ULPGC
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

Escuela de Doctorado

ESTUDIO CLÍNICO Y ANALÍTICO DE LA SENSIBILIZACIÓN A ALÉRGENOS EMERGENTES EN EL ÁREA SUR DE GRAN CANARIA

GABRIEL MARRERO ALEMÁN

DOCTORADO EN
Investigación en Biomedicina

LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
FEBRERO 2021

Agradecimientos

Me gustaría emplear las siguientes líneas para expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas implicadas en la elaboración de la presente Tesis Doctoral, y sin las cuales este trabajo no se podría haber llevado a cabo.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi tutor y codirector de la tesis, el Dr. Leopoldo Borrego Hernando, la ayuda brindada tanto en mi formación profesional como en la dirección y supervisión de la tesis. Su extraordinaria capacidad organizativa, perseverancia e insaciable interés científico me han acompañado desde mis primeros pasos en la facultad de Medicina hasta la actualidad, incluyendo los años de formación durante la residencia en el Hospital Universitario Insular Materno – Infantil (CHUIMI). Quiero destacar su gran implicación durante estos años con el fin de poder llevar a término esta tesis, incluyendo largas horas de conversación telefónica robadas a su familia, a quienes les debo una disculpa por ello. Sin duda, este proyecto jamás se hubiera gestado sin su ayuda.

En segundo lugar, quisiera mostrar mi más sincero agradecimiento a mi codirectora, la Dra. Ana González Antuña, por sus conocimientos, su interés y su continua disposición a prestarme ayuda en todo momento incluso a pesar de haber cambiado de ciudad, de trabajo y aumentado en número su familia durante estos años. Su competencia y desempeño en el ámbito químico han hecho posible la realización de la presente tesis.

No quisiera olvidarme del Dr. Octavio Pérez Luzardo, quien desde el inicio vio factible el análisis de las isotiazolinonas en el laboratorio y mostró su apoyo para hacerlo posible. Su supervisión e implicación en el proyecto han sido muy valiosos. También agradecer a Ana Macías Montes por su ayuda de forma desinteresada, sin la cual el desarrollo de la tesis habría sido más complejo. Agradezco a ambos su activa participación en algunos de los trabajos que se recogen a continuación. Por supuesto, agradecer al resto de personal implicado del Laboratorio de Toxicología del Grupo de Investigación en Medioambiente y Salud de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

También me gustaría agradecer a Federica Liuti, la Dra. Noelia Hernández Hernández, Esmeralda López Jiménez y al Dr. Pedro Saavedra su vital labor en la elaboración del primero de los artículos de la tesis, así como los estudios previos realizados en esta línea de investigación, los cuales han marcado la senda del proyecto actual.

Por último, debo nombrar la importante implicación de Javier Sabater Abad, Julián Boix Vilanova, el Dr. Francisco Javier Miquel y la Dra. Francisca Mestre Bauzá, quienes hicieron posible la realización del estudio multicéntrico de los acrilatos. Su inestimable ayuda demuestra que el trabajo en equipo siempre tiene sus frutos, incluso a tanta distancia.

Finalmente, me gustaría dedicar este trabajo a mis padres y mi hermano Carlos, a mi tía Obdulia por su ayuda en la obtención de las telas y su habilidad como costurera, y por supuesto a mi mujer María y mis maravillosos hijos Julia, Mario y la pequeña que viene en camino. No tengo palabras para agradecer su apoyo y su paciencia en los momentos más duros, ayudándome cuando más lo necesitaba y mostrándose siempre comprensivos a pesar de las interminables horas de trabajo.

Índice

RESUMEN 1

I. INTRODUCCIÓN 3

I.1 Generalidades de la dermatitis alérgica de contacto 5
I.2 Isotiazolinonas 7
I. 2.1 Historia del uso de conservantes 7
I. 2.2 Introducción de las isotiazolinonas como conservantes 8
I. 2.3 Metilisotiazolinona y otras isotiazolinonas 8
I. 2.4 Justificación del estudio de isotiazolinonas 10
I.3 Acrilatos 11
I.3.1 Justificación de investigación de acrilatos en relación con manicuras 11
I.3.2 Aproximación histórica de los acrilatos 11
I.3.3 Problemática de su uso en manicuras 12

II. HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN 15

III. OBJETIVOS 19

IV. METODOLOGÍA 23

IV.1 Metodología del estudio clínico 25
IV.2 Material y métodos del estudio químico – experimental 26
IV.3 Medios y recursos materiales 29

V. RESULTADOS 31

V.1 Papel de los productos de limpieza en la epidemia de dermatitis alérgica de contacto por metilcloroisotiazolinona / metilisotiazolinona 33
V.2 Isotiazolinonas en productos de limpieza: análisis con cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem de muestras procedentes de pacientes sensibilizados y del mercado 39
V.3 Persistencia de isotiazolinonas en ropa tras lavado a máquina 48
V.4 Dermatitis alérgica de contacto a (met)acrilatos en técnicos de uñas y usuarios: pronóstico y diagnóstico diferencial 52

VI. DISCUSIÓN INTEGRADORA **57**

VII. MEDICINA TRASLACIONAL **63**

VIII. CONCLUSIONES **67**

IX. ANEXOS **71**

I. Formulario de base de datos de la Unidad de Dermatitis de Contacto del Complejo Hospitalario Universitario Insular-Materno Infantil **73**
II. Hoja de información al paciente y consentimiento informado **74**
III. Baterías de pruebas epicutáneas **79**
IV. Certificado del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del Complejo Hospitalario Universitario Insular-Materno Infantil **82**
V. Certificado de competencia analítica del Laboratorio de Toxicología del Grupo de Investigación en Medioambiente y Salud de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria **84**
VI. Niveles de concentración de isotiazolinonas en productos de limpieza **85**
VII. Imágenes no publicadas en el artículo "Persistencia de isotiazolinonas en ropa tras lavado a máquina" **86**
VIII. Índices de calidad **87**

X. BIBLIOGRAFÍA **89**

La presente tesis forma parte del programa de Investigación en Biomedicina de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, siguiendo la línea de investigación de "Oncología y Toxicología Medioambiental", y consiste en el estudio epidemiológico y etiológico de los pacientes que padecen dermatitis de contacto por exposición a sustancias contenidas en productos cosméticos, de limpieza y otros posibles contactantes emergentes en el área Sur de Gran Canaria.

Resumen: En la práctica clínica de la Unidad de Dermatitis de Contacto del Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno-Infantil (CHUIMI) se observó que existía un grupo de pacientes con intolerancia a cosméticos por sensibilización a metilisotiazolinona (MI) y metilcloroisotiazolinona/metilisotiazolinona (MCI/MI) que trabajaban como profesionales de la limpieza en nuestra área de referencia. Con estos hallazgos, en un primer trabajo se decidió ahondar en la asociación de sensibilización a MI en camareras de piso de servicios turísticos. Posteriormente, para comprobar la exposición real de nuestras pacientes a estas sustancias, se realizó un análisis de las concentraciones de isotiazolinonas (IT) en muestras aportadas por pacientes sensibilizados y muestras del mercado. Para ello, se utilizó una técnica analítica híbrida basada en la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). El método desarrollado en la presente tesis doctoral también se utilizó para analizar la posible persistencia de estos alérgenos tras el lavado de ropa con los detergentes empleados por nuestros pacientes que pudiesen justificar una clínica de eccema alérgico de contacto de patrón "vestimentario".
Por otro lado, y debido a la irrupción de nuevas técnicas de empleo de acrilatos en la industria cosmética, se ha realizado un estudio de éstos como fuente de sensibilización en profesionales y usuarias de la estética ungueal. Para ello, se recogió información de pacientes sensibilizados a estas sustancias en distintos hospitales de España para analizar sus características clínicas.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Generalidades de la dermatitis alérgica de contacto

El término "eccema" o "eczema" (https://dle.rae.es/eccema?m=form RAE) deriva del griego "*ekzema*", que significa "ebullición hacia afuera" (*ek* = fuera; *zema* = ebullición), y hace referencia a las características de la fase aguda del proceso en la cual la piel está cubierta de vesículas simulando al agua en ebullición. Bajo este concepto se reúnen un grupo de patologías de distinta etiología y patogenia, pero que comparten manifestaciones clínicas similares. El eccema es un proceso inflamatorio de la piel cuya manifestación fundamental es el prurito, el cual se acompaña de lesiones eritematosas, edematosas, vesículas y costras en su fase aguda, lesiones descamativas en su fase subaguda y liquenificación en su fase crónica. Histológicamente se caracteriza por la presencia de espongiosis (edema intraepidérmico), aunque puede presentar otros hallazgos en función del estado evolutivo de las lesiones. Existen distintas formas de eccema, clasificándose en eccema exógeno o de contacto (irritativo o alérgico) y eccema endógeno (principalmente eccema atópico, numular, dishidrótico y xerodérmico)[1].

La dermatitis de contacto irritativa se produce tras un daño físico o químico, no inmunológico, y es la responsable del 80% de todas las dermatitis de contacto, mientras que la dermatitis de contacto alérgica lo es del 20%. Esta última se ocasiona por una respuesta de hipersensibilidad de tipo IV frente a un alérgeno específico, con una fase inicial de sensibilización que ocurre en el momento en que el paciente se expone por primera vez a la sustancia química. Estas sustancias tienen bajo peso molecular y, una vez atraviesan la barrera cutánea, se combinan con proteínas del huésped para poder actuar como antígenos completos, denominándose haptenos. Las células presentadoras de antígenos captan el antígeno, migran a los ganglios linfáticos regionales y lo presentan a linfocitos T vírgenes. Exposiciones ulteriores a un mismo alérgeno, aún a bajas concentraciones, ocasionan una respuesta inflamatoria mediada por linfocitos T previamente sensibilizados causando la liberación de citocinas y factores quimiotácticos que dan lugar a una clínica de eccema. El cuadro clásico de la dermatitis de contacto es una placa bien delimitada vesiculosa, eritematosa o descamativa, o ambas combinadas, con unos bordes bien definidos correspondientes a la zona de contacto[2].

Las pruebas epicutáneas son pruebas de provocación que reproducen *in vivo* y de forma controlada un proceso de dermatitis alérgica de contacto mediante un proceso de hipersensibilidad de tipo retardado. El objetivo de este procedimiento es demostrar que las lesiones cutáneas están provocadas por alguna sustancia concreta, y consisten en la aplicación de unos parches en la espalda del paciente que contienen cantidades estandarizadas de alérgenos, realizándose una posterior lectura de su reactividad[3]. Es importante destacar que las pruebas epicutáneas en sí mismas solamente sirven para el diagnóstico de sensibilización de contacto a un alérgeno. Sin embargo, el abordaje clínico de un paciente con eccema de contacto es un proceso mucho más complejo que abarca la realización de una anamnesis detallada, una exploración dermatológica adecuada y una interpretación clínica del resultado de las pruebas epicutáneas[4] (Fig. 1).

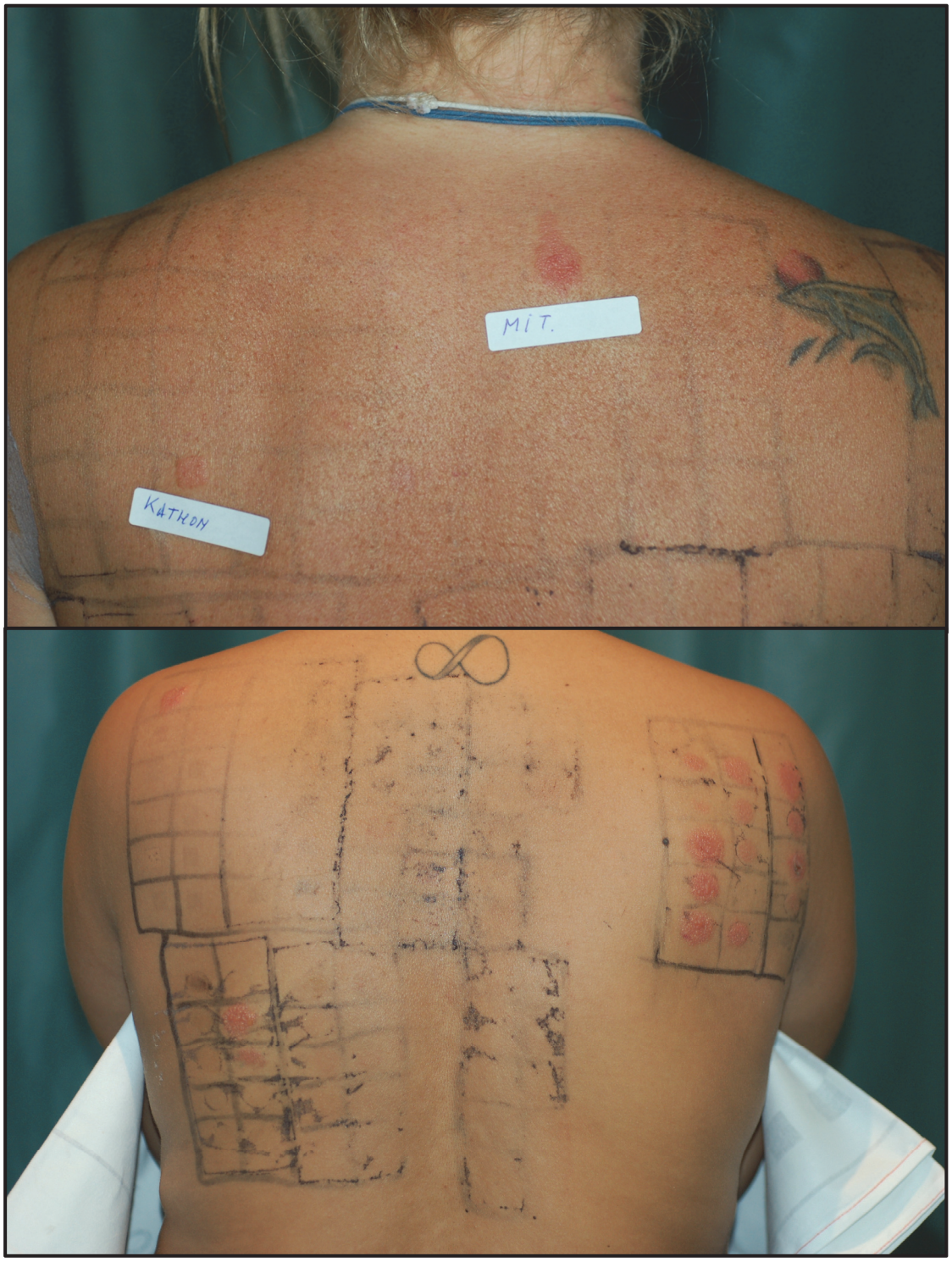


Fig. 1. *Ejemplos de pruebas epicutáneas. Imagen superior: lectura a las 96 horas con positividades (++/+++) a Kathon® CG (MCI/MI) y MIT (metilisotiazolinona) en la batería estándar española (True Test® y Allergeaze®). Imagen inferior: en este caso, lectura a las 96 horas con positividades (+++) a níquel (True Test® superior izda.), níquel y cobalto (batería "metales" inferior izda.), múltiples acrilatos (batería "acrilatos" dcha.).*

La dermatitis alérgica de contacto ocasiona limitaciones en la vida diaria de los pacientes además de presentar importantes repercusiones en determinados ámbitos laborales. Las comisiones Nacional (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios – AEMPS) y Europea (*European Commission* y la Agencia Europea del Medicamento – EMA*)* son responsables de garantizar a la sociedad, desde la perspectiva de servicio público, la calidad, seguridad, eficacia y correcta información de los medicamentos y productos sanitarios, desde su investigación hasta su utilización, en interés de la protección y promoción de la salud de las personas, de la sanidad animal y el medio ambiente (https://www.aemps.gob.es/; https://www.ema.europa.eu/en).

I.2 Isotiazolinonas

I.2.1 Historia del uso de conservantes

En condiciones normales, todo producto está expuesto a dos agentes potencialmente contaminantes durante su uso, el medio ambiente y el propio consumidor. Con el fin de que el producto llegue al consumidor con un contenido bajo o nulo de microorganismos se emplean fundamentalmente tres procedimientos: control microbiológico de las materias primas, buena higiene en la fabricación y envasado del producto y la utilización de conservantes[5].

Los conservantes son sustancias empleadas en la industria alimentaria, cosmética y de productos farmacéuticos e industriales, imprescindibles para dar estabilidad a los productos y evitar el crecimiento de microorganismos que puedan suponer un riesgo para la salud. Son sustancias con un uso muy extendido. Por norma general deben ser baratos, poco tóxicos y con una vida útil larga. No existe un conservante "ideal", pero existen varias características que se deben tener en cuenta en la selección de un conservante: debe tener amplio espectro y ser activo contra infecciones bacterianas y fúngicas, ser estable bajo diversas condiciones (temperatura, pH, etc.), no alterar el color o el olor del producto, ser compatible con otros componentes de la preparación, y ser fácilmente manejable y bien tolerado por el medio ambiente y los humanos[6]. Dada la inexistencia de ese conservante "ideal", se utilizan combinaciones en la mayoría de los productos finales. Estos conservantes son biológicamente activos y, dada su ubicuidad, existen numerosas fuentes de exposición convirtiéndolos en importantes alérgenos de contacto que han producido verdaderas "epidemias" de dermatitis alérgica de contacto. En el pasado se han utilizado conservantes como el formaldehido o liberadores de formaldehido, metildibromo glutaronitrilo, parabenos o iodopropinil butilcarbamato entre otros. Históricamente, la introducción de nuevos conservantes con una inadecuada evaluación de los riesgos previa a su comercialización ha conllevado a un rápido incremento de casos de sensibilización cutánea a estas sustancias[6,7].

I.2.2 Introducción de las isotiazolinonas como conservantes

La benzisotiazolinona (BIT) se introdujo en 1960, siendo publicado el primer caso de dermatitis alérgica de contacto en 1976 en dos empleados que trabajaban con emulsiones de poliacrilatos en pinturas y ceras. Para ello usaban como conservante el Proxel® CRL (Imperial Chemical Industries, Slough, UK), un biocida industrial, pesticida y conservante que contenía BIT (10-20%)[8]. En los años 80, se introdujo la mezcla de metilcloroisotiazolinona (MCI) y metilisotiazolinona (MI) como conservante en numerosos productos como champús, cremas, lociones o productos industriales como aceites de corte, sistemas de refrigeración, pinturas o pegamentos. La MCI/MI, también conocido comercialmente bajo los términos Kathon® CG (*Cosmetic Grade*), Euxil® K100, Acticida, Algucid CH50 o Amerstat 250, está compuesto por dos ingredientes, el 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one y el N 2-methyl-4-isothiazolin-3-one en una relación 3:1 a una concentración del 1,5% en solución acuosa de sal magnésica. Los primeros casos de alergia de contacto provocada por su uso en cosméticos se describieron en 1984 y 1985[9–11]. Tras el aumento de casos de sensibilización a este conservante, se precisó establecer unos límites de uso "seguros" en productos cosméticos de 15 ppm en la Unión Europea, aunque no tuvo influencia en la prevalencia de alergia de contacto a MCI/MI. Dado que las propiedades sensibilizantes se atribuían a la MCI, después del año 2000 la mezcla de MCI/MI se sustituyó por MI, introduciéndose en solitario como conservante en productos industriales (pinturas, tintas, pegamentos, lacas, líquidos refrigerantes…) a unas concentraciones elevadas dado su débil efecto biocida[12]. Posteriormente, se permitió además su uso en productos cosméticos a una concentración máxima de 100 ppm, sin limitación en productos no-cosméticos, ocasionando una aparición progresiva de casos de sensibilización a MI provocando una verdadera epidemia[13]. Inicialmente se describieron casos en el ámbito ocupacional en la industria de la pintura[14], aunque seguidamente el número de casos publicados también no ocupacionales aumentaron en gran medida debido al uso de toallitas limpiadoras, cosméticos capilares y faciales, desodorantes y fotoprotectores, así como casos de dermatitis alérgica de contacto aerotransportada por MI contenida en paredes recién pintadas[15–17]. Otro derivado de las isotiazolinonas, la octilisotiazolinona (OIT), también se describió como causante de dermatitis alérgica de contacto en 1982 en dos empleados expuestos a pintura en una fábrica de techos[18].

I.2.3 Metilisotiazolinona y otras isotiazolinonas

Las isotiazolinonas (IT) son compuestos heretocíclicos que se caracterizan por un anillo aromático de nitrógeno y azufre con similitudes estructurales que presentan diferencias entre sus derivados. La MI (CAS No. 2682-20-4) es un compuesto orgánico heterocíclico que conforma la fórmula C_4H_5NOS. La MCI (CAS No. 26172-55-4), por su parte, presenta la fórmula química C_4H_4ClNOS. Las estructuras químicas de las IT más frecuentes se muestran en la Figura 2. Cada IT se clasifica en función de su capacidad sensibilizante como leve, moderado o fuerte según distintos métodos de evaluación de riesgos. En 1987, Bruze et al. realizaron un estudio para determinar la capacidad sensibilizante de MCI/MI en cobayas mediante test de maximización, concluyendo que la MCI era un sensibilizante fuerte y la MI un sensibilizante débil[19].

Posteriormente, Basketter el al. también estudiaron la potencia de sensibilización de la MI mediante el estudio de ganglios linfáticos regionales (LLNA), señalando que los test previos habían sido interpretados de forma incorrecta y considerándolo un sensibilizante moderado-fuerte[20]. El productor de MI, Rohm&Hass (ahora Dow Chemicals, Midland, MI, U.S.A) realizó ambos estudios en animales, así como pruebas epicutáneas en humanos con distintas concentraciones concluyendo que a concentraciones de hasta 600 ppm no tenía capacidad sensibilizante por vía cutánea[21]. En Europa, el Comité Científico de Productos Cosméticos y Productos no-alimenticios para Consumidores (SCCNFP) realizó una evaluación del uso de MI, aportando la opinión de que a concentraciones inferiores a 100 ppm en el producto cosmético final no se ponía en riesgo la salud del consumidor[22].

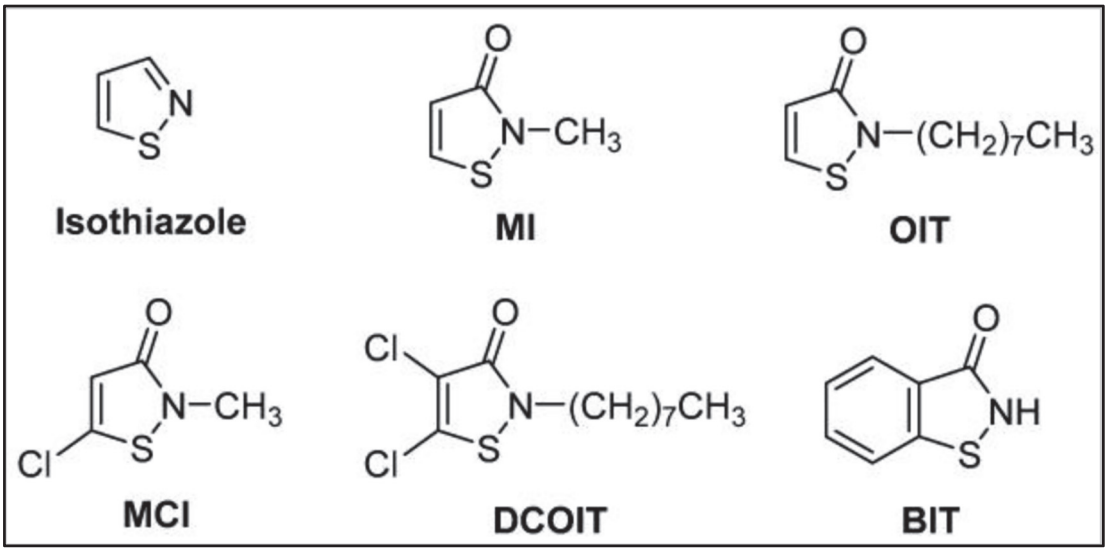


Fig. 2. Estructuras químicas de isotiazol y las isotiazolinonas más frecuentes empleadas como biocidas. MI, metilisotiazolinona; OIT, octilisotiazolinona; MCI, metilcloroisotiazolinona; DCOIT, diclorooctilisotiazolinona; BIT, benzisotiazolinona[23].

La MI fue nombrada "Alérgeno del año 2013" por la Sociedad Americana de Dermatitis de Contacto[24] y se introdujo en la batería estándar Europea de pruebas epicutáneas ese mismo año tras la recomendación de la Sociedad Europea de Dermatitis de Contacto y el Grupo Europeo de Investigación Medioambiental y de Dermatitis de Contacto[25]. También en el año 2013 el Comité Científico de Seguridad del Consumidor (SCCS), al mismo tiempo que la industria europea representada por *Cosmetics Europe*, recomendaron que la MI no debería utilizarse en productos cosméticos sin aclarado (*leave-on*), mientras que debería restringirse a 15 ppm en cosméticos con aclarado (*rinse-off*), prohibiéndose definitivamente en febrero de 2017 y abril de 2018 respectivamente[26,27]. Sin embargo, el empleo de estas IT en productos de uso industrial no ha sido regulado[28]. Dada la historia de la MCI como potente sensibilizante, su uso está permitido únicamente asociado a MI en una relación 3:1 (MCI/MI; CAS No. 55965-84-9) y solamente en productos cosméticos con aclarado a una concentración máxima de 15 ppm[29]. La normativa vigente a nivel europeo e internacional en relación con el uso de MCI/MI o MI en cosméticos se puede observar en la Tabla 1.

	Cosmetics	Europe	Canada	USA	Asia		
					Japan	Korea	Singapore
MCI/MI	Rinse-off	15ppm	15ppm	15ppm	1000ppm	15ppm	15ppm
	Leave-on	/	/	/	/	/	/
MI	Rinse-off	15ppm	100ppm	100ppm	100ppm	100ppm	100ppm
	Leave-on	/	100ppm	100ppm	100ppm	/	/

Tabla 1. Normativa europea e internacional sobre uso de MCI/MI y MI en cosméticos. Rinse-off, con aclarado; leave-on, sin aclarado; ppm, partes por millón[30].

Otras IT, como la BIT (CAS No. 2634-33-5) y la OIT (CAS No. 26530-20-1) también han demostrado capacidad de provocar reacciones alérgicas cutáneas en humanos. La OIT presenta un potencial sensibilizante moderado según test de maximización en cobayas y en experimentos animales recientes[31,32]. Por su parte, la BIT en modelos animales ha demostrado una potencia similar a la MI, aunque en LLNA parece mostrar una potencia más débil que la MI[33,34]. Según estos datos, las IT se clasifican según su riesgo de sensibilización: MCI > MI > OIT > BIT, aunque en otras clasificaciones la BIT se sitúa con mayor potencial sensibilizante que la OIT, lo cual se podría justificar por su uso más extendido y como consecuencia una mayor exposición a BIT[35,36].

I.2.4 Justificación del estudio de isotiazolinonas

El uso de MI en productos cosméticos ha ocasionado una verdadera epidemia de dermatitis de contacto. Un estudio prospectivo en 8 países europeos demostró que un 6% del total de pacientes parcheados fueron positivos a MI, principalmente por su uso en cosméticos[37]. El seguimiento epidemiológico de la sensibilización de la población de referencia del área sur de Gran Canaria ha mostrado un incremento constante en la sensibilización a MCI/MI y MI, llegando a ser una de las más frecuentemente descritas en nuestro ámbito[38] y siendo referenciada en los estudios europeos que han motivado el cambio en la normativa actual[26]. En la actualidad, se conoce que la MI contenida en productos cosméticos, productos de limpieza del hogar y pinturas, entre otros, son capaces de producir una clínica de dermatitis alérgica de contacto, aunque los datos de las concentraciones reales de IT en estos productos son escasos[39]. En otros ámbitos se ha determinado la presencia de MI, MCI y otras IT en productos industriales y productos de limpieza[40], pero hasta el presente no existe ningún estudio que relacione claramente la presencia de estas sustancias en un ámbito laboral concreto con unas consecuencias clínicas relevantes. Por último, existe una información muy limitada acerca de las concentraciones de IT existentes en las prendas de vestir de los pacientes tras su lavado a máquina que pudiese justificar una clínica de eccema de patrón "vestimentario"[41].

I.3 Acrilatos

I.3.1 Justificación de investigación de acrilatos en relación con manicuras

Mediante la vigilancia epidemiológica de posibles alérgenos emergentes en nuestra población de referencia, apreciamos una verdadera epidemia de dermatitis alérgica de contacto a acrilatos en usuarios de centros de estética ungueal y en esteticistas que realizan manicuras, derivando en importantes limitaciones laborales. Siguiendo una metodología similar a la empleada en el estudio de la MI, observamos que estos hallazgos parecen seguir un curso histórico paralelo a este contactante, aunque con varios años de decalaje.

I.3.2 Aproximación histórica de los acrilatos

Los acrilatos son termoplásticos sintéticos y resinas presentes en gran cantidad de productos, y están formados por derivados del ácido acrílico. Los acrilatos y metacrilatos se forman por la polimerización espontánea o inducida por radiación ultravioleta de monómeros que contienen un grupo acrilo derivado del ácido acrílico (acrilatos) o ácido metacrílico (metacrilato), los cuales tienen una alta capacidad sensibilizante (Fig. 3). Desde 1954, el monómero de metil metacrilato se describió inicialmente como sensibilizante al estar contenido en materiales de la industria dental, ocasionando una clínica de dermatitis de manos en dentistas y técnicos dentales[42]. Pocos años después ya se publicaron artículos de sensibilización a acrilatos relacionados con el uso de uñas artificiales, provocando onicolisis, distrofia ungueal, paroniquia y eccema periungueal[43]. Posteriormente se describieron casos de dermatitis de manos en cirujanos ortopédicos en relación a recambios protésicos, ya que el metil metacrilato se empleaba en cementos óseos, y además se demostró que el monómero era capaz de penetrar guantes intactos[44,45].

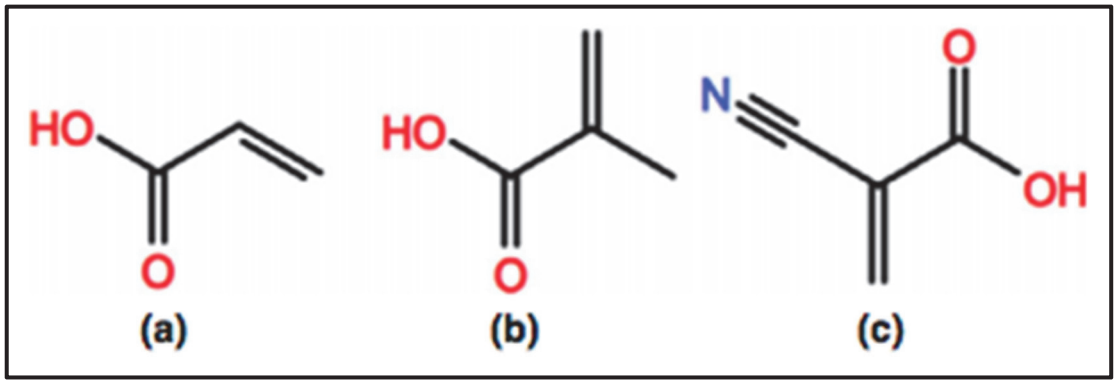


Fig. 3. Estructura química del (a) ácido acrílico, (b) ácido metacrílico y (c) cianoacrilato[46].

I.3.3 Problemática de su uso en manicuras

La dermatitis alérgica de contacto por acrilatos se ha relacionado con la exposición ocupacional de dentistas, protésicos dentales, trabajadores de las industrias de fibra de vidrio, imprenta y profesionales de recubrimiento y pintura[47–50]. En los últimos años se ha observado un importante incremento de casos de sensibilización a acrilatos en profesionales y usuarios de manicuras, lo cual deriva en importantes limitaciones laborales a causa de un eccema crónico de manos[51] (Fig. 4). Desde 2008, Roche et al. describieron en España 15 casos de sensibilización a acrilatos en relación a cosmética ungueal, donde se detallan los *kits* empleados en las manicuras y destacan las medidas de protección primaria que deberían utilizarse en su realización[52]. Existen 3 tipos principales de manicuras acrílicas: "uñas acrílicas" o "de porcelana", "uñas de gel" que precisan de luz ultravioleta (UV) para su polimerización, y esmaltado "semipermanente". En los dos primeros casos se emplean para reparar una uña dañada o para extender la uña más allá de su borde natural, aplicándose habitualmente sobre un molde. En el caso del esmaltado "semipermanente", los productos se aplican en capas directamente sobre las uñas del usuario, polimerizando con luz UV o LED tras cada capa. Este último tipo de manicura es más barato, sencillo, duradero y rápido de realizar en manos experimentadas, por lo que su empleo se ha hecho muy popular en los últimos tiempos. Este hecho, sumado a la falta de entrenamiento e información de riesgos y medidas preventivas por parte de los profesionales, además de la actual disponibilidad de esmaltados y lámparas para aplicación casera, se cree que ha disparado el número de casos de dermatitis de contacto por acrilatos tanto en profesionales de la estética ungueal como en usuarios[53]. En junio de 2018, el SCCS de la Comisión Europea opinó que el uso adecuado de estos productos aplicados en la lámina ungueal y evitando el contacto con la piel en el contexto del remodelado ungueal es seguro[54]. A finales del año 2019, un portavoz de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), dependiente del Ministerio de Sanidad, solicitó a la Comisión Europea limitar el empleo del esmaltado "semipermanente" exclusivamente a profesionales de la estética ungueal.

Fig. 4. Pulpitis secundaria a eccema crónico en relación con contacto frecuente a acrilatos en una profesional de la estética ungueal (imagen superior izquierda) y en usuaria que se autoaplicaba los productos (imagen superior derecha). La imagen inferior muestra un eccema periungueal en usuaria habitual de manicuras.

Con idéntica metodología empleada en el estudio de isotiazolinonas, se evaluaron los aspectos clínicos y etiológicos de este problema en nuestra área de referencia.

II. HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

Hipótesis

- La alta tasa de sensibilización a IT en nuestro medio se debe en parte a su empleo en productos de limpieza. En ellos existe una concentración suficiente de IT para producir dermatitis alérgica de contacto.

- La frecuencia de sensibilización a acrilatos debido al uso de esmaltado semipermanente es equivalente al resto de la población española, y presenta unas características clínicas específicas.

Justificación

En nuestra área de referencia, al igual que a nivel mundial, se ha observado un incremento de casos de sensibilización a IT y acrilatos en el ámbito personal y laboral. Debido a ello, ha sido necesario un estudio epidemiológico, clínico y analítico que permita conocer el comportamiento de estos alérgenos con el fin de establecer unas medidas de prevención adecuadas.

III. OBJETIVOS

El objetivo general de la presente tesis doctoral ha sido el estudio epidemiológico y clínico de los alérgenos emergentes en nuestra área de referencia, determinando la exposición y, en su caso, la concentración a la que están expuestos los enfermos sensibilizados.

Este objetivo general se ha concretado en los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollo de un método analítico para la determinación de compuestos químicos derivados de isotiazolinonas mediante el empleo de la cromatografía líquida (LC) acoplada a la espectrometría de masas en tándem (MS/MS).
- Validación de la metodología para el posterior análisis de muestras de productos de limpieza y telas.
- Determinación de las concentraciones de MI y otras IT en productos de limpieza.
- Determinación de las concentraciones de MI y otras IT en muestras de tela tras distintas modalidades de lavado.
- Determinación de las características clínicas de los pacientes sensibilizados a acrilatos.

IV. METODOLOGÍA

IV.1 Metodología del estudio clínico

Los sujetos del estudio son aquellos pacientes que acuden a la Unidad de Dermatitis de Contacto del Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno Infantil (CHUIMI) y que han demostrado sensibilización a IT o acrilatos mediante pruebas epicutáneas. Desde enero del año 2005, en esta Unidad se registran los datos clínicos y resultados de pacientes a quienes se les ha realizado pruebas epicutáneas según la práctica clínica habitual en un programa propio generado en Microsoft Access® (Redmond, WA, U.S.A.). Esta base de datos recoge la siguiente información: antecedentes personales, edad, sexo, relación laboral, localización de las lesiones, tiempo de evolución y relevancia de las positividades (Anexo I).

La fase experimental y de análisis de datos se realizó desde enero de 2016 hasta diciembre de 2019, aunque los datos clínicos de los sujetos se recogieron de forma retrospectiva a partir de la base de datos. A todos los sujetos se les hizo entrega de una hoja de información, y aquellos pacientes sensibilizados a acrilatos recogidos de forma prospectiva firmaron un consentimiento informado (Anexo II).

A todos los pacientes se les realizaron pruebas epicutáneas siguiendo las guías del Grupo Internacional de Investigación en Dermatitis de Contacto con la batería estándar española mediante True Test® y AllergEAZE® (SmartPractice®, distribuidor en España MartiTor Alergia, Barcelona, España)[55,56], y otras baterías en función de la sospecha clínica. Estas otras engloban la batería de cosméticos (Chemotechnique Diagnostics® Vellinge, Suecia) y dos baterías distintas de acrilatos en función del hospital (Chemotechnique Diagnostics® Vellinge, Suecia y AllergEAZE® distribuidor en España MartiTor Alergia, Barcelona, España) si la sospecha era alergia a los acrilatos (Anexo III). La concentración de MI en los parches fue de 0,2% (2000 ppm) en agua, mientras que de MI/MCI fue de 0,02% (200 ppm) en agua. Se realizó una lectura de los parches a las 48 y 96 horas, alcanzando un diagnóstico de sensibilización al alérgeno en caso de observar eritema (+), pápula/placa (++) o vesícula/ampolla (+++), y estableciendo una relevancia pasada, presente o desconocida según la historia clínica.

La metodología específica de cada trabajo se encuentra explicada en su artículo correspondiente en el apartado “Material y Métodos”.

IV.2 Material y métodos del estudio químico – experimental

- **HPLC-ESI-MS/MS**

Para la determinación de las IT se utilizó un cromatógrafo de líquidos HPLC modelo 1290 Infinity (Agilent Technologies) que consta de un desgasificador, una doble bomba binaria que permite alcanzar presiones de hasta 1200 bares y un inyector automático termostatizado. Se utilizó una columna analítica de fase reversa, Zorbax C18 (2,1 mm x 50 mm y 1,8 µm, Agilent). Las fases móviles utilizadas fueron agua y metanol con un 0.1% de ácido fórmico y el flujo de fase móvil fue 0.45 mL/min. El sistema HPLC está acoplado a un analizador de masas de tipo triple cuadrupolo, modelo 6460 (Agilent Technologies) con una fuente de electrospray en modo positivo con tecnología "jet-stream". Este tipo de fuente permite aumentar la sensibilidad de la medida en comparación con otros analizadores de sus mismas características. Todos los compuestos fueron adquiridos en modo MRM (multiple reaction monitoring) positivo seleccionando el ion más intenso para la cuantificación de los compuestos.

La Figura 5 muestra el espectrómetro de masas triple cuadrupolo utilizado a lo largo de esta Tesis Doctoral.

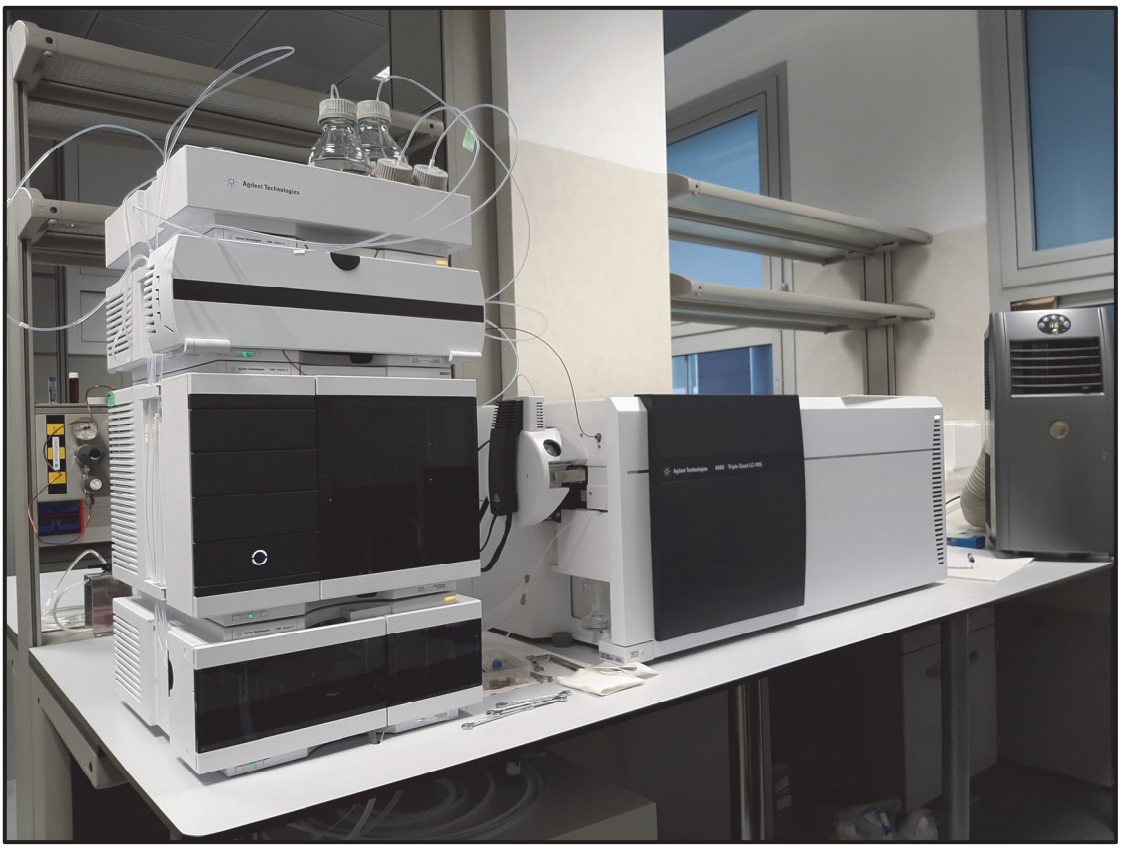


Fig. 5. Espectrómetro de masas de tipo triple cuadrupolo Agilent 6460.

Otra instrumentación

- Las pesadas se realizaron con una balanza analítica con una resolución de 0,1 mg: modelo MS205DU (Mettler Toledo, España).

- Para el ajuste del pH de las fases móviles se empleó un pH-metro modelo Basic 20 de Crison (España).

- Agitador Heidolph Reach (Germany).

- **Materiales y reactivos**

Los patrones de IT (MCI, MI, BI, OI) se obtuvieron de Dr. Ehrenstrofer™ (Augsburg, Germany). Todos los compuestos están certificados en un 96% de pureza.

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Para preparar las disoluciones acuosas y las fases móviles se utilizó agua ultrapura con una resistividad de 18,2 MΩ cm^{-1} y obtenida en un sistema de purificación de agua Milli-Q® (Millipore, Bedford, MA, USA). Las disoluciones patrón se prepararon en metanol descrito para análisis de trazas orgánicas con una pureza >99,0% (Fisher Scientific™). El ácido fórmico utilizado en las fases móviles se obtuvo de Merk con una pureza >96%.

- **Procedimientos.**

Preparación de las disoluciones estándar de isotiazolinonas.

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Las disoluciones patrón se prepararon en metanol con una pureza >99,0% (Fisher Scientific™).

Cuatro disoluciones con concentraciones de 1000 µg/g de MCI, MI, BIT y OIT se prepararon en metanol utilizando viales de vidrio ámbar y se almacenaron a -20ºC. A partir de estas disoluciones, se preparó una disolución patrón en metanol que contenía una mezcla de 1 µg/g de MCI, MI, BIT y OIT.

Seis puntos de calibrado comprendidos de 0.5 a 500 ng/g se prepararon diariamente a partir de la disolución patrón de 1 µg/g. Para el calibrado se utilizó como matriz un detergente libre de estos compuestos.

- **Materiales generales de laboratorio**

A lo largo de la presente Tesis Doctoral se utilizó el siguiente material de laboratorio:

- Viales ámbar de vidrio con tapón recubierto de PTFE de 2, 7 y 15 mL (Sigma-Aldrich®).

- Tubos de polipropileno de 15 y 50 mL (Deltalab).
- Viales de vidrio de 2 mL con septum de silicona/PTFE para autoinyector (Sigma-Aldrich®).
- Microinsertos de vidrio para viales de autoinyector (Sigma-Aldrich®).
- Micropipetas de volumen ajustable de 2-20 µL, 20-200 µL y de 100-1000 µL (High Tech Lab, Polonia y Eppendorf, Alemania).

- **Preparación de las muestras de limpieza.**

Las muestras se trataron con un procedimiento denominado "Dilute and shoot". Para ello, un gramo de cada muestra se añadió a un tubo de polipropileno y se diluyó con 60 mL de agua Milli-Q®. La muestra se agitó durante 2 minutos para eliminar todas las burbujas formadas. Finalmente, una alícuota de 0.5 mL de cada muestra se transfirió a un vial de cromatografía y se guardó a 4ºC hasta su análisis en el HPLC-MSMS.

- **Preparación de las muestras de ropa.**

Un fragmento de cada tela de 10x20 cm fue sometido a un procedimiento de extracción líquido-líquido. Para ello, cada pieza se introdujo en un tubo Falcon™ al cual se añadieron 45 mL de metanol. Para extraer los compuestos, los tubos Falcon™ se agitaron durante la noche. Después, se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 minutos y se extrajo de cada tubo la misma cantidad de metanol. Finalmente, se evaporó el disolvente hasta sequedad utilizando para ello una corriente de nitrógeno y se añadieron 15 mL de metanol. Se transfirió 1 mL de la solución resultante a un vial de cromatografía para su estudio mediante HPLC-MS/MS.

- **Validación de la metodología.**

La validación de la metodología para la determinación de las IT se basó en la realización de estudios de recuperación. Para ello, se fortificó un detergente libre de IT con una cantidad conocida de los compuestos. La adición se controló gravimétricamente.

El detergente se fortificó a 40, 400 y 4000 ng/g. Las recuperaciones se calcularon dividiendo el valor experimental obtenido entre el teórico calculado.

IV.3 Medios y recursos materiales

Este estudio recibió un informe valorable por parte del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del CHUIMI, cumpliendo con las normas de Buena Práctica Clínica (CPMP/ICH/135/95) y los preceptos éticos formulados en la orden SAS 3470/2009 y la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos y en sus posteriores revisiones, así como aquellos exigidos por la normativa aplicable en este tipo de estudios (Anexo IV). Asimismo, este estudio no ha implicado realizar ninguna intervención sobre el paciente distinta a las necesarias para su adecuado diagnóstico, aplicando normas adecuadas de anonimización de datos.

Para el análisis bioquímico se utilizó el sistema de LC acoplada a la MS/MS, ubicado en el Departamento de Toxicología Clínica y Analítica de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, ubicado en la Facultad de Ciencias de la Salud (Anexo V). Los estudios analíticos se realizaron con financiación obtenida de forma independiente. El material analizado mediante el sistema de LC-MS/MS fue aportado libremente por parte de los sujetos del estudio, obteniendo otra parte de muestras de productos de limpieza y telas del mercado.

V. RESULTADOS

V.1 Papel de los productos de limpieza en la epidemia de dermatitis alérgica de contacto por metilcloroisotiazolinona/metilisotiazolinona

Título: "The role of cleaning products in epidemic allergic contact dermatitis due to methylchloroisothiazolinone/methylisothiazolinone".

Autores: Gabriel Marrero-Alemán, Pedro Saavedra Santana, Federica Liuti, Noelia Hernández, Esmeralda López-Jiménez, Leopoldo Borrego.

Objetivo: Analizar la relación existente entre el incremento de la sensibilización a MCI/MI y el empleo de nuestros pacientes.

Referencia: *Dermatitis*. 2018 Mar/Apr;29(2):77-80.

DOI: 10.1097/DER.0000000000000352.

PMID: 29494393.

Índices de calidad:

- Revista: *Dermatitis*. ISSN: 1710-3568.
- Factor de impacto (2018): 2.630.
- Cuartil: 2º (23/64).
- Citas del artículo: 9 (Web of Science/Scopus, última visita Enero 2021).

Comunicaciones en congresos:

- 46 Congreso Nacional de Dermatología y Venereología, Palma de Mallorca. Mayo 2018.
  Formato: Comunicación oral.
  Papel de los productos de limpieza en la epidemia de dermatitis alérgica de contacto a metilcloroisotiazolinona/metilisotiazolinona.
  Presentado por Gabriel Marrero Alemán, Pedro Saavedra Santana, Federica Liuti, Noelia Hernández, Esmeralda López, Leopoldo Borrego.

STUDIES

The Role of Cleaning Products in Epidemic Allergic Contact Dermatitis to Methylchloroisothiazolinone/Methylisothiazolinone

Gabriel Marrero-Alemán, MD,* Pedro Saavedra Santana, MD,† Federica Liuti, MD,* Noelia Hernández, MD,‡ Esmeralda López-Jiménez, MD,* and Leopoldo Borrego, MD*

Background: **Sensitivity to methylchloroisothiazolinone (MCI)/methylisothiazolinone (MI) has increased rapidly over recent years. This increase is mainly related to the extensive use of high concentrations of MI in cosmetic products, although a growing number of cases of occupational allergic contact dermatitis are caused by MCI/MI.**

Objective: **The aim of this study was to examine the association between the increase in MCI/MI sensitization and the work undertaken by the patients in our area.**

Methods: **A retrospective study was undertaken of the records of a total of 1179 patients who had undergone contact skin patch tests for MCI/MI from January 2005 to December 2015. A multivariate logistic regression analysis was performed to identify the factors independently associated with sensitivity to MCI/MI.**

Results: **A constant increase in MCI/MI sensitization was observed over the observation period. The only work associated with a significant increase in the prevalence of MCI/MI sensitization was cleaning, with 38.5% of the cleaning professionals with MCI/MI sensitization consulting for cosmetics-related dermatitis.**

Conclusions: **Occupational sensitization to MCI/MI in cleaning professionals is worryingly increasing. This, in turn, could possibly account for many cases of cosmetics-associated contact dermatitis. Our findings suggest that a review of the regulations with regard to isothiazolinone concentrations in industrial and household detergents is necessary.**

Sensitivity to methylchloroisothiazolinone (MCI)/methylisothiazolinone (MI) has increased rapidly over recent years worldwide. This increase has been related mainly to the extensive use of high concentrations of MI in personal care and household products,[1] although a growing number of cases of occupational allergic contact dermatitis are caused by MCI/MI or MI, especially among painters and workers in the cosmetics industry.[2]

In 2005, MI was approved for use in cosmetic products at a maximum concentration of 100 ppm, although it can be used at any concentration without restriction in noncosmetic products, such as household or industrial cleaning agents. Meanwhile, European authorities have banned the use of MI in leave-on cosmetics, effective last February 22, 2017, and limited MI to 15 ppm in rinse-off products, effective on April 27, 2018.

*From the *Department of Dermatology, Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno-Infantil, and †Mathematics, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria; and ‡Department of Dermatology, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, Spain.*

Address reprint requests to Gabriel Marrero-Alemán, MD, Department of Dermatology, Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno-Infantil, Avda Marítima del Sur s/n, CP 35016, Gran Canaria, Spain. E-mail: gabriel.marrero88@gmail.com.

The authors have no funding or conflicts of interest to declare.

DOI: 10.1097/DER.0000000000000352

© 2018 American Contact Dermatitis Society. All Rights Reserved.

In our hospital, patients attend from the south of Gran Canaria (one of the Canary Islands, Spain), where most people are employed in the tourism industry (mainly housekeeping services). As has already been published, our population is experiencing an epidemic increase in contact sensitization to MCI/MI.[3]

The finding that many MCI/MI-sensitized patients were hotel housekeeping staff inspired us to analyze the relationship between the increase in MCI/MI sensitization and the employment of our patients.

MATERIALS AND METHODS

We undertook a retrospective study of the records of a total of 1179 patients who had undergone contact skin patch testing for MCI/MI from January 2005 to December 2015. Variables studied were age, sex, year of diagnosis, and employment. Sensitization to MCI/MI was diagnosed using the TRUE Test (SmartPractice Denmark ApS, Hillerød, Denmark) (MCI/MI 0.0032 mg/patch equals 100 ppm [0.01%]). Readings were performed on days 2 and 4; no later reactions were reported. Employment was recorded as the longest job a patient have had during the previous 2 years. Cosmetic intolerance was recorded if a patient reported experiencing dermatitis after contact with cosmetic or personal care products.

Categorical variables are expressed as frequencies and percentages, and continuous variables are expressed as mean and SD when data followed a normal distribution or median and interquartile

TABLE 1. Sensitivity Rates to MCI/MI According to Cosmetic Intolerance and Occupation

	Sensitivity to MCI/MI
Total N = 1179	**n = 148 (12.6)**
Cosmetic intolerance (n = 231)	64 (27.7)*
Occupation	
Housewife/homemaker (n = 245)	19 (7.8)*
Administrative (n = 98)	11 (11.2)
Farmer/rancher (n = 43)	4 (9.3)
Driver (n = 23)	3 (13.0)
Construction sector worker (n = 70)	8 (11.4)
Teacher (n = 15)	1 (6.7)
Student (n = 77)	5 (6.5)
Waiter/waitress (n = 12)	4 (33.3)
Retired (n = 48)	4 (8.3)
Cleaning professional (n = 109)	26 (23.9)*
Food handler (n = 76)	13 (17.1)
Mechanic (n = 31)	6 (6.7)
Unemployed (n = 2)	1 (0.7)
Beauty therapist (n = 63)	8 (12.7)
Health care professional (n = 69)	13 (18.8)
Sales (n = 59)	5 (8.5)
Other (n = 131)	16 (12.2)
Not reported (n = 8)	1 (12.5)

Data are frequencies and percent sensitivity to MCI/MI.
**P < 0.05 for the association of each binary factor (yes/no) with sensitivity to MCI/MI.*

range (IQR; 25th, 75th percentiles) when distributions departed from normality. The percentages were compared using the χ^2 test, the means were compared by *t* test, and the medians were compared by the Wilcoxon test.

A multivariate logistic regression analysis was performed to identify the factors independently associated with sensitivity to MCI/MI. The variables showing a significant association with sensitivity to MCI/MI in the univariate analysis were entered into the multivariate analysis. Selection of variables was then performed based on the complete enumeration algorithm and Bayesian information criterion (BIC). When the number of covariables is not too large, calculation of all possible logistic regressions is an attractive alternative to the various stepwise procedures. Each one of these regressions has an associated error measure. Bayesian information criterion estimates this error as follows:

$$BIC = -2 \cdot loglik + (\log N) \cdot d$$

with loglik being the log likelihood, N being the sample size, and d being the number of covariables. The optimal subset of covariables is that which minimizes the error measure. Bayesian information criterion is asymptotically consistent as a selection criterion, which means that, for a set of models including the true, the probability that BIC selects the true model approaches 1 as the sample size tends to infinity.[4] Other criteria, such as the Akaike, do not satisfy this property. For the large sample size of the current study (N = 1179), BIC could be the best criterion for the selection of variables. The complete enumeration procedure[5] is an efficient algorithm to determine the optimum subset of covariables (implemented in R procedure bestglm). Moreover, the possible nonlinear effects of continuous variables were explored using additive models.[6] The model was summarized as *P* values (likelihood ratio test) and odds ratios (ORs), which were estimated by means of 95% confidence intervals (CIs).

The discriminant capacity of the score deduced from the logistic model was evaluated from a receiver operating characteristic (ROC) curve analysis. The area under the ROC curve was estimated by means of the 95% CI. Statistical significance was set at $P < 0.05$. Data were analyzed using the R package, version 3.1.1.[7]

RESULTS

Of the 1179 subjects included in the study, 148 (12.6%) showed sensitivity to MCI/MI. The mean (SD) age of those with sensitivity was 47.1 (15.8) years, whereas that of those without sensitivity was 45.1 (15.8) years, with the difference being nonsignificant ($P = 0.163$). The percentage of men in the study was 29.3%, with no significant difference between sensitized and nonsensitized patients ($P = 0.913$). For the subjects who were sensitive, the median year of observation was 2013 (IQR, 2010, 2014), whereas for those who were not sensitive, it was 2011 (IQR, 2008, 2013) ($P < 0.001$). Table 1 shows the rates of MCI/MI sensitivity for the subjects with cosmetic intolerance according to occupation. As binary factors, cosmetic intolerance ($P < 0.001$), housewife/homemaker ($P = 0.011$), and cleaning professional ($P = 0.001$) were associated with sensitivity to MCI/MI. These variables were introduced into the multivariate logistic analysis with MCI/MI sensitization as the outcome. The selected explanatory variables were as follows: year of observation ($P < 0.001$; OR per year, 1.155; 95% CI, 1.084–1.231), cosmetic intolerance ($P < 0.001$; OR, 3.228; 95% CI, 2.212–4.712), and cleaning professional ($P = 0.004$; OR, 2.188; 95% CI, 1.319–3.628). Housewife/homemaker failed to meet the BIC inclusion criterion, with its OR being adjusted for the 3 included covariates (0.593; 95% CI, 0.349–1.006) (Table 2).

TABLE 2. Factors Independently Associated With Sensitivity to MCI/MI in the Multivariate Logistic Regression

	*P**	OR (95% CI)
Year of observation,† per year	<0.001	1.155 (1.084–1.231)
Cosmetic intolerance	<0.001	
Yes		3.228 (2.212–4.712)
No		1 (Reference)
Cleaning professional	0.004	
Yes		2.188 (1.319–3.628)
No		1 (Reference)

"Housewife/homemaker" did not meet the BIC inclusion criterion; adjusted OR, 0.593 (95% CI, 0.349–1.006).
**Likelihood ratio test.*
†The nonlinearity of the year of observation did not show statistical significance when the additive logistic regression was used.

The only employment significantly associated with an increase in the prevalence of MCI/MI sensitization was therefore cleaning professional. Of the 26 cleaners who were sensitive to MCI/MI, 10 (38.5%; 95% CI, 20.2%–59.4%) had consulted for cosmetics-related dermatitis.

The additive logistic regression does not show nonlinearity for the variable year of observation. This means that the growth of the risk is constant over the observation time. Figure 1 shows the observed incidences of MCI/MI sensitivity by year and estimated probabilities of sensitivity to MCI/MI according to the status of professional cleaner (yes/no) and of having cosmetic intolerance (yes/no) from the logistic model. From the estimated logistic model, we deduced the following discriminant score:

$$\text{Score} = 0.144 \times \text{year} + 1.172 \times \text{cosmetic intolerance} + 0.783 \times \text{cleaning professional}.$$

Receiver operating characteristic curve analysis showed that the linear score deduced from the logistic model has an acceptable discriminant capacity for the end point of the study (area under the ROC curve, 0.715; 95% CI, 0.670–0.761). The corresponding ROC curve is shown in Figure 2.

DISCUSSION

The main limitation of our study is that MI sensitization may be underestimated because MCI/MI sensitivity was tested using the TRUE Test (only containing MCI/MI 100 ppm or 0.01%) in a retrospective study dating back to 2005, when patch testing with isolated MI (at a higher concentration, eg, 2000 ppm or 0.2%) or other isothiazolinones was not generalized.

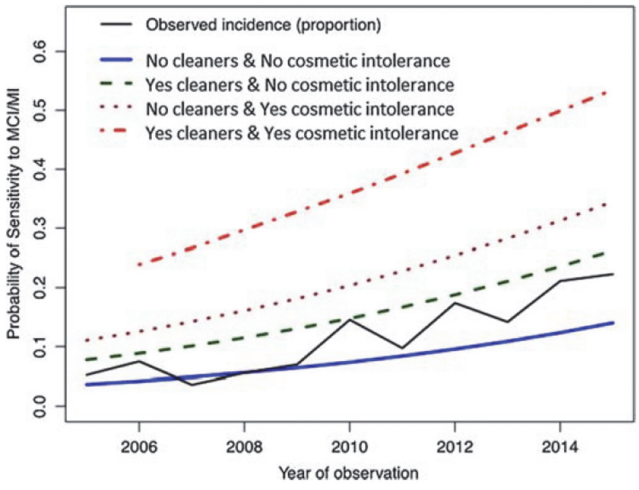


Figure 1. Sensitivity to MCI/MI: observed incidences (proportions) by year and estimated probabilities from the logistic model according to year, status of cleaner (yes/no), and cosmetic intolerance (yes/no). The incidence growth is statistically significant ($P < 0.001$). Likewise, in each year and group determined by the factor "cleaners," the probability of sensitivity to MCI/MI is significantly higher in those with cosmetic intolerance in relation to those without cosmetic intolerance ($P < 0.001$). Similarly, in each year and group determined by the factor "cosmetic intolerance," the cleaners have a significantly greater probability of sensitivity to MCI/MI than noncleaners.

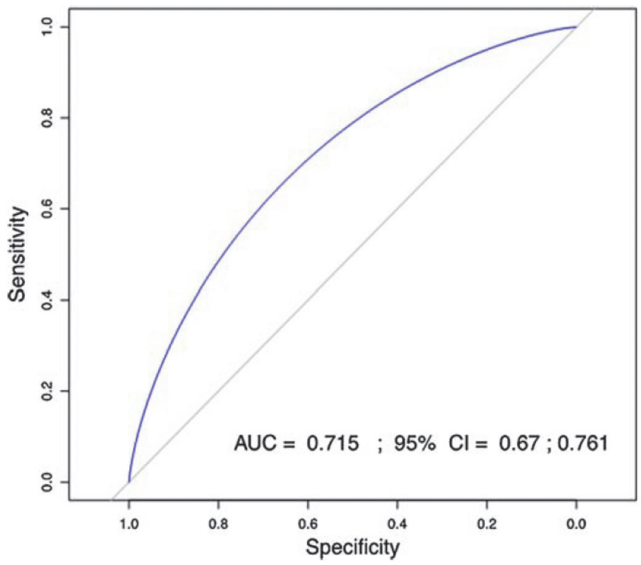


Figure 2. Receiver operating characteristic curve for the linear discriminant score deduced from the logistic model.

Occupational sensitization to MCI/MI, and to MI in particular, is increasing among cleaning professionals, and this might be positively associated with (or perhaps even result in) allergic contact dermatitis from cosmetics. Sources of MCI/MI in housekeeper staff are numerous (Table 3).[8] Allergic contact dermatitis to MCI/MI or MI contained in cosmetics may in part be the consequence of a preexisting sensitization due to exposure to industrial cleaning products, which frequently contain high concentrations of MI or other isothiazolinones.[9,10] Aerts et al[11] reported for the first time the occurrence of high use concentrations of MI in products such as detergents and cosmetics.

Our data highlight the need for a review of the regulations regarding (unlimited) isothiazolinone concentrations in industrial and household detergents, as is performed for cosmetics.[12] Although working conditions are variable, in the experience of the authors, regulations should include setting maximum concentrations permitted,

TABLE 3. Examples of Potential Sources of MCI/MI in Cleaning Products

All-purpose household cleaners
Glass cleaners
Dishwashing and machine-washing liquids
Wet wipes
Fabric softeners
Liquid detergents and washing powders
Floor detergents
Toilet and kitchen cleaners
Maintenance products for clothes
Maintenance products for air conditioning, pools, and vehicles (eg, glass cleaners, brake fluids)

providing clear instructions of use, avoiding spray products, and selling undiluted detergents that may be used at very high concentrations.

REFERENCES

1. Geier J, Lessmann H, Schnuch A, et al. Recent increase in allergic reactions to methylchloroisothiazolinone/methylisothiazolinone: is methylisothiazolinone the culprit? *Contact Dermatitis* 2012;67:334–341.
2. Urwin R, Warburton K, Carder M, et al. Methylchloroisothiazolinone and methylisothiazolinone contact allergy: an occupational perspective. *Contact Dermatitis* 2015;72:381–386.
3. Liuti F, Hernández Z, Borrego Hernando L. Increased sensitization to Kathon CG (methylchloroisothiazolinone plus methylisothiazolinone) in the south of Gran Canaria, Spain. *Actas Dermosifiliogr* 2014;105:882–883.
4. Schwarz GE. Estimating the dimension of a model. *Ann Stat* 1978;6: 461–464.
5. Morgan JA, Tatar JF. Calculation of the residual sum of squares for all possible regressions. *Technometrics* 1972;14:317–325.
6. Hastie TJ, Tibshirani RJ. Generalized additive models. *Stat Sci* 1986; 1:297–318.
7. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2016. Available at: http://www.R-project.org/. Accessed March 1, 2017.
8. Aerts O, Goossens A, Lambert J, et al. Contact allergy caused by isothiazolinone derivatives: an overview of non-cosmetic and unusual cosmetic sources. *Eur J Dermatol* 2017;27:115–122.
9. Scheman A, Severson D. American Contact Dermatitis Society Contact Allergy Management Program: an epidemiologic tool to quantify ingredient usage. *Dermatitis* 2016;27:11–13.
10. Garcia-Hidalgo E, Sottas V, von Goetz N, et al. Occurrence and concentrations of isothiazolinones in detergents and cosmetics in Switzerland. *Contact Dermatitis* 2017;76:96–106.
11. Aerts O, Meert H, Goossens A, et al. Methylisothiazolinone in selected consumer products in Belgium: adding fuel to the fire? *Contact Dermatitis* 2015;73:142–149.
12. Bruze M, Uter W, Gonçalo M, et al. Incompetence and failure to regulate methylisothiazolinone. *Contact Dermatitis* 2015;72:353–354.

V.2 Isotiazolinonas en productos de limpieza: análisis con cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem de muestras procedentes de pacientes sensibilizados y del mercado.

Título: "Isothiazolinones in cleaning products: analysis with liquid chromatography tandem mass spectrometry of samples from sensitized patients and market".

Autores: Gabriel Marrero-Alemán, Leopoldo Borrego, Ana González Antuña, Ana Macías Montes, Octavio Pérez Luzardo.

Objetivo: Evaluar la exposición a isotiazolinonas contenidas en productos de limpieza del mercado y de pacientes sensibilizados, y verificar su correcto etiquetado.

Referencia: *Contact Dermatitis*. 2020 Feb;82(2):94-100.

DOI: 10.1111/cod.13430.

PMID: 31657463.

Índices de calidad:

- Revista: *Contact Dermatitis*. ISSN: 0105-1873.
- Factor de impacto (2019): 3.952.
- Cuartil: 1º (9/68).
- Citas del artículo: 2 (Web of Science/Scopus, última visita Enero 2021).

Received: 8 June 2019 | Revised: 24 September 2019 | Accepted: 25 October 2019

DOI: 10.1111/cod.13430

ORIGINAL ARTICLE

CONTACT DERMATITIS WILEY

Isothiazolinones in cleaning products: Analysis with liquid chromatography tandem mass spectrometry of samples from sensitized patients and market

Gabriel Marrero-Alemán[1,4] | Leopoldo Borrego[1,4] | Ana González Antuña[2,4] | Ana Macías Montes[2,4] | Octavio Pérez Luzardo[2,3,4]

[1]Dermatology Department, Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno-Infantil, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

[2]Toxicology Unit, Research Institute of Biomedical and Health Sciences (IUIBS), Las Palmas de Gran Canaria, Spain

[3]Spanish Biomedical Research Centre in Physiopathology of Obesity and Nutrition (CIBERObn), Las Palmas de Gran Canaria, Spain

[4]Medical Sciences Department, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

Correspondence
Gabriel Marrero-Alemán, Department of Dermatology, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Ctra. Gral. del Rosario 145, Santa Cruz de Tenerife 38010, Spain.
Email: gabriel.marrero@aedv.es.

Present address
Gabriel Marrero-Alemán, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, Spain.

Abstract

Background: Methylchloroisothiazolinone (MCI) and methylisothiazolinone (MI) contact dermatitis is a severe problem. The high concentrations of these substances and other isothiazolinones such as benzisothiazolinone (BIT) and octylisothiazolinone (OIT) contained in cleaning products may cause allergic contact dermatitis in sensitized patients.

Objectives: To evaluate the exposure to isothiazolinones contained in cleaning products on the market and from sensitized patients, and to verify the accuracy of labeling.

Methods: A total of 34 cleaning products were collected (17 supplied by sensitized patients and 17 bought randomly). Analysis was made of the concentrations of MI, MCI, BIT, and OIT using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

Results: MI and BIT were the components most frequently detected. Of all the products analyzed, 76.5% contained at least one isothiazolinone. Twelve products had an MI concentration above the permitted level for rinse-off cosmetics. Most of them were coming into direct contact with the skin in daily use. Mislabeling occurred in eight products.

Conclusions: Some cleaning products with high concentrations of isothiazolinones may cause cutaneous symptoms in sensitized patients, especially in spray form. The labeling should be correct, also regarding the use of each article.

KEYWORDS

benzisothiazolinone, cleaning products, contact dermatitis, isothiazolinones, labeling, liquid chromatography, market survey, methylchloroisothiazolinone, methylisothiazolinone, octylisothiazolinone

1 | INTRODUCTION

Sensitization to methylchloroisothiazolinone (MCI) and methylisothiazolinone (MI) is a worldwide problem. Cosmetics are the most common causative products in patients who are sensitized to MI and MCI.[1] Accordingly, the Cosmetics Regulation now prohibits the use of MI in leave-on cosmetics and limits it to 15 ppm in rinse-off products.[2] Cleaning detergents have been considered to be the

© 2019 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd

second leading source of MI in some studies, and responsible for sensitization in 16.7% of patients, mostly due to dishwashing liquids.[3] Repeated exposure to isothiazolinones has been suggested to be able to induce or aggravate occupational hand dermatitis in patients with frequent contact, and even to cause lesions on other parts of the body when the product is applied in spray form, but there is no legislation limiting their use. Washing machine detergents are also suspected to cause cutaneous symptoms in highly sensitized patients.[4] A case has recently been reported of a worker involved in the production of detergents with hand eczema due to sensitization to MCI/MI and MI, noting that high concentrations of these products can produce skin problems.[5]

In our area, sensitization to MCI/MI is common, with an epidemiologic association with use of cosmetics and working as cleaning personnel.[6,7] Accordingly, we aimed to determine the degree of exposure to MCI/MI and other isothiazolinones in our patients. We used liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) to analyze the concentration of isothiazolinones in cleaning products provided by our patients, and extended the study to also include products chosen randomly from the market.

2 | METHODS

2.1 | Patients and products

Products were supplied by six patients. All the patients were sensitized to MI and MCI/MI, with symptoms elicited by cleaning products they handled frequently in their daily life. All patients were patch tested according to ESCD guidelines.[8] Relevant clinical data are summarized in Table 1. Most patients had concomitant cosmetic-related or irritant hand dermatitis; five of them reported significant improvement after avoidance of cleaning products, with recurrence in case of unsuspected reexposure. The other patient died during the follow-up.

A total of 34 cleaning products were obtained, 17 provided by sensitized patients suspected to have elicited their clinical symptoms and which remained closed until the analysis. Another 17 products were purchased at random from four different supermarkets in Las Palmas de Gran Canaria, with or without the inclusion of the word isothiazolinones on the product label. The supermarket products were of medium price and different brands. The product labeling reported the presence of MI in 23 cases, MCI in 9, benzisothiazolinone (BIT) in 14, and octylisothiazolinone (OIT) in 2.

2.2 | Chemicals and instrumentation

LC-MS grade water and methanol (analytical grade) were purchased from Fisher Scientific (Pittsburgh, Pennsylvania). MI, MCI, BIT, and OIT (CAS no. 2682-20-4, 2634-33-5, 26172-55-4, and 26530-20-1, respectively) were purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). All chemicals were obtained with 96% purity. From all isothiazolinones, 1 g/L standard was used. Stock solution mixtures containing four isothiazolinones were prepared in methanol. This solution was stored in a refrigerator at −18°C and all calibration solutions were prepared daily using the stock solution mixture.

The separation of isothiazolinones from the cleaning products was carried out using a high-performance liquid chromatography (HPLC) system (consisting of vacuum degasser, auto sampler, and a binary pump) (Agilent series 1290, Agilent Technologies, Santa Clara, California) equipped with a reversed-phase zorbax-C18 analytical column (2.1 × 50 mm and 1.8 μm particle size, Agilent Technologies). One microliter of the extract was injected in each run.

Mobile phases A and B were water and methanol, both with 0.1% formic acid. The chromatographic method held the initial mobile phase composition (10% B), followed by a linear gradient to 90% B up to 6 min and constant for 2 min. Then, the initial conditions were set until 11 min of total run at 10% B. The flow rate used was 0.45 mL min^{-1}. The HPLC system was connected to a triple quadrupole mass spectrometer Agilent 6460 equipped with an electrospray interface operating in positive ion mode, using the following operation parameters: capillary voltage, 3500 V; nebulizer pressure, 45 psi; nitrogen drying gas flow rate, 11.0 L/min; gas temperature, 400°C. The data were recorded with Agilent MassHunter Data Acquisition software (version B.04.00) and processed with Agilent MassHunter Qualitative Analysis software (version B.04.00) and Agilent MassHunter Quantitative Analysis software (version B.04.00). Quantitative analysis of isothiazolinones was done by monitoring the multiple transition reaction (MRM) corresponding to octylisothiazolinone 214 → 102.6; methylisothiazolinone 116 → 71.5; methylchloroisothiazolinone 150 → 87.6; benzisothiazolinone (BIT) 150 → 77.1. An analytical balance model MS205DU (Mettler Toledo, Zurich, Switzerland) was used for the gravimetric preparation of all solutions. Finally, a shaker from Heidolph Reach (Germany) was employed.

2.3 | Preparation of calibration standard solutions and samples

Four stock solutions each containing 1000 μg/g (790 μg/mL) of MCI, MI, BIT, or OIT were prepared in methanol using amber glass vials with screw caps and stored at −20°C. From these stock solutions, a mixture containing all of them at 1 μg/g of MCI, MI, BIT, and OIT was prepared also in methanol. This mixture was employed daily to prepare the calibration graph in a blank detergent matrix. Six calibration solutions were prepared using the stock solution. The concentration ranges for the standard solutions were 0.5 to 500 ng/g for each compound. All calibration points were performed using a blank matrix of a detergent free of these compounds.

Dilute and shoot procedure was carried out for the sample preparation. To this end, 1 g of each cleaning product was weighed in a polypropylene tube using an analytic balance. After that, the sample was diluted up to 60 mL with Milli-Q water and then slowly shaken for 2 min, with the objective of preventing bubbles in the solution. Finally, 0.50 mL of each sample was taken with a micropipette and transferred into a clear glass vial with a screw cap and stored at 4°C until injection into the LC-MS/MS system.

2.4 | Validation of the methodology

The validation of the methodology based on the quantification of isothiazolinones was carried out performing recovery studies spiking a detergent-free matrix of these compounds. For this purpose, a gravimetrically controlled amount of the stock solution mixture of isothiazolinones was added at the beginning of the sample preparation procedure. The samples were spiked at a level of 40, 400, and 4000 ng/g and three independent replicates for each concentration level were analyzed. Then, the recovery values were calculated dividing the concentration obtained by the theoretical concentration calculated from the added amount of standard stock solutions. The limits of detection (LODs) and quantification (LOQs) of the methodology were calculated by quantifying the blank values in 10 independent replicates of 1 g of soap. For this purpose, the LODs and the LOQs were calculated as 3 and 10 times the standard deviation of the blank concentration, respectively.

3 | RESULTS

3.1 | Validation of the methodology

The validation of the methodology was carried out by recovery studies described above. All recoveries were obtained with a range of 85%-110% from each compound and at each level of concentration (Figure 1). Table S1 also shows the relative standard deviations (RSD) lower than 5% except for MI, where it was 7%. We observed no worsening of the accuracy or precision of the recovery values when decreasing the concentration from 4000 to 40 ng/g in matrices. The results show that all compounds were quantitatively recovered from the matrix applying the proposed sample preparation at all concentration levels in soap.

The sensitivity of the methodology for the detection of isothiazolinones in different products at the very low levels was evaluated. Figure 2 shows an LC-MS/MS chromatogram of a sample

TABLE 1 Clinical data of sensitized patients

	Gender	Age	Year of diagnosis	Time with lesions (months)	Occupation	Location of lesions	Positivities	Follow-up
1.	Female	46	2015	8	Cleaning professional (hotel)	Face, upper and lower limbs, trunk	MCI/MI, MI, Nickel, Thimerosal, Fragrance mix II[a]	Asymptomatic after avoidance. Hand eczema when not using gloves
2.	Female	71	2015	48	Disabled caregiver	Face, trunk, upper limbs and shins	MCI/MI, MI, Shellac	*2015*: Persistence of lesions on hands, forearms and shins after cosmetic avoidance. *2016*: Asymptomatic after avoidance of cleaning products.
3.	Female	58	2015	6	Cleaning professional (driving school)	Face, neck and axillae	MCI/MI, MI	Asymptomatic after avoidance of cosmetics (axillae) and spray cleaning products (neck, face)
4.	Male	58	2017	4	Cleaning professional (apartments building)	Upper limbs	MCI/MI, MI, Methyldibromo glutaronitrile, Bronopol, Iodopropynyl butylcarbamate	Asymptomatic after strict use of gloves and long sleeves
5.	Female	62	2017	60	Housekeeper	Face, neck, trunk and upper limbs	MCI/MI, MI, Nickel, Ethylenediamine, Fragrance mix I[a]	Asymptomatic after avoidance of cosmetics and cleaning products. Occasional forearm lesions where not protected by gloves
6.	Male	80	2017	Years	Priest	Trunk and proximal limbs	MCI/MI, MI, Potassium dichromate	Improvement after cosmetic avoidance. Died during the follow up.

Abbreviations: MCI, methylchloroisothiazolinone; MI, methylisothiazolinone.

[a]Patch tested with the Chemotechnique Diagnostics Fragrance Series with negative results to all allergens.

spiked with 40 ng/g. The sensitivity obtained for each of the MRM transitions acquired was satisfactory. The LOD and LOQ in a soap sample are given in Table S2. The LOD for a sample volume of 1 g was found to be lower than 1 ng/g for all compounds. According to these results, the methodology could be efficiently applied for the quantification of isothiazolinones in cosmetic and noncosmetic control analysis.

3.2 | Analysis of samples

Thirty-four samples of detergents, multipurpose cleaning sprays, dishwashing liquids, glass cleaners, WC cleaners, floor cleaners, grease removers, one air freshener, and one stain remover were analyzed. The results showed that 26 of 34 cleaning products (76.5%) contained isothiazolinones, with a range from 18.6 to 58 426.8 ng/g (ppb), as can be seen in Table 2. Thus all samples showed concentrations lower than 100 ppm, although in 12 cases (35.3%) the MI concentration was higher than 15 ppm, the limit that regulation indicates for rinse-off cosmetics.

MI and BIT were the compounds most often used, followed by MCI; BIT was detected alone in only one product, and together with MI in 15 of 34 products analyzed. MCI was detected in seven samples and OIT was detected in only one product. Simultaneous presence of three isothiazolinones was detected in only three products. Six products contained isothiazolinones not declared on the product labeling, whereas four products declared the presence of these substances even when they did not contain any isothiazolinones.

4 | DISCUSSION

According to our results, two-thirds of our products contained isothiazolinones below the level permitted by European legislation for rinse-off cosmetics and 12 products contained concentrations of MI above the 15 ppm permitted. It has been postulated for cleaning

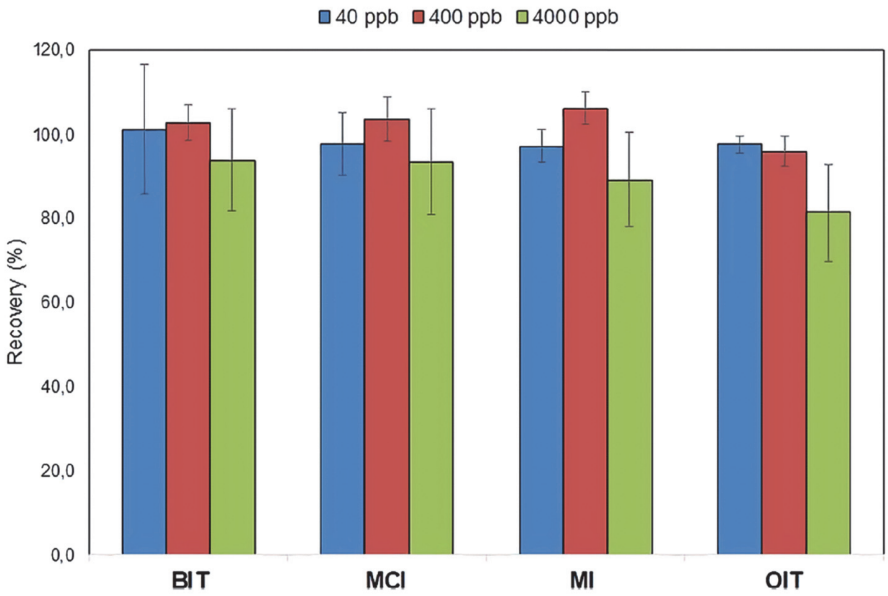


FIGURE 1 Recoveries obtained of each isothiazolinone determined by the proposed procedure based on LC-MS/MS. Uncertainty is expressed as standard deviation of n = 3 independent replicates. (BIT, benzisothiazolinone; MCI, methylchloroisothiazolinone; MI, methylisothiazolinone; OIT, octylisothiazolinone)

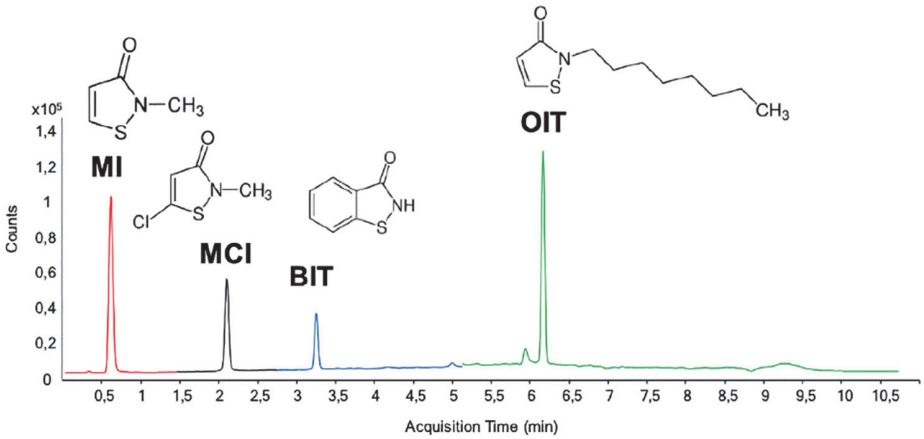


FIGURE 2 LC-MS/MS chromatogram of a sample spiked at 40 ng/g

TABLE 2 Isothiazolinone concentration in cleaning products, expressed in ng/g (ppb)

Type of product	Product	BIT (ppb)	MCI (ppb)	MI (ppb)	OIT (ppb)
Multipurpose cleaning spray[a]	Ajax Expel	0.0	1495.1	3068.5	2378.1
Multipurpose cleaning spray[a,d]	Froggy ecológico hogar	20 767.7	0.0	58 426.8	0.0
Multipurpose cleaning spray[a]	Imi TOP Ecolab	0.0	0.0	0.0	0.0
Multipurpose cleaning spray[a]	Renolit Amoniacal Ecolab	0.0	0.0	0.0	0.0
Multipurpose cleaning spray[a]	Desinclor Pons higienizante clorado	0.0	0.0	0.0	0.0
Multipurpose cleaning spray[d]	IFA SABE Limpiador multiusos	14 909.3	0.0	15 277.2	0.0
Multipurpose cleaning spray[d]	Tenn brillante universal con bioalcohol	14 575.1	0.0	15 237.0	0.0
Dishwashing liquid[a]	Frosch Ecológico hipoalergénico	0.0	0.0	0.0	0.0
Dishwashing liquid[a]	Assert Lemon Ecolab	0.0	0.0	0.0	0.0
Dishwashing liquid[a]	Lavavajillas manual Pons	0.0[c]	0.0	3626.8	0.0
Dishwashing liquid	Bosque Verde Lavavajillas	217.3[b]	450.1	3496.8	0.0
Dishwashing liquid	Spar lavavajillas	0.0	13 421.2	4800.5	0.0
Dishwashing liquid	Lagarto concentrado ultra	0.0	15 235.8	4538.8	0.0
Glass cleaner[a,d]	W5 Limpacristales	34 263.1	0.0	16 427.2	0.0
Glass cleaner[a]	Multiusos multiglas PonsPro	0.0	0.0	3431.1[b]	0.0
Glass cleaner[d]	Hiperdino Home Limpiacristales	11 294.6	0.0	16 055.9	0.0
Glass cleaner[d]	Spar limpiacristales	20 086.7	0.0	19 800.6	0.0
Glass cleaner	Bosque Verde limpiacristales y multiuso	0.0	0.0	74.1[b]	0.0
Detergent[a]	Detergente COLON	22 451.4	0.0	29 942.7	0.0
Detergent[a]	Oro Marsella	55.4[b]	0.0[c]	0.0[c]	0.0
Stain remover[a]	Neutrex OXY 5 sin lejía	0.0	0.0[c]	316.8	0.0[c]
WC cleaner[a]	Inquivisa Suavizante Perfumado	158.7[b]	6410.5	2985.2	0.0
WC cleaner	Hiperdino GEL WC	0.0	0.0	0.0	0.0
WC cleaner	Bosque Verde Gel Limpiador Baños	35 372.8	0.0	42 477.7	0.0
Grease remover[a]	Froggy Ecológico Desengrasante	0.0	0.0	0.0	0.0
Grease remover[d]	Las 3 Brujas Pargras	33 113.2	0.0	8272.3	0.0
Grease remover	VialPlus Quitagrasas multiusos	0.0	72.0	0.0[c]	0.0
Grease remover	Bosque Verde Quitagrasas	0.0	0.0	18.6[b]	0.0
Floor cleaner[a]	Neutro concentrado Ponslim TOP PonsPro	528.5	0.0	32 414.6	0.0
Floor cleaner	Bosque Verde Abrillantador	19 431.5	0.0	28 978.9	0.0
Floor cleaner	Spar fregasuelos jabón verde	43 826.7	0.0	51 184.5	0.0
Floor cleaner	Bosque Verde aromatico (pino)	12 433.6	0.0	43 985.1	0.0
Floor cleaner	La Sabandeña fregasuelos	0.0	80.7	51.0	0.0
Air freshener[a]	LOEME Pons	0.0	0.0	0.0	0.0

Abbreviations: BIT, benzisothiazolinone; MCI, methylchloroisothiazolinone; MI, methylisothiazolinone; OIT, octylisothiazolinone.
[a]Products from patients.
[b]Not labeled as containing the isothiazolinone.
[c]Labeled as containing the isothiazolinone.
[d]Spray form.

products that a brief but repeated exposure could induce or aggravate dermatitis in patients who have frequent contact with these products.[4] Limiting contact with these products in sensitized patients has led to a reduction in cutaneous symptoms in patients with recalcitrant eczema.[9] Due to the ubiquity of isothiazolinones, it is impossible to establish whether sensitization was due to contact with cosmetics or cleaning products in our patients. Most probably both sources should be considered to a varying extent in each patient. The frequent contact with these products and the clearance of lesions after avoiding sprays, hand dishwashing detergents, laundry detergents, and using gloves and long sleeves indicated that they were the main agents responsible for the presence or persistence of dermatitis in our patients (Table 1).

Alvarez-Rivera et al developed a method for the detection of isothiazolinones in cosmetics and cleaning products using HPLC-MS/MS in A Coruña, with the same detection limit of our study in ng/g (ppb).

These authors demonstrated the presence of high concentrations of isothiazolinones in rinse-off cosmetics, as well as noting mislabeling in some products. Regarding household products, they found low concentrations of MI and MCI (lower than 15 ppm) and quite high concentrations of BIT.[10] Our study additionally analyzed samples provided by patients who were sensitized to isothiazolinones. Garcia-Hidalgo et al determined the concentrations of isothiazolinones in 19 cosmetics and 69 detergents on the market in Switzerland, finding that 42.9% of the detergents contained isothiazolinones compared to 7.6% of the cosmetics. In view of these results and our data, consideration should be given to evaluating new restrictions in noncosmetic products that might come into direct contact with the skin.[11]

In our study, 12 products had concentrations of MI above 15 ppm, the limit established for rinse-off cosmetic products. Three were multipurpose cleaning sprays, which can also cause cutaneous symptoms via an airborne mechanism (Table 1, Patient 3). In this case, the ways to prevent direct contact are to avoid spraying the product (and just pour it directly onto a cloth) or limit the concentration of MI as though they were rinse-off cosmetics. Eight samples, including glass, WC, and floor cleaners, come into direct contact with patients if not properly used (Table 1, Patients 1, 2, 4, and 5). Accordingly, the labeling should state that gloves and long sleeves should be worn. One dishwashing liquid had concentrations above 15 ppm of MCI. Hahn et al studied biocides in cleaning products and concluded that these can contribute to inducing sensitization in the population.[12] Here, too, it would be useful to specify by labeling the recommendation to use gloves with hand dishwashing detergents. One case of washing machine detergent had a concentration of almost 30 ppm. Hofmann et al studied the persistence of MI in various types of clothes after washing in a washing machine and found no detectable levels.[13] It would be interesting to examine the persistence of levels of MI after different type of washes and the use of other products in the washing cycle, such as softeners.

The need to limit the concentration of a substance in a product that can be dangerous to the skin should be based on the concentration of the product and the manner of exposure to this product. Based on the manner of use and our results, it would be justified to limit the concentration of cleaning products in sprays and strictly label the rest of products.

Given that the number of reported cases of patients sensitized to BIT and OIT is much lower, the role of these agents in isothiazolinone sensitization in the general population is not clear. Schwensen et al showed that MI-sensitized individuals may react to OIT and BIT if exposed to sufficient concentrations.[14] Other studies have noted that the reactions can be attributed to coexposure more than cross-reactivity.[15] In our series, 16 samples contained BIT or OIT plus MI or MCI in the same product. On the other hand, 12 samples had concentrations of BIT above 10 ppm, so that perhaps this component should be considered. Garcia-Hidalgo et al developed a probabilistic model, suggesting that around 1% of the Swiss population is at risk of being sensitized by BIT because it may exceed the adjusted acceptable exposure level; in addition, they noted that cleaning products are currently a greater source of sensitization than cosmetics.[16] *N*-Butyl-1,2-benzisothiazolin-3-one caused sensitization in a patient in contact with cooling fluid.[17] Two cases have recently been reported of sensitization to BIT used as a preservative in the development of encapsulated substances,[18] used to release fragrances in textiles and detergents.[19] Even fewer data are available for OIT. The presence of OIT in leather goods caused the induction of sensitization in several consumers, showing potential cross-reactivity with MI.[20] A European prospective study is currently attempting to determine the rate of sensitization to these two isothiazolinones. After their conclusions, decisions will be taken concerning the recommendation of restrictions, as was done with MI/MCI and MI.[21]

In 10 samples (29.4%) we found discordance between the product label and the results of the analysis. Six of these contained isothiazolinones at very low concentrations that were not mentioned on the label, probably with no clinical relevance (MI concentration lower than 3 ppm). Wittenberg et al undertook an analysis using UHP LC-MS/MS with a lower limit of quantitation (LLOQ) of 0.1 µg/g to determine the concentration of MI and MCI in 24 cosmetics, finding a good correlation between the label and the study analysis.[22] In Belgium, eight detergents were studied in supermarket samples, results showing high levels of MI in three products and mislabeling in two.[23] The LOD in this study was around 1 ppm, so it is possible that lower concentrations were not detected. Because the cleansing power of the detergent is unchanged, the high percentage of mislabeling in our cases is perhaps due more to a minimal contamination in the product manufacturing cycle than to any intentional alteration on the label.[24] Notable in our cases was the lack of some isothiazolinones declared on the label of four products. The failure in the composition and labeling indicates that an adequate quality control of the final product is required.

In conclusion, we do not consider it necessary to restrict the concentration of isothiazolinones in all cleaning products. However, suitable quality controls of the final product should be made and the labels should specify the correct way to use the products, both for consumers, and the potentially more exposed professional users (cleaners). In the case of sprays, limiting the concentration of MI to 15 ppm would probably reduce the cutaneous symptoms in susceptible patients. We now await the results concerning the rate of sensitization to BIT and OIT in the European population to determine whether these substances pose a risk of general sensitization that would require legislation restricting their use.

CONFLICTS OF INTEREST

None to declare.

ORCID

Gabriel Marrero-Alemán https://orcid.org/0000-0001-5677-4599
Leopoldo Borrego https://orcid.org/0000-0002-0199-2756

REFERENCES

1. Lundov MD, Opstrup MS, Johansen JD. Methylisothiazolinone contact allergy - a growing epidemic. *Contact Dermatitis*. 2013;69:271-275.
2. Council on cosmetic products. Opinion on methylisothiazolinone (EC. No 1223/2009), adopted July 6, 2017. European Commission. 2017. http://

eur-lex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R1224&from=EN (Accessed in November, 2018).
3. Aerts O, Goossens A, Giordano-Labadie F. Contact allergy caused by methylisothiazolinone: the Belgian-French experience. *Eur J Dermatology*. 2015;25:228-233.
4. Aerts O, Goossens A, Lambert J, Lepoittevin JP. Contact allergy caused by isothiazolinone derivatives: an overview of non-cosmetic and unusual cosmetic sources. *Eur J Dermatology*. 2017;27:115-122.
5. Sandvik A, Holm JØ. Severe allergic contact dermatitis in a detergent production worker caused by exposure to methylisothiazolinone. *Contact Dermatitis*. 2019;80:243-245.
6. Liuti F, Hernández Hernández Z, Borrego Hernando L. Increased sensitization to Kathon CG (Methylchloroisothiazolinone plus methylisothiazolinone) in the south of Gran Canaria, Spain. *Actas Dermosifiliogr*. 2014;105:882-883.
7. Marrero-Alemán G, Saavedra Santana P, Liuti F, Hernández N, López-Jiménez E, Borrego L. The role of cleaning products in epidemic allergic contact dermatitis to Methylchloroisothiazolinone/Methylisothiazolinone. *Dermatitis*. 2018;29:77-80.
8. Johansen JD, Aalto-Korte K, Agner T, et al. European Society of Contact Dermatitis guideline for diagnostic patch testing - recommendations on best practice. *Contact Dermatitis*. 2015;73:195-221.
9. Gallo R, Signori A, Gervasio S, Riva S, Parodi A. Methylisothiazolinone contact allergy - are rinse-off cosmetics and household products relevant sources of exposure? *Contact Dermatitis*. 2016;75:319-321.
10. Alvarez-Rivera G, Dagnac T, Lores M, et al. Determination of isothiazolinone preservatives in cosmetics and household products by matrix solid-phase dispersion followed by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2012;1270:41-50.
11. Garcia-Hidalgo E, Sottas V, von Goetz N, Hauri U, Bogdal C, Hungerbühler K. Occurrence and concentrations of isothiazolinones in detergents and cosmetics in Switzerland. *Contact Dermatitis*. 2017;76:96-106.
12. Hahn S, Schneider K, Gartiser S, Heger W, Mangelsdorf I. Consumer exposure to biocides-identification of relevant sources and evaluation of possible health effects. *Environ Health*. 2010;9:1-11.
13. Hofmann MA, Giménez-Arnau A, Aberer W, Bindslev-Jensen C, Zuberbier T. MI (2-methyl-4-isothiazolin-3-one) contained in detergents is not detectable in machine washed textiles. *Clin Transl Allergy*. 2018;8:4-9.
14. Schwensen J, Menné Bonefeld C, Zachariae C, et al. Cross-reactivity between methylisothiazolinone, octylisothiazolinone and benzisothiazolinone using a modified local lymph node assay. *Br J Dermatol*. 2017;176:176-183.
15. Geier J, Lessmann H, Schnuch A, Uter W. Concomitant reactivity to methylisothiazolinone, benzisothiazolinone, and octylisothiazolinone. International Network of Departments of Dermatology data, 2009-2013. *Contact Dermatitis*. 2015;72:337-339.
16. Garcia-Hidalgo E, Schneider D, von Goetz N, Delmaar C, Siegrist M, Hungerbühler K. Aggregate consumer exposure to isothiazolinones via household care and personal care products: probabilistic modelling and benzisothiazolinone risk assessment. *Environ Int*. 2018;118:245-256.
17. Dahlin J, Isaksson M. Occupational contact dermatitis caused by N-butyl-1,2-benzisothiazolin-3-one in a cutting fluid. *Contact Dermatitis*. 2015;73:60-62.
18. Maillard A, Quenan S, Piletta-Zanin P. Occupational contact dermatitis caused by benzylisothiazolinone in two fragrance industry workers. *Contact Dermatitis*. 2019;81:140-141.
19. Ghayempour S, Montazer M. Micro/nanoencapsulation of essential oils and fragrances: focus on perfumed, antimicrobial, mosquito-repellent and medical textiles. *J Microencapsul*. 2016;33:497-510.
20. Aerts O, Meert H, Romaen E, et al. Octylisothiazolinone, an additional cause of allergic contact dermatitis caused by leather: case series and potential implications for the study of cross-reactivity with methylisothiazolinone. *Contact Dermatitis*. 2016;75:276-284.
21. Wilkinson M, Gonçalo M, Aerts O, et al. The European baseline series and recommended additions: 2019. *Contact Dermatitis*. 2019;80:1-4.
22. Wittenberg JB, Canas BJ, Zhou W, Wang PG, Rua D, Krynitsky AJ. Determination of methylisothiazolinone and methylchloroisothiazolinone in cosmetic products by ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Sep Sci*. 2015;38:2983-2988.
23. Aerts O, Meert H, Goossens A, Janssens S, Lambert J, Apers S. Methylisothiazolinone in selected consumer products in Belgium: adding fuel to the fire? *Contact Dermatitis*. 2015;73:142-149.
24. Cervigón-González I, Conde-Salazar L, Torres-Iglesias LM, Palomo-Arellano Á. Contact dermatitis due to Methylchloroisothiazolinone/Methylisothiazolinone (Kathon CG) as a contaminant in the manufacturing process of a cream. *Actas Dermosifiliogr*. 2013;104:81-82.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Marrero-Alemán G, Borrego L, Antuña AG, Macías Montes A, Pérez Luzardo O. Isothiazolinones in cleaning products: Analysis with liquid chromatography tandem mass spectrometry of samples from sensitized patients and market. *Contact Dermatitis*. 2020;82:94–100. https://doi.org/10.1111/cod.13430

Supporting Information

Table S1. Relative Standard Deviation of four isothiazolinones.

Level of concentration ng/g (ppb)	RSD (%)			
	BIT	**MCI**	**MI**	**OIT**
40	4.1	2.5	7.3	2.1
400	1.2	1.1	1.5	3.4
4000	1	0.8	1.3	2.4

RSD, relative standard deviation; BIT, benzisothiazolinone; MCI, methylchloroisothiazolinone; MI, methylisothiazolinone; OIT, octylisothiazolinone.

Table S2. LOD and LOQ of the isothiazolinones in ng/g (soap sample).

	LOD and LOQ (ng/g)			
	BIT	**MCI**	**MI**	**OIT**
Average	0.4	0.1	0.1	0.34
Standard deviation	0.2	0.01	0.09	0.31
LOD (3std)	0.7	0.03	0.27	0.93
LOQ (10std)	2.3	0.11	0.89	3.10

LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; BIT, benzisothiazolinone; MCI, methylchloroisothiazolinone; MI, methylisothiazolinone; OIT, octylisothiazolinone.

En el Anexo VI se muestra más información acerca de los niveles de IT en los productos de limpieza.

V.3 Persistencia de isotiazolinonas en ropa tras lavado a máquina

Título: "Persistence of isothiazolinones in clothes after machine washing".

Autores: Gabriel Marrero-Alemán, Leopoldo Borrego, Ana González Antuña, Ana Macías Montes, Octavio Pérez Luzardo.

Objetivo: Analizar la posible persistencia de metilisotiazolinona, metilcloroisotiazolinona, bencilizotiazolinona y octilisotiazolinona en telas habituales tras lavado a máquina.

Referencia: *Dermatitis*. 2020 Oct; Online ahead of print.

DOI: 10.1097/DER.0000000000000603.

PMID: 33074936.

Índices de calidad:

- Revista: *Dermatitis*. ISSN: 1710-3568.
- Factor de impacto (2019): 3.988.
- Cuartil: 1º (8/68).
- Citas del artículo: 0 (Online ahead of print, aún no disponible).

Comunicaciones en congresos:

- Aceptado para presentación en 15th Congress European Society of Contact Dermatitis. Amsterdam, Holanda.
  Formato: Póster.
  Persistence of isothiazolinones in clothes after machine washing.
  Presentado por Gabriel Marrero Alemán, Leopoldo Borrego, Ana González Antuña, Ana Macías Montes, Octavio Pérez Luzardo.

En el Anexo VII se muestran imágenes no publicadas de la metodología empleada en el lavado de las telas.

STUDIES

Persistence of Isothiazolinones in Clothes After Machine Washing

Gabriel Marrero-Alemán, MD,*† Leopoldo Borrego, PhD,*† Ana González Antuña, PhD,†‡
Ana Macías Montes, DVM,†‡ and Octavio Pérez Luzardo, PhD†‡§

Downloaded from http://journals.lww.com/dermatitis by BhDMf5ePHKav1zEoum1tQfN4a+kJLhEZgbsIHo4XMi0hCywCX1AWnYQp/IlQrHD3i3D0OdRyi7TvSFl4Cf3VC4/OAVpDDa8K2+Ya6H515kE= on 01/20/2021

Background: **Sensitization to methylchloroisothiazolinone (MCI) and methylisothiazolinone (MI) is a worldwide problem. Washing machine detergents are suspected to cause cutaneous symptoms in highly sensitized patients. Little is known about the persistence of isothiazolinones in clothes that have been washed.**

Objective: **The aim of the study was to analyze the possible persistence of MI, MCI, benzisothiazolinone, and octylisothiazolinone in common fabrics after machine washing.**

Methods: **Different clothes (cotton, polyester, linen, and wool) were collected, and 4 types of wash were done (control, standard, standard + conditioner, and standard + double rinse). The samples were analyzed using ultrahigh-performance liquid chromatography.**

Results: **The results showed that the concentrations of isothiazolinones were very low, independent of the type of material or wash. The highest levels were found in the control wash (hand wash), reaching a maximum of 0.4 ppm in the linen.**

Conclusions: **Our findings suggest that it is not necessary to recommend that patients sensitized to MI avoid isothiazolinones in machine detergents or fabric conditioners or to double rinse. However, after using the detergent for hand washing (the control in our study), there may remain sufficient concentrations of isothiazolinones in clothes to produce symptoms in highly sensitized patients.**

Sensitization to methylchloroisothiazolinone (MCI) and methylisothiazolinone (MI) is a worldwide problem. Fabric conditioners and washing machine detergents are suspected to cause cutaneous symptoms in highly sensitized patients.[1,2] Little is known about the persistence of isothiazolinones in clothes that have been machine washed.

Generalized dermatitis is not uncommon in isothiazolinone-sensitized patients, and spreading symptoms can occur via contact with cosmetics, paints, or airborne sprays. As isothiazolinones are present in many laundry detergents, avoidance methods or double rinsing after machine may be recommended. In the present study, we attempted to determine the degree of persistence of isothiazolinones in clothes after machine washing. Two patients (1 man and 1 woman) were patch tested with the standard Spanish series[3] because of a generalized cutaneous eruption. Both were very intensely positive for MI (0.2% aq.) and MCI/MI (0.2% aq.; Chemotechnique Diagnostics, Vellinge, Sweden) and negative for other possible allergens. The woman was also patch tested with benzisothiazolinone (BIT) and octylisothiazolinone (OIT), with negative results. The cutaneous symptoms improved in both patients after they started avoiding substances containing isothiazolinones (cosmetics and cleaning products). Both patients provided the same detergent (Colon detergent; Reckitt Benckiser S.L., Barcelona, Spain) and fabric conditioner (Flor Azul; Reckitt Benckiser S.L.) they used to wash their clothes. In a previous study, our group determined high concentrations of MI and BIT in the detergent (29,942.7 and 22,451.4 ppm, respectively),[4] so it was decided to study the possible persistence of these preservatives in common fabrics using liquid chromatography–tandem mass spectrometry.

Reagents and Instrumentation

Liquid chromatography–mass spectrometry–grade water and analytical-grade methanol were purchased from Fisher Scientific (Pittsburgh, PA). MI, MCI, BIT, and OIT were purchased from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Germany). All chemicals were purchased with 96% purity. All analyses were carried out using a high-performance liquid chromatography system (Agilent series 1290; Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipped with a

*From the *Dermatology Department, Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno-Infantil; †Universidad de Las Palmas de Gran Canaria; ‡Toxicology Unit, Research Institute of Biomedical and Health Sciences (IUIBS); and §Spanish Biomedical Research Centre in Physiopathology of Obesity and Nutrition (CIBERObn), Madrid, Spain.*

Address reprint requests to Gabriel Marrero-Alemán, MD, Department of Dermatology, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Ctra. Gral. del Rosario, 145, 38010 Santa Cruz de Tenerife, Spain. E-mail: gabriel.marrero@aedv.es.

The authors have no funding or conflicts of interest to declare.

G.M.-A. is now with the Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, Spain.

DOI: 10.1097/DER.0000000000000603

© 2020 American Contact Dermatitis Society. All Rights Reserved.

Copyright © 2020 American Contact Dermatitis Society. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

TABLE 1. Characteristics of the Washes

	Control (in a Bucket of Water)	Standard	Standard + Fabric Conditioner	Standard + Double Rinse
Detergent (52 mL)	Yes	Yes	Yes	Yes
Fabric conditioner (30 mL)	No	No	Yes	No
Total time, min	30	44	44	63
No. rinses	1	1	1	2
Amount of water, L	5	70	70	70

reversed-phase column and coupled to triple quadrupole (tandem mass spectrometry).

Sample Preparation

Sample fabrics were purchased in a specialized textile store at Las Palmas de Gran Canaria (Spain). The specimens collected were as follows: 100% cotton, 100% polyester, 80% linen/20% cotton, and 100% wool, either white or light colored. Two samples of each material measuring 10 × 20 cm each were used (the woolen samples shrunk after washing to half the original size). A market detergent (Colon) and a fabric conditioner (Flor Azul) were used. The washes were done in a standard washing machine (model WA10J5710SW/GG; Samsung, Thailand), without mixing with any other clothes. The washes were done with the standard program, in cold water, with rinses of 10 minutes and centrifuge for 1 minute. Details of the various types of wash are given in Table 1. The samples were then hung up outside to dry for 16 to 20 hours, and then each sample was placed in an individual plastic bag and kept in darkness until its analysis 48 hours later. As a control, we used the same fabrics immersed in water with the detergent for 30 minutes and hung up for the same time.

A liquid-liquid extraction procedure with methanol was carried out. To do this, a piece of each cloth was put into a Falcon tube, and then 45 mL of methanol was added. To extract all the compounds, the Falcon tubes were stirred overnight. After that, the same volume of methanol was taken from each sample and then evaporated until dryness. Finally, 15 mL of methanol was added to wash the tubes, and then 1 mL was transferred into a chromatogram vial. All samples were analyzed using ultrahigh-performance liquid chromatography. A previous study by our group found the limit of detection to be lower than 1 ng/g for all compounds in a detergent matrix, this being more difficult than in the present study.[4]

RESULTS

The analysis of the detergent and the fabric conditioner showed concentrations of MI of 29,942.7 and 43,187.9 ng/g and of BIT of

TABLE 2. Concentration of Isothiazolinones According to the Washing Method Used

Concentration in ng/g Extracted From the 10 × 20-cm sample (Except Wool, 5 × 10 cm)	BIT		MCI		MI		OIT	
	Mean, ng/g	SD	Mean, ng/g	SD	Mean, ng/g	SD	Mean, ng/g	SD
Control (n = 2)								
Polyester	7.8	5.5	0	0	77.4	33.3	2.6	1.7
Wool	0	0	0	0	14.6	1.8	0	0
Cotton	6.1	1.4	0	0	548	89.6	0	0
Linen	3.59	0.01	0	0	457.8	14.8	0	0
Standard wash (n = 2)								
Polyester	0	0	0	0	5.5	1.4	3.4	2.2
Wool	0	0	0	0	17.7	4.6	0	0
Cotton	1	0.2	0	0	9.5	3.1	0	0
Linen	3.8	0.4	0	0	4.7	0.8	3.6	2.9
Standard wash + conditioner(n = 2)								
Polyester	10.1	2	0	0	8.9	1.1	2.4	0.5
Wool	0.9	1.3	0	0	16.6	0.4	0	0
Cotton	5.48	0.05	0	0	19.9	2.3	0	0
Linen	15.8	3.3	0	0	23.6	5.2	0	0
Standard wash double rinse (n = 2)								
Polyester	1.6	2.3	0	0	36.4	15.6	2.6	1.1
Wool	0	0	0	0	14.3	2.1	3.3	2.2
Cotton	0	0	0	0	10.1	3.7	1.1	0.1
Linen	5.8	1.5	0	0	13.2	7.1	2.5	0.9

BIT, benzisothiazolinone; MCI, methylchloroisothiazolinone; MI, methylisothiazolinone; OIT, octylisothiazolinone.

Copyright © 2020 American Contact Dermatitis Society. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

22,451.4 and 34,708.5 ng/g, respectively. No MCI or OIT was found. These data agree with those indicated on the product labels.

After machine washing, the results show that the concentrations of all the isothiazolinones were very low, independently of the type of material or wash. The highest levels were found in the control wash (water immersion), reaching a maximum of 0.4 ppm in the linen (Table 2).

DISCUSSION

The increasing use of MI in cosmetic and cleaning products earned the preservative the title of contact allergen of the year by the American Contact Dermatitis Society in 2013.[5] Cleaning products often contain high concentrations of MI, which may facilitate contact sensitization.[6] Studies have shown that the lowest dose level of chloromethylisothiazolinone that was able to induce significant lymphocyte proliferation was 100 ppm using murine local lymph node assay[7] and 25 ppm in the guinea pig using the modified Buehler protocol.[8]

An Italian study detected the presence of isothiazolinones in 90.7% of the laundry detergents analyzed, with the most common preservative being MCI/MI, followed by MI and BIT.[9] Pastor-Nieto et al[2] also determined the presence of isothiazolinones in fabric conditioners in the Spanish market. Although isothiazolinones contained in clothes are able to cause dermatitis,[10] little is known about the persistence of these substances after washing. As far as we are aware, the only previous study to examine this issue is that of Hofmann et al,[11] which, with a detection limit of 0.5 ppm, detected no isothiazolinones. Our study, however, which had a detection limit of 1 ng/g (0.001 ppm), found traces of isothiazolinones at concentrations having no clinical relevance.

Because of the particular setting of each case, we cannot be sure that all washing machines or cycles can totally clear isothiazolinones. However, the findings of Hofmann et al[11] together with our results suggest that it is not necessary to recommend that patients sensitized to MI avoid it in machine detergents or fabric conditioners or to double rinse, as a first approach in standard cycles regardless of the composition of the clothes. Isothiazolinones are soluble substances in water, so it seems that standard programs in washing machines are able to decrease their concentrations to levels without clinical relevance. However, after using the detergent for hand washing (similar conditions to our control), there may remain sufficient concentrations of isothiazolinones in clothes to produce symptoms in highly sensitized patients.

REFERENCES

1. Aerts O, Goossens A, Lambert J, et al. Contact allergy caused by isothiazolinone derivatives: an overview of non-cosmetic and unusual cosmetic sources. *Eur J Dermatol* 2017;27:115–122.
2. Pastor-Nieto MA, Alcántara-Nicolás F, Melgar-Molero V, et al. Conservantes en productos de higiene y cosméticos, medicamentos tópicos y productos de limpieza doméstica en España. *Actas Dermosifiliogr* 2017;108:758–770.
3. Hervella-Garcés M, García-Gavin J, Silvestre-Salvador JF. The Spanish standard patch test series: 2016 update by the Spanish Contact Dermatitis and Skin Allergy Research Group (GEIDAC). *Actas Dermosifiliogr* 2016;107:559–566.
4. Marrero-Alemán G, Borrego L, Antuña AG, et al. Isothiazolinones in cleaning products: Analysis with liquid chromatography tandem mass spectrometry of samples from sensitized patients and market. *Contact Dermatitis* 2020;82:94–100.
5. Castanedo-Tardana M, Zug K. Methylisothiazolinone. *Dermatitis* 2013;24:2–6.
6. Aerts O, Meert H, Goossens A, et al. Methylisothiazolinone in selected consumer products in Belgium: adding fuel to the fire? *Contact Dermatitis* 2015;73:142–149.
7. Botham P, Hilton J, Evans C, et al. Assessment of the relative skin sensitizing potency of 3 biocides using the murine local lymph node assay. *Contact Dermatitis* 1991;25:172–177.
8. Chan PK, Baldwin RC, Parsons RD, et al. Kathon biocide: manifestation of delayed contact dermatitis in guinea pigs is dependent on the concentration for induction and challenge. *J Invest Dermatol* 1983;81:409–411.
9. Magnano M, Silvani S, Vincenzi C, et al. Contact allergens and irritants in household washing and cleaning products. *Contact Dermatitis* 2009;61:337–341.
10. Umekoji A, Fukai K, Sowa-Osako J, et al. Allergic contact dermatitis caused by the preservative 4,5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one in black trousers. *Contact Dermatitis* 2016;75:326–328.
11. Hofmann MA, Giménez-Arnau A, Aberer W, et al. MI (2-methyl-4-isothiazolin-3-one) contained in detergents is not detectable in machine washed textiles. *Clin Transl Allergy* 2018;8:1.

Copyright © 2020 American Contact Dermatitis Society. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

V.4 Dermatitis alérgica de contacto a (met)acrilatos en técnicos de uñas y usuarios: pronóstico y diagnóstico diferencial

Título: "Allergic contact dermatitis to (meth)acrylates involving nail technicians and users: prognosis and differential diagnosis".

Autores: Gabriel Marrero-Alemán, Javier Sabater-Abad, Francisco Javier Miquel, Julián Boix-Vilanova, Francisca Mestre Bauzá, Leopoldo Borrego.

Objetivo: Analizar las variables clínicas, positividades a alérgenos y, específicamente, el pronóstico y diagnóstico diferencial en pacientes con sospecha de sensibilización a acrilatos en tres servicios de Dermatología de España.

Referencia: *Allergy*. 2019 Jul;74(7):1386-1389.

DOI: 10.1111/all.13736.

PMID: 30739348.

Índices de calidad:

- Revista: *Allergy*. ISSN: 0105-4538.
- Factor de impacto (2019): 8.706.
- Cuartil (Alergología): 1º (2/28).
- Citas del artículo: 1 (Web of Science/Scopus, última visita Enero 2021).

Comunicaciones en congresos:

- 14th Congress European Society of Contact Dermatitis. Milan, Italia.
  Octubre 2018.
  Formato: Póster.
  Allergic contact dermatitis to acrylates: prognosis and differential diagnosis in nail technicians and users.
  Presentado por Gabriel Marrero Alemán, Javier Sabater Abad, Francisco Miquel, Julián Boix Vilanova, Francisca Mestre, Mercè Grau Pérez, Leopoldo Borrego.

In Patient_2, bortezomib was discontinued in October 2017 since she had reached partial response with decrease of the monoclonal component. Nine months later, biochemical progression and new bone lesions, with 18% of plasma cells in the bone marrow aspirate, prompted her hematologists to consider starting another proteasome inhibitor. Although no previous reports on tolerance to alternative proteasome inhibitor in patients with a history of severe skin reactions to bortezomib had been published, we set out to try carfilzomib (KYPROLIS®, Amgen Inc., Thousand Oaks, CA, USA), since its molecular structure was different enough to predict a low level of cross-reactivity. SPT (2 mg/mL) and IDT (0.2 mg/mL) to carfilzomib were negative both at immediate and delayed reading. A controlled intravenous challenge with carfilzomib (20 mg/m^2) was performed in a hospital setting in July 2018, with good tolerance. The patient received two more cycles without any side effects.

Here, we present two new cases of confirmed delayed hypersensitivity to bortezomib with positive late-reading intradermal tests that suggest an underlying T-cell mechanism. To our knowledge, this is the first report of a desensitization schedule to bortezomib and the first evidence that carfilzomib is well tolerated and can be considered as a safe alternative in patients with delayed hypersensitivity to bortezomib.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Keywords
bortezomib, carfilzomib, desensitization, drug hypersensitivity, skin test

ORCID

Paula Galvan-Blasco https://orcid.org/0000-0003-3006-3160

Paula Galvan-Blasco[1,2]
Mar Guilarte[1,2,3]
Victoria Cardona[1,2,3]
Moises Labrador-Horrillo[1,2,3]
Anna Sala-Cunill[1,2,3]
Ingrid Johana Gil-Serrano[1,2]
Olga Luengo[1,2,3]

[1]*Allergy Section, Internal Medicine Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain*
[2]*Allergy Department, Institut de Recerca Vall d''Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain*
[3]*ARADyAL Research Network, Madrid, Spain*

Correspondence
Paula Galvan-Blasco, Allergy Section, Internal Medicine Department, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.
Email: paulagalv27@gmail.com

REFERENCES

1. Ri M. Mechanism of action of bortezomib in multiple myeloma therapy. *International Journal of Myeloma*. 2016;6(1):1-6.
2. Tung D, Cheung PH, Kaur P, et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of bortezomib in various in vivo models. *Pharmacology*. 2011;88(1–2):100-113.
3. Moreau P, Pylypenko H, Grosicki S, et al. Subcutaneous versus intravenous administration of bortezomib in patients with relapsed multiple myeloma: a randomised, phase 3, non-inferiority study. *Lancet Oncol*. 2011;12:431-440.
4. Malissen N, Bourrain JL, Chiriac A, et al. Symmetrical intertriginous and flexural exanthema due to bortezomib (a Proteasome Inhibitor) Given for Myeloma. *Acta Derm Venereol*. 2016;96(7):995-996.
5. Almudimeegh A, Le Pelletier F, Dupin N. Nicolau syndrome secondary to subcutaneous bortezomib injection. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2016;30(2):348-350.
6. Knoops L, Jacquemain A, Tennstedt D, Theate I, Ferrant A, Van den Neste E. Bortezomib-induced sweet syndrome. *Br J Haematol*. 2005;131(2):142.
7. Gerber PA, Bölke E, Buhren BA, et al. Bortezomib induces erythema multiforme-like cutaneous adverse effects: report of two cases. *Wien Klin Wochenschr*. 2009;121(21–22):723-724.
8. Hattori N, Adachi D, Nakashima H, Saito B, Nakamaki T, Tomoyasu S. Drug-induced hypersensitivity syndrome after bortezomib treatment for refractory multiple myeloma. *Leuk Res*. 2009;33(4):574-577.
9. Fang B, Song Y, Ma J, Zhao RC. Severe epidermal necrolysis after bortezomib treatment for multiple myeloma. *Acta Haematol*. 2007;118(2):65-67.
10. Peter JG, Lehloenya R, Dlamini S, Risma K, White KD, Konvinse KC, Phillips EJ. Severe Delayed Cutaneous and Systemic Reactions to Drugs: A Global Perspective on the Science and Art of Current Practice. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2017;5(3):547–563.

DOI: 10.1111/all.13736

Allergic contact dermatitis to (meth)acrylates involving nail technicians and users: Prognosis and differential diagnosis

To the Editor,

Acrylates and methacrylates are formed by polymerization of acrylic monomers. These monomers can cause allergic contact dermatitis, and, in the last years, an increasing number of cases have been reported among nail esthetics professionals and users, manifesting as chronic hand eczema[1] with occupational consequences.[2] The aim of

this study was to analyze the clinical variables, allergens positivity and, specifically, the prognosis and differential diagnosis, in patients with suspected sensitization to (meth)acrylates from three Dermatology Services in Spain ("Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno-Infantil," Las Palmas de Gran Canaria; "Hospital Universitari Son Espases," Palma de Mallorca; and "Hospital Arnau de Vilanova," Valencia).

We undertook a retrospective study of patients assessed for possible sensitization to acrylates used in manicures between January 2008 and December 2017. The study was approved by the local ethics committee. Informed consent was obtained from each participant.

The variables recorded were age, sex, history of atopic dermatitis, occupation, year of diagnosis, clinical characteristics, patch-test positivity and latency time to develop the clinical lesions. Patients with suspicious of manicure-related sensitization to acrylates but with negative results were also recorded.

All the patients underwent patch testing according to the guidelines of the International Contact Dermatitis Research Group with the standard Spanish series (True Test SmartPractice® Phoenix, USA and AllergEAZE® Calgary, Canada) and the acrylate series "nails" (13 allergens) from Chemotechnique Diagnostics® (Vellinge, Sweden) in one Department and AllergEAZE® (Calgary, Canada) in another Department (eight allergens). The third Department used the acrylate series "adhesives, dental and others" (15 allergens) from Chemotechnique Diagnostics® (Vellinge, Sweden), adding the AllergEAZE® series (Calgary, Canada) in the second half of 2017 (12 allergens). Relevance was established according to the clinical history. An adequate follow-up was carried out by the clinical records or phone calls when necessary.

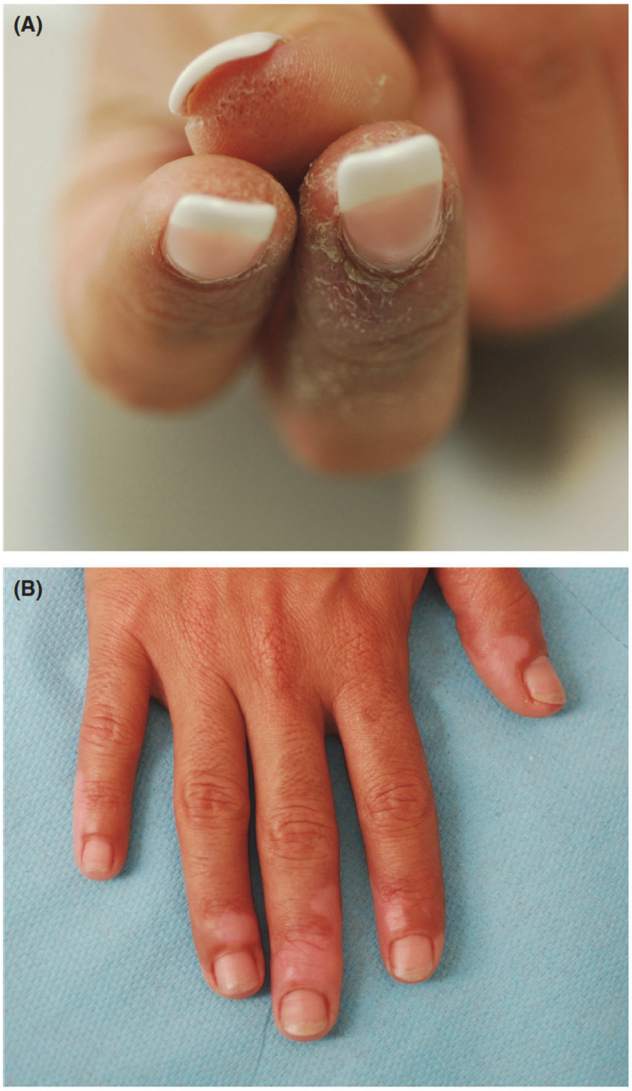


FIGURE 1 A, Chronic dermatitis on the fingertips of the first three fingers of the professional hand that hold the brush during the manicure. B, Acquired leukoderma in a patient sensitized to acrylates after repeated episodes of acute dermatitis on the fingertips

TABLE 1 Positive results of the (meth)acrylates patch tests

Acrylates	Concentration	Total positive	Total patch tested	% Positive
2-HE methacrylate	2.0% pet	64	66	97
HP methacrylate	2.0% pet	58	66	87.9
EG dimethacrylate	2.0% pet	53	66	80.3
2-HE acrylate	0.1% pet	35	44	79.5
Triethylene glycol dimethacrylate	2.0% pet	19	66	28.8
Ethyl acrylate	0.1% pet	16	44	36.4
1-6 hexanediol diacrylate	0.1% pet	12	43	27.9
Tetrahydrofurfuryl methacrylate	2.0% pet	11	43	25.6
Tetraethylene glycol dimethacrylate	2.0% pet	10	26	38.5
Methyl methacrylate	2.0% pet	8	49	16.3
Triethylene glycol diacrylate	0.1% pet	8	17	47.1
Urethane dimethacrylate	2.0% pet	6	26	23.1
1-4 butanediol dimethacrylate	2.0% pet	6	26	23.1
Bis-GMA	2.0% pet	6	26	23.1
Ethyl methacrylate	2.0% pet	5	21	23.8
Butyl acrylate	0.1% pet	4	21	19.1
Butyl methacrylate	2.0% pet	3	43	7
Ethyl cyanoacrylate	10.0% pet	2	49	4.1
Dimethylaminoethyl methacrylate	0.2% pet	3	26	11.5
Trimethylolpropane triacrylate	0.1% pet	0	17	0
Bis-MA	2.0% pet	0	26	0

Bis-GMA, bisphenol A glycerolate dimethacrylate; Bis-MA, bisphenol A dimethacrylate; EG, ethylene glycol; HE, hydroxyethyl; HP, hydroxypropyl.

TABLE 2 Positive results of the patch tests (other than acrylates)

Other allergens	Concentration	N (%)
Nickel sulfate	200 μg/cm^2	31 (47)
Cobalt chloride	20 μg/cm^2	9 (13.6)
Paraphenylenediamine	80 μg/cm^2	6 (9.1)
Sodium thiosulfate gold	75 μg/cm^2	4 (6.1)
Thiomersal	7 μg/cm^2	3 (4.5)
Balsam of Peru	800 μg/cm^2	3 (4.5)
Potassium dichromate	54 μg/cm^2	3 (4.5)
P-tert-butylphenol formaldehyde resin	45 μg/cm^2	2 (3)
Caine mix	630 μg/cm^2	2 (3)
Mercury	0.1% pet	2 (3)
Diazolidinyl urea	550 μg/cm^2	1 (1.5)
Chloroacetamide	0.2% pet	1 (1.5)
Disperse blue 106	50 μg/cm^2	1 (1.5)
Colophony	1200 μg/cm^2	1 (1.5)
Methylisothiazolinone	0.2% aq	1 (1.5)
Methylisothiazolinone+Cl-methylisothiazolinone	0.02% aq	1 (1.5)
Bisphenol A	1.0% pet	1 (1.5)
1 2-dibromo-2 4-dicyanobutane	0.3% pet	1 (1.5)
Dimethylaminopropylamine	1.0% aq	1 (1.5)
Isoeugenol	2.0% pet	1 (1.5)
Ethylenediamine dihydrochloride	50 μg/cm^2	1 (1.5)

TABLE 3 Comparison of the symptoms between the patients sensitized and not sensitized to (meth)acrylates

Lesion site	Acrylates sensitized patients (%) (N = 66)	Acrylates nonsensitized patients (%) (N = 23)
Fingertips	55 (83.3)	3 (13)
Hands other than fingertips	31 (47)	14 (60.9)
Face	10 (15.2)	9 (39.1)

Of a total of 2844 patients, an acrylate series was applied to 208 (7.3%), of which 89 (3.1%) were manicure-related. Sixty-six (74.1%) were positive for at least one of the acrylate allergens. The MOAHLFA index was analyzed for both the positive and negative tested cases (Table S1).

All the manicure-related sensitized patients were women, with a mean age of 34.5 years (20-62). Forty-six (69.7%) were professionals, 11 were users (16.7%) and 9 (13.6%) were both professionals and users. Fifty-five cases (83.3%) had lesions located on the fingertips of the first three fingers ("prehensile pattern") (Figure 1A). Of the non-professional users, six patients (9.1%) showed a "prehensile pattern," 6 (9.1%) had periungual lesions, two presented with both patterns and three with other locations affected. Eleven cases (16.7%) had dysesthesia, which resolved in all cases after a few months. One case had acquired leukoderma in the fingertips (Figure 1B). The latency period from the initial contact was recorded in 54 cases (81.8%) and varied, from 7 days to 19 years, with a mean of 42 months.

Table 1 and 2 show the positive results of the patch tests. Two-hydroxyethyl methacrylate was positive in 97% (n = 64) of patients.

We managed a valuable follow-up in 42 technicians (76.4%). Of these, 24 (57.1%) left their jobs. Among the 18 patients who continued working, 11 were given a different work activity in areas of less or no contact with acrylic nail esthetic procedures. Eight patients who went on working continued to have lesions despite taking avoidance methods (change of work activity or use of gloves).

All 23 patients (25.8%) with negative patch testing were women, nine of them (39.1%) were occupationally exposed. Seventeen patients (73.9%) had hand involvement, with just three cases (13%) involving the fingertips (Table 3). Ten patients (43.5%) had other positivities in the patch testing, of which four were considered to be of present relevance. The final established diagnosis was as follows: 8 (34.8%) irritant contact dermatitis, 6 (26.1%) allergic dermatitis not related to acrylates, 4 (17.4%) atopic dermatitis, 3 (13%) dyshidrotic eczema and 2 (8.7%) seborrheic dermatitis (facial involvement).

Our results showed that almost three out of every four patients patch tested due to suspected manicure-related sensitization to acrylates proved to be sensitized to acrylate monomers. The symptoms were bouts of acute and chronic hand dermatitis, mainly affecting the fingertips of the first fingers. Interestingly, in the group of users, those who developed lesions on the fingertips were those who admitted to apply the products themselves. Kits for home use applied by inexperienced hands may be increasing the prevalence of sensitization to (meth)acrylates.[3,4]

All the patients except two would have been diagnosed of acrylate allergic contact dermatitis using 2-hydroxyethyl methacrylate. This allergen is positive in over 90% of cases of published articles, and these results, therefore, would justify its isolated use at least as a screening method for selected patients.[5,6] Wilkinson et al recently published the European baseline series and recommended additions for 2019, including 2-HEMA as screening allergen for acrylates. They take into account some considerations: in children or adult males, where no obvious exposure has occurred, it would be reasonable to exclude 2-HEMA from the European baseline series.[7]

At least 11.7% of patients left their jobs according to the literature.[2] In our study, two out of three of the technicians changed their jobs or were relocated due to their skin lesions. Among those who continued working, neither the use of gloves nor relocation in the same workplace were able to prevent the appearance of new lesions. Our patients did not currently use 4H gloves (North Safety Products by Honeywell, Smithfield, RI, USA), facial masks or protective glasses due to their inconvenience and specially the appearance of danger to the client. Ursberg et al[8] studied an in vivo system simulating a nail technician's work exposure using several glove materials and different exposure times showing no positive reactions. Although not suitable in real life for our patients, strict physical protection with adequate clothes, masks and gloves should be the best preventive measures.[9]

In our experience, negative cases occurred mainly in users, without fingertip affectation and with more facial and leg involvement. The final predominant diagnosis was irritant hand dermatitis which should be always reached after ruling out sensitization to acrylates.

As conclusions, our study confirms a prehensile pattern in patients who apply the substance (professionals or "do it yourself" users) and a different clinical location of lesions in negative patch tested patients. We highlight the limitation in work ability created in our patients which in many cases required a definitive change of job, and the potential sensitization to acrylates in general population, specially when these substances are self-applied by the user.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Keywords
allergic contact dermatitis, dermatology, occupational allergies, prevention

ORCID

Gabriel Marrero-Alemán https://orcid.org/0000-0001-5677-4599
Leopoldo Borrego https://orcid.org/0000-0002-0199-2756

Gabriel Marrero-Alemán[1]
Javier Sabater-Abad[2]
Francisco Javier Miquel[2]
Julián Boix-Vilanova[3]
Francisca Mestre Bauzá[3]
Leopoldo Borrego[1]

[1]*Department of Dermatology, Complejo Hospitalario Universitario Insular-Materno Infantil, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, Spain*
[2]*Department of Dermatology, Hospital Arnau de Vilanova, Valencia, Spain*
[3]*Department of Dermatology, Hospital Universitari Son Espases, Palma de Mallorca, Spain*

Correspondence
Gabriel Marrero-Alemán, Department of Dermatology, Complejo Hospitalario Universitario Insular-Materno Infantil, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, Spain.
Email: gabriel.marrero88@gmail.com

REFERENCES

1. Uter W, Geier J. Contact allergy to acrylates and methacrylates in consumers and nail artists – data of the Information Network of Departments of Dermatology, 2004–2013. *Contact Dermatitis*. 2015;72:224-228.
2. Gonçalo M, Pinho A, Agner T, et al. Allergic contact dermatitis caused by nail acrylates in Europe. An EECDRG study. *Contact Dermatitis*. 2018;78:254-260.
3. Gatica-Ortega M-E, Pastor-Nieto M-A, Gil-Redondo R, Martínez-Lorenzo E-R, Schöendorff-Ortega C. Non-occupational allergic contact dermatitis caused by long-lasting nail polish kits for home use: "the tip of the iceberg". *Contact Dermatitis*. 2018;78:261-265.
4. Gatica-Ortega ME, Pastor-Nieto MA, Mercader-García P, Silvestre-Salvador JF. Allergic contact dermatitis caused by (meth)acrylates in long-lasting nail polish – are we facing a new epidemic in the beauty industry? *Contact Dermatitis*. 2017;77:360-366.
5. Aalto-Korte K, Kuuliala O, Jolanki R. Occupational methacrylate and acrylate allergy – cross-reactions and possible screening allergens. *Contact Dermatitis*. 2010;63:301-312.
6. Raposo I, Lobo I, Amaro C, et al. Allergic contact dermatitis caused by (meth) acrylates in nail cosmetic products in users and nail technicians – a 5-year study. *Contact Dermatitis*. 2017;77:356-359.
7. Wilkinson M, Gonçalo M, Aerts O, et al. The European baseline series and recommended additions: 2019. *Contact Dermatitis*. 2019;80:1-4.
8. Ursberg AM, Bergendorff O, Thorsson AC, Isaksson M. Is there a good *in vivo* method to show whether gloves are sufficiently protective when a nail technician is exposed to (meth) acrylates? An *in vivo* pilot study. *Contact Dermatitis*. 2016;75:48-65.
9. Roche E, Cuadra JDe, Alegre V. Sensibilización a acrilatos por uñas artificiales acrílicas. Revisión de 15 casos. *Actas Dermosifiliogr*. 2008;99:788-794.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

DOI: 10.1111/all.13737

Idiopathic nonhistaminergic angioedema: A single-center real-life experience from Italy

To the Editor,

Angioedema (AE) is a reversible, localized swelling of the subcutaneous and/or submucosal tissue, caused by mediators that enhance vascular permeability.[1] Although it is frequently associated with other skin lesions, mainly wheals, recurrent angioedema may also occur separately.[1,2] A recent clinical classification describes five conditions that can manifest with recurrent AE only: idiopathic histaminergic acquired AE (IH-AAE), idiopathic nonhistaminergic acquired AE (InH-AAE), acquired angioedema related to angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy (ACEI-AAE), hereditary

VI. DISCUSIÓN INTEGRADORA

Desde una perspectiva individual y clínica, la palabra vigilancia alude a una actitud responsable sobre el estado de salud de un individuo por parte de los agentes de salud. Esto requiere de observaciones sistemáticas orientadas a la toma de decisiones sobre medidas concretas a implementar para la prevención, atención y mejora del estado de salud. Cuando se trata de vigilar el estado de salud de la población y no el de un individuo particular, se utiliza el término Vigilancia Epidemiológica.

La Vigilancia Epidemiológica como componente de la Epidemiología es una de las disciplinas básicas en Salud Pública y se define como: "*la recolección sistemática de información sobre problemas específicos de salud en poblaciones, su procesamiento y análisis, y su oportuna utilización por quienes deben tomar decisiones de intervención para la prevención y control de los riesgos o daños correspondientes*"[57].

El eccema alérgico de contacto es un problema médico frecuente que resulta de la sensibilización por un amplio espectro de sustancias de bajo peso molecular que actúan como alérgenos[58]. Esta patología implica un importante problema de salud con un impacto a nivel personal, social y económico, además de conllevar un importante deterioro de la calidad de vida en los pacientes afectos[59]. Además, en muchas ocasiones, las manifestaciones clínicas son incompatibles con un desempeño laboral normal, obligando al paciente a prolongados periodos de baja e incluso a cambios de puesto de trabajo. Por estas razones, el conocimiento de las características epidemiológicas del eccema de contacto es necesario, tanto para intentar precisar la magnitud exacta del problema como para plantear estrategias encaminadas a minimizar su impacto en la sociedad[60].

La investigación clínica en dermatitis de contacto es aquella que tiene como objetivo el estudio de las pacientes para mejorar su atención, partiendo de personas enfermas con sospecha de eccema de contacto que han sido estudiadas en Unidades de Alergia Cutánea y sometidas a pruebas epicutáneas[61]. Tradicionalmente, la investigación epidemiológica del eccema de contacto se ha realizado a partir de estudios clínicos. El objetivo principal es conocer las características de los pacientes para extraer conclusiones que posteriormente podrán aplicarse de forma rápida a la práctica clínica[4].

La vigilancia epidemiológica de la dermatitis de contacto es uno de los pilares fundamentales sobre los que se basan las decisiones que toman las autoridades nacionales y europeas (especialmente la Agencia Europea del Medicamento) en relación con el empleo de sustancias que pueden estar en contacto con la piel. La aplicación de normativas que restringen el uso de distintos productos ha permitido que sustancias como el níquel, cromo o MCI/MI entre otras, experimenten un descenso en la tasa de sensibilización de la población en los últimos años. Como ejemplo, el sulfato de níquel se describió como causante de dermatitis alérgica de contacto en 1880, siendo parcheado por primera vez en 1925. Desde entonces se ha convertido en una verdadera epidemia, por lo que en 2001 se implantó una normativa europea (Nickel Directive) que prohíbe la venta de productos en contacto directo y prolongado con la piel que liberen > 0,5 μg cm^2 a la semana en sudor artificial. En los últimos años se ha observado un descenso progresivo de la sensibilización al níquel en Europa, mientras que en EEUU, donde no existe normativa vigente, el número de publicaciones está aumentando[62]. Por otro lado, el cromo también es un metal que se encuentra en numerosos productos, destacando su uso en cementos, y que históricamente ha

presentado una importante tasa de sensibilización en trabajadores de la construcción. En el año 2015 se implantó una normativa europea que limitó su uso, permitiendo un descenso de la prevalencia de alergia a cromo en este ámbito laboral[63]. Por último, y en relación con la investigación de la presente tesis doctoral, la MI también experimentó un importante incremento del número de casos de sensibilización que ha precisado de la implantación de distintas normativas en los últimos años[64].

En nuestra área de salud, decidimos realizar un estudio preliminar que demostrara la asociación entre el aumento de la prevalencia de sensibilización a MCI/MI y un ámbito laboral concreto, al objetivar un número importante de casos entre trabajadoras del sector de la limpieza. En este caso, logramos comprobar que el aumento de sensibilización a MCI/MI en nuestro medio se asocia a profesionales de la limpieza[65]. A tenor de estos resultados, se decidió trasladar esta información clínico-epidemiológica a estudios experimentales, por lo que procedimos a analizar productos de limpieza aportados por pacientes sensibilizados a MCI o MI u obtenidos al azar del mercado en busca de IT, determinando sus concentraciones. Para ello, fue necesario el desarrollo de un método analítico sensible que permitiese detectar estos compuestos (MI, MCI, OIT, BIT) en niveles de trazas. La metodología basada en el empleo de la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), permitió detectar los analitos con límites de detección de 1 ng/g. Los resultados mostraron la presencia de al menos una IT en el 76,5 % de los productos de limpieza analizados. De esta forma conseguimos estimar el potencial riesgo que presentan nuestros pacientes para sensibilizarse a estas sustancias tras su empleo. Con este estudio concluimos que no es necesario restringir las IT en todos los productos de limpieza, aunque sí deberían existir unos controles de calidad y unas indicaciones adecuadas que permitan al paciente tomar medidas de cara a evitar una potencial sensibilización, especialmente en profesionales de la limpieza. Específicamente en productos usados en pulverización, limitar la concentración a 15 ppm es probable que reduzca la sintomatología cutánea en pacientes susceptibles[66]. Con respecto al uso de IT en pinturas, faltan estudios para establecer una legislación que limite sus concentraciones o al menos aporte información en el etiquetado.

Siguiendo esta línea de investigación, tras observar la presencia de cuadros generalizados de dermatitis de contacto en pacientes sensibilizados a IT, se decidió estudiar las prendas de vestir como otra posible fuente de exposición a estas sustancias (Fig. 6). Para ello, analizamos la persistencia de IT tras distintas modalidades de lavado en varias muestras de tela. Pudimos observar que en ningún caso persisten en concentraciones suficientemente elevadas como para provocar clínica de dermatitis de contacto, salvo en su uso de lavado a mano, donde se debería tener precaución en pacientes sensibilizados[67].

Fig. 6. Placas eccematosas en área de escote y hombros (imagen izquierda) y en dos tercios superiores de tronco posterior (imagen derecha).

Por otro lado, y de forma paralela al estudio de las IT, la vigilancia epidemiológica nos permitió objetivar un importante número de casos de dermatitis alérgica de contacto a acrilatos en trabajadores y usuarios de centros de estética ungueal. La clínica principal observada fue una dermatitis de manos, la cual tiene importantes implicaciones laborales. En este caso, decidimos realizar un estudio multicéntrico en tres hospitales de tercer nivel para determinar las características clínicas y estudiar el pronóstico y diagnóstico diferencial de los casos con sospecha de sensibilización a acrilatos. Confirmamos una clínica de patrón prensil en pacientes que realizan la manicura, tanto profesionales como no profesionales que se autoaplican la manicura, así como una clínica diferente en pacientes con resultado negativo en pruebas epicutáneas. Asimismo, observamos una limitación en la capacidad laboral de las profesionales de la estética que incluso deriva en cambios laborales[68]. El aumento del empleo de la técnica semipermanente junto con el uso de *kits* de autoaplicación se han postulado como probables causas del incremento de casos[53]. El empleo de estos productos únicamente debería estar permitido para profesionales de la estética ungueal adecuadamente entrenados y provistos de equipos de protección individual, y los consumidores deberían conocer los riesgos derivados de estos procedimientos[69]. Durante el proceso final de redacción de la presente tesis doctoral se ha publicado el Reglamento (UE) 2020/1682 de la Comisión Europea que limitará el empleo de hidroxietilmetacrilato (HEMA) y di-HEMA trimetilhexildicarbamato solamente a profesionales de la estética ungueal, quedando prohibido su uso doméstico. A partir de junio de 2021 no se introducirán en el mercado de la Unión Europea, mientras que a partir de septiembre de 2021 no se comercializarán[70].

Los resultados del estudio nos permiten esclarecer que las IT y los acrilatos son una fuente de sensibilización común en nuestra población. Por un lado, el aumento de sensibilización a IT se encuentra directamente relacionado con las profesionales de la limpieza, las cuales están expuestas a concentraciones elevadas de diversas IT en su ámbito laboral como hemos demostrado tras analizar muestras de productos de limpieza. Además, hemos demostrado que el lavado a máquina elimina casi por completo las IT de las prendas de vestir, permaneciendo cantidades residuales sin relevancia clínica lo cual lo descarta como fuente de sensibilización/exposición. Por otro lado, se constata una gran cantidad de casos de sensibilización a acrilatos predominantemente en profesionales de la estética ungueal y en usuarias que se autoaplican los productos, y hemos demostrado que clínicamente existe una distribución de lesiones distinta entre los casos con sospecha de sensibilización que resultaron positivos de aquellos que mostraron negatividad en las pruebas epicutáneas.

En relación con los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral, se proponen algunas sugerencias para futuras investigaciones:

- El uso de productos de limpieza en aerosol que contienen IT ocasiona dermatitis de contacto en los pacientes por mecanismo de aerotransporte. El uso de medidas protectoras habituales como guantes no previene el desarrollo de sintomatología en áreas como la cara, cuello y miembros superiores (excepto manos). Se propone realizar un estudio para evaluar las concentraciones de IT remanentes en distintas superficies corporales expuestas que puedan provocar clínica cutánea en pacientes susceptibles.

- En la misma línea, el empleo de pinturas con IT ha demostrado provocar una dermatitis alérgica de contacto en áreas expuestas. Se propone analizar las concentraciones de IT tras pintar una habitación valorando su presencia tras distintos periodos temporales.

- Analizar si la sensibilización a acrilatos depende de su estructura conformacional, pudiendo establecer distintos grupos que puedan emplearse con mayor seguridad en determinados ámbitos.

VII. MEDICINA TRASLACIONAL

La aplicabilidad directa de los resultados de nuestros trabajos en la práctica clínica habitual es:

- La sensibilización de origen ocupacional a MCI/MI y MI puede manifestarse como una dermatitis alérgica de contacto por exposición a productos cosméticos. El conocimiento de esta asociación permite a nuestros pacientes tomar las medidas adecuadas para evitar manifestaciones cutáneas secundarias al contacto con IT.
- El estudio realizado acerca de las concentraciones de IT en productos de limpieza demostró que algunos productos sobrepasan unos límites considerados "seguros", así como la ausencia de un etiquetado adecuado. Además de estas consideraciones, también deberían limitarse las concentraciones de IT en productos de limpieza en aerosol.
- No es necesario recomendar la evitación de detergentes o suavizantes con IT en lavado a máquina, puesto que sus concentraciones son indetectables independientemente de la tela empleada. No obstante, es conveniente aportar hojas de información útil a los pacientes sensibilizados para los lavados a mano.
- Tras la reciente normativa de la Comisión Europea prohibiendo el uso de acrilatos en usuarias, debemos continuar con una adecuada vigilancia epidemiológica para determinar si esta exclusión también debe aplicarse en un futuro a los profesionales de la estética ungueal.

VIII. CONCLUSIONES

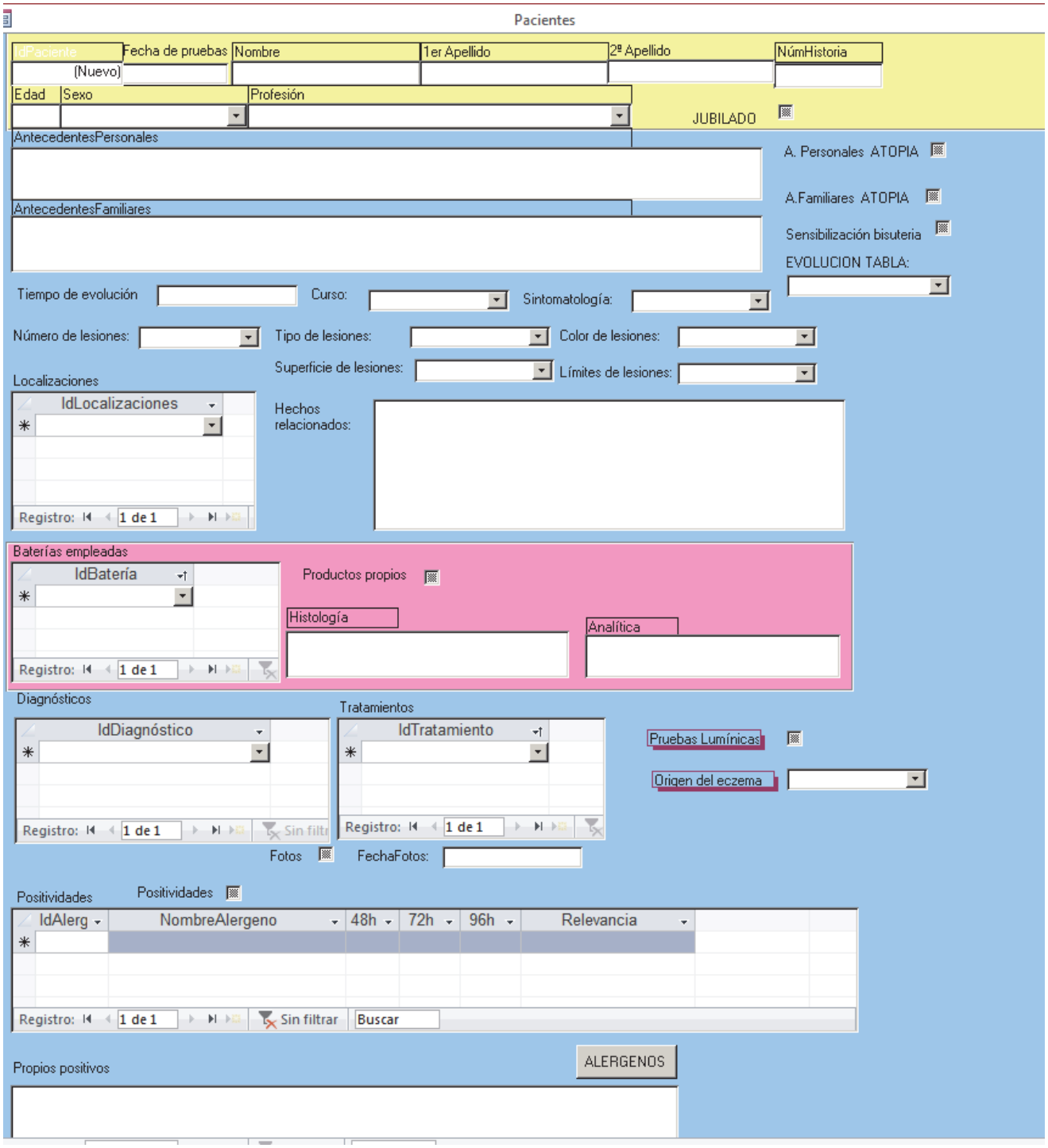
Como conclusiones generales del trabajo, se puede decir que existen concentraciones elevadas de IT en algunos productos de limpieza que pueden desencadenar o agravar una dermatitis alérgica de contacto y que existe una clínica diferenciada entre los pacientes sensibilizados a acrilatos por manicura semipermanente.

En relación con los objetivos planteados, podemos afirmar que:

- Nuestros datos destacan la necesidad de revisar la normativa en relación con las concentraciones de IT en productos de limpieza domésticos e industriales al igual que se ha establecido en cosméticos.
- No consideramos necesario restringir las concentraciones de IT en todos los productos de limpieza.
- En el caso de productos de limpieza en aerosol, la limitación a 15 ppm probablemente reduciría la sintomatología cutánea en pacientes susceptibles.
- Acerca de la persistencia de IT tras el lavado a máquina, nuestros resultados sugieren que no es necesario recomendar a los pacientes evitar su uso en detergentes o suavizantes.
- Con respecto a los acrilatos, nuestros resultados confirman un patrón prensil, tanto en profesionales como en usuarios que se lo autoaplican, mostrando localizaciones diferentes en aquellos con pruebas epicutáneas negativas.
- Destacamos la limitación laboral de los pacientes que en muchas ocasiones les obliga a cambiar de trabajo, y la potencial sensibilización a acrilatos de la población general especialmente cuando esas sustancias se autoaplican por el usuario.

IX. ANEXOS

IX.Anexo I. Formulario de la base de datos de la Unidad de Dermatitis de Contacto del Complejo Hospitalario Universitario Insular - Materno Infantil.



IX.Anexo II. Hoja de información al paciente y consentimiento informado.

HOJA DE INFORMACIÓN
AL PACIENTE
Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

Servicio Canario de la Salud
COMPLEJO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO
INSULAR MATERNO INFANTIL

Versión
201708

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

TÍTULO DEL ESTUDIO: ESTUDIO CLÍNICO Y ANALÍTICO DE LA SENSIBILIZACIÓN A ALÉRGENOS EMERGENTES EN EL ÁREA SUR DE GRAN CANARIA

Estimado padre, madre/tutor legal, o paciente, le invitamos a tomar parte en un estudio sobre aspectos epidemiológicos y etiológicos de los pacientes que padecen dermatitis de contacto en el área Sur de Gran Canaria.

Antes de decidir si desea tomar parte, es importante que entienda por qué se realiza este estudio y qué es lo que implica si acepta participar.

Por favor, lea con detenimiento la siguiente información y, si hay algo que no está claro o desea más información, no deje de consultarlo, puede solicitar la ampliación de información al investigador principal o sus colaboradores, o bien a su médico responsable. Le concederemos todo el tiempo que necesite para decidirse o no a participar.

IDENTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

El Kathon CG es un biocida de uso general formado por la mezcla de Metilcloroisotiazolinona y Metilisotiazolinona (MCI/MI), que se emplea como conservante de productos cosméticos, productos de limpieza, pinturas al agua y numerosos fluidos industriales. Su uso generalizado ha provocado un incremento importante de la frecuencia a la sensibilización a esta sustancia, alcanzando cifras epidémicas. La última normativa europea (aplicable desde febrero 2017), solamente permite el empleo de la MI en cosméticos de lavado, no permitiendo el empleo de MCI/MI en ningún cosmético. Sin embargo, el empleo de estas isotiazolinonas en productos de uso industrial no ha sido regulado.

El seguimiento epidemiológico de la sensibilización de la población de referencia del área Sur de Gran Canaria ha mostrado un incremento constante en la sensibilización a MCI/MI, llegando a ser una de las sensibilizaciones más altas del mundo y siendo referenciada en los estudios europeos que han motivado el cambio en la normativa actual.

En otros ámbitos se ha determinado por cromatografía de forma esporádica la presencia de MI, MCI y otras isotiazolinonas en productos industriales y productos de limpieza, pero no existe ningún estudio que relacione claramente la presencia de estas sustancias en un ámbito laboral concreto con unas consecuencias clínicas relevantes.

Mediante la vigilancia epidemiológica ante la aparición de posibles alérgenos emergentes, detectamos durante el periodo de realización de la investigación una verdadera epidemia de dermatitis alérgica de contacto a acrilatos tanto en usuarios de centros de estética ungueal como en esteticistas o peluqueros que realizan manicuras, derivando en importantes limitaciones laborales a causa de un eccema crónico de manos.

Con idéntica metodología empleada en el estudio de isotiazolinonas, se evaluarán los aspectos clínicos y etiológicos de este problema en nuestra área de referencia.

OBJETIVO Y BENEFICIOS QUE SE ESPERAN ALCANZAR

El objetivo general es continuar el estudio epidemiológico, clínico y analítico a los alérgenos emergentes en nuestra área de referencia, determinando la exposición y, en su caso, la concentración a la que están expuestos los enfermos sensibilizados en nuestra área de referencia, por lo que se solicitarán muestras de estos productos para su análisis.

La participación es totalmente voluntaria. De ningún modo está obligado a participar y, si decide hacerlo, puede cambiar de opinión en todo momento. Todos los aspectos de este estudio, incluidos los resultados, serán tratados de manera estrictamente confidencial.

Los beneficios son aportar evidencia científica acerca de la concentración de estas sustancias en productos de uso cotidiano, con el objetivo de implantar una normativa que permita regularlo y a su vez disminuir la tasa de pacientes sensibilizados.

¿POR QUÉ HA SIDO ELEGIDO?

Usted ha sido elegido debido a que cumple los criterios de inclusión, estando sensibilizado a dichas sustancias.

CONFIDENCIALIDAD:

Se garantiza el derecho a la intimidad y a la confidencialidad de todos los datos relativos a su salud, tanto de los obtenidos durante la investigación, como de los que constan en su historia clínica, en los términos establecidos en la Ley 15/1999 de protección de datos de carácter personal y en la Ley 41/2002, reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica.

Para la finalidad expuesta, a Ud. se le identificará con un código y la información personal de sus archivos no será distribuida o cedida a terceras personas sin su consentimiento previo por escrito. En este sentido, no se le identificará personalmente en las publicaciones escritas o seminarios en los que se pudieran exponer los resultados de este estudio.

Los monitores, auditores, CEIC y las autoridades competentes tendrán acceso directo a la historia clínica original del sujeto para la verificación de los procedimientos y/o datos del estudio/ensayo clínico, sin violar la confidencialidad del sujeto, dentro de lo permitido por la norma pertinente y que, al firmar el formulario de consentimiento informado, el sujeto o su representante legal están autorizando el acceso a estos datos.

CONSIDERACIONES ÉTICAS:

Este estudio se llevará a cabo siguiendo las reglas de buena práctica clínica, y tienen como exclusiva finalidad científico-analítica. Esto quiere decir que, al participar en este estudio, a Ud. no se le someterá a ningún procedimiento innecesario, y tampoco dejará de recibir las atenciones necesarias para tratar su enfermedad si decide no participar.

DURACIÓN PREVISTA DE SU INCLUSIÓN EN EL ESTUDIO:

El estudio durará un periodo de varios meses mientras dure el reclutamiento, únicamente estando prevista una única visita para la recogida de datos clínicas y las muestras en caso necesario.

NÚMERO APROXIMADO Y CARACTERÍSTICAS DE PARTICIPANTES QUE SE PREVÉ INCLUIR EN EL ESTUDIO:

Serán seleccionados todos aquellos pacientes sensibilizados a MCI/MI y acrilatos que tengan una relevancia presente, habiendo estado en contacto con dichas sustancias en el ámbito cosmético y de limpieza desarrollando una dermatitis de contacto.

PREGUNTAS QUE PUDIERAN SURGIRLE DURANTE Y DESPUÉS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO:

Si alguna vez necesita respuesta a alguna pregunta sobre este estudio, puede contactar con: Gabriel Marrero Alemán

COMPENSACIÓN ECONÓMICA:

Este estudio no tiene ánimo de lucro. Las personas que voluntariamente acepten ser incluidas en este estudio, así como los investigadores que intervienen en el mismo, no recibirán compensación económica alguna por ello.

CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE

He leído y entendido la Hoja de información al paciente. He tenido la oportunidad de discutir las cuestiones relacionadas con esta información. Mis preguntas y dudas han sido respondidas de forma satisfactoria.

Entiendo que mi participación es voluntaria y que soy libre de abandonar el estudio en cualquier momento y sin que esto vaya en detrimento de mis derechos legales.

Entiendo que es posible que los datos puedan ser utilizados en otros documentos y que los detalles personales serán tratados de forma estrictamente confidencial. Doy autorización para que se acceda a mis informes sin que se revele información personal.

Estoy de acuerdo con que la información relativa a mi participación en este estudio sea comunicada a mi facultativo especialista y médico de cabecera si lo solicita.

He leído la información anterior y acepto participar en el estudio.

PARTICIPANTE

Nombre y apellidos: .....

Firma: Fecha:

REPRESENTANTE LEGAL

Nombre y apellidos: .....

Firma padre, madre o tutor legal: Fecha:

INVESTIGADOR

Nombre y apellidos: .....

Firma: Fecha:

CESIÓN DE DATOS PERSONALES

En cumplimiento de lo dispuesto en el artículo 5 de la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal, por el que se regula el derecho de información en la recogida de los datos, le informamos que los datos de carácter personal facilitados en el presente formulario, se incluirán y serán tratados con confidencialidad y seguridad en ficheros, responsabilidad de LA DIRECCIÓN GERENCIA DEL COMPLEJO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO INSULAR MATERNO INFANTIL, cuya finalidad es realizar UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN, haciendo uso de las nuevas tecnologías.

El destinatario de los datos es EL EQUIPO DE INVESTIGACIÓN DEL SERVICIO de DERMATOLOGÍA, SIENDO RESPONSABLE EL INVESTIGADOR PRINCIPAL Gabriel Marrero Alemán, no teniendo previsto realizar cesiones a terceros distintas de las previstas por Ley o, los expresamente autorizados por usted o su representante legal. De igual forma, asumirán dicha responsabilidad los Investigadores Colaboradores: Leopoldo Borrego Hernando.

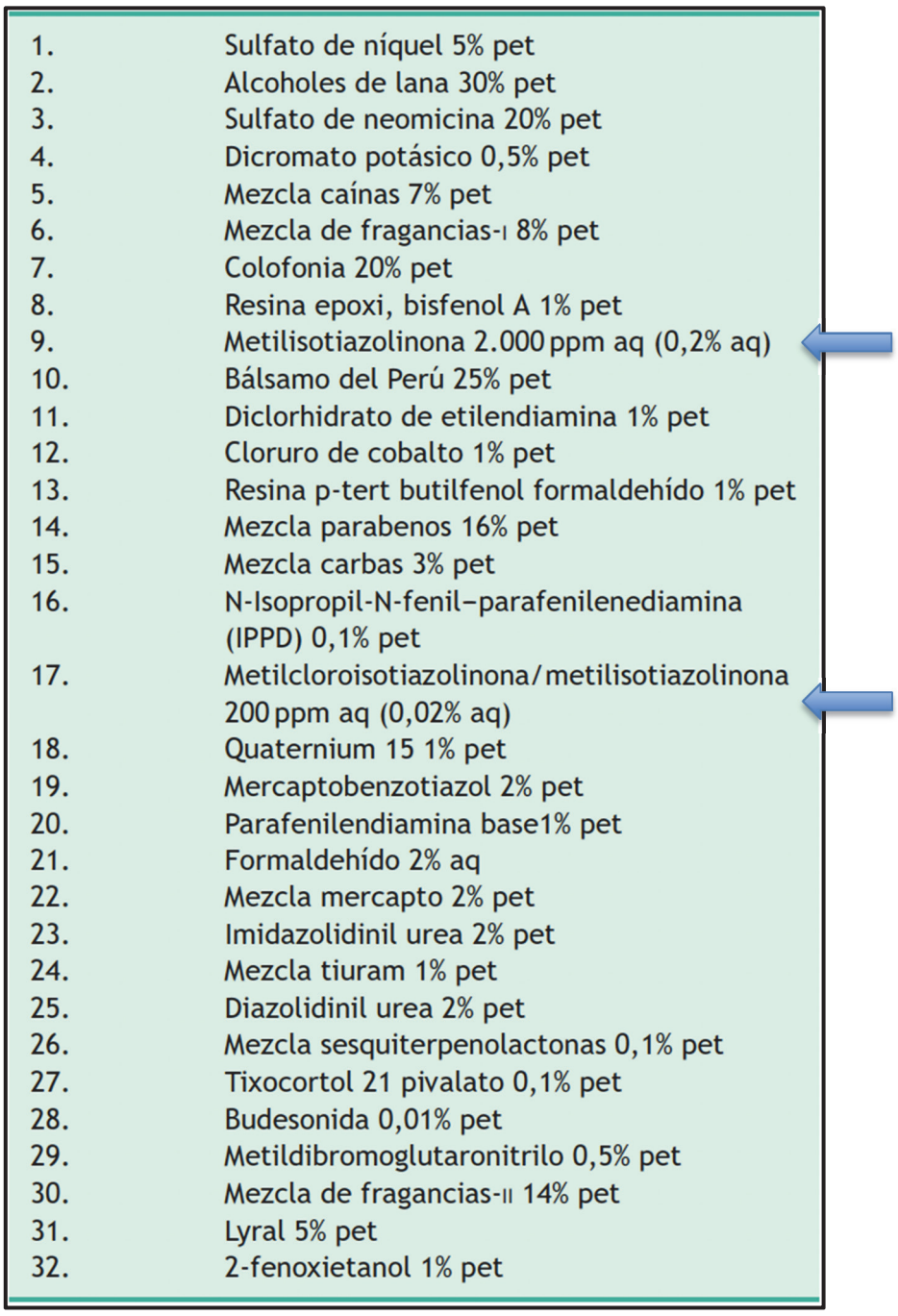
Los datos aportados deben ser verdaderos, exactos, completos y actualizados. El interesado se hará responsable de cualquier daño o perjuicio, directo o indirecto, como consecuencia del incumplimiento de tal obligación.

En cumplimiento de principio de calidad de sus datos, la DIRECCION GERENCIA DEL COMPLEJO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO INSULAR MATERNO INFANTIL conservará la información consignada con la finalidad descrita. Si desea modificarlos se tendrá que poner en contacto con el investigador principal.

El interesado podrá ejercitar los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición en los términos establecidos en citada Ley Orgánica 15/1999 y normativa concordante ante la DIRECCION GERENCIA DEL COMPLEJO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO INSULAR MATERNO INFANTIL, ubicada en la 6ª planta del Edificio Anexo al Hospital Insular de Gran Canaria. Podrá revocar el consentimiento otorgado, sin efectos retroactivos y sin necesidad de justificación, a través de una solicitud por escrito ante EL REGISTRO GENERAL del CHUIMI, Avda. Marítima del Sur, s/n, 35010, Las Palmas de Gran Canaria, haciendo la mención expresa de "Protección de Datos", o por correo electrónico a la siguiente dirección gmaralej@gobiernodecanarias.org, o por correo ordinario a la dirección anteriormente reseñada y haciendo entrega de copia de DNI.

Participante o Representante legal (Nombre y apellidos)	Investigador principal
Firma: Fecha:	Firma: Fecha:

IX.Anexo III. Baterías de pruebas epicutáneas.



1.	Sulfato de níquel 5% pet
2.	Alcoholes de lana 30% pet
3.	Sulfato de neomicina 20% pet
4.	Dicromato potásico 0,5% pet
5.	Mezcla caínas 7% pet
6.	Mezcla de fragancias-I 8% pet
7.	Colofonia 20% pet
8.	Resina epoxi, bisfenol A 1% pet
9.	Metilisotiazolinona 2.000 ppm aq (0,2% aq)
10.	Bálsamo del Perú 25% pet
11.	Diclorhidrato de etilendiamina 1% pet
12.	Cloruro de cobalto 1% pet
13.	Resina p-tert butilfenol formaldehído 1% pet
14.	Mezcla parabenos 16% pet
15.	Mezcla carbas 3% pet
16.	N-Isopropil-N-fenil–parafenilenediamina (IPPD) 0,1% pet
17.	Metilcloroisotiazolinona/metilisotiazolinona 200 ppm aq (0,02% aq)
18.	Quaternium 15 1% pet
19.	Mercaptobenzotiazol 2% pet
20.	Parafenilendiamina base1% pet
21.	Formaldehído 2% aq
22.	Mezcla mercapto 2% pet
23.	Imidazolidinil urea 2% pet
24.	Mezcla tiuram 1% pet
25.	Diazolidinil urea 2% pet
26.	Mezcla sesquiterpenolactonas 0,1% pet
27.	Tixocortol 21 pivalato 0,1% pet
28.	Budesonida 0,01% pet
29.	Metildibromoglutaronitrilo 0,5% pet
30.	Mezcla de fragancias-II 14% pet
31.	Lyral 5% pet
32.	2-fenoxietanol 1% pet

Serie estándar española del GEIDAC 2016 [71].

	Art.No	Name	Conc
1.	I-003	ISOPROPYL MYRISTATE	20.0% pet
2.	A-004	Amerchol L-101	50.0% pet
3.	T-016	TRIETHANOLAMINE	2.0% pet
4.	P-013	POLYSORBATE 80	5.0% pet
5.	S-004	SORBITAN OLEATE	5.0% pet
6.	B-022	2-tert-Butyl-4-methoxyphenol (BHA)	2.0% pet
7.	D-006	BHT	2.0% pet
8.	O-002	Octyl gallate	0.25% pet
9.	T-014	TRICLOSAN	2.0% pet
10.	S-003	SORBIC ACID	2.0% pet
11.	C-008	p-CHLORO-m-CRESOL	1.0% pet
12.	C-010A	CHLOROXYLENOL (PCMX)	0.5% pet
13.	T-007	THIMEROSAL	0.1% pet
14.	I-001A	IMIDAZOLIDINYL UREA	2.0% pet
15.	H-003	METHENAMINE	2.0% pet
16.	C-005	CHLORHEXIDINE DIGLUCONATE	0.5% aq
17.	Mx-03C	Paraben mix	16.0% pet
18.	P-008	PHENYL MERCURIC ACETATE	0.01% aq
19.	C-006	CHLOROACETAMIDE	0.2% pet
20.	H-002	Hexahydro-1,3,5-tris-(2-hydroxyethyl)triazine	1.0% aq
21.	C-015	Clioquinol	5.0% pet
22.	E-005	Ethylenediamine dihydrochloride	1.0% pet
23.	A-002	HYDROABIETYL ALCOHOL	10.0% pet
24.	P-011	PHENYL SALICYLATE	1.0% pet
25.	H-014C	BENZOPHENONE-3	10.0% pet
26.	S-005	SORBITAN SESQUIOLEATE	20.0% pet
27.	P-019A	PROPYLENE GLYCOL	5.0% pet
28.	S-006	STEARYL ALCOHOL	30.0% pet
29.	C-003	CETYL ALCOHOL	5.0% pet
30.	B-010B	BENZYL SALICYLATE	10.0% pet
31.	B-015A	2-BROMO-2-NITROPROPANE-1,3-DIOL	0.25% pet
32.	S-002	Sodium-2-pyridinethiol-1-oxide	0.1% aq
33.	C-018	COCAMIDOPROPYL BETAINE	1.0% aq
34.	B-008B	BENZYL ALCOHOL	10.0% sof
35.	C-009B	METHYLISOTHIAZOLINONE+ METHYLCHLOROISOTHIAZOLINONE	0.02% aq
36.	B-028	t-BUTYL HYDROQUINONE	1.0% pet
37.	H-016	DROMETRIZOLE	1.0% pet
38.	P-021	PROPYL GALLATE	1.0% pet
39.	D-042	DODECYL GALLATE	0.25% pet
40.	C-007A	QUATERNIUM-15	1.0% pet
41.	P-025	PHENOXYETHANOL	1.0% pet
42.	D-044A	DIAZOLIDINYL UREA	2.0% pet
43.	T-036	TOCOPHEROL	100%
44.	D-047A	DMDM HYDANTOIN	2.0% aq
45.	D-049E	METHYLDIBROMO GLUTARONITRILE	0.5% pet
46.	T-035B	Tea Tree Oil oxidized	5.0% pet
47.	I-008C	IODOPROPYNYL BUTYLCARBAMATE	0.2% pet
48.	D-053	3-(Dimethylamino)-1-propylamine	1.0% aq
49.	L-004	LAURYL POLYGLUCOSE	3.0% pet
50.	P-036	Peppermint oil	2.0% pet
51.	S-015	SHELLAC	20.0% alc
52.	T-037B	TOCOPHERYL ACETATE	10.0% pet
53.	T-024B	Turpentine oil oxidized	0.4% pet
54.	M-035B	METHYLISOTHIAZOLINONE	0.2% aq
55.	Mx-10B	Musk mix	3.0% pet
56.	O-005	OLEAMIDOPROPYL DIMETHYLAMINE	0.1% aq
57.	D-065	DECYL GLUCOSIDE	5.0% pet
58.	E-027	ETHYLHEXYLGLYCERIN	5.0% pet
59.	S-011	SODIUM METABISULFITE	1.0% pet
60.	Mx-28B	Gallate mix	1.0% pet
61.	C-056	CETEARYL GLUCOSIDE	5.0% pet
62.	P-042	PANTHENOL	5.0% pet
63.	P-043	POLYAMINOPROPYL BIGUANIDE	2.5% aq

Batería de cosméticos (Chemotechnique Diagnostics® Vellinge, Suecia) (imagen obtenida de chemotechnique.se/products/series/cosmetic-series/).

	Art.No	Name	Conc
1.	B-018	Butyl acrylate	0.1% pet
2.	E-012	ETHYL METHACRYLATE	2.0% pet
3.	B-021	BUTYL METHACRYLATE	2.0% pet
4.	H-010	2-Hydroxyethyl methacrylate	2.0% pet
5.	H-018	Hydroxypropyl methacrylate	2.0% pet
6.	E-007	Ethylene glycol dimethacrylate	2.0% pet
7.	T-018	Triethylene glycol dimethacrylate	2.0% pet
8.	H-004	1,6-Hexanediol diacrylate	0.1% pet
9.	T-021	Trimethylolpropane triacrylate	0.1% pet
10.	T-027	Tetrahydrofurfuryl methacrylate	2.0% pet
11.	E-004	Ethyl acrylate	0.1% pet
12.	H-009	2-Hydroxyethyl acrylate	0.1% pet
13.	T-017	Triethylene glycol diacrylate	0.1% pet

Batería acrilatos – uñas (Chemotechnique Diagnostics® Vellinge, Suecia) (imagen obtenida de chemotechnique.se/products/series/meth-acrylate-series-nails/).

SKU	SUBSTANCE
DM212NA	2-hydroxy-ethylacrylate, 0.1%, pet
DM210NA	2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), 1%, pet
DM213NA	2-hydroxypropyl-methacrylate, 2%, pet
NA34NA	ethyl acrylate, 0.1%, pet
NA90NA	ethyl cyanoacrylate (2 ml), 10%, pet
DM224NA	ethyleneglycol dimethacrylate (EGDMA), 2%, pet
NA49NA	methyl methacrylate, 2%, pet
DM231NA	triethyleneglycol dimethacrylate (TEGDMA), 2%, pet

Batería acrilatos – uñas (AllergEAZE® distribuidor en España MartiTor Alergia, Barcelona, España)
(imagen obtenida de smartpracticecanada.com/shop/style?id=SCSERIESNSNA).

IX.Anexo VI. Niveles de concentración de isotiazolinonas en productos de limpieza.

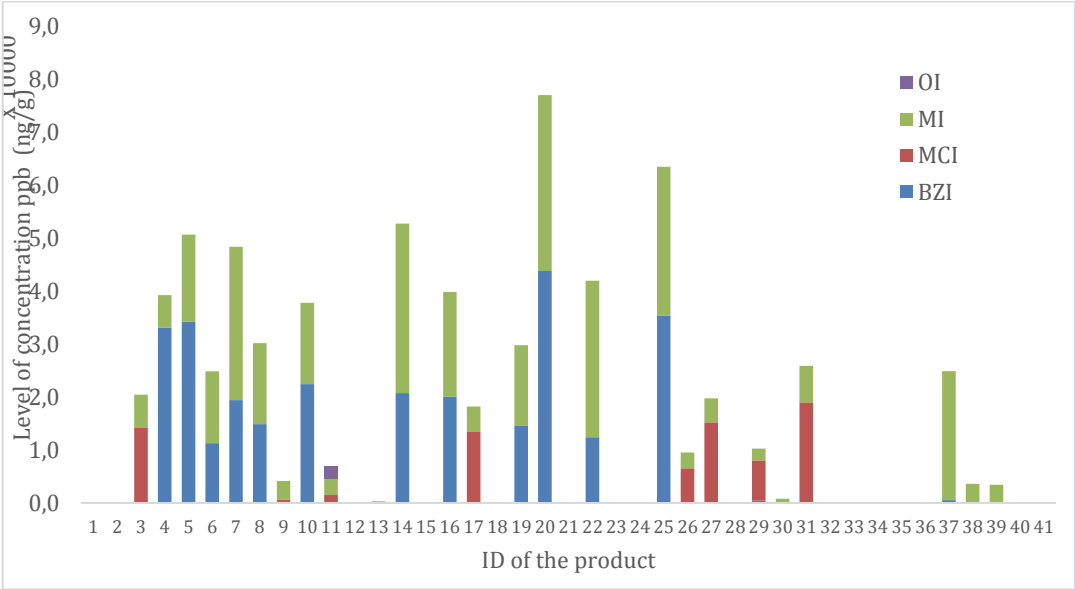


Figure. Level of concentrations of Isothiazolinones in ppb (ng/g) in cleaning products (**Blue**: BZI, Benzhylisothiazolinone; **Orange**: MCI, Methylchloroisothiazolinone; **Grey**: MI, Methylisothiazolinone; **Yellow**: OI, Octylisothiazolinone).

Table. Number of identification of each cleaning product analysed in the LC/MS-MS.

ID	Product	ID	Product	ID	Product	ID	Product
1	Hiperdino Gel WC	**11**	AJAX EXPEL Multisuperficie	**21**	Bosque Verde Limpiacristales y Multiusos	**31**	Gel de ducha Farline - farmacia
2	Timotei Champú	**12**	Froggy Ecológico Desengrasante	**22**	Bosque verde Friegasuelos aromático-pino	**32**	Deteergente Oro Marsella
3	Lavavajillas Lagarto Concentrado Ultra	**13**	Neutrex OXY 5 sin lejía	**23**	La Sabandeña Friegasuelos	**33**	IMI TOP
4	Las 3 Brujas Pargras Quitagrasas	**14**	Froggy ecológico hogar Multiusos	**24**	Bosque Verde Quitagrasas	**34**	ASERT LEMON
5	W5 Limpacristales	**15**	Frosch Ecológico Lavavajillas hipoalergénico	**25**	Bosque Verde Gel Limpiador Baños	**35**	REMOLIT AMONIACAL
6	Hiperdino Home Limpiacristales	**16**	Spar Limpiacristales	**26**	Inquivisa Suavizante Perfumado	**36**	LOEME PONS
7	Bosque Verde Abrillantador	**17**	Spar Lavavajillas	**27**	Lavavajillas Lagarto concentrado ultra	**37**	Neutro concentrado Ponslim TOP Ponspro
8	IFA SABE Limpiador Multiusos	**18**	VialPlus Quitagrasas multiusos	**28**	Insecticida Oro	**38**	Lavavajillas manual extrapon neutro Pons
9	Bosque Verde Lavavajillas	**19**	Tenn Brillante universal con bioalcohol	**29**	Gel de ducha familiar Lidl	**39**	Multiusos Multiglas Ponspro
10	Detergente COLON	**20**	Spar Friegasuelos jabón verde	**30**	Stylius Crema Suavizante - Mercadona	**40**	Limpiador higienizante clorado desinclor Pons
41	Desodorante femenino-Deliplus Mercadona						

IX.Anexo IV. Certificado del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del Complejo Hospitalario Universitario Insular-Materno Infantil.

Servicio Canario de la Salud Complejo Hospitalario Universitario Insular-Materno Infantil	Certificado TESIS DOCTORAL	Informe Protocolo: Id: CEIm-CHUIMI-2017/937

Vicente Olmo Quintana, Presidente del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del Complejo Hospitalario Universitario Insular-Materno Infantil,

C E R T I F I C A:

Que este Comité, en la sesión celebrada el 1 de junio de 2017, ha evaluado la propuesta del **Dr. Gabriel Marrero Alemán,** para que se realice el estudio abajo señalado, dando por concluidas las alegaciones y estudiadas las mismas, se decide aceptarlas como válidas y emitir informe favorable.

"Estudio clínico y analítico de la sensibilización a Iso-tiazolinonas en el área sur de Gran Canaria".

Protocolo: Versión agosto 2017.
Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado: Versión agosto 2017.

1. Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
2. La capacidad del investigador principal, **Dr. Gabriel Marrero Alemán, Servicio de Dermatología del CHUIMI.**
3. Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el Consentimiento Informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.
4. El alcance de las compensaciones previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
5. El CEIm del Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno Infantil, tanto en su composición, como en los PNT cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95).
6. Que se cumplen los preceptos éticos formulados en la orden SAS 3470/2009 y la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial sobre principios éticos para las investigaciones medicas en seres humanos y en sus posteriores revisiones, así como aquellos exigidos por la normativa aplicable para este tipo de estudios.
7. La composición actual del CEIm del Complejo Hospitalario Universitario Insular-Materno Infantil es la siguiente:

PRESIDENTE:

D. Vicente Olmo Quintana	Farmacéutico de Atención Primaria

SECRETARIA:

Dª. Attenya Álamo Medina	Farmacéutica Hospitalaria CHUIMI

VOCALES:

D. José L Alonso Bilbao	Epidemiólogo, Área Técnica, Atención Primaria
Dª. Eva Elisa Álvarez León	Subdirectora Médica CHUIMI

Gobierno de Canarias

Servicio Canario de la Salud Complejo Hospitalario Universitario Insular-Materno Infantil	Certificado **TESIS DOCTORAL**	Informe Protocolo: Id: CEIm-CHUIMI-2017/937

D. Mauro Boronat Cortés	Endrocrinólogo, Servicio Endrocrinología CHUIMI
Dª. Elisabeth Cheneau	Enfermera, Docencia Salud Mental
D. Félix López Blanco	Farmacólogo Clínico, Dpto. Farmacología ULPGC
D. Jordi López García	Neumólogo, Servicio de Neumología CHUIMI
D. José Juan Morales Castro	Enfermero, Área de Quirófano CHUIMI
Dª. Adriana Ortiz Andrellucchi	Bioestadístico, ULPGC
D. Octavio Ramírez García	Presidente Comité Ética Asistencial
Dª Beatriz Sánchez Lerma	Farmacéutica Hospitalaria CHUIMI
D. Julio Ángel de Santiago Angulo	Asesor Jurídico CHUIMI
D. Antonio Tugores Cester	Unidad de Investigación, CHUIMI
Dª. Blanca Valenciano Fuente	Pediatra, Servicio de Pediatría HUMIC
Dª Teresa Tavío Mendoza	Secretaria Administrativa CEIm

8. Este CEIm emite un **INFORME FAVORABLE.**

9. Y que este CEIm acepta que dicho estudio para tesis doctoral sea realizado por el investigador principal en el Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno Infantil.

Lo que firmo en Las Palmas de Gran Canaria, a 21 de agosto de 2017

PRESIDENTE DEL COMITÉ

Dr. D. Vicente J. Olmo Quintana

Id:CEIm-CHUIMI-2017/937

IX.Anexo V. Certificado de competencia analítica del Laboratorio de Toxicología del Grupo de Investigación en Medioambiente y Salud de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA
Unidad de Toxicología

SERTOX
SERVICIO DE TOXICOLOGÍA CLÍNICA Y ANALÍTICA

Dr. Octavio Luis Pérez Luzardo, Catedrático de Toxicología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, en calidad de Jefe del Laboratorio de Toxicología del Grupo de Investigación en Medioambiente y Salud de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria,

DECLARA

Que el Laboratorio de Toxicología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria cuenta con los medios materiales suficientes para desarrollar la parte experimental del proyecto de investigación presentado por **D. Gabriel Marrero Alemán**. Asimismo el personal de la sección de Toxicología del GIMAS cuenta con más de 20 años de experiencia en el campo de la Toxicología Analítica, por lo que el desarrollo del plan de trabajo previsto está garantizado.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente documento a petición del interesado en Las Palmas de Gran Canaria a 8 de mayo de dos mil diecisiete.

IX.Anexo VII. Imágenes no publicadas en el artículo “Persistence of isothiazolinones in clothes after machine washing”. Secuencia de la metodología utilizada en el lavado de las telas.

Imagen superior: detergente y suavizante empleados. **Imágenes inferiores, de izquierda a derecha:** lavadora Samsung modelo WA10J5710SW/AQ9 GG; secado al aire en patio exterior.

IX.Anexo VIII. Índices de Calidad.

El trabajo desarrollado en la presente Tesis Doctoral ha sido publicado en revistas científicas del campo de la Dermatología Médico-Quirúrgica y Venereología y la Alergología. Todas las publicaciones se encuentran en revistas internacionales indexadas en el JCR (*Journal Citation Report*), la mayoría en el primer cuartil de su categoría. En la tabla siguiente se muestran los datos de factor de impacto y categoría de las revistas en las que se pueden encontrar las publicaciones de la presente Tesis Doctoral.

Revista	FI	Categoría	Puesto	Fuente
Dermatitis	2.630	Dermatología Médico Quirúrgica y Venereología	23 de 64	JCR 2018
Contact Dermatitis	3.952	Dermatología Médico Quirúrgica y Venereología	9 de 68	JCR 2019
Dermatitis	3.988	Dermatología Médico Quirúrgica y Venereología	8 de 68	JCR 2019
Allergy	8.706	Alergología	2 de 28	JCR 2019

* FI, factor de impacto; JCR, *Journal Citation Reports*.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Garavís González JL, Ledesma Martín MC, de Unamuno Pérez P. Eccemas en Atención Primaria. SEMERGEN. 2005;31:67–85.
2. Bolognia J, Schaffer J, Cerroni L. Dermatología. 4ª Edición. Elsevier, editor. 2018.
3. Basketter DA, White IR. Diagnostic patch testing-does it have a wider relevance? Contact Dermatitis. 2012;67:1–2.
4. García-Gavín J, Armario-Hita J, Fernández-Redondo V, Fernández-Vozmediano J, Sánchez-Pérez J, Silvestre J, et al. Importancia de la vigilancia epidemiológica en el eczema de contacto. La Red Española de Vigilancia de Alergia de Contacto. Actas Dermosifiliogr. 2011;102:19–23.
5. Lemmel J. Conservantes. OFFARM. 2008;27:58–64.
6. Deza G, Giménez-Arnau A. Allergic contact dermatitis in preservatives : current standing and future options. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2017;17:263–8.
7. Yim E, Baquerizo Nole KL, Tosti A. Contact dermatitis caused by preservatives. Dermatitis. 2014;25:215–31.
8. Pedersen N. Occupational allergy from 1,2-benzisothiazolin-3-one and other preservatives in plastic emulsions. Contact Dermatitis. 1976;2:340–2.
9. de Groot A, Liem D, Nater J, van Ketel W. Patch tests with fragrance materials and preservatives. Contact Dermatitis. 1985;12:87–92.
10. de Groot A, Liem D, Weyland J. Kathon CG: cosmetic allergy and patch test sensitization. Contact Dermatitis. 1985;12:76–80.
11. Foussereau J, Brändle I, Boujnah-Khouadja A. Allergic contact eczema caused by isothiazolin-3-one derivatives. Derm Beruf Umwelt. 1984;32:208–11.
12. Gonçalo M, Goossens A. Whilst Rome burns: The epidemic of contact allergy to methylisothiazolinone. Contact Dermatitis. 2013;68:257–8.
13. Commission Directive 2005/42/EC. amending Council Directive 76/768/EEC, concerning cosmetic products, for the purposes of adapting Annexes II, IV and VI thereto to technical progress. Off J Eur Union. 2005;L158/17-18.
14. Thyssen JP, Sederberg-Olsen N, Thomsen JF, Menné T. Contact dermatitis from methylisothiazolinone in a paint factory. Contact Dermatitis. 2006;54:322–4.
15. García-Gavín J, Vansina S, Kerre S, Naert A, Goossens A. Methylisothiazolinone, an emerging allergen in cosmetics? Contact Dermatitis. 2010;63:96–101.
16. Lundov MD, Thyssen JP, Zachariae C, Johansen JD. Prevalence and cause of methylisothiazolinone contact allergy. Contact Dermatitis. 2010;63:164–7.
17. Lundov MD, Zachariae C, Menné T, Johansen JD. Airborne exposure to preservative methylisothiazolinone causes severe allergic reactions. BMJ. 2012;345:e8221.
18. Thormann J. Contact dermatitis to a new fungicide, 2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one. Contact Dermatitis. 1982;8:204–21.
19. Bruze M, Fregert S, Gruvberger B, Persson K. Contact allergy to the active ingredients of Kathon CG in the guinea pig. Acta Derm Venereol. 1987;67:315–20.
20. Basketter DA, Gilmour NJ, Wright ZM, Walters T, Boman A, Lidén C. Biocides: Characterization of the Allergenic Hazard of Methylisothiazolinone. J Toxicol - Cutan Ocul Toxicol. 2003;22:187–99.
21. Burnett CL, Bergfeld WF, Belsito D V., Klaassen CD, Marks JG, Shank RC, et al. Final report of the safety assessment of methylisothiazolinone. Int J Toxicol. 2010;29:187S-213S.

22. SCCNFP. The Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-food Products intended for Consumers (SCCNFP), Opinion on Methylisothiazolinone (Colipa no. P94) April 2004. SCCNFP/0805/04.
23. Silva V, Silva C, Soares P, Garrido EM, Borges F, Garrido J. Isothiazolinone biocides: Chemistry, biological, and toxicity profiles. Molecules. 2020;25:991.
24. Castanedo-Tardana M, Zug K. Methylisothiazolinone. Dermatitis. 2013;24:2–6.
25. Bruze M, Engfeldt M, Gonçalo M, Goossens A. Recommendation to include methylisothiazolinone in the European baseline patch test series - On behalf of the European Society of Contact Dermatitis and the European Environmental and Contact Dermatitis Research Group. Contact Dermatitis. 2013;69:263–70.
26. SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), Opinion on Methylisothiazolinone (MI) (P94) sensitisation only, 25 June 2015, SCCS/1557/15, final opinion December 2015.
27. Council on cosmetic products. Opinion on methylisothiazolinone (EC. No 1223/2009), adopted on 6 July 2017. European Commission. 2017.
28. Scientific Committee of Consumer Safety - SCCS, Giménez-Arnau AM. Opinion of the Scientific Committee on Consumer safety (SCCS) - Opinion on the safety of the use of Methylisothiazolinone (MI) (P94), in cosmetic products (sensitisation only). Regul Toxicol Pharmacol. 2016;76:211–2.
29. Drug, U.S. Food and Administration. Annex VI release - 26 November 2017 - 201703. 2018;(November).
30. Herman A, Aerts O, de Montjoye L, Tromme I, Goossens A, Baeck M. Isothiazolinone derivatives and allergic contact dermatitis: a review and update. J Eur Acad Dermatology Venereol. 2019;33:267–76.
31. Mathias C, Andersen K, Hamann K. Allergic contact dermatitis from 2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one, a paint mildewcide. Contact Dermatitis. 1983;9:507–9.
32. Schwensen J, Menné Bonefeld C, Zachariae C, Agerbeck C, Petersen T, Geisler C, et al. Cross-reactivity between methylisothiazolinone, octylisothiazolinone and benzisothiazolinone using a modified local lymph node assay. Br J Dermatol. 2017;176:176–83.
33. Scientific Committee on Consumer Safety. Opinion on Benzisothiazolinone (P96), adopted on 27 June 2012, European Commission. Available at: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_099.pdf last accessed December 2017. 2012;(June):1–32. Available from: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_099.pdf
34. Basketter DA, Rodford R, Kimber I, Smith I, Wahlberg JE. Skin sensitization risk assessment: A comparative evaluation of 3 isothiazolinone biocides. Contact Dermatitis. 1999;40:150–4.
35. Mose AP, Frost S, Öhlund U, Andersen KE. Allergic contact dermatitis from octylisothiazolinone. Contact Dermatitis. 2013;69:49–52.
36. Aerts O, Goossens A, Lambert J, Lepoittevin JP. Contact allergy caused by isothiazolinone derivatives: An overview of non-cosmetic and unusual cosmetic sources. Eur J Dermatology. 2017;27:115–22.
37. Schwensen JF, Uter W, Bruze M, Svedman C, Goossens A, Wilkinson M, et al. The epidemic of methylisothiazolinone: a European prospective study. Contact Dermatitis. 2017;76:272–9.

38. Liuti F, Hernández Hernández Z, Borrego Hernando L. Increased Sensitization to Kathon CG (Methylchloroisothiazolinone plus methylisothiazolinone) in the South of Gran Canaria, Spain. Actas Dermosifiliogr. 2014;105:882–3.
39. Aerts O, Meert H, Goossens A, Janssens S, Lambert J, Apers S. Methylisothiazolinone in selected consumer products in Belgium: Adding fuel to the fire? Contact Dermatitis. 2015;73:142–9.
40. Garcia-Hidalgo E, Sottas V, von Goetz N, Hauri U, Bogdal C, Hungerbühler K. Occurrence and concentrations of isothiazolinones in detergents and cosmetics in Switzerland. Contact Dermatitis. 2017;76:96–106.
41. Hofmann MA, Giménez-Arnau A, Aberer W, Bindslev-Jensen C, Zuberbier T. MI (2-methyl-4-isothiazolin-3-one) contained in detergents is not detectable in machine washed textiles. Clin Transl Allergy. 2018;8:4–9.
42. Fisher A. Allergic Sensitization of the Skin and Oral Mucosa to Acrylic Denture Materials. J Am Med Assoc. 1954;156:238–42.
43. Fisher A, Franks A, Glick H. Allergic Sensitization of the Skin and Nails to Acrylic Plastic Nails. J Allergy. 1957;28:84–8.
44. Pegum JS, Medhurst FA. Contact Dermatitis from Penetration of Rubber Gloves by Acrylic Monomer. Br Med J. 1971;2:141–3.
45. Rycroft R. Contact dermatitis from acrylic compounds. Br J Dermatol. 1977;96:685.
46. Voller LM, Warshaw EM. Acrylates: new sources and new allergens. Clin Exp Dermatol. 2020;45:277–83.
47. Mikov I, Turkali I, Jovanović M. Occupational Contact Allergic Dermatitis in Dentistry. Vojn Pregl. 2011;68:523–5.
48. Kanerva L, Alanko K, Estlander T, Jolanki R, Lahtinen A, Savela A. Statistics on Occupational Contact Dermatitis From (Meth)acrylates in Dental Personnel. Contact Dermatitis. 2000;42:175–6.
49. Kiec-Swierczynska M, Krecisz B, Swierczynska-Machura D, Zaremba J. An Epidemic of Occupational Contact Dermatitis From an Acrylic Glue. Contact Dermatitis. 2005;52:121–5.
50. Geukens S, Goossens A. Occupational Contact Allergy to (Meth)acrylates. Contact Dermatitis. 2001;44:153–9.
51. Gonçalo M, Pinho A, Agner T, Andersen KE, Bruze M, Diepgen T, et al. Allergic contact dermatitis caused by nail acrylates in Europe. An EECDRG study. Contact Dermatitis. 2018;78:254–60.
52. Roche E, Cuadra J De, Alegre V. Sensibilización a acrilatos por uñas artificiales acrílicas. Revisión de 15 casos. 2008;99:788–94.
53. Gatica-Ortega ME, Pastor-Nieto MA, Mercader-García P, Silvestre-Salvador JF. Allergic contact dermatitis caused by (meth)acrylates in long-lasting nail polish – are we facing a new epidemic in the beauty industry? Contact Dermatitis. 2017;77:360–6.
54. Scientific Committee of Consumer Safety - SCCS. Opinion on the safety of cosmetic ingredients HEMA and Di-HEMA Trimethylhexyl Dicarbamate, Submission I (Sensitisation only). 2018.
55. Johansen JD, Aalto-Korte K, Agner T, Andersen KE, Bircher A, Bruze M, et al. European Society of Contact Dermatitis guideline for diagnostic patch testing - Recommendations on best practice. Contact Dermatitis. 2015;73:195–221.

56. Hervella-Garcés M, García-Gavin J, Silvestre-Salvador JF. The Spanish standard patch test series: 2016 update by the Spanish Contact Dermatitis and Skin Allergy Research Group (GEIDAC). Actas Dermosifiliogr. 2016;107:559–66.
57. Martínez F, Amela C, Arredondo C, Bergonzoli G, Castellanos L, Castellanos P. Vigilancia epidemiológica. Mc Graw Hill. 2004. 57–66 p.
58. Uter W, Johansen JD, Orton DI, Frosch PJ, Schnuch A. Clinical update on contact allergy. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2005;5:429–36.
59. Ayala F, Nino M, Fabbrocini G, Panariello L, Balato N, Foti C, et al. Quality of life and contact dermatitis: A disease-specific questionnaire. Dermatitis. 2010;21:84–90.
60. Uter W, Rämsch C, Aberer W, Ayala F, Balato A, Beliauskiene A, et al. The European baseline series in 10 European Countries, 2005/2006 - Results of the European Surveillance System on Contact Allergies (ESSCA). Contact Dermatitis. 2009;61:31–8.
61. García-Doval I, Naldi L. Introduction to clinical research in Dermatology: The link between clinical practice and research. Actas Dermosifiliogr. 2009;100:749–55.
62. Thyssen JP, Uter W, McFadden J, Menné T, Spiewak R, Vigan M, et al. The EU Nickel Directive revisited-future steps towards better protection against nickel allergy. Contact Dermatitis. 2011;64:121–5.
63. Bregnbak D, Johansen JD, Jellesen MS, Zachariae C, Menné T, Thyssen JP. Chromium allergy and dermatitis: Prevalence and main findings. Contact Dermatitis. 2015;73:261–80.
64. Geier J, Lessmann H, Schnuch A, Uter W. Recent increase in allergic reactions to methylchloroisothiazolinone/ methylisothiazolinone: Is methylisothiazolinone the culprit? Contact Dermatitis. 2012;67:334–41.
65. Marrero-Alemán G, Saavedra Santana P, Liuti F, Hernández N, López-Jiménez E, Borrego L. The Role of Cleaning Products in Epidemic Allergic Contact Dermatitis to Methylchloroisothiazolinone/Methylisothiazolinone. Dermatitis. 2018;29:77–80.
66. Marrero-Alemán G, Borrego L, Antuña AG, Macías Montes A, Pérez Luzardo O. Isothiazolinones in cleaning products: Analysis with liquid chromatography tandem mass spectrometry of samples from sensitized patients and market. Contact Dermatitis. 2020;82:94–100.
67. Marrero-Alemán G, Borrego L, González Antuña A, Macías Montes A, Pérez Luzardo O. Persistence of Isothiazolinones in Clothes After Machine Washing. Dermatitis. 2020;Online ahead of print.
68. Marrero-Alemán G, Sabater-Abad J, Miquel FJ, Boix-Vilanova J, Mestre Bauzá F, Borrego L. Allergic contact dermatitis to (meth)acrylates involving nail technicians and users: Prognosis and differential diagnosis. Allergy Eur J Allergy Clin Immunol. 2019;74:1386–9.
69. Gatica-Ortega M-E, Pastor-Nieto M-A. The Present and Future Burden of Contact Dermatitis from Acrylates in Manicure. Curr Treat Options Allergy. 2020;7:291–311.
70. REGLAMENTO (UE) 2020/1682 DE LA COMISIÓN de 12 de noviembre de 2020 que modifica el anexo III del Reglamento (CE) n.º 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre los productos cosméticos. Disponible en: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES. D Of la Unión Eur. 2020;L 379/31-33.

71. Hervella-Garcés M, García-Gavín J, Silvestre-Salvador JF. Actualización de la serie estándar española de pruebas alérgicas de contacto por el Grupo Español de Investigación en Dermatitis de Contacto y Alergia Cutánea (GEIDAC) para 2016. Actas Dermosifiliogr. 2016;107:559–66.