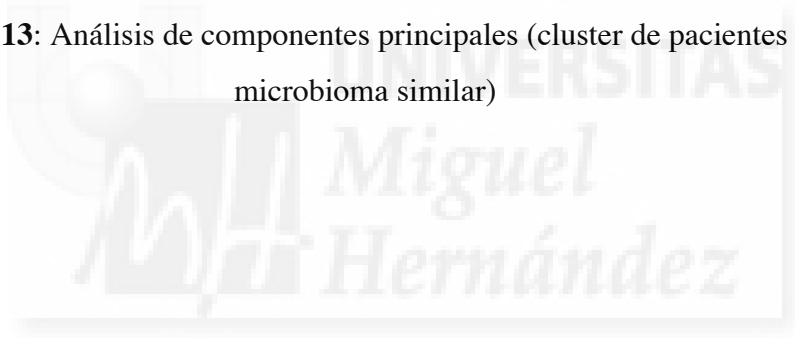


Gráfico 13: Análisis de componentes principales (cluster de pacientes con microbioma similar)





VII. DISCUSIÓN

VII.1. Discusión de los resultados de los objetivos principales

VII.1.1. Características epidemiológicas y sociodemográficas de los casos

En nuestro trabajo hemos encontrado una colonización nasal de *S. aureus* del 32,5% en niños con DA (**gráfico 1**). Estos datos son esperables atendiendo a la fisiopatología de la enfermedad como se ha comentado previamente en la introducción, donde normalmente se encuentra una mayor colonización en los niños con DA que en niños sanos de la población general donde la prevalencia es del 20-30%^{154, 155}. Si comparamos estas cifras con los datos extraídos de otros estudios en niños con DA también están en consonancia, habiéndose encontrado cifras que se acercan al mismo rango, tanto a la baja (23,5%)⁷⁸ como a la alta (46,1%)¹⁵⁶.

El **gráfico 2** muestra como casi la mitad de los casos (46,5%) de nuestro trabajo presentaban alteraciones del sueño asociadas al prurito. En un estudio por *Hon et al.*³⁸ encuentra también alteraciones del sueño asociadas al prurito en un porcentaje similar de casos ($r = 0.57$, $p < 0.001$), sin embargo este parámetro no se correlaciona bien con la intensidad y extensión de la enfermedad, a pesar de ser una de las variables importantes dentro del SCORAD. Esto en parte puede ser explicado porque se trata de un parámetro subjetivo que además muchas veces se pregunta a los padres y no a los propios pacientes. En cualquier caso, el prurito es un importante factor de impacto en niños con DA, ya que está indirectamente relacionado con la calidad de vida de la enfermedad pudiendo influir en trastornos emocionales y de conducta de los niños que la padecen e incluso de sus familiares⁴⁰.

En nuestro estudio la distribución de casos según la gravedad fue de un 35% de casos leves y de un 65% de casos moderados-graves (**gráfico 3**). Las edades en los tres grupos de gravedad se distribuyeron de forma similar (**tabla 1**). Es difícil establecer el porcentaje real de casos graves que hay de DA ya que los datos recogidos pueden depender de cuando los pacientes acuden a la consulta, de si están en ese momento en brote o bajo tratamiento. Normalmente las DA leves se manejan en pediatría o en la consulta ambulatoria de dermatología. La justificación de que

hayan más casos moderados-graves en nuestra población se debe a que los casos se han recogido en la consulta de dermatología pediátrica del hospital donde normalmente llegan ya filtrados y suelen ser más graves.

En los **gráficos 4 y 5** se recoge la proporción de casos de nuestro estudio con colonización nasal por *S. aureus* según parámetros de gravedad (alteraciones del sueño asociadas al prurito y SCORAD). Dentro de los niños sin alteraciones del sueño asociadas al prurito un 38% presentaban colonización nasal por *S. aureus*, mientras que de los pacientes con alteraciones del sueño asociadas al prurito, solo un 26% estaban colonizados. Si analizamos la colonización nasal por *S. aureus* de los casos según el SCORAD, un 45,5% de los casos leves, un 22,4% de los casos moderados y un 34,6% de los casos graves estaban colonizados. Llama la atención estos datos ya que lo esperable sería encontrar mayor colonización nasal en los casos más graves (mayor SCORAD, mayor prurito...) como ocurre con los datos de colonización cutánea. Numerosos estudios han asociado la colonización cutánea de las lesiones de DA por *S. aureus* con la gravedad de la enfermedad, llegando a tasas de hasta un 90% en casos graves^{93, 94, 157, 158}. Sin embargo en lo que a la colonización nasal se refiere existe controversia en la literatura. A pesar de que el *S. aureus* esté implicado en la patogenia de la enfermedad, algunos autores no encuentran asociación con la gravedad^{159, 160}, mientras que otros sí que asocian la colonización nasal por *S. aureus* a lesiones más extensas y signos de infección cutánea⁹⁵.

Una posible explicación a que los casos menos sintomáticos sean los más colonizados puede ser que los pacientes menos graves estén infratratados y reciban menos tandas de antibioterapia y en contraposición los más graves hayan recibido más tandas de tratamiento antiestafilocócico durante el curso de su enfermedad, así como más tratamiento erradicador a las familias y como consecuencia probablemente también estén menos colonizados los contactos. Por otra parte, podría plantearse que el hecho de estar colonizado a nivel nasal sea un factor desencadenante para un futuro brote, y que al tratarse de un estudio transversal, hemos recogido a los pacientes en un momento de menor gravedad, que puede preceder a un empeoramiento. Quizás con sucesivas mediciones temporales, hubiésemos podido constatar un empeoramiento en

el SCORAD de los casos leves con colonización nasal, que pasarían a formar parte de los graves.

VII.1.2. Características epidemiológicas y sociodemográficas comparando casos y controles

En nuestro estudio encontramos una colonización nasal por *S. aureus* mayor en los casos (32,5%) que en los controles (23,9%) con una OR 1,5 (1,0-2,3) y significación estadística (p: 0,047) (**tabla 2**). Estas cifras son coherentes con lo que era esperable, ya que según diferentes estudios la colonización nasal por *S. aureus* alcanza al 20-30% de la población general^{154, 155} y es mayor en niños con DA que en niños sanos¹⁶¹.

En la **tabla 3** se muestra la distribución de los niños estudiados por sexo y por edad en casos y controles. En los casos un 54,8% fueron niños y un 45,2% niñas. En los controles el 51,6% fueron niños y el 48,4% niñas. A pesar de que algunos estudios han encontrado mayor predominancia en el sexo femenino para la DA⁸, en el nuestro hay una ligera predominancia del sexo masculino en el grupo de casos comparado con el grupo de controles, pero es mínima y las diferencias no son estadísticamente significativas.

En los casos el 55,5% de los niños tenían 5 o menos años, mientras que en los controles los niños de 5 o menos años correspondían a un 46,2% del total. A pesar de las que diferencias no son estadísticamente significativas, si ampliásemos la muestra podrían llegar a serlo. Una explicación a estos resultados de nuestro trabajo es que la DA tiende a mejorar con la edad por eso los casos son más pequeños que los controles, de hecho se calcula que en el 45 % de los casos el comienzo de la DA se produce durante los primeros 6 meses de vida, en el 60% durante el primer año y en más del 85% antes de los 5 años de edad⁷.

En la **tabla 4** se muestra la distribución de los niños estudiados por IMC. Por una parte, en nuestro estudio, un 7,6% de los casos tenía un peso inferior al ideal frente a un 5,1% de los controles, con una OR 2,6 (1,1-6,2) con significación estadística (p: 0,035). Por tanto, estas diferencias apoyan que los niños con DA

generalmente son más delgados. Esto podría explicarse debido a que los niños con DA tienden a dormir menos por el prurito y a tener más trastornos de hiperactividad e inatención, así como trastornos emocionales y de conducta³⁸, siendo muchas veces niños inquietos y nerviosos por lo que les es más difícil engordar.

Por otra parte, los controles tenían mayores tasas de sobrepeso u obesidad (44,3%) que los casos (33,1%), sin ser las diferencias estadísticamente significativas. No obstante, si la muestra se ampliase posiblemente podríamos encontrarlas, lo cual apoyaría también que los niños con DA son más delgados que los niños sin DA. Sin embargo, recientemente en la literatura están intentando asociar la obesidad y el síndrome metabólico a la DA como ocurre en la psoriasis¹⁹⁻²¹. Quizás esta asociación ocurra de forma más evidente conforme los niños se acercan a la adolescencia o a la edad adulta, y la población de nuestro estudio presente edades inferiores para poder apoyar esta teoría.

Otro dato interesante a destacar es que de todos los niños estudiados, ya fueran casos o controles, se encontraron tasas de sobrepeso u obesidad infantil en un 40,5% (101/471) del total. Actualmente el exceso de peso en la población infantil supone un problema de salud pública ante el que se deben tomar medidas políticas por el importante factor de riesgo que supone esta patología en las enfermedades cardiovasculares de cara a la edad adulta. Estudios recientes cifran la obesidad infantil en Estados Unidos en un tercio de los niños, y en Europa en una quinta parte de los niños¹⁶². Si comparamos nuestros datos con los de un estudio realizado en 2015 en España¹⁶³ donde cifran las tasas de exceso de peso (incluyendo tanto el sobrepeso como la obesidad) en un 41,3%, vemos que son tasas muy similares a las de nuestro trabajo.

En nuestro estudio los casos tuvieron más antecedentes familiares de asma y de DA (14% y el 25,5% respectivamente) que los controles (el 4,1% y el 5,1% respectivamente) con significación estadística en ambos casos ($p < 0,001$). En los casos, también se encontraron más antecedentes familiares de rinitis (16,6%) que en los controles (13,7%), con una OR 1,3 (0,7-2,1), pero sin significación estadística ($p = 0,407$) (**tabla 5**). Las diferencias encontradas entre ambos grupos son coherentes con lo que es esperable atendiendo a la etiopatogenia de la enfermedad atópica y la

predisposición genética de la misma. Es posible que comparada con el asma o la DA, la rinitis alérgica esté infradiagnosticada o haya sesgo de olvido en los pacientes al preguntar por sus antecedentes debido a que la clínica es menos florida. Quizás también por el clima de la zona donde se ha realizado el estudio, haya influido en que haya menos casos de rinitis alérgicas que en otras áreas.

En la **tabla 6** se muestra como los casos presentaron mayor proporción de antecedentes personales de atopia como rinitis OR 9,0 (4,2-19,4) asma OR 8,8 (3,7-20,7), alergias inhaladas a pólenes OR 10,9 (3,1-38,4), pelo de animales OR 14,1 (3,1-63,2), y ácaros del polvo OR 12,0 (4,0-35,5), todos ellos con significación estadística ($p < 0,001$). Estos datos son similares a lo descrito por otros autores y concuerda con lo referido en la literatura en relación a la marcha atópica y como lo DA puede preceder al desarrollo de asma y rinitis alérgica en estos pacientes^{4, 6, 9}. Además probablemente a esto se sobreañada que normalmente los pacientes atópicos han sido más estudiados en cuanto a sensibilizaciones se refiere por los compañeros de alergología.

Recientemente se ha postulado que las alergias alimentarias también podrían formar parte de la marcha atópica⁶. En nuestro estudio se encontraron 56 alergias alimentarias de un total de 157 casos, lo que supone una prevalencia de un 35%. Esto se ajusta con lo descrito en los estudios donde se postula que alrededor del 33% de los niños con DA moderada a grave presentan positividad para IgE específica frente a alguna proteína alimentaria³³. Además la presencia de alergia a proteínas del huevo se ha relacionado con una mayor gravedad del eccema atópico³³. De hecho, en nuestro estudio destaca que en los casos el 12,7% tenía alergia al huevo frente al 0,3% de los controles, con una OR 47,5 (6,1-343,9), con significación estadística ($p < 0,001$). En el resto de alergias a alimentos las OR fueron incalculables o la p no fue significativa (**tabla 7**).

Aunque un mayor número de casos presentaron enfermedad celiaca que los controles (2,5% frente a 0,6%), las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p: 0,099$). De todas formas en la literatura es un tema controvertido y se ha intentado relacionar en varios trabajos la enfermedad celiaca con otras enfermedades inmuno-mediadas como la DA. Un estudio realizado en 351 niños con

DA en Estonia¹⁶⁴, muestra tasas de enfermedad celiaca en un 1,4% de ellos, cifras similares a las de nuestro trabajo. Hacen falta más estudios y tamaños muestrales más grandes para poder corroborar esta asociación.

VII.1.3. Características epidemiológicas y sociodemográficas comparando niños con colonización nasal por *S. aureus* y niños no colonizados.

Las características epidemiológicas y sociodemográficas de los niños colonizados y no colonizados por *S. aureus* quedan recogidas en el **tabla 8**. Dentro de los pacientes colonizados un 50,8% fueron niños frente a un 53,3% en los pacientes no colonizados, con una OR 0,9 (0,6-1,4) sin tener significación estadística las diferencias encontradas en el sexo. Estos datos concuerdan con lo esperable ya que en principio la colonización nasal por *S. aureus* no tiene predilección por un sexo.

Las edades se distribuyeron de la siguiente forma: en los pacientes colonizados el 10,3% eran niños con edades comprendidas entre los 6 meses y dos años, el 18,3% tenían entre 3 y 5 años, el 40,5% tenían entre 6 y 9 años, y el 31,0% tenían 10 o más años. En los pacientes no colonizados el 33,0% eran niños con edades comprendidas entre los 6 meses y dos años, el 23,8% tenían entre 3 y 5 años, el 22,6% tenían entre 6 y 9 años, y el 20,6% tenían 10 o más años.

Si analizamos estos datos, objetivamos un 71,5% de los pacientes colonizados tenía 6 o más años, sin embargo un 55,8% de los pacientes no colonizados tenía menos de seis años. Por tanto en los niños de nuestro estudio, la colonización se asoció a mayor edad y la no colonización a menor edad. Que haya menos colonización en los niños más pequeños podría justificarse por que estos han estado menos expuestos al ambiente, al humo del tabaco, a contactos colonizados... y otros factores que pueden influenciar en ella. Además cuanto más pequeños son los niños, más está la familia al cargo de los tratamientos y probablemente se les administra más antiinflamatorios y antibióticos, que pueden contribuir a una menor colonización; mientras que cuanto más mayores son los niños más autónomos se hacen y muchas veces descuidan ellos mismos su propio tratamiento. Otra justificación podría ser que en los niños menores de un año todavía no se ha producido la maduración de la microbiota, y tienen muchos gérmenes comensales y saprofitos en su reservorio nasal,

y como con la edad aumenta la densidad y disminuye la diversidad, es entonces más adelante, cuando el *S.aureus* encuentra su microambiente adecuado.

Sin embargo, hay estudios que refieren lo contrario, en los que los niños con mayor colonización nasal por *S. aureus* son los más pequeños¹²⁷. En este sentido, a pesar de que haya más casos colonizados mayores que pequeños, si los agrupamos, el 69% de los niños colonizados eran menores de 10 años, y solo un 31% tenían 10 o más años. Es posible que si nos centrásemos en niños que están llegando a la adolescencia o a la edad adulta, y hubiésemos recogido niños más mayores, las tasas de colonización hubiesen bajado todavía más en esas edades. Estos datos son coherentes con lo descrito en la literatura que postula que la instalación de la microbiota definitiva no se produce hasta bien desarrollada la adolescencia. A partir de esa edad otros gérmes competidores del *S. aureus* lo desplazan y predominan *Propionibacterium* y *corynebacterium*¹²⁷. Esto se debe a que con la edad aumenta la concentración de sebo y el metabolismo lipídico reduce el pH de la piel, lo cual inhibe el crecimiento de especies como *Streptococcus* y *Staphylococcus*, y hace que predominen bacterias más lipofílicas^{121,122}.

Por otra parte, en nuestro trabajo es posible que exista sesgo de estación, ya que no se ha clasificado la colonización en función de la temporada del año en que se recogió el cultivo y esto puede estar falseando los resultados de la colonización con la edad. Algunos autores nombran a la edad y a la estación del año como los principales factores implicados en los cambios dinámicos de la microbiota nasal¹²⁶.

No se encontraron diferencias significativas respecto al IMC al comparar pacientes colonizados y no colonizados, lo cual concuerda con lo esperable ya que en principio la colonización nasal por *S. aureus* no tiene relación con el IMC. En los pacientes colonizados el 6,3% eran niños con peso inferior al ideal, el 50,8% tenían peso ideal, el 27,8% tenían sobrepeso y el 15,1% tenían obesidad; en los pacientes no colonizados el 5,8% eran niños con peso inferior al ideal, el 54,5% tenían peso ideal, el 15,7% tenían sobrepeso y el 24,1% tenían obesidad.

Respecto a los antecedentes familiares de atopia (rinitis, asma y DA) no se objetivaron diferencias con significación estadística entre los niños colonizados y no colonizados. Esto es lógico ya que la colonización dependerá más de las condiciones del huésped que de sus familiares. Si hubiésemos recogido el antecedente de colonización en familiares podríamos haber visto diferencias estadísticamente significativas, ya que se ha observado en otros estudios.

En cuanto a los antecedentes personales de atopia se encontraron más antecedentes personales de rinitis OR 2,5 (1,3-4,7), alergias inhaladas a pólenes 2,9 (1,1-7,4) y a ácaros del polvo 2,7 (1,2-6,1), con significación estadística (p:0,005; p:0,030; p: 0,014 respectivamente), en los niños colonizados que en los niños no colonizados. Sin embargo, aunque se encontraron más antecedentes personales de asma 1,6 (0,8-3,4) y de alergias inhaladas a pelos de animales 1,9 (0,7-5,4) estas no fueron estadísticamente significativas (p: 0,199; p:0,244 respectivamente). Los resultados de nuestro estudio son los esperables debido a que otros trabajos también han relacionado la colonización nasal por *S. aureus* con los síntomas de la rinitis alérgica a través de superantígenos y con la exacerbación de cuadros alérgicos^{167,168}. Otro hallazgo de interés en este sentido es que algunos autores han administrado antibióticos para los que esta bacteria es sensible en pacientes con rinitis alérgica, resolviéndose la patología^{165,166}. La asociación existente entre la colonización nasal por *S. aureus* y la rinitis alérgica y el asma, hace necesario el desarrollo de más estudios en este ámbito, especialmente con respecto a su relación con los síntomas y exacerbaciones, y también con la falta de respuesta a tratamientos antialérgicos clásicos.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en lo que respecta a las alergias alimentarias o enfermedad celiaca entre pacientes colonizados y no colonizados; en la revisión de la literatura no se ha encontrado asociación en este sentido.

VII.1.4. Análisis Multivariante.

Para conocer si la DA se asocia de manera independiente a la colonización nasal por *S. aureus* se realizó el análisis multivariante recogido en la **tabla 9**. La

colonización nasal por *S. aureus* encontrada en nuestro estudio tras el análisis multivariante fue de un 32,5% en los casos y de un 23,9% en los controles con una OR ajustada es de 1,5 (0,9-2,6) con una $p=0,110$. Por tanto vemos como no se modifica la OR, manteniéndose el efecto, ya que continúa siendo de 1,5, aunque disminuye la significación estadística y la p pasa a ser de 0,110; probablemente si la muestra fuese más grande tal vez en análisis multivariante también alcanzaría la significación estadística. Con estos datos, podemos concluir entonces que el aumento de riesgo de padecer colonización nasal por *S. aureus* debido a tener DA depende exclusivamente de la enfermedad, independientemente de cómo sean el resto de variables estudiadas.

VII.2. Discusión de los resultados de los objetivos secundarios

VII.2.1. Perfil de resistencia antibiótica en los pacientes con colonización nasal por *S. aureus*.

En la **tabla 10** queda recogido el perfil de resistencia antibiótica de los pacientes colonizados por *S. aureus*. No se ha encontrado significación estadística en las diferencias halladas en los perfiles de resistencia antibiótica del *S. aureus* entre los casos y los controles, lo cual es lógico, ya que las cepas son las mismas en el ambiente tanto para los niños con DA como los niños sanos. Otra cosa distinta es que los pacientes con DA estuviesen ingresados y se tratase de una colonización nosocomial, en cuyo casos sí que se hallaría probablemente un perfil de sensibilidad antibiótico diferente, con mayores tasas de resistencia, especialmente de SARM.

Respecto al SARM las tasas obtenidas (15,1%) están en consonancia con lo descrito previamente en la literatura, al igual que ocurría con las tasa de colonización nasal por *S. aureus* de nuestro trabajo, un 26,8% (126/471) del total de niños estudiados, que son las habituales según las tasas de la población general (20-30%)^{154, 155}. Algunos estudios sobre población pediátrica en España estiman una frecuencia de SARM de entre el 9 y el 14,8%⁹⁷. Otros estudios españoles refieren porcentajes más elevados de SARM que ascienden al 29,2%^{169,170}, pero parece que la tendencia se ha estabilizado en los últimos años, sin ser actualmente un problema de salud pública,

aunque debemos mantenernos en constante vigilancia epidemiológica en este sentido.

En un informe redactado recientemente en nuestro hospital acerca de la sensibilidad antimicrobiana en el HGUA en el año 2016, se constata una proporción de SARM entre los cultivos de *S. aureus* aislados del 13,8%, tasas similares a las de nuestro estudio (15,1%)¹⁷¹. Cuando comparamos en nuestro trabajo los casos y los controles, no se objetivaron más cepas SARM en los casos de forma significativa (un 16,3% de SARM en los casos colonizados) que en los controles (un 14,3% de SARM en los controles colonizados) con una OR:1,2 (0,4-3,2) y una $p=0,760$. Por tanto, aunque la colonización por *S. aureus* en los niños con DA es mayor que en los niños sin DA, podemos concluir que no ocurre lo mismo con el SARM.

Es difícil comparar nuestro estudio con la bibliografía publicada respecto a las tasas de resistencias para cada uno de los antibióticos, ya que los patrones de sensibilidad antibiótica de las cepas del *S. aureus*, presentan cifras muy variables que van a depender mucho las características microbiológicas y epidemiológicas de cada país. En general en nuestro estudio las tasas de resistencia son similares a las publicadas en la literatura^{100,101,169,172}.

Un 15,4% de las cepas de los niños colonizados por *S. aureus* fueron resistentes a amoxicilina-ácido clavulánico, y un 3,9% a tetraciclina. Las tasas de resistencia a los aminoglucósidos fueron del 11,7% para la gentamicina, del 9,8% para la tobramicina y del 1,8% para la amikacina. Las tasas de resistencia a las quinolonas en los niños colonizados fue del 2,0% para el ciprofloxacino y del 1,9% para el levofloxacino.

En cuanto al ácido fusídico y a la mupirocina, se encontraron tasas de resistencia en los niños con colonización nasal por *S. aureus* del 7,1% y del 15,9%. Estas tasas de resistencia no son altas comparado con otros estudios donde por ejemplo encuentran tasas de resistencia al ácido fusídico del 25%¹⁰¹, pero tampoco son despreciables si se tiene en cuenta que estos antibióticos se utilizan con frecuencia en forma de cremas tópicas para tratar lesiones de eccema atópico sobreinfectadas, así como para la erradicación nasal del *S. aureus*.

La mayor parte de las cepas de *S. aureus* que son resistentes a macrólidos lo son también a las lincosamidas. Esto es codificado por el gen *erm* que induce la metilación de la subunidad 23S ribosomal lo que conlleva a la modificación del sitio de unión de estos antibióticos^{102, 103}. En nuestro estudio las tasas de resistencia a la eritromicina y a la clindamicina fueron del 31,1% y del 42,7% respectivamente del total de niños con colonización nasal por *S. aureus*. Estas tasas tampoco son despreciables, de hecho, son más altas que las de otros trabajos donde hallan unas tasas de resistencia del 21% frente a eritromicina y clindamicina¹⁰¹. Es importante recalcar que estos antibióticos comercializados tópicamente (Dalacin®, Deripil®...) se utilizan con frecuencia para tratar infecciones cutáneas en la práctica clínica de dermatología como por ejemplo foliculitis.

No se encontraron cepas resistentes a cotrimoxazol, rifampicina ni vancomicina en los pacientes colonizados a *S. aureus*, incluyendo casos y controles. Esto encaja con lo descrito en la literatura donde las tasas de resistencia a estos antibióticos son nulas o mínimas^{105,169}.

VII.2.2. Estudio de colonización nasal por otros gérmenes potencialmente patógenos diferentes de *S. aureus* comparando casos y controles.

En nuestro estudio también hemos objetivado población asintomática colonizada por bacterias consideradas patógenas como por ejemplo *S. pneumoniae* y *H. Influenza* entre otros, lo cual podría explicarse por una posible portación transitoria, correspondiendo así sólo a portadores asintomáticos. En cuanto a la prevalencia de colonización a estos gérmenes potencialmente patógenos diferentes de *S. aureus* comparando casos y controles (**tabla 11**), no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Tanto en casos como en controles, un 3,8% de los niños estaban colonizados por gérmenes gram positivos (incluyéndose *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*). De los casos, un 19,1% (30/157) estaban colonizados por gram negativos (un 1,9% por *M. Catharralis*, un 12,7% *H. Influenza*, un 1,3% por *Acinetobacter spp*, un 1,3% por *Pseudomona spp* y un 1,9% por *Enterobacterias spp*) mientras que de los controles, un 11,1% (35/314) estaban colonizados por gram negativos (un 2,2% por *M.*

Catharralis, un 8,0% *H. Influenza*, un 0,3% por *Pseudomona spp* y un 0,6% por *Enterobacterias spp*). La mayor aproximación a la significación estadística es que los casos tienen mayor número de colonización por gram negativos cuando los agrupamos con una OR 1,7 (1,0-2,9; IC95%) y una p: 0,057, y mayor colonización de *H. Influenza* OR 1,7 (0,9-3,1; IC95%) y una p: 0,096. Una posible explicación sería que como los casos tienen más antecedentes de atopía (asma, rinitis...) y cierto grado de inmunosupresión por la enfermedad y los tratamientos, son más susceptibles a infecciones de las vías respiratorias altas por bacterias gram negativas, especialmente por *H. Influenza*. Por otra parte, cabe la posibilidad de que las diferencias sean debidas al sesgo de no consignar la estación del año en la que se recogían los cultivos y quizás haya recogido más casos en invierno que es cuando la DA suele empeorar y cuando más infecciones respiratorias hay.

VII.2.3. Estudio de colonización nasal por otros gérmenes potencialmente patógenos diferentes de *S. aureus* comparando pacientes niños colonizados y no colonizados.

En la **tabla 12** se describe la prevalencia de pacientes colonizados a otros gérmenes potencialmente patógenos diferentes de *S. aureus* en pacientes colonizados y no colonizados. Por un lado, de los pacientes colonizados por *S. aureus* un 1,6% estaban colonizados a su vez por otros gram positivos (1,6% de *S. pneumoniae*), mientras que de los pacientes no colonizados por *S. aureus* un 4,6% estaban colonizados por gram positivos (un 4,3% por *S. pneumoniae* y un 0,3% por *S. pyogenes*). Por otro lado, de los pacientes colonizados por *S. aureus* un 4,8% estaban colonizados a su vez por gram negativos (un 1,6% por *M. Catharralis*, un 1,6% *H. Influenza*, un 0,8% por *Acinetobacter spp* y un 0,8% por *Pseudomona spp*), mientras que de los pacientes no colonizados por *S. aureus* un 17,1% estaban colonizados por gram negativos (un 2,3% por *M. Catharralis*, un 12,5% *H. Influenza*, un 0,3% por *Acinetobacter spp*, un 0,9% por *Pseudomona spp* y un 1,2% por *Enterobacterias spp*). Estas diferencias son estadísticamente significativas en el caso *H. Influenza* y cuando agrupamos los gram negativos ($p < 0,001$).

En todos los casos los pacientes no colonizados por *S. aureus* tienden a tener más colonización por otros gérmenes (a excepción de *Acinetobacter spp*). Esto tiene

sentido ya que sabemos que el *S. aureus* tiene su reservorio habitual en esta zona desplazando al resto de microorganismos. Por tanto, en nuestro estudio como en muchos otros trabajos publicados en la literatura previamente^{90,125}, la portación nasal de *S. aureus* se correlaciona de forma negativa con la presencia de colonización nasal por otros gérmenes, lo que apoya la hipótesis de un antagonismo en el nicho biológico con otras especies, pues tener otra flora supone un factor protector frente a la colonización nasal por *S. aureus*, dado que la competición entre ellos le impide el establecimiento como reservorio.

VII.2.4. Discusión del estudio piloto de la microbiota nasofaríngea

Cada vez son más los trabajos que estudian cómo puede influir la microbiota en la patogenia de las enfermedades alérgicas¹⁷³. Queremos destacar que en nuestro conocimiento este es el primer estudio de la microbiota nasofaríngea por secuenciación masiva en niños con DA en España. Se trata de un estudio piloto con un tamaño muestral pequeño, y aunque hacen falta trabajos más grandes y representativos para poder sacar conclusiones y aplicarlas en nuestra práctica clínica diaria, los resultados obtenidos suponen una aportación pionera en este campo.

Si observamos los géneros en los casos y controles de forma individualizada (**gráficos 6-7** y **tabla 14-15**) llama la atención que el *Staphylococcus* no está presente de forma predominante en las muestras del aspirado nasofaríngeo, sino que en la comunidad bacteriana de estos niños existen muchos otros géneros que habitan conjuntamente en esta localización. Esto abre nuevas perspectivas en el estudio de la colonización bacteriana en pacientes con DA. Mediante las técnicas de secuenciación masiva no hemos encontrado que el género *Staphylococcus* sea mayor en casos que en controles (**tabla 18**), pero las diferencias encontradas entre ambos grupos tampoco son estadísticamente significativas cuando vemos los datos del análisis ANOVA por géneros (**tabla 19**).

Las discrepancias entre los resultados de los cultivos habituales y los de la secuenciación masiva probablemente sean debidas a que las bacterias como los *Staphylococcus* crezcan fácilmente en los medios de cultivo clásicos y es posible que

tengan un papel sobrevalorado ya que impiden la expresión de la otra flora “escondida”. Se han documentado hallazgos similares con las *Enterobacterias* y el EPOC (Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica) en otros trabajos¹⁷⁴. Esto corrobora la baja resolución de los cultivos habituales y la necesidad de estudios más amplios con estas nuevas técnicas más eficaces que nos permitirán descubrir toda la carga microbiana de las muestras y conocer así la verdadera abundancia relativa de las especies.

Cuando agrupamos las muestras de los casos y controles vemos que algunos géneros fueron más frecuentes en un grupo que en otro (**tabla 18**). Destaca que la abundancia del género de *Oscillospira* fue mayor en casos (1,7%) que en controles (0,2%) (**gráfico 14**), siendo las diferencias encontradas estadísticamente significativas. La *Oscillospira* es una bacteria enigmática que nunca ha sido cultivada y cuyo papel se desconoce. Existen trabajos recientes que sugieren que estas bacterias aumentan a nivel intestinal en los niños expuestos a perros, gatos y otros animales con pelo durante los 3 primeros meses de vida, y que son beneficiosas para la salud ya que disminuyen el riesgo de alergia en la infancia, y también de obesidad¹⁷⁵. Podría ocurrir lo mismo a nivel nasofaríngeo ya que esta localización anatómica se continúa con el tubo digestivo. Sin embargo, estos datos no se corresponderían con los de nuestro trabajo en el que los casos (niños con DA y con más alergias) son los que más *Oscillospira* han presentado. El tamaño de nuestra muestra es pequeña para sacar conclusiones, y además no disponemos de algunas variables que podrían ser relevantes para este dato como el tipo de alimentación, parto, lactancia materna, animales domésticos...etc) y por tanto serían necesarios más estudios para poder verificar el verdadero papel de la *oscillospira* en esta patología.

No obstante, nuestros resultados sí que apoyarían la hipótesis de la relación entre *Oscillospira* y menor riesgo de obesidad, ya que los casos presentaron menor IMC que los controles en el estudio de la microbiota (donde el 50% (5/10) de los controles y el 25% (2/8) de los casos tenían sobrepeso u obesidad) (**tabla 13**). Estos datos nos dan una información que puede abrir un camino hacia futuras investigaciones para conocer verdaderamente qué papel juega la microbiota en la enfermedad y cómo podemos influir en ella para tratarla.

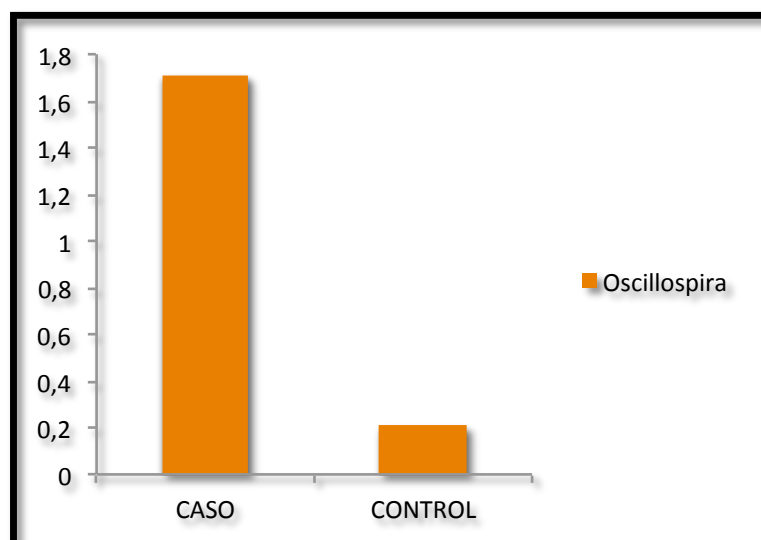


Gráfico 14: Histograma donde se representa gráficamente la abundancia relativa del género *Oscillospira* comparando casos y controles

Si analizamos los *phyllum* en las muestras individualizadas de los casos y controles (gráficos 8-9 y tabla 16-17), vemos que en todos ellos predominan 4 *phyllum* que se corresponden con los más frecuentes descritos en la bibliografía (*Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria*)¹¹⁷. Destaca que en ambos grupos los *phyllum* más abundantes fueron los *Firmicutes* (tabla 20). Esto concuerda con los datos descritos en la literatura donde a nivel nasal predomina las *Actinobacterias* en adultos y los *Firmicutes* en niños^{121, 122, 123, 124, 127}. La explicación de estos hallazgos se basaría en que a medida que nos acercamos a la edad adulta, aumenta la concentración de sebo y el metabolismo lipídico reduce el pH de la piel, con lo que predominan bacterias más lipofílicas (*Actinobacterias* como *Corynebacteria* y *Propionibacteria*).

En cuanto a la diversidad de las muestras comparando ambos grupos, se observó que había más biodiversidad según los índices de Chao1 y Shannon (tabla 21) en los casos que en los controles (51vs 34 y 3,29 vs 1,14 respectivamente), pero sin ser estas diferencias estadísticamente significativas (p: 0,23 y p: 0,37 respectivamente). Esto va en contra de lo referido en otros trabajos en que estudian el microbioma de las lesiones cutáneas de niños con DA, donde observan que la colonización por *S. aureus* produce una disbiosis y hace que haya menos diversidad en la piel afectada de estos pacientes¹³³. Una posible explicación es que el *S. aureus* solo habite a nivel nasal como reservorio sin producir disbiosis en esta localización, y que

sea solo a nivel cutáneo donde altera el microambiente y donde afecte a la gravedad de la enfermedad.

Respecto al cluster de pacientes en los que hemos observado un microbioma similar (**gráficos 11-12**), no hemos encontrado ninguna variable de las recogidas en nuestro estudio (como sexo, edad, antecedentes de alergias...) que justifiquen esta posible asociación. Probablemente exista alguna variable que actúe como factor común en todos ellos (tratamientos previos, etnia, tipo de parto o lactancia, mascotas, dieta...) y que nosotros no hayamos registrado en nuestro trabajo. Un dato que nos parece interesante a destacar, es que todos los pacientes de este cluster tenían en su microbioma una abundancia relativa de *oscillospira* representativa (**tablas 14 y 15**), y todos ellos tenían un IMC normal a excepción de dos de ellos que tenían sobrepeso u obesidad (control 18 y 23) y que son los que se sitúan en los extremos izquierdo y derecho respectivamente de la gráfica del cluster (**gráfico 13**). Sin embargo, no podemos olvidar que la microbiota es una comunidad dinámica, y que por el momento solo podemos postular hipótesis. Hacen falta más investigaciones que corroboren estos hallazgos y saber si en un futuro podemos aprovechar estos conocimientos para transformarlos en tratamientos contra la obesidad infantil o diferentes enfermedades de la esfera atópica como la DA.

Tabla 14: Tabla con los valores expresados en tanto por uno de la abundancia relativa de los diferentes géneros en cada caso estudiado (género *oscillospira* de los pacientes del cluster destacados en azul)

Taxon	caso9	caso8	caso6	caso21	caso19	caso17	caso16	caso12
Oscillospira	0,039303091	0,04613632	0	0,006474025	5,46E-05	0,009440104	8,76E-05	0,042366479
Prevotella	0,00842001	0,044554142	2,16E-05	0,012474341	0,000218221	0,005859375	0	0,012436799
Ruminococcus	0,004574192	0,014302892	0	0,011526922	0	0,006510417	0	0
Lactobacillus	0,022171722	0,005759129	0	0,008526765	5,46E-05	0,002848307	0	0
Bacteroides	0,043993823	0,005505981	0	0,005210801	0,000272777	0,020263672	4,38E-05	0,046608938
Blautia	0	0,004240238	0	0	0	0,003011068	4,38E-05	0
Odoribacter	0,025813594	0,003733941	0	0,002210643	5,46E-05	0,001220703	0	0,016214331
Stenotrophomonas	0,000932319	0,002468198	0	0	0	0,001302083	0	0,001859708
Staphylococcus	0	0,002151763	0,073617906	0,417653561	0	0	0	0,007032022
Pseudomonas	0,048626286	0,001455604	0	0	0,000218221	0,002115885	0,588044668	0,015923752
Propionibacterium	0,013256417	0,000759446	6,49E-05	0,007579346	0	0,001139323	0	0,003835648
Acinetobacter	0	0,000316436	0	0	0	8,14E-05	0	0
Corynebacterium	0,00011654	6,33E-05	0,104809732	0	0,013311511	0,585123698	0	0,008717382
Alloiococcus	0	6,33E-05	0,796917615	0	0,081833061	0	0	0
Streptococcus	0	6,33E-05	2,16E-05	0	0	0,010498047	0,000262755	0
Yersinia	0,28898989	0,001265743	0	0	0	0	0	0

Tabla 15: Tabla con los valores expresados en tanto por uno de la abundancia relativa de los diferentes géneros en cada control estudiado (género *oscillospira* de los pacientes del cluster destacados en azul)

Taxon	control7	control5	control23	control22	control20	control18	control15	control14	control13	control10
Oscillospira	0	0,002489368	0,001433349	0,004854737	0,000477286	0,003625232	0	0,009802646	0	0,000240471
Prevotella	0	0,003163572	0	0,001896382	0,00216948	0,001530653	0	0,00373021	3,06E-05	0,001803535
Ruminococcus	0	0,002074474	0,000955566	0,000379276	0,000260338	0,001772335	0	0,001604858	0	0,000120236
Lactobacillus	0	0	0,001672241	0,003868619	0,000694234	0,000805607	0	0,000824116	3,06E-05	0,000360707
Bacteroides	0	0	0,000955566	0,002048092	0,00104135	0,00112785	0	0,003816959	6,11E-05	0,002044006
Blautia	0	0	0	0	0,000390506	0,001208411	0	0	0	0
Odoribacter	0	0,00140027	0,000238892	0,002275658	4,34E-05	0,004833642	0	0,002732596	0	0
Stenotrophomonas	0	0	0,000238892	0,000455132	0	0	0	0,00047712	0	0,007454611
Staphylococcus	0,664276808	0	0	0,000455132	0,000130169	0	0	4,34E-05	0	0,488998437
Pseudomonas	0	0	0	0,000606842	0,951273485	0,000966728	0	0,013532856	0	0,252013947
Propionibacterium	0	0,000881651	0,005494505	0,001668816	8,68E-05	0,844759526	2,30E-05	0	6,11E-05	0,015750872
Acinetobacter	0	0,000103724	0	0,000910263	0	0,000241682	0	0,000390371	0	0,017313935
Corynebacterium	0	0	0	0	0	0,000161121	0	0	0,031836236	0,002524949
Alloiococcus	0	5,19E-05	0	0	0	0	0	0	0	0
Streptococcus	0,182564422	0,934809667	0,000716675	0,000455132	0,00637827	0,002980746	0,53713918	0,000173498	0,125145127	0,000120236
Yersinia	0	0	0,000716675	0	0	0,040441473	0	0	0	0

VII.3. Aplicabilidad del estudio

Con ese trabajo podemos apoyar la hipótesis de que ser atópico comporta más riesgo de colonización nasal por *S. aureus*, si bien no podemos afirmar que la colonización a este nivel se asocie a mayor gravedad de la enfermedad, como ocurre con la colonización de las lesiones del eccema atópico.

En la literatura existe controversia sobre la utilización de terapia antiestafilocócica para la DA. De hecho, se ha visto que la sobreutilización de antibióticos ha dado lugar a la aparición de resistencias, y también puede producir desequilibrios en la microbiota, por lo que deben evitarse cuando no son necesarios. Sin embargo, cuando existe sobreinfección de las lesiones, el tratamiento antibacteriano puede tener implicaciones terapéuticas mejorando la severidad y las infecciones secundarias, pero debemos tener en cuenta que los beneficios de la antibioterapia son transitorios, y la resistencia antibiótica sigue representando un problema a largo plazo.

Por ello, antes de dar estos tratamientos, es importante conocer el perfil microbiológico del *S. aureus* nasal en nuestra comunidad con la realización de estudios como el de esta tesis. También es conveniente un adecuado análisis microbiológico tanto de piel como de reservorios nasales con estudio de la sensibilidad antimicrobiana en niños con DA para una terapia efectiva y adecuada en caso de ser necesaria.

Hasta hace pocos años no existían publicaciones que relacionasen la influencia de la flora cutánea y nasal en la salud de la piel y su respuesta inmune, y los trabajos publicados se centraban solamente en los microorganismos patógenos. Gracias a trabajos como este podemos empezar a conocer mejor el desequilibrio del ecosistema que ocurre en la DA, y comprender mejor así su etiopatogenia. Además futuros avances en terapias que modulen esta disbiosis, dirigidas no solo a inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, sino favorecer el de comensales, seguramente podrán ser útiles en el manejo de estos pacientes.

VII.4. Limitaciones del estudio

A pesar de no existir ningún riesgo de selección relevante, el diseño de este estudio no está planteado para asegurar una inclusión homogénea de pacientes, puesto que el muestreo se realizó de forma consecutiva en los pacientes, y no de forma aleatoria.

Este trabajo no permite estimar la incidencia debido a que partimos de un grupo de casos y controles seleccionado, por ello, el estimador de la magnitud de asociación utilizado es la *odds ratio* y no el riesgo relativo.

Un posible factor de confusión contemplado en este estudio es la edad, la cual ha sido minimizada mediante el análisis adecuado (estratificación y análisis multivariante). También existe la posibilidad de otros factores de confusión que no hayan sido tenidos en cuenta, como los tratamientos recibidos para la DA.

La reducida frecuencia de ciertas variables como las alergias alimentarias en la muestra no permiten demostrar significación estadística en algunas diferencias observadas. Esto podría haberse minimizado aumentando el tamaño muestral.

El estudio se realizó durante todo el año sin tener en cuenta la estación en la que se encontraban en el momento de la recogida, por lo que no se puede detectar si existen cambios en la colonización secundarios a la estacionalidad.

A la hora de recoger los antecedentes familiares y personales de asma, rinitis o alergias, normalmente se indaga más en los niños con DA y a su vez, estos tienden a recordarlos mejor, por lo que es posible que haya existido un sesgo de información.



VIII. CONCLUSIONES

- 1- La colonización nasal por *S. aureus* es mayor en niños con DA que en niños sanos.
- 2- La DA se asocia de forma independiente a la colonización nasal por *S. aureus*
- 3- La colonización nasal por *S. aureus* no se ha asociado a mayor gravedad de la enfermedad ni a alteraciones del sueño.
- 4- Los niños con DA tienen más antecedentes familiares de DA y asma, así como más antecedentes personales de rinitis, asma y de alergias alimentaria al huevo.
- 5- Se han observado altas tasas de obesidad infantil en la población estudiada, mientras que en los niños con DA el IMC es menor.
- 6- Los niños en la franja de edad 6-9 años fueron los que tuvieron más riesgo de estar colonizados, y con tendencia a disminuir al acercarse a la adolescencia/ edad adulta.
- 7- Las tasas de resistencia antibiótica del *S. aureus* es similar en casos y controles.
- 8- Ser portador nasal de *S. aureus* se correlaciona negativamente con la frecuencia de colonización por otros gérmenes en los cultivos clásicos, lo que sugiere un antagonismo microbiológico.
- 9- El estudio de secuenciación masiva nos permite detectar una gran diversidad de flora, destacando la pérdida de protagonismo del *S.aureus*, en contraposición con lo que ocurre con los medios de cultivo habituales.
- 10- Hemos observado una mayor proporción del género *oscillospira* en casos que en controles, asociado a una tendencia a menor IMC, así como, un cluster de pacientes con un microbioma similar sin haber podido relacionarlo con ninguna de las variables recogidas en el estudio.



IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Conde-Taboada A, González-Barcala FJ, Toribio J. Dermatitis atópica infantil: revisión y actualización. *Actas Dermosifiliogr.* 2008;99:690-700
2. Wise F, Sulzberger MB. Editorial remarks. En: *Year book of dermatology and syphilology.* Chicago: Year book Medical Publisher; 1933. p. 59 [citado en Simpson EL, Hanifin JM. Atopic dermatitis. *Med Clin N Am.* 2006;90:149-67].
3. Johansson SGO, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113:832-6.
4. Zheng T, Yu J, Oh MH, Zhu Z. The atopic march: Progression from atopic dermatitis to allergic rhinitis and asthma. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2011;3:67-73.
5. Spergel JM, Paller AS. Atopic dermatitis and the atopic march. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112:S118-27.
6. Allen KJ, Dharmage SC. The role of food allergy in the atopic march. *Clin Exp Allergy.* 2010;40:1439-41.
7. Bieber T. Mechanisms of Disease Atopic Dermatitis. *N Engl J Med* 2008;358:1483-94.
8. Mortz CG, Lauritsen JM, Bindslev-Jensen C, Andersen KE. Prevalence of atopic dermatitis in adolescents. The Odense Adolescence Cohort Study on Atopic Diseases and Dermatitis. *Br J Dermatol.* 2001;144:523-32.
9. Williams HC. Atopic dermatitis. *N Engl J Med.* 2005;352:2314-24.
10. Silverberg NB1, Silverberg JI2. Inside out or outside in: does atopic dermatitis disrupt barrier function or does disruption of barrier function trigger atopic dermatitis?. *Cutis.* 2015 ;96:359-61.
11. De Benedetto A, Kubo A, Beck LA. Skin barrier disruption: A requirement for allergen sensitization? *J Invest Dermatol.* 2012;132:949-63.
12. Brown SJ, McLean WH. One remarkable molecule: Filaggrin. *J Invest Dermatol.* 2012;132:751-62.
13. McAleer MA, Irvine AD. The multifunctional role of filaggrin in allergic skin disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131:280-91.
14. Gruber R, Elias PM, Crumrine D, Lin T-K, Brandner JM, Hachem J-P, et al.

Filaggrin genotype in ichthyosis vulgaris predicts abnormalities in epidermal structure and function. *Am J Pathol.* 2011;178:2252-63.

15. Irvine AD, McLean WHI, Leung DYM. Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases. *N Engl J Med.* 2011;365:1315-27.

16. Kezic S, O'Regan GM, Lutter R, Jakasa I, Koster ES, Saunders S, et al. Filaggrin loss-of-function mutations are associated with enhanced expression of IL-1 cytokines in the stratum corneum of patients with atopic dermatitis and in a murine model of filaggrin deficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129:1031-9,e1.

17. Homey B, Steinhoff M, Ruzicka T, Leung DYM. Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118:178-89.

18. Alcalá Pérez D, Montserrat Gómez Molinar V, Jurado Santa Cruz F. Receptores tipo Toll en dermatología. *Rev Cent Dermatol Pascua.* 2013; 22.

19- Yamanaka K, Mizutani H. "Inflammatory skin march": IL-1-mediated skin inflammation, atopic dermatitis, and psoriasis to cardiovascular events. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136:823-4.

20- Hjuler KF, Böttcher M, Vestergaard C, Deleuran M, Raaby L, Bøtker HE, et al. Increased Prevalence of Coronary Artery Disease in Severe Psoriasis and Severe Atopic Dermatitis. *Am J Med.* 2015;128:1325-34.

21. Nagel G, Koenig W, Rapp K, Wabitsch M, Zoellner I, Weiland SK. Associations of adipokines with asthma, rhinoconjunctivitis and eczema in German schoolchildren. *Pediatr Allergy Immunol.* 2009; 20:81-8.

22. Leung DY, Bieber T. Atopic dermatitis. *Lancet.* 2003;361: 151-60

23. Kato A, Fukai K, Oiso N, Hosomi N, Murakami T, Ishii M. Association of SPINK5 gene polymorphisms with atopic dermatitis in the Japanese population. *Br J Dermatol.* 2003;148:665-9.

24. Irvine AD, McLean WH. Breaking the (un)sound barrier: filaggrin is a major gene for atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2006;126:1200-2.

25. Armengot-Carbo M, Hernández-Martín A, Torrelo A. Filagrina: papel en la barrera cutánea y en el desarrollo de patología. *Actas Dermosifiliogr.* 2015;106:86-95

26. Brown SJ, Relton CL, Liao H, Zhao Y, Sandilands A, McLean WHI, et al. Filaggrin haploinsufficiency is highly penetrant and is associated with increased severity of: Further delineation of the skin phenotype in a prospective epidemiological study of 792 school children. *Br J Dermatol.* 2009;161:884-9.

27. Marenholz I, Nickel R, Rüschemdorf F, Schulz F, Esparza-Gordillo J, Kerscher T, et

- al. Filaggrin loss-of-function mutations predispose to phenotypes involved in the atopic march. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118:866-71.
28. Weidinger S, O'Sullivan M, Illig T, Baurecht H, Depner M, Rodriguez E, et al. Filaggrin mutations, atopic eczema, hay fever, and asthma in children. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121:1203-9, e1.
29. Brown SJ, Asai Y, Cordell HJ, Campbell LE, Zhao Y, Liao H, et al. Loss-of-function variants in the filaggrin gene are a significant risk factor for peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127:661-7.
30. Ying S, Meng Q, Corrigan CJ, Lee TH. Lack of filaggrin expression in the human bronchial mucosa. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118:1386-8.
31. De Benedetto A, Qualia CM, Baroody FM, Beck LA. Filaggrin expression in oral, nasal, and esophageal mucosa. *J Invest Dermatol.* 2008;128:1594-7.
32. Bowcock A, Cookson WOCM. The genetics of psoriasis, psoriatic arthritis and atopic dermatitis. *Hum Mol Genet.* 2004;13:s43-s55.
33. Ricci G, Patrizi A, Baldi E, Menna G, Tabanelli M, Masi M. Long-term follow up of atopic dermatitis: retrospective analysis of related risk factors and association with concomitant allergic diseases. *J Am Acad Dermatol.* 2006;55:765-71.
34. Gdalevich M, Mimouni D, David M, Mimouni M. Breast-feeding and the onset of atopic dermatitis in childhood: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *J Am Acad Dermatol.* 2001;45:520-7.
35. Flohr C, Pascoe D, Williams HC. Atopic dermatitis and the «hygiene hypothesis»: too clean to be true? *Br J Dermatol.* 2005;152:202-16.
36. Barnetson RS, Rogers M. Childhood atopic eczema. *BMJ.* 2002;324:1376-9.
37. Febrer-Bosch I. Dermatitis atópica clínica. En: Fonseca Capdevila, editor. *Dermatitis atópica.* Madrid: Drug Farma, SL; 2002. p. 75-83.
38. Holm EA, Wulf HC, Stegmann H, Jemec GBE. Life quality assessment among patients with atopic eczema. *Br J Dermatol.* 2006;154:719-25.
39. Hon KL, Leung TF, Wong Y, Fok TF. Lesson from performing SCORADs in children with atopic dermatitis: subjective symptoms do not correlate well with disease extent or intensity. *Int J Dermatol.* 2006;45:728-30
40. Moore K, David TJ, Murray CS, Child F, Arkwright PD. Effect of childhood eczema and asthma on parental sleep and well-being: a prospective comparative study. *Br J Dermatol.* 2006;154: 514-8.
41. Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol*

- (Stockh). 1980; Suppl 92:44-7.
42. Eichenfield LF1, Hanifin JM, Luger TA, Stevens SR, Pride HB. Consensus conference on pediatric atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol.* 2003 ;49:1088-95.
43. Baselga E. Tratamiento de la dermatitis atópica en la infancia. *Actas Dermosifiliogr* 2003;94:345-55.
44. Saeki H, Nakahara T, Tanaka A, Kabashima K, Sugaya M, Murota H. Clinical Practice Guidelines for the Management of Atopic Dermatitis 2016. *J Dermatol.* 2016;43:1117-45.
45. Barbarot S, Bernier C, Deleuran M, De Raeve L, Eichenfield L, El Hachem M, et al: Therapeutic Patient Education in Children with Atopic Dermatitis: Position Paper on Objectives and Recommendations. *Pediatric Dermatology Vol.* 2013; 2:199–206.
46. Berth-Jones J, Damstra RJ, Golsch S, Livden JK, Van Hootehem O, Allegra F, et al, Multinational Study Group. Twice weekly fluticasone propionate added to emollient maintenance treatment to reduce risk of relapse in atopic dermatitis, double blind, parallel group study. *BMJ.* 2003;326:1367.
47. Peserico A, Städtler G, Seastian M, Fernández RS, Vick K, Bieber T. Reduction of relapses of atopic dermatitis with methylprednisolone aceponate cream twice weekly in addition to maintenance treatment with emollient: a multicentre, randomized, double-blind, controlled study. *Br J Dermatol.* 2008;158:801-7.
48. Stalder JF, Fleury M, Sourisse M, Rostin M, Pheline F, Litoux P. Local steroid therapy and bacterial skin flora in atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 1994;131:536-40.
18. Williams HC. Atopic dermatitis. *N Engl J Med.* 2005;352: 2314-24.
49. Verbist I. The antimicrobial activity of fucidic acid. *J Animicrob Chemother.* 1990;25 Suppl B:1-5.
50. Grimalt R, Mengeaud V, Cambazard F, Study Investigator's Group. The steroid-sparing effect of an emollient therapy in infants with atopic dermatitis: a randomized controlled study. *Dermatology.* 2007;214:61-7.
51. Eichenfield LF, McCollum A, Msika P. The benefits of sunflower oleodistillate (SOD) in pediatric dermatology. *Pediatr Dermatol.* 2009;26:669-75.
52. Ashcroft DM, Dimmoc P, Garside R, Stein K, Williams HC. Efficacy and tolerability of topical pimecrolimus and tacrolimus in the treatment of atopic dermatitis: meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ.* 2005;330:516.
53. Breneman D, Fleischer AB Jr, Abramovits W, Zeichner J, Gold MH, Kirsner RS, et al. Intermittent therapy for flare prevention and long-term disease control in stabilized

- atopic dermatitis: a randomized comparison of 3-times-weekly applications of tacrolimus ointment versus vehicle. *J Am Acad Dermatol*. 2008;58:990-9.
54. Zuberbier T, Bräutigam M. Long-term management of facial atopic eczema with pimecrolimus cream 1 % in paediatric patients with mild to moderate disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2008;22:718-21.
55. Hanifin JM, Cooper KD, Ho VC, Kang S, Krafchik BR, Margolis DJ, et al. Guidelines of care for atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*. 2004;50:391-404.
56. Akdis CA, Akdis M, Biber T, Bindslev-Jensen C, Boquniewicz M, Eigenmann P, et al; European Academy of Allergy and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergy and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL. Consensus Report. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118:152-69.
57. Schmitt J, Schakel K, Schmitt N, Meurer M. Systemic treatment of severe atopic eczema: a systematic review. *Acta Derm Venereol*. 2007;87:100-11.
58. Grüber C, Wendt M, Sulser C, Lau S, Kulig M, Wahn U, et al. Randomized, placebo-controlled trial of *Lactobacillus rhamnosus* GG as treatment of atopic dermatitis in infancy. *Allergy*. 2007;62:1270-6.
59. Taylor AL, Dunstan JA, Prescott SL. Probiotic supplementation for the first 6 months of life fails to reduce the risk of atopic dermatitis and increases the risk of allergen sensitization in high-risk children: a randomized controlled trial. *J Allergy Immunol*. 2007;119:184-91.
60. Guhl G, Díaz-Ley B, Fernández-Herrera J. Uso de fármacos biológicos en dermatosis fuera de la indicación aprobada. Segunda parte: etanercept, efalizumab, alefacept, rituximab, daclizumab, basiliximab, omalizumab y cetuximab. *Actas Dermosifiliogr*. 2008;99:5-33.
61. Fernández Vozmediano JM, Armario Hita JC. Nuevas perspectivas terapéuticas en dermatitis atópica. *Med Cutan Iber Lat Am* 2011;39:30-36.57.
62. Jacobi A, Antoni C, Manger B, et al. Infliximab in the treatment of moderate to severe atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*. 2005;52: 522–6.
63. Yayli S, Irla N, Yawalkar N. Adalimumab in recalcitrant severe psoriasis associated with atopic dermatitis. *Case Rep Dermatol*. 2013;5:332-5.
64. <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm549078.htm>
65. Lane JE, Cheyney JM, Lane TN, Kent DE, Cohen DJ. Treatment of recalcitrant

- atopic dermatitis with omalizumab. *J Am Acad Dermatol*. 2006;54:68-72.
66. Forman SB, Garrett AB. Success of Omalizumab as monotherapy in adult atopic dermatitis: case report and discussion of the high-affinity immunoglobulin E receptor, FcεpsilonRI. *Cutis*. 2007;80:38-40.
67. Krathen RA, Hsu S. Failure of omalizumab for treatment of severe adult atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*. 2005;53:338-40.
68. Beck LA, Saini S. Wanted: A study with omalizumab to determine the role of IgE-mediated pathways in atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*. 2006;55:540-1.
69. Cervantes-García E, García-González R, Salazar-Schettino PM. Características generales del *Staphylococcus Aureus*. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab* 2014; 61: 28-40.
70. Página web Public Health Image Library. URL <https://phil.cdc.gov/phil/details.asp>
71. Weidinger S, Rodríguez E, Stahl C, Wagenpfeil S, Klopp N, Illig T, et al. Filaggrin mutations strongly predispose to earlyonset and extrinsic atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2007;127:724-6.
72. Guzik TJ, Bzowska M, Kasproicz A, Czerniawska-Mysik G, Wojcik K, Szmyd D et al. Persistent skin colonization with *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis. Relationship to clinical and immunological parameters. *Clin Exp Allergy* 2005; 35:448-55.
73. Gong JQ, Lin L, Lin T, Hao F, Zeng FQ, Bi ZG et al. Skin colonization by *Staphylococcus aureus* in patients with eczema and atopic dermatitis and relevant combined topical therapy: A double-blind multicentre randomized controlled trial. *Br J Dermatol* . 2006; 155: 680-7.
74. De Benedetto A, Kubo A, Beck LA. Skin barrier disruption: A requirement for allergen sensitization? *J Invest Dermatol*. 2012;132:949-63.
75. Kezic S, O'Regan GM, Lutter R, Jakasa I, Koster ES, Saunders S, et al. Filaggrin loss-of-function mutations are associated with enhanced expression of IL-1 cytokines in the stratum corneum of patients with atopic dermatitis and in a murine model of filaggrin deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129:1031-9, e1.
76. Madison KC. Barrier function of the skin: «la raison d'être» of the epidermis. *J Invest Dermatol*. 2003;121:231-41.
77. Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, McLean WH. Filaggrin in the frontline: Role in skin barrier function and disease. *J Cell Sci*. 2009;122:1285-94.
78. Gilaberte Y, Sanmartín R, Aspiroz C, Hernández-Martin A, Benito D, Sanz-

Puertolas P, et al. Correlation between serum 25-hydroxyvitamin D and virulence genes of staphylococcus aureus isolates colonizing children with atopic dermatitis. *Pediatr Dermatol.* 2015;32:506-13.

79. Youssef DA, Miller CW, El-Abassi Am et al. Antimicrobial implications of vitamin D. *Dermatoendocrinol* 2001; 3:220-9.

80. Hata TR, Kkotol P, Jackson M et al. Administration of oral vitamin D induces cathelicidin production in atopic individuals. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 829-31.

81. Brauweiler AM, Bin L, Kim BE, Oyoshi MK, Geha RS, Goleva E, et al. Filaggrin-dependent secretion of sphingomyelinase protects against staphylococcal α - toxin induced keratinocyte death. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131:421-7, e2.

82. Cai SC, Chen H, Koh WP, Common JE, van Bever HP, McLean WH, et al. Filaggrin mutations are associated with recurrent skin infection in Singaporean Chinese patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 2012;166:200-3.

83. Gilaberte Y, Aspiroz C. Importancia del aislamiento y caracterización molecular de *Staphylococcus aureus* en los niños con dermatitis atópica. *Piel;* 2013; 28: 565-7.

84-Na Sy, Roh JY, Kim JM, Tamang MD, Lee JR. Analysis of colonization and genotyping of the exotoxins of *Staphylococcus aureus* in patients with atopic Dermatitis. *Ann Dermatol.* 2012; 24: 413-9.

85. López-Aguilera S, Goñi-Yeste MD, Barrado L y cols. Colonización nasal por *Staphylococcus aureus* en estudiantes de medicina: importancia en la transmisión hospitalaria *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013M 31;500-5.

86- Lin YT, Shau WY, Wang LF, Yang YH, Hwang YW, Tsai MJ, et al. Comparison of serum specific IgE antibodies to staphylococcal enterotoxins between atopic children withn an without atopic dermatitis. *Allergy* 2000; 55: 641-6

87. Boada A, Almeda J, Grenzner E, Pons-Vigués M, Morros R, Juvé R, et al. Prevalencia de portadores nasales de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* en atención primaria y factores asociados a la colonización. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015; 33: 451-7.

88. Lai Shan Chiu, Viola Chi Ying Chow, Julia Mei Lun Ling, Kam Lun Hon,. *Staphylococcus aureus* Carriage in the Anterior Nares of Close Contacts of Patients With Atopic Dermatitis. *Arch Dermatol.* 2010; 146:748-52.

89. Konno M, Baba S, Mikawa H, Hara K, Matsumoto F, Kaga K, Nishimura T et al. Study of upper respiratory tract bacterial flora: first report. Variations in upper respiratory tract bacterial flora in patients with acute upper respiratory tract infection

- and healthy subjects and variations by subject age. *J Infect Chemother* 2006; 12 : 83-96.
90. Cogen AL, Yamasaki K, Sanchez KM, Dorschner RA, Lai Y, MacLeod DT et al., "Selective antimicrobial action is provided by phenol-soluble modulins derived from staphylococcus epidermidis, a normal resident of the skin," *Journal of Investigative Dermatology* 2010; 130:192-200.
91. Zipperer A, Konnerth MC, Laux C, Berscheid A, Janek D, Weidenmaier C. Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature*. 2016;535:511-6.
92. Tang CS, Wang CC, Huang CF, Chen SJ, Tseng MH, Lo WT. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* in children with atopic dermatitis. *Pediatr Int*. 2011; 53:363-67.
93. Semic-Jusufagic A, Bachert C, Gevaert P, et al. *Staphylococcus aureus* sensitization and allergic disease in early childhood: population-based birth cohort study. *J Allergy Clin Immunol*. 2007; 119: 930-36.
94. Lomholt H, Andersen KE, Kilian M. *Staphylococcus aureus* clonal dynamics and virulence factors in children with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2005; 125: 977-82.
95. Hon KLE, Lam MCA, Leung TF, et al. Clinical features associated with nasal *Staphylococcus aureus* colonisation in Chinese children with moderate-to-severe atopic dermatitis. *Ann Acad Med Singapore*. 2005; 34:602-05.
96. Pattern of bacterial colonization of atopic dermatitis in saudi children. Bilal JA, Ahmad MI, Robaee AA, Alzolibani AA, Shobaili HA, Al-Khowailed MS. *J Clin Diagn Res*. 2013;7:1968-70
97. Broseta A, Chaves F, Rojo P, Otero JR. Emergencia de un clon de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina de origen comunitario en la población pediátrica del sur de Madrid. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006;24:31-5.
98. Garnacho-Saucedo G., Salido-Vallejo R. y Moreno-Giménez J.C. Actualización en dermatitis atópica. Propuesta de algoritmo de actuación. *Actas Dermosifiliogr*. 2013; 104:4-16.
99. Liesbeth Platzer M1, Carolina Aranís J2, Constanza Beltrán M2, Ximena Fonseca A2, Patricia García C3. Colonización nasal bacteriana en población sana de la ciudad de Santiago de Chile: ¿Existe portación de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente comunitario? *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello* 2010; 70: 109-116
100. Korting HC, Neubert U, Abeck D. Current antimicrobial susceptibility of

- cutaneous bacteria to first line antibiotics. *Int J Antimicrob Agents* 1998; 10:165–8.
101. Niebuhr M1, Mai U, Kapp A, Werfel T. Antibiotic treatment of cutaneous infections with *Staphylococcus aureus* in patients with atopic dermatitis: current antimicrobial resistances and susceptibilities. *Exp Dermatol*. 2008 Nov;17:953-7.
102. Montoya I, Mira M, Alvarez I, Cofré J, Cohen J, Donoso G, Torres JP. Resistencia inducible a clindamicina en *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. *Rev Chil Pediatr* 2009; 80: 48-53.
103. Kedzierska A, Kapinska-Mrowiecka M, Czubak-Macugowska M, Wojcik§ K, Kedzierska J. Susceptibility testing and resistance phenotype detection in *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with atopic dermatitis, with apparent and recurrent skin colonization. *British Journal of Dermatology*. 2008; 159:1290–9.
104. Conejo-Fernández AJ, Martínez-Chamorro MJ, Couceiro JA, Moraga-Llop FA, Baquero-Artigao F, Alvez F, et al. Documento de consenso SEIP-AEPAP-SEPEAP sobre la etiología, el diagnóstico y el tratamiento de las infecciones cutáneas bacterianas de manejo ambulatorio. *An Pediatr (Barc)*. 2016;84:121.e1-e10.
105. Ching-Shen T, Chih-Chien W, Ching-Feng H, Shyi-Jou C, Min-Hua T and Wen-Tsung L. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* in children with atopic dermatitis. *Pediatrics International* 2011; 53: 363–7.
106. Pascolini C, Sinagra J, Pecetta S, Bordignon V, De Santis A Cili L et al. Molecular and immunological characterization of *Staphylococcus aureus* in pediatric atopic dermatitis: implications for prophylaxis and clinical management. *Clin. Dev. Immunol*. 2011; 2011:718708
107. Elisabeth p.Chase, M, and April W. Armstrong, MD, MPH. Advances in Management of Atopic Dermatitis: New Therapies and Novel Uses of Existing Treatments. *Semin Cutan Med Surg* 2012; 31: 17-24.
108. Huang JT, Abrams M, Tlougan B, Rademaker A, Paller AS. Treatment of *Staphylococcus aureus* colonization in atopic dermatitis decreases disease severity. *Pediatrics*. 2009;123: e808-14.
109. Craig FE, Smith EV, Williams HC. Bleach baths to reduce severity of atopic dermatitis colonized by *Staphylococcus*. *Arch Dermatol*. 2010;146:541-3.
110. Bath-Hextall FJ, Birnie AJ, Ravenscroft JC, Williams HC. Interventions to reduce *Staphylococcus aureus* in the management of atopic eczema: an updated Cochrane review. *Br J Dermatol*. 2010;163:12-26.

111. Sharon Jacob, MD; Jeremiah Miller, MD; Elise M. Herro, MD. Atopic Dermatitis- A Historical Review. Supplement to Skin and Aging. 2011; 3-10.
112. Lai Y, Di Nardo A, Nakatsuji T, et al. Commensal bacteria regulate Toll-Like receptor 3- dependant inflammation alter skin injury. Nat Med. 2009; 15: 1377-82.
113. Skin microbiota: a source of disease or defence? Cogen AL, Nizet V, Gallo RL. Br J Dermatol. 2008;158:442-55.
114. Kong HH. Skin microbiome: genomics-based insights into the diversity and role of skin microbes. Trends Mol Med . 2011; 17: 320–28.
115. Jo JH, Kennedy EA, Kong HH. Research Techniques Made Simple: Bacterial 16S Ribosomal RNA Gene Sequencing in Cutaneous Research. Journal of Investigative Dermatology 2016; 136:e23-e27.
116. Gotelli NJ, Chao A. Measuring and estimating species richness, species diversity and biotic similarity from sampling data . Encyclopedia of Biodiversity. Nueva York: Ed. Elsevier; 2013. Segunda Edición
117. Grice EA, Kong HH, Conlan S, Deming CB, Davis J, Young AC, et al. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. Science 2009; 324: 1190–92.
118. Findley K, Oh J, Yang J, Conlan S, Deming C, Meyer JA. Human Skin Fungal Diversity Nature2013; 498:367-70. Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. Nature 2014 ; 514:59-64.
119. Dreno B, Araviiskaia E, Berardesca E, Gontijo G, Sanchez Viera M, Xiang LF, et al. Microbiome in healthy skin, update for dermatologists. JEADV 2016, 30, 2038–47
120. Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. Nat Rev Microbiol . 2011 April ; 9: 244–53.
121. Oh J, Conlan S, Polley EC, Segrel JA, Kong HH. Shifts in human skin and nares microbiota of healthy children and adults. Genome Medicine 2012, 4:77.
122. Baviera G, Leoni MC, Capra L, Cipriani F, Longo G, Maiello N. Microbiota in Healthy Skin and in Atopic Eczema. Biomed Res Int. 2014;2014: 436921.
123. Yan M, Pamp SJ, Fukuyama J, Hwang PH, Cho DY, Holmes S, et al. Nasal microenvironments and interspecific interactions influence nasal microbiota complexity and *S. aureus* carriage. Cell Host Microbe. 2013; 14: 631-40.
124. Bassis CM, Tang AL, Young VB, Pynnonen MA. The nasal cavity microbiota of healthy adults. Bassis et al. Microbiome 2014, 2:27.

125. Frank DN, Feazel LM, Bessesen MT, Price CS, Janoff EN, Pace NR. The human Nasal microbiota and *Staphylococcus aureus* carriage. *PLoS One*. 2010;5:e10598.
126. Mika M, Mack I, Korten I, Qi W, Aebi S, Frey U. Dynamics of the nasal microbiota in infancy: a prospective cohort study. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135:905-12.e11
127. Peterson SW, Knox NC, Golding GR, Tyler SD, Tyler AD, Mabon P, et al. A Study of the Infant Nasal Microbiome Development over the First Year of Life and in Relation to Their Primary Adult Caregivers Using cpn60 Universal Target (UT) as a Phylogenetic Marker. *PLoS One*. 2016;11:e0152493.
128. Kong HH, Segre JA. Skin Microbiome: Looking Back to Move Forward *J Invest Dermatol*. 2012; 132: 933-9.
129. Puig L. Psoriasis, artritis psoriásica y enfermedad de Crohn: circuitos de citocinas y papel de la disbiosis. *Actas Dermosifiliogr*. 2016;107:95-7.
130. Drago L, De Grandi R, Altomare G, Pigatto P, Rossi O, Toscano M. Skin microbiota of first cousins affected by psoriasis and atopic dermatitis. *Clin Mol Allergy*. 2016; 14:2.
131. Ganju P, Nagpal S, Mohammed MH, Nishal Kumar P, Pandey R, Natarajan VT, et al. Microbial community profiling shows dysbiosis in the lesional skin of Vitiligo subjects. *Sci Rep* 2016;6:18761.
132. Akaza N, Akamatsu H, Numata S, Yamada S, Yagami A, Nakata S, et al. Microorganisms inhabiting follicular contents of facial acne are not only *Propionibacterium* but also *Malassezia* spp. *J Dermatol*. 2016; 43: 906-11.
133. Kong HH, Oh J, Deming C, Conlan S, Grice EA, Beatson MA. H. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome Research* 2012; 22:850-9.
134. Baviera G, Leoni MC, Capra L, Cipriani F, Longo G, Maiello N, et al. Microbiota en atopic eczema. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:436921.
135. Higaki S, Morohashi M, Yamagishi T, Hasegawa Y. Comparative study of staphylococci from the skin of atopic dermatitis patients and from healthy subjects. *Int J Dermatol* 1999; 38: 265–269.
136. Darabi K, Hostetler SG, Bechtel MA, Zirwas M. The role of *Malassezia* in atopic dermatitis affecting the head and neck of adults. *J Am Acad Dermatol* 2009; 60: 125–

137. Seite S, Flores GE, Henley JB, Martin R, Zelenkova H, Aguilar L. Microbiome of affected and unaffected skin of patients with atopic dermatitis before and after emollient treatment. *J Drugs Dermatol* 2014; 13: 1365–72.
138. Kubo, A., Nagao, K., and Amagai, M. Epidermal barrier dysfunction and cutaneous sensitization in atopic diseases. *J. Clin. Invest.* 2012; 122, 440–447.
139. Chavanas S, Bodemer C, Rochat A, Hamel-Teillac D, Ali M, Irvine AD, et al. Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. *Nat. Genet.* 2000; 25, 141–2.
140. Minegishi Y, Saito M, Tsuchiya S, Tsuge I, Takada H, Hara T, et al. Dominant negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature* 2007; 448, 1058–62.
141. Oh J, Freeman AF, Park M, Sokolic R, Candotti F, Holland SM, et al. NISC Comparative Sequencing Program. The altered landscape of the human skin microbiome in patients with primary immunodeficiencies. *Genome Res.* 2013; 23, 2103–14.
142. Lacouture, M.E. Mechanisms of cutaneous toxicities to EGFR inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* 2006; 6, 803–12.
143. Eilers RE., Gandhi M, Patel JD, Mulcahy MF, Agulnik M, Hensing T et al. Dermatologic infections in cancer patients treated with epidermal growth factor receptor inhibitor therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 2010;102, 47–53.
144. Lichtenberger BM, Gerber PA, Holcman M, Buhren BA, Amberg N, Smolle V, et al. Epidermal EGFR controls cutaneous host defense and prevents inflammation. *Sci. Transl. Med.* 2013; 5:199ra111.
145. Kobayashi T, Glatz m, Horiuchi K, Kawasaki H, Akiyama H, Kaplan DH. Dysbiosis and Staphylococcus aureus Colonization Drives Inflammation in Atopic Dermatitis. *Immunity* 2015;42 .756–66.
146. Blaydon DC, Biancheri P, Di WL, Plagnol, V, Cabral RM, Brooke MA, et al. Inflammatory skin and bowel disease linked to ADAM17 deletion. *N Engl. J Med.* 2011; 365, 1502–08.
147. Bianchi P, Theunis J, Casas C, Villeneuve C, Patrizi A, Phulpin C, et al. Effects of a New Emollient-Based Treatment on Skin Microflora Balance and Barrier Function in Children with Mild Atopic Dermatitis. *Pediatr Dermatol.* 2016;33:165-71.
148. Gueniche, A., Knautt, B., Schuck, E., Volz, T., Bastien, P., Martin, R., et al. Effects of nonpathogenic gram-negative bacterium *Vitreoscilla filiformis* lysate on

atopic dermatitis: A prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study *British Journal of Dermatology*, 2008; 159:1357-63.

149. Mahe YF, Perez MJ, Tacheau C, Fanchon C, Martin R, Rousset f, et al. Aqua Posae Filiformis, lysate of *Vitreoscilla filiformis* extract grown on la roche-posay spa water, stimulates innate skin defenses *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 2013; 6:191-6.

150. Nakatsuji T, Gallo RL. Dermatological therapy by topical application of non-pathogenic bacteria *Journal of Investigative Dermatology*, 2014;134: 11-14.

151. Martin H, Laborel-Préneron E, Fraysse F, Nguyen T, Schmitt AM, Redoulès D et al. *Aquaphilus dolomiae* extract counteracts the effects of cutaneous *S. aureus* secretome isolated from atopic children on CD4+ T cell activation. *Pharm Biol.* 2016;54:2782-85.

152. DeSantis TZ Jr, Hugenholtz P, Keller K, Brodie EL, Larsen N, Piceno YM, et al. NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. *Nucleic Acids Res.* 2006 ;34(Web Server issue):W394-9.

153. Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, et al. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 2009; 37 (Database issue):D141–5.

154. Ammerlaan HS, Kluytmans JA, Wertheim HF, Nouwen JL, Bonten MJ. Eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage: A systematic review. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 922-30.

155. Weidenmaier C, Goerke C, Wolz C. *Staphylococcus aureus* determinants for nasal colonization. *Trends Microbiol* 2012, 20: 243-50.

156. Na SY, Roh JY, Kim JM, Tamang MD, Lee JR. Analysis of Colonization and Genotyping of the Exotoxins of *Staphylococcus aureus* in Patients with Atopic Dermatitis. *Ann Dermatol.* 2012;24:413-9.

157. Leyden JJ, Marples RR, Kligman AM. *Staphylococcus aureus* in the lesions of atopic dermatitis. *BR J Dermatol* 1974; 90: 525-30

158. Ricci G, Patrizi A, Neri I, Bendandi B, Masi M. Frequency and clinical role of *Staphylococcus aureus* overinfection in atopic dermatitis in children. *Dermatol* 2003; 20: 389-92.

159. Chiu LS, Chow VC, Ling JM et al. *Staphylococcus aureus* carriage in the anterior nares of close contacts of patients with atopic dermatitis. *Arch Dermatol* 2010;146:748–752.

160. Gilani SJ, Gonzalez M, Hussain I et al. Staphylococcus aureus re-colonization in atopic dermatitis: beyond the skin. *Clin Exp Dermatol* 2005;30:10–13.
161. Lo WT1, Wang SR, Tseng MH, Huang CF, Chen SJ, Wang CC. Comparative molecular analysis of meticillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from children with atopic dermatitis and healthy subjects in Taiwan. *Br J Dermatol*. 2010;162:1110-6.
162. Antelo M, Magdalena P, Reboredo JC. Obesity: A major problem for Spanish minors. *Econ Hum Biol*. 2017;24: 61-73.
163. Estudio ALADINO 2015: Estudio de Vigilancia del Crecimiento, Alimentación, Actividad Física, Desarrollo Infantil y Obesidad en España 2015. Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Madrid, 2016
164. Ress K, Annus T, Putnik U, Luts K, Uibo R, Uibo O. Celiac disease in children with atopic dermatitis. *Pediatr Dermatol*. 2014;31:483-8.
165. Shiomori T, Yoshida S, Makishima K. Relationship of nasal carriage of Staphylococcus aureus to pathogenesis of perennial allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 449-54.
166. Bozzola CM. ¿La colonización nasal por Staphylococcus aureus tiene un papel en la permanencia de los síntomas de la rinitis persistente? *AAIC* 2003; 34; 2: 54-7.
167. Clement S, Vaudaux P, Francois P, Echrenzel J, Huggler E, Kampf S, et al. Evidence of an intracellular reservoir in the nasal mucosa of patients with recurrent Staphylococcus aureus rhinosinusitis. *J Inf Dis* 2005; 6: 1023-8.
168. Liu T, Wang BQ, Yang PC. A possible link between sinusitis and lower airway hypersensitivity, the role of staphylococcal. *Clin Mol Allergy*. 2006;4:7.
169. Cuevas o, Cercenado E, Goyanes MJ, Vindel A, Trincado P, Boquete T et al. Staphylococcus spp en España: situación actual y evolución de la resistencia a antimicrobianos (1986-2006). *Enf Infecc Microbil Clin*. 2008; 26:269-77.
170. Chaves F, Daskalaki M, Otero JR. Epidemiología de las infecciones por grampositivos multirresistentes. *Enf Infecc Microbiol Clin* 2008; 26 Supl 2: 4-12.
171. Informe de sensibilidad antimicrobiana . Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario de Alicante, 2016.
172. Fosch S, Yones C, Trossero M, Grosso O, Napote A. Portación nasal de Staphylococcus aureus en individuos de la comunidad: factores epidemiológicos. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2012; 46 : 59-67.

173. Hong SW1, Kim KS1, Surh CD2. Beyond Hygiene: Commensal Microbiota and Allergic Diseases. *Immune Netw.* 2017;17:48-59.
174. Aguirre E, Galiana A, Mira A, Guardiola R, Sánchez-Guillén L, Garcia-Pachon E. et al. Analysis of microbiota in stable patients with chronic obstructive pulmonary disease. *APMIS.* 2015;123:427-32.
175. Tun HM, Konya T, Takaro TK, Brook JR, Chari R, Field CJ, et al. Exposure to household furry pets influences the gut microbiota of infant at 3-4 months following various birth scenarios. *Microbiome.* 2017 6;5:40.





ANEXO I: SCORAD (SCORing Atopica Dermatitis)

a) Extensión: La superficie corporal se divide en cuatro segmentos (cabeza y cuello, tronco, extremidades superiores, extremidades inferiores) a los cuales se asigna un porcentaje en función de la superficie que representan. Siguiendo el esquema abajo indicado se realiza el cálculo de la superficie afecta.

b) Intensidad: Los signos clínicos que se evalúan son eritema, edema/pápulas, exudación/costras, excoriación, liquenificación y xerosis. En función de la intensidad de cada uno de los factores se le asigna un valor: 0 (ausencia), 1 (leve), 2 (moderado), 3 (grave).

c) Síntomas subjetivos: Basándose en la escala visual (0-10) se valora la presencia de prurito y de pérdida de sueño.

La puntuación se obtiene siguiendo la fórmula: **SCORAD= A/5+ 7B/2+ C**

Una puntuación SCORAD < 15 se considera DA leve, entre 15-40 DA moderada y > 40 DA grave.

SCORAD
EUROPEAN TASK FORCE
ON ATOPIC DERMATITIS

Last Name First Name

Date of Birth: DD/MM/YY

Date of Visit:

INSTITUTION

PHYSICIAN

Topical Steroid used:
 Potency (brand name)
 Amount / Month (g)
 Number of flares / Month

Figures in parenthesis
for children under two years

A: EXTENT Please indicate the area involved

B: INTENSITY

CRITERIA	INTENSITY	MEANS OF CALCULATION
Erythema	<input type="text"/>	INTENSITY ITEMS (average representative area) 0= absence 1= moderate 3= severe * Dryness is evaluated on uninvolved areas.
Edema/Papulation	<input type="text"/>	
Oozing/crust	<input type="text"/>	
Excoration	<input type="text"/>	
Lichenification	<input type="text"/>	
Dryness*	<input type="text"/>	

C: SUBJECTIVE SYMPTOMS
PRURITUS + SLEEP LOSS

SCORAD A/5 + 7B + 2 + C

Visual analog scale (average for the last 3 days or nights)

PRURITUS (0 to 10)

SLEEP LOSS (0 to 10)

0 10

TREATMENT:

REMARKS:

ANEXO II: Criterios Diagnóstico de Hanifin y Rajka para Dermatitis Atópica (DA)

Criterios Mayores: Debe tener tres o más:

1. Prurito
2. Distribución y morfología típica
 - Liquenificación o linearidad flexional en adultos
 - Compromiso extensor y facial en infantes y niños
3. Dermatitis crónica o crónicamente recidivante
4. Historia personal o familiar de atopias (asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica)

Criterios Menores: Deben tener 3 o más de:

1. Xerosis
2. Ictiosis, hiperlinearidad palmar, o queratosis pilaris
3. Reactividad a pruebas cutáneas inmediata (tipo 1)
4. IgE sérico elevado
5. Comienzo a temprana edad
6. Tendencia a infecciones cutáneas (especialmente *S. aureus* y herpes simplex) o defecto en la inmunidad mediada por células
7. Tendencia a dermatitis en manos y pies inespecíficas
8. Eczema del pezón
9. Queilitis
10. Conjuntivitis recurrente
11. Pliegue infraorbitario de Dennie-Morgan
12. Queratocono
13. Cataratas anterior subcapsular
14. Oscurecimiento orbitario (ojeras)
15. Eritema o palidez facial
16. Pitiriasis alba
17. Pliegues anteriores del cuello
18. Prurito al sudar (hipersudoración)
19. Intolerancia a lanas y solventes orgánicos
20. Acentuación perifolicular
21. Intolerancia a alimentos
22. Curso influenciado por factores ambientales o emocionales
23. Dermografismo blanco



ANEXO III: Criterios diagnósticos de DA
(Consenso de la “American Academy of Dermatology, 2003)*

Criterios esenciales

Deben estar presentes y si están todos son suficientes para el diagnóstico:

- Prurito
- Cambios eczematosos con patrones específicos según la edad: cara, cuello y superficie de extensión de miembros en lactantes y niños. Lesiones flexurales presentes o previas a cualquier edad. Respeto de pliegues axilares/inguinales
- Curso crónico, recidivante

Criterios importantes

Ayudan a avalar el diagnóstico.

- Edad de comienzo temprana
- Atopia (historia personal o familiar, hiperreactividad IgE)
- Xerosis

Criterios asociados

Ayudan a sugerir el diagnóstico.

- Queratosis pilar. Ictiosis vulgar. Hiperlinealidad palmar
- Respuestas vasculares atípicas (Por ej.: palidez facial, dermatografismo blanco, blanqueo retardado)
- Acentuación perifolicular/liquenificación/prurigo
- Cambios oculares/periorbitarios
- Lesiones periorales/periauriculares

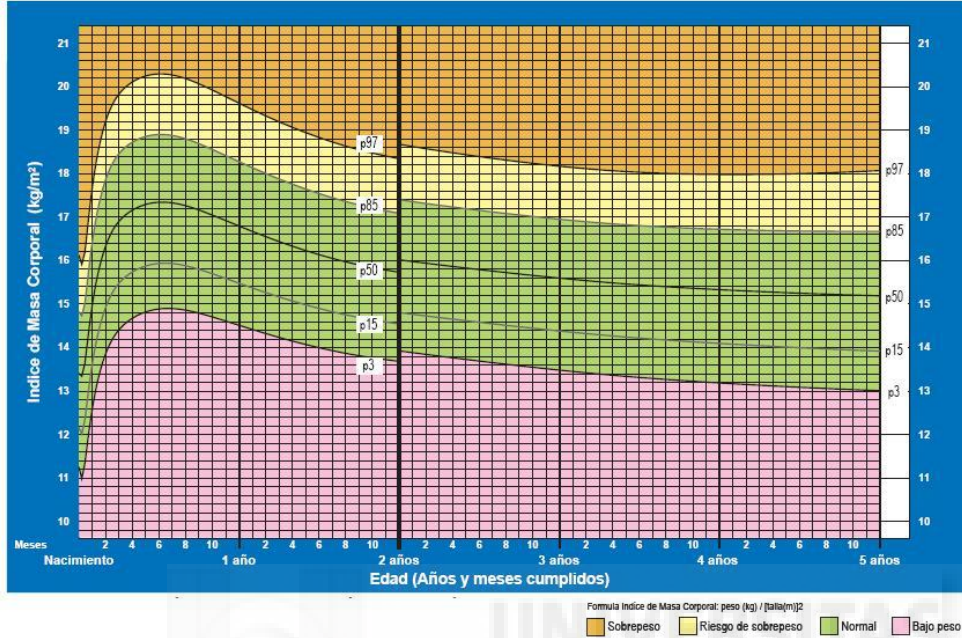
Diagnósticos de exclusión: escabiosis, dermatitis alérgica de contacto, dermatitis seborreica, ictiosis, linfoma cutáneo, psoriasis, fotodermatosis, inmunodeficiencia, eritrodermia por otras causas .



ANEXO IV: VALORES DE REFERENCIA DE IMC SEGÚN LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD

Índice de Masa Corporal - NIÑOS

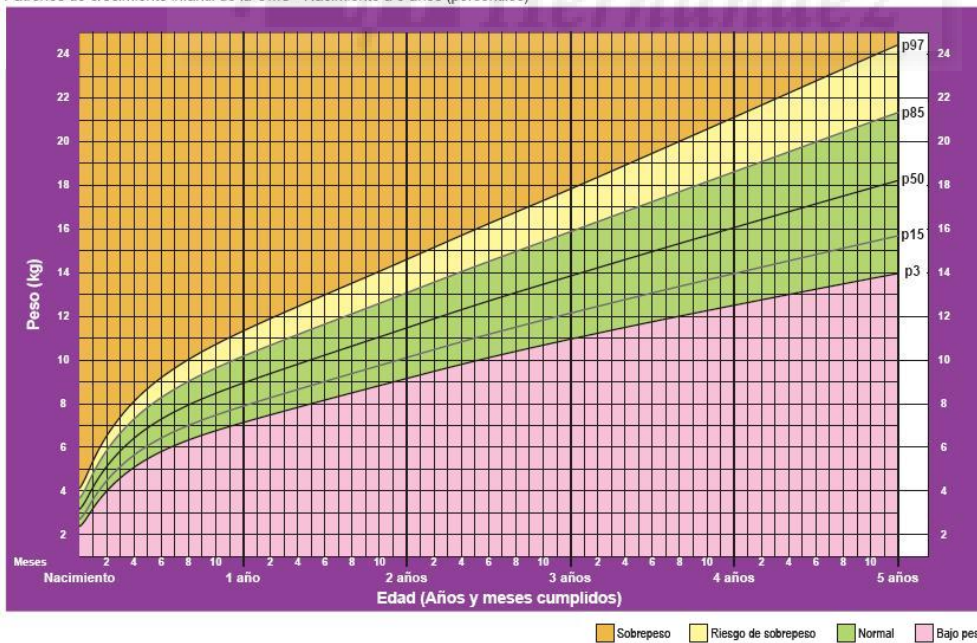
Patrones de crecimiento infantil de la OMS - Nacimiento a 5 años (percentiles)



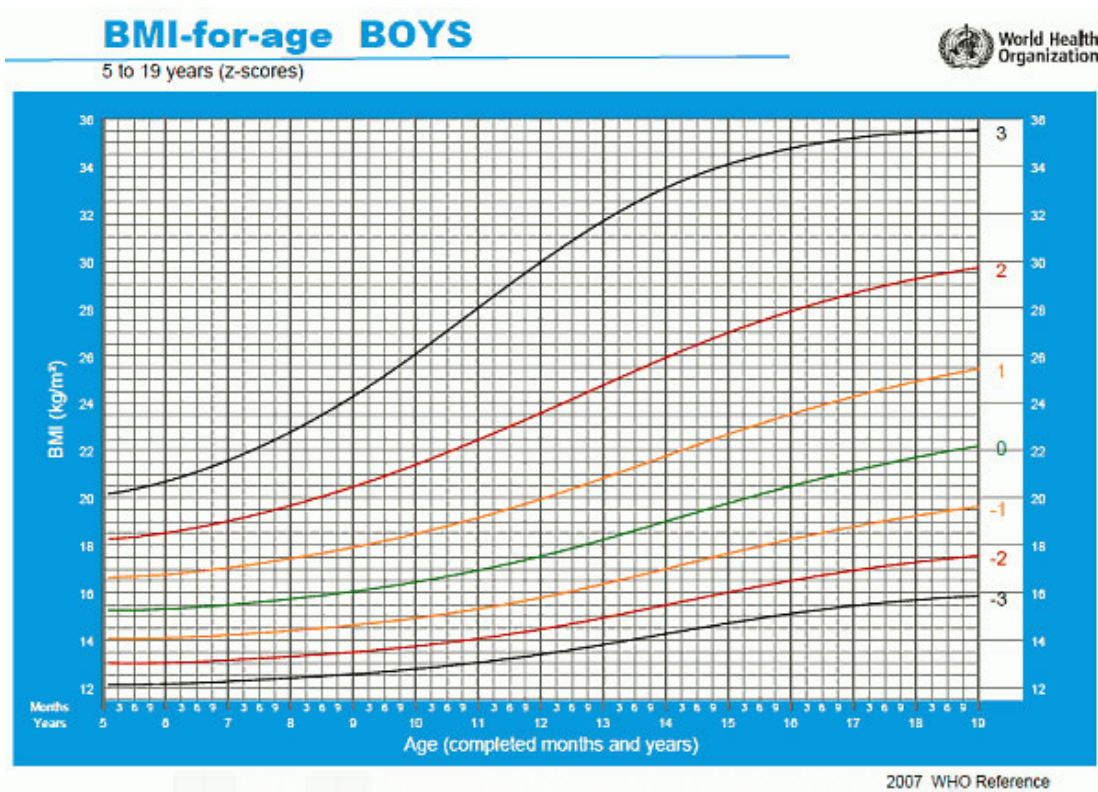
Valores de referencia de IMC en niños de 0-5 años.

Peso para la edad - NIÑAS

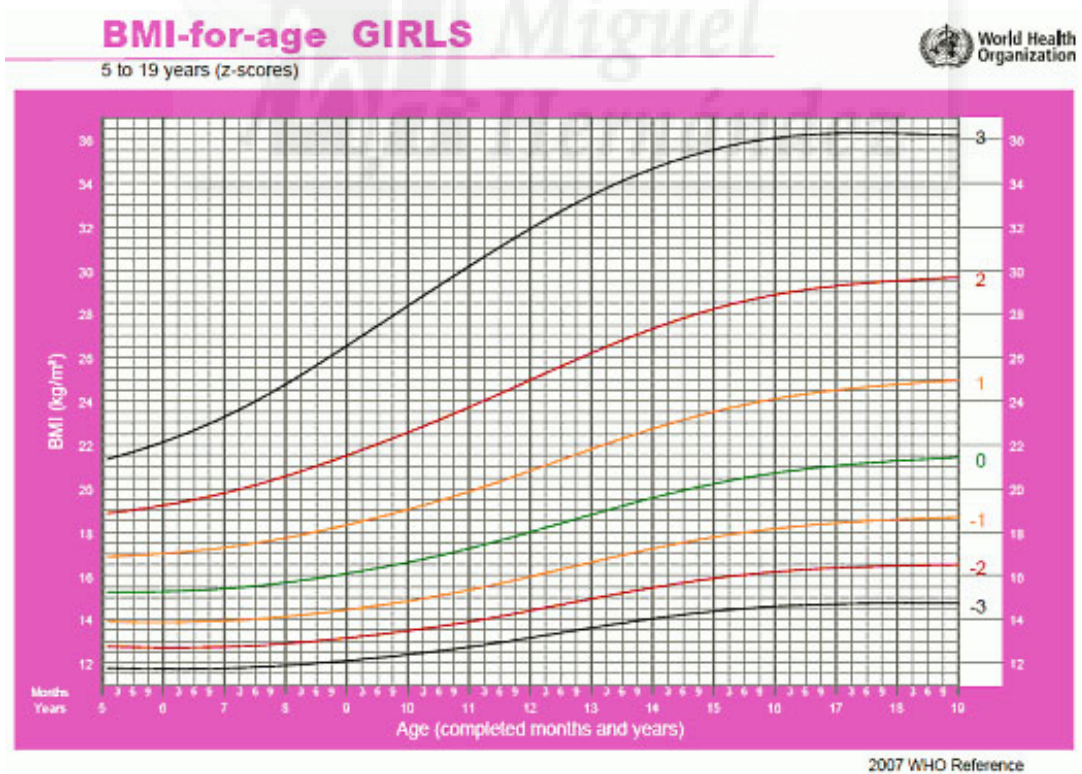
Patrones de crecimiento infantil de la OMS - Nacimiento a 5 años (percentiles)



Valores de referencia de IMC en niñas de 0-5 años.



Valores de referencia de IMC en niños de 5-19 años.



Valores de referencia de IMC en niñas de 5-19 años.

ANEXO V: HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO (*Padre /representante legal*)

Este Documento de Consentimiento Informado tiene dos partes:

- Información (proporciona información sobre el estudio)
- Formulario de Consentimiento (para obtener la firma si usted está de acuerdo en que su hijo pueda participar)

PARTE 1: HOJA DE INFORMACIÓN AL PARTICIPANTE INCLUIDO EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

Título del estudio:

“Estudio de *Staphylococcus aureus* nasal en niños con dermatitis atópica”

Investigador Principal:

Laura Berbegal de Gracia

Entidad donde se desarrolla la investigación o patrocinador.

Servicio de Dermatología, Hospital General Universitario de Alicante

Introducción:

Existen diversos estudios que han demostrado que la colonización nasal por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) en pacientes con Dermatitis Atópica (DA) es más elevada que en la población general, probablemente como resultado de la combinación de la disfunción de la barrera epidérmica y la alteración en su respuesta inmune. Dada la alta incidencia de la DA en los últimos años en los países industrializados y la implicación del *S. aureus* en la patogenia de esta enfermedad, es necesario constatar la frecuencia de la colonización nasal por *S.aureus* en estos pacientes y la relación con la gravedad, ya que podría tener implicaciones terapéuticas importantes. En este sentido, el departamento de Dermatología del Hospital General Universitario de Alicante está realizando un estudio titulado “**Estudio de *Staphylococcus aureus* nasal en niños con dermatitis atópica**”

Objetivos:

Este estudio tiene como objetivo analizar si la colonización nasal por *S. aureus* es mayor en niños con Dermatitis atópica (DA) que en niños sanos, y determinar la correlación clínica de esta colonización con la gravedad de la enfermedad.

Métodos:

Para ello se realizará un estudio analítico observacional prospectivo de casos (niños con DA) y controles (niños sin DA), donde se estudiará la frecuencia de la colonización nasal por *S. aureus*. Adicionalmente, se recogerán variables que pueden condicionar a esta enfermedad así como la severidad de los pacientes con DA mediante el SCORAD (Severity Scoring of Atopic Dermatitis) mediante la anamnesis y la exploración física, para estudiar si la colonización nasal se correlaciona con una mayor gravedad en estos pacientes.

La colonización significa que el microorganismo se encuentra entre la flora del paciente pero no causa enfermedad. Hasta el 30% de los sujetos sanos pueden estar colonizados por *S. aureus* de manera persistente o transitoria, convirtiéndose las narinas en el

principal reservorio. Para su estudio, se tomarán muestras del vestíbulo de ambas fosas nasales mediante un hisopo estéril. Para ello, se insertará en la fosa nasal hasta el punto de mayor resistencia correspondiente a los cornetes, aproximadamente 2 a 3 centímetros. Se rota el escobillón contra la mucosa nasal en 360° y se repetirá el proceso en fosa nasal contralateral. Posteriormente, la muestra se llevará en medio de transporte hasta el laboratorio de microbiología donde será sembrada en cultivada para la identificación bacteriana.

Confidencialidad y anonimización de datos:

El proyecto se realiza de acuerdo a las Normas de Buena Práctica clínica, la Declaración de Helsinki y la legislación vigente en España para proyectos de investigación. La información sobre los datos personales y de salud del paciente será incorporada y tratada en una base de datos informatizada cumpliendo con las garantías que establece la Ley de Protección de Datos de Carácter Personal y la legislación sanitaria.

PARTE 2: CONSENTIMIENTO INFORMADO

D./D^a. _____ como padre o representante legal del paciente _____ de _____ años de edad, con domicilio en _____, con DNI nº _____.

DECLARO:

Que el/la Dr./Dra. _____ Miguel _____, me ha explicado que:

- El Hospital General Universitario de Alicante realiza investigaciones para estudiar aspectos relacionados con la correlación entre la Dermatitis atópica y la colonización nasal de *Staphylococcus aureus*. Los resultados derivados de dichos proyectos de investigación podrán ser utilizados para la creación de protocolos de diagnóstico y seguimiento de pacientes con esta enfermedad.
- El procedimiento que se propone consiste en permitir recoger datos personales y médicos así como el estudio físico mediante exploración física básica y la realización de exploraciones complementarias como la recogida de frotis nasal para cultivo.
- El paciente no recibirá ninguna compensación económica ni otros beneficios, sin embargo si las investigaciones tuvieran éxito, podrían ayudar en el futuro al mejor manejo de éstos pacientes por parte de los clínicos responsables.
- El proyecto se realiza de acuerdo a las Normas de Buena Práctica clínica, la Declaración de Helsinki y la legislación vigente en España para proyectos de investigación. La información sobre los datos personales y de salud del paciente será incorporada y tratada en una base de datos informatizada cumpliendo con las garantías que establece la Ley de Protección de Datos de Carácter Personal y la legislación sanitaria.

- Si se decidiera revocar el consentimiento que ahora presto, los datos del paciente no serán utilizados en ninguna investigación después de la fecha en la que se haya retirado el consentimiento, si bien, los datos obtenidos hasta ese momento seguirán formando parte de la investigación.

Yo entiendo que:

La elección es voluntaria, y que puedo revocar el consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Otorgo el consentimiento para que el Hospital General Universitario de Alicante utilice los datos para investigaciones médicas, manteniendo siempre el anonimato y la confidencialidad de los datos.

He comprendido las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo y el facultativo que me ha atendido me ha permitido realizar todas las observaciones y me ha aclarado todas las dudas que le he planteado.

Observaciones:

Por ello, manifiesto que estoy satisfecho con la información recibida y en tales condiciones estoy de acuerdo y **consiento permitir el uso de mis datos clínicos y demográficos para investigación.**

En Alicante, ____ de _____ de 201__

Firma padre representante legal del paciente

Firma del médico responsable

DNI:

Fdo.: _____

Fdo.: _____

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO PARA PERMITIR EL USO DE MIS DATOS CLÍNICOS Y DEMOGRÁFICOS PARA INVESTIGACIÓN

D./D^a _____

Como padre o representante legal del paciente.

_____, de ____ años de edad, con domicilio en _____ DNI. nº _____ Revoco el consentimiento prestado en fecha _____, que doy con esta fecha por finalizado, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

En Alicante, _____ de _____ de 201__

Firma del padre o representante legal de paciente

DNI:

Fdo.: _____

Firma del médico responsable

Fdo.: _____

**Este documento se firmará por duplicado quedándose una copia el investigador y otra el padre/
representante legal del paciente**



ANEXO VI. HOJA DE RECOGIDA DE VARIABLES**CASO****CONTROL****Variables de identificación**

- **Número de registro:**
- **Número Historia Clínica:**
- **Sexo (hombre/mujer):**
- **Edad (años):**
- **Talla (cm):**
- **Peso (kg):**
- **IMC:**
- **IMC2:**

Variables explicativas

- **Antecedentes familiares atopia**
 - Rinitis (si/no)
 - Asma (si/no)
 - D.Atópica (si/no)
- **Antecedentes personales de atopia**
 - Antecedentes de rinitis (si/no)
 - Antecedentes de asma (si/no)
 - Alergias inhaladas a pólenes (si/no)
 - Alergias inhaladas a ácaros (si/no)
 - Alergias inhaladas a pelos de animales (si/no)
 - Alergias alimentarias a huevo (si/no)
 - Alergias alimentarias a frutos secos (si/no)
 - Alergias alimentarias a melocotón (si/no)
 - Alergias alimentarias a kiwi (si/no)

- Alergias alimentarias a proteínas de leche de vaca (si/no)
- Alergias alimentarias a marisco (si/no)
- Antecedentes personales de celiaquía (si/no)
- Alteraciones del sueño (si/no)
- Alteraciones del sueño (si/no)
- Antecedentes de celiaquía (si/no)

Variables de resultado

- **Tipo:** 1: Caso 2: Control
- **SCORAD:**
- **SCORAD 2:** : 1 no DA; 2 leve (0-14); 3 moderado (15-40); 4 grave (>40)
- **Colonización nasal por *S. aureus*** (si/no)
- **Sensibilidad antibiótica de las cepas de *S. aureus*:** 1: sensible; 2: resistente; 3: no recogido; 4: no aplicable por cultivo negativo.
 - Meticilina (1: sensible; 2: resistente; 3: no recogido; 4: no aplicable)
 - Amoxicilina/ácido clavulánico (1: sensible; 2: resistente; 3: no recogido; 4: no aplicable)
 - Penicilina (1: sensible; 2: resistente; 3: no recogido; 4: no aplicable)
 - Tetraciclina (1: sensible; 2: resistente; 3: no recogido; 4: no aplicable)
 - Eritromicina (1: sensible; 2: resistente; 3: no recogido; 4: no aplicable)
 - Clindamicina (1: sensible; 2: resistente; 3: no recogido; 4: no aplicable)
 - Gentamicina (1: sensible; 2: resistente; 3: no recogido; 4: no aplicable)
 - Tobramicina (1: sensible; 2: resistente; 3: no recogido; 4: no aplicable)
 - Amikacina (1: sensible; 2: resistente; 3: no recogido; 4: no aplicable)
 - Ciprofloxacino (1: sensible; 2: resistente; 3: no recogido; 4: no aplicable)
 - Levofloxacino (1: sensible; 2: resistente; 3: no recogido; 4: no aplicable)
 - Cotrimoxazol (1: sensible; 2: resistente; 3: no recogido; 4: no aplicable)
 - Rifampicina (1: sensible; 2: resistente; 3: no recogido; 4: no aplicable)
 - Vancomicina (1: sensible; 2: resistente; 3: no recogido; 4: no aplicable)
- **Colonización nasal por otras bacterias gram positivas potencialmente patógenas:** se categorizó en función de la presencia o ausencia de otras

- bacterias gram positivas en cultivo nasal diferentes a s.aureus en (si/no).
- Streptococcus Pneumoniae (si/no).
 - Streptococcus Pyogenes (si/no).
- **Colonización nasal por otras bacterias gram negativas potencialmente patógenas:** se categorizó en función de la presencia o ausencia de bacterias gram negativas en cultivo nasal en (si/no).
 - Moraxella catarrhalis (si/no).
 - Haemophilus influenza (si/no).
 - Enterobacterias spp (si/no).
 - Pseudomonas spp (si/no).
 - Acinetobacter spp (si/no).
- **Estudio microbioma nasofaríngeo:** se categorizó en función de presencia o ausencia de realización mediante secuenciación masiva del estudio del microbioma nasofaríngeo en (si/no).



ANEXO VII: HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO (*Padre o representante legal*)

Este Documento de Consentimiento Informado tiene dos partes:

- **Información** (proporciona información sobre el estudio)
- **Formulario de Consentimiento** (para obtener la firma si usted está de acuerdo en que su hijo pueda participar)

Título del estudio:

“Estudio de *Staphylococcus aureus* nasal en niños con dermatitis atópica”
(*Subapartado de estudio piloto del microbioma nasofaríngeo*)

Investigador Principal:

Laura Berbegal de Gracia

Entidad donde se desarrolla la investigación o patrocinador.

Servicio de Dermatología, Hospital General Universitario de Alicante

PARTE 1: HOJA DE INFORMACIÓN AL PARTICIPANTE INCLUIDO EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

Introducción:

Existen diversos estudios que han demostrado que la colonización nasal por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) en pacientes con Dermatitis Atópica (DA) es más elevada que en la población general, probablemente como resultado de la combinación de la disfunción de la barrera epidérmica y la alteración en su respuesta inmune. Por otra parte recientes estudios hablan de la alteración del microbioma nasofaríngeo como posibles factores implicados en esta enfermedad.

En la superficie cutánea cohabitan bacterias, hongos y parásitos que, en condiciones normales, constituyen un complejo ecosistema en permanente interacción con el huésped. Este ecosistema participa activamente en la doble función protectora de la piel, como barrera física e inmunológica. Por lo tanto, cuando el equilibrio del ecosistema se trastorna, se generan consecuencias negativas que predisponen y causan la aparición de enfermedades.

Dada la alta incidencia de la DA en los últimos años en los países industrializados y la posible implicación del microbioma en la patogenia de esta enfermedad, es necesario constatarlo a nivel nasofaríngeo, y compararlo con controles sanos, ya que podría tener implicaciones terapéuticas importantes. En este sentido, el departamento de Dermatología del Hospital General Universitario de Alicante está realizando un estudio piloto en 10 casos y 10 controles dentro del estudio titulado “**Estudio de *Staphylococcus aureus* nasal en niños con dermatitis atópica**”

Objetivos:

Este estudio tiene como objetivo analizar si el microbioma nasofaríngeo en niños con Dermatitis atópica (DA) es diferente al que presentan los niños sanos (controles), y generar una posible hipótesis de si esta correlación tiene alguna implicación en la patogenia de la enfermedad.

Métodos:

Para ello se realizará un estudio analítico observacional prospectivo de casos (niños con DA) y controles (niños sin DA), donde se estudiará la frecuencia de la colonización nasal por *S. aureus*. Adicionalmente, se recogerán variables que pueden condicionar a esta enfermedad así como la severidad de los pacientes con DA mediante el SCORAD (Severity Scoring of Atopic Dermatitis) mediante la anamnesis y la exploración física, para estudiar si la colonización nasal se correlaciona con una mayor gravedad en estos pacientes. Además en estos casos también se extraerá una muestra de aspirado nasofaríngeo por método asistido por vacío y se analizará mediante la técnica de secuenciación masiva en el laboratorio de microbiología.

La colonización significa que el microorganismo se encuentra entre la flora del paciente pero no causa enfermedad. Hasta el 30% de los sujetos sanos pueden estar colonizados por *S. aureus* de manera persistente o transitoria, convirtiéndose las narinas en el principal reservorio. Para su estudio, se tomarán muestras del vestíbulo de ambas fosas nasales mediante un hisopo estéril. Para ello, se insertará en la fosa nasal hasta el punto de mayor resistencia correspondiente a los cornetes, aproximadamente 2 a 3 centímetros. Se rota el escobillón contra la mucosa nasal en 360° y se repetirá el proceso en fosa nasal contralateral. Posteriormente, la muestra se llevará en medio de transporte hasta el laboratorio de microbiología donde será sembrada en cultivada para la identificación bacteriana.

Para el estudio del microbioma nasofaríngeo se introducirá un catéter dentro de la nariz, dirigido hacia atrás y hacia la apertura del oído externo, hasta llegar a la faringe posterior. Posteriormente, se introducirá 1-2 mL de solución salina estéril, y se aspirará con un jeringa para obtener la muestra de moco que se transportará al laboratorio de microbiología en un frasco estéril. El proceso puede ser molesto durante los segundos que dura el procedimiento; no supone ningún riesgo para el paciente.

Confidencialidad y anonimización de datos:

El proyecto se realiza de acuerdo a las Normas de Buena Práctica clínica, la Declaración de Helsinki y la legislación vigente en España para proyectos de investigación. La información sobre los datos personales y de salud del paciente será incorporada y tratada en una base de datos informatizada cumpliendo con las garantías que establece la Ley de Protección de Datos de Carácter Personal y la legislación sanitaria.

PARTE 2: CONSENTIMIENTO INFORMADO

D./D^a. _____ como padre o representante legal del paciente _____ de _____ años de edad, con domicilio en _____, con DNI nº _____.

DECLARO:

Que el/la Dr./Dra. _____, me ha explicado que:

- El Hospital General Universitario de Alicante realiza investigaciones para estudiar aspectos relacionados con la correlación entre la Dermatitis atópica y el microbioma nasofaríngeo. Los resultados derivados de dichos proyectos de investigación podrán ser utilizados para conocer mejor la patogenia de esta enfermedad.
- El procedimiento que se propone consiste en permitir recoger datos personales y médicos así como el estudio físico mediante exploración física básica y la realización de exploraciones complementarias como la recogida de muestras mediante aspirado nasofaríngeo.
- El paciente no recibirá ninguna compensación económica ni otros beneficios, sin embargo si las investigaciones tuvieran éxito, podrían ayudar en el futuro al mejor manejo de éstos pacientes por parte de los clínicos responsables.
- El proyecto se realiza de acuerdo a las Normas de Buena Práctica clínica, la Declaración de Helsinki y la legislación vigente en España para proyectos de investigación. La información sobre los datos personales y de salud del paciente será incorporada y tratada en una base de datos informatizada cumpliendo con las garantías que establece la Ley de Protección de Datos de Carácter Personal y la legislación sanitaria.
- Si se decidiera revocar el consentimiento que ahora presto, los datos del paciente no serán utilizados en ninguna investigación después de la fecha en la que se haya retirado el consentimiento, si bien, los datos obtenidos hasta ese momento seguirán formando parte de la investigación.

Yo entiendo que:

La elección es voluntaria, y que puedo revocar el consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Otorgo el consentimiento para que el Hospital General Universitario de Alicante utilice los datos para investigaciones médicas, manteniendo siempre el anonimato y la confidencialidad de los datos.

He comprendido las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo y el facultativo que me ha atendido me ha permitido realizar todas las observaciones y me ha aclarado todas las dudas que le he planteado.

Observaciones:

Por ello, manifiesto que estoy satisfecho con la información recibida y en tales condiciones estoy de acuerdo y **consiento permitir el uso de mis datos clínicos y demográficos para investigación.**

En Alicante, ____ de _____ de 201__

Firma padre representante legal del paciente

DNI:

Fdo.: _____

Firma del médico responsable

Fdo.: _____

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO PARA PERMITIR EL USO DE MIS DATOS CLÍNICOS Y DEMOGRÁFICOS PARA INVESTIGACIÓN

D./D^a _____

Como padre o representante legal del paciente.

_____, de ____ años de edad, con domicilio en _____ DNI. n° _____ Revoco el consentimiento prestado en fecha _____, que doy con esta fecha por finalizado, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercute en mis cuidados médicos.

En Alicante, _____ de _____ de 201__

Firma del padre o representante legal de paciente

DNI:

Fdo.: _____

Firma del médico responsable

Fdo.: _____

Este documento se firmará por duplicado quedándose una copia el investigador y otra el padre/representante legal del paciente

XI. RELACION DE GRÁFICOS Y TABLAS

Gráfico 1. Análisis de prevalencia de la colonización nasal por *S. aureus* en los casos.

Gráfico 2. Prevalencia de las alteraciones del sueño asociadas al prurito en los casos.

Gráfico 3. Gravedad en los casos según SCORAD

Gráfico 4. Prevalencia de colonización nasal por *S. aureus* en los casos clasificados según las alteraciones del sueño asociadas al prurito.

Gráfico 5. Prevalencia de colonización nasal por *S. aureus* en los casos clasificados según el SCORAD

Gráfico 6: Histograma donde se representa gráficamente la abundancia relativa de los diferentes géneros en cada caso estudiado.

Gráfico 7: Histograma donde se representa gráficamente la abundancia relativa de los diferentes géneros en cada control estudiado.

Gráfico 8: Histograma donde se representa gráficamente la abundancia relativa de los diferentes *phyllum* en cada caso estudiado.

Gráfico 9: Histograma donde se representa gráficamente la abundancia relativa de los diferentes *phyllum* en cada control estudiado.

Gráfico 10: Histograma donde se representa gráficamente la abundancia de *phyllum* comparando casos y controles

Gráfico 11: Análisis de componentes principales (género)

Gráfico 12: Análisis de componentes principales (*phyllum*)

Gráfico 13: Análisis de componentes principales (cluster de pacientes con microbioma similar)

Gráfico 14: Histograma donde se representa gráficamente la abundancia relativa del género *Oscillospira* comparando casos y controles

Tabla 1. Distribución de la edad en los casos según el SCORAD

Tabla 2. Prevalencia de colonización nasal en casos y en controles

Tabla 3. Distribución de los niños estudiados por edad y sexo en casos y en controles.

Tabla 4. Distribución de los niños estudiados por IMC en casos y en controles.

Tabla 5. Antecedentes familiares de atopia en los niños estudiados comparando casos y controles.

Tabla 6. Antecedentes personales de atopia en los niños estudiados comparando casos y controles.

Tabla 7. Antecedentes de alergias alimentarias en los niños estudiados comparando casos y controles.

Tabla 8. Comparación de las características clínicas y epidemiológicas en niños colonizados y niños no colonizados

Tabla 9. Análisis multivariante

Tabla 10. Tabla de resistencias antibióticas en pacientes colonizados a *S. aureus*

Tabla 11. Prevalencia de pacientes colonizados por otros gérmenes potencialmente patógenos diferentes de *S. aureus* comparando casos y controles

RELACIÓN DE GRÁFICOS Y TABLAS

Tabla 12. Prevalencia de pacientes colonizados por otros gérmenes potencialmente patógenos diferentes de *S. aureus* comparando niños colonizados y niños no colonizados

Tabla 13: Variables de los pacientes a los que se les ha realizado estudio del microbioma nasofaríngeo

Tabla 14: Tabla con los valores expresados en tanto por uno de la abundancia relativa de los diferentes géneros en cada caso estudiado

Tabla 15: Tabla con los valores expresados en tanto por uno de la abundancia relativa de los diferentes géneros en cada control estudiado

Tabla 16: Tabla con los valores expresados en tanto por uno de la abundancia relativa de los diferentes *phyllum* en cada caso estudiado

Tabla 17: Tabla con los valores expresados en tanto por uno de la abundancia relativa de los diferentes *phyllum* en cada control estudiado

Tabla 18: Tabla con los valores expresados en tanto por uno de la abundancia relativa de los diferentes géneros comparando casos y controles

Tabla 19: Tabla con análisis Anova de los géneros con significación estadística entre casos y controles y del género *Staphylococcus*.

Tabla 20: Tabla con los valores expresados en tanto por uno de la abundancia relativa de los diferentes *phyllum* comparando casos y controles

Tabla 21: Índices de biodiversidad Chao1 y Shannon comparando en casos y controles



XII. ABREVIATURAS

DA: Dermatitis atópica

Ig: Inmunoglobulina

S.aureus: *Staphylococcus aureus*

pH: Potencial hidrógeno

Th: Linfocito T helper

IL: Interleuquinas

TNF: Factor de necrosis tumoral

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

TLR: receptores toll like

FLG: gen de la filagrina

SCORAD: Scoring Atopic Dermatitis

AAD: Academia Americana de Dermatología

PPAR: Receptores activados por proliferadores de peroxisomas

RAST: Pruebas radioalergosorbente

TSLP: Linfopoyetina estromal tímica

UCA: ácido transurocánico

PCA: ácido pirrididona-5-carboxílico

QS: Quorum-sensing

Agr: Gen accesorio regulador

Fc: Fracción constante

PVL: toxina Panton-Valentine

ET: Toxinas exfoliativas

TSST: toxina del síndrome del *shock* tóxico

SEA: Enterotoxina estafilocócicas A

SEB: Enterotoxina estafilocócica B

S viridans: *Streptococcus viridans*

S.epidermidis: *Staphylococcus epidermidis*

S.pyogenes: *Streptococcus pyogenes*

S. pneumoniae: *Streptococcus pneumoniae*

H. influenzae: *Haemophilus influenzae*

M. catarrhalis: *Moxarella catarrhalis*

S. lugdunensis: *Staphylococcus lugdunensis*

SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

OTUs: Unidades Taxonómicas Operacionales

ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico

P.acnes: *Propionibacterium acnes*

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

ADAM 17: A disintegrin and metalloproteinase domain 17

HGUA: Hospital General Universitario de Alicante

IMC: Índice de Masa Corporal

CSISP: Centro Superior de Investigación en Salud Pública

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

FISABIO: Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana

χ^2 : Prueba de chi cuadrado

OR: Odds Ratio

IC: Intervalo de Confianza

ORa: Odds Ratio ajustada

P: nivel de significación estadística

ATCDfam: Antecedentes familiares

ATCDper: Antecedentes personales

AI: Alergias Inhaladas

AA: Alergias Alimentarias

