



Correlación de reactividad cutánea entre extractos alergénicos de *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Dermatophagoides farinae*, con *Blomia tropicalis* en pacientes con rinitis alérgica y asma

Guadalupe Morales-de-León, Aida López-García, Oswaldo Arana-Muñoz, Y Carcaño-Pérez, Sergio Papaqui-Tapia, CG Caballero-López, M Martínez-Villegas,* JJ Ríos-López**

RESUMEN

Antecedentes: existen homologías moleculares documentadas entre antígenos de ácaros del mismo grupo; sin embargo, a pesar de los ácaros comparten el mismo orden taxonómico, las especies son antigénicamente distintas. Aún no se han aclarado las diferencias en la reactividad cutánea entre diversas especies de ácaros.

Objetivo: determinar la correlación entre la reactividad cutánea y los extractos alergénicos de *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* y *Blomia tropicalis* en pacientes con rinitis alérgica y asma.

Material y métodos: estudio transversal, observacional, prolectivo e interpretativo realizado en 110 pacientes de uno y otro sexo con límites de edad de 2 y 58 años, con rinitis alérgica y asma. A todos los pacientes se les aplicaron pruebas cutáneas por punción con los extractos antigénicos.

Resultados: se incluyeron 110 pacientes, con promedio de edad de 24.1 años; 50% eran hombres. En 59% de los pacientes hubo pruebas cutáneas positivas para los ácaros, en 24.5% correspondieron a *Blomia t.*; 10% tenían pruebas cutáneas positivas para *D. pteronyssinus* más *Blomia tropicalis* y 7.29% para *D. farinae* más *Blomia tropicalis*. La correlación de reactividad cutánea positiva entre *D. pteronyssinus* y *B. tropicalis* fue de 0.36, y entre *D. farinae* y *B. tropicalis* de 0.27.

Conclusiones: la mayoría de los pacientes con rinitis y asma tuvo pruebas cutáneas positivas a los ácaros domésticos probados. Existe una correlación débil entre las dos especies de *Dermatophagoides* y *Blomia tropicalis*.

Palabras clave: *Blomia tropicalis*, reactividad cutánea, *Dermatophagoides*, rinitis, asma.

ABSTRACT

Background: there are documented molecular homologies between mites from the same group, but intergroup characteristics are not. Although mites share the same taxonomic order, there are species antigenically distinct. At the present we don't know clearly the differences in cutaneous reactivity among several house dust mites species.

Objective: to estimate the correlation of skin reactivity to *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* antigens with that of *Blomia tropicalis* in patients with allergic rhinitis and asthma.

Material and Methods: a cross sectional, observational, prolective and interpretive study was performed in patients of both genders, aged 2 to 58 with allergic rhinitis and asthma. All patients underwent skin prick tests with allergenic extracts.

Results: One hundred and ten patients were included, with an age average of 24.1 years; 50% were males. There were positive skin tests with mites in 59% of the patients, 24.5% for *Blomia t.*; 10% for *D. pteronyssinus* plus *Blomia t.* and 7.29% for *D. farinae* plus *Blomia t.* The correlation of the skin reactivity between *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Blomia tropicalis* ($r=0.36$) and between *Dermatophagoides farinae* and *Blomia tropicalis* ($r=0.27$), was not significant in both cases.

Conclusions. We found that most patients with allergic rhinitis and asthma showed positive skin tests with the mite extracts tested. There is a weak correlation between both species of *Dermatophagoides* and *Blomia tropicalis*.

Key words: *Blomia tropicalis*, correlation, mites *Dermatophagoides*.

En la última década, los estudios epidemiológicos sugieren una tendencia creciente de la prevalencia de las enfermedades alérgicas en todo el mundo en general, en particular

en Latinoamérica. El asma y la rinitis alérgica son enfermedades con elevada prevalencia; pueden afectar de 4 a 7% y de 10 a 20% de la población general, respectivamente. Por esto, la OMS las reconoció entre las

seis enfermedades que con más frecuencia afectan a la población mundial y son los dos principales motivos de consulta alergológica.^{1,2} Independientemente de la etiología, la rinitis es una manifestación extremadamente común en los pacientes asmáticos, alrededor de 50 a 80% de estos también tienen rinitis, y de 20 a 50% de los pacientes con rinitis tienen asma concomitante. La rinitis alérgica es un factor de riesgo para la incidencia y gravedad del asma alérgica. Ambas comorbilidades comparten un fondo de atopia común relacionado con genes situados en 13 cromosomas diferentes, aunque algunos alelos de los cromosomas 5 y 11 son los que muestran mayor asociación con los valores de IgE, el grado de hiperreactividad bronquial y el fenotipo de asma o rinitis. La rinitis y el asma por hipersensibilidad a alérgenos son diferentes expresiones de la alergia respiratoria en un individuo; por tanto, forman parte del síndrome alérgico inflamatorio sistémico, regulado en su conjunto por el sistema inmunitario cutáneo-mucoso.²⁻⁴

En la alergia respiratoria, el periodo patogénico se inicia con el contacto del alérgeno en la mucosa respiratoria con la célula presentadora de antígeno, en donde es fagocitado, procesado y presentado a las células T cooperadoras, a través de un mecanismo en el que interviene el complejo mayor de histocompatibilidad clase II, la célula dendrítica y el receptor de la célula T. La reacción de hipersensibilidad, mediada por IgE específica para el alérgeno, desencadena la liberación de

mediadores preformados por los mastocitos en la mucosa nasal y bronquial. Esta reacción va seguida de un reclutamiento de linfocitos colaboradores CD4 + que, a través de la secreción de citocinas, favorecen la quimiotaxis y activación de eosinófilos y la síntesis de IgE, perpetuando la respuesta al alérgeno durante la fase tardía, los mismos mediadores proinflamatorios como histamina y leucotrienos, citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-14 y GM-CSF), quimiocinas (RANTES, eotaxinas) y moléculas de adhesión están involucradas en la inflamación nasal y bronquial de pacientes con alergia respiratoria. La hipótesis más aceptada que explica la conexión nasobronquial es la liberación de citocinas, como IL-5 y otros mediadores proinflamatorios a la circulación sanguínea, con el consiguiente reclutamiento y activación de más células inflamatorias donde destaca, principalmente, el eosinófilo y la propagación por vía sistémica de la inflamación iniciada en un órgano de choque.⁵⁻⁷

Los alérgenos son proteínas o glicoproteínas capaces de inducir la producción de anticuerpo IgE específico en individuos susceptibles. Los alérgenos intradomiciliarios más importantes que provocan enfermedades alérgicas, como el asma y la rinitis, son de origen animal incluidos: cucarachas, ácaros de polvo y animales domésticos. Los ácaros están distribuidos por todo el mundo, principalmente en zonas húmedas y el habitat de sus especies se superpone, a pesar de las necesidades climáticas, de cada una de ellos, son arácnidos (subclase Acari dentro de la clase Arachnida), que constituyen el grupo más diverso y rico en especies. Entre los principales grupos de ácaros causantes de enfermedades en el hombre están los pertenecientes al orden Astigmata, Ixodida, Mesostigmata y Prostigmata.⁸⁻¹¹

La especie *Blomia* pertenece a la familia *Glycyphagidae* y *Dermatophagoides* pertenecen a la *Pyroglyphidae* y ambas familias al orden Astigmata. La hembra mide 320 a 457 µm y el macho 246 a 406 µm. Su ciclo biológico de huevo a adulto es de 23 días. La longevidad de la hembra es de 58 días y la fecundidad es de 28 huevos por hembra. Su ubicación habitual es el polvo doméstico y productos almacenados. Se distribuye mundialmente en regiones tropicales y subtropicales. Diversos estudios han reportado una alta frecuencia de reacciones cutáneas positivas para *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* y *Blomia tropicalis*.¹²⁻¹⁵

* Hospital Universitario de Puebla, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.

** Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.

Correspondencia: Dra. Guadalupe Morales de León. Argentina 2622-101, Puebla 72070, México. Correo electrónico: de-leon-03@hotmail.com

Declaración de conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflicto de intereses relacionados con esta publicación. Recibido: 10 de enero 2012. Aceptado: 20 de mayo 2012.

Este artículo debe citarse como: Morales-de-León G, López-García A, Arana-Muñoz O, Carcaño-Pérez Y, Papaqui-Tapia S, Caballero-López CG, Martínez-Villegas M, Ríos-López JJ. Correlación de reactividad cutánea entre extractos alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Dermatophagoides farinae*, con *Blomia tropicalis* en pacientes con rinitis alérgica y asma. Rev Alergia Mex 2012;59(3):107-112.

La coexistencia, en un mismo paciente, de sensibilización simultánea a diferentes ácaros plantea la hipótesis de reactividad cruzada, en la que deben distinguirse dos aspectos inmunológicos en cuanto a la capacidad alérgica de una determinada molécula: la inmunogenicidad y reactividad. La primera se refiere a la capacidad intrínseca de un alérgeno para inducir una respuesta alérgica mediada por la síntesis de IgE y la segunda a la reactividad provocada mediante la IgE ya sintetizada por una exposición previa, al unirse al alérgeno. Cuando la reactividad se produce contra una proteína distinta al alérgeno que originó la sensibilización, pero que es homóloga a él, se habla de reactividad cruzada. Este fenómeno es consecuencia de la similitud de la superficie molecular de las proteínas homólogas. Un grado de identidad en la secuencia de aminoácidos no superior al 25% puede ser suficiente para que dos proteínas se plieguen de modo equivalente y compartan una estructura terciaria común; sin embargo, para que dos proteínas compartan aminoácidos expuestos en la superficie molecular y epítomos de IgE, que den lugar a la reactividad cruzada, es necesario que el grado de identidad sea superior a 70%. Se ha reportado un alto grado de reactividad cruzada y correlación moderada entre *Dermatophagoides pteronyssinus* y *farinae*, así como reactividad cruzada y correlación baja de estos ácaros con *Blomia tropicalis*.¹⁶⁻²⁰

El método de elección para el estudio de pacientes con sospecha de una enfermedad causada por una reacción mediada por IgE es la prueba cutánea, por su alta sensibilidad. La selección de alérgenos de las pruebas cutáneas varía según el área geográfica; deben incluirse alérgenos de mayor prevalencia en esa área que aporten información objetiva al confirmar o excluir la sensibilización. La estandarización de los extractos alérgicos ocupados para la realización de las pruebas cutáneas se realiza con métodos de laboratorio y biológicos que midan la potencia total, la actividad biológica del alérgeno y cuantifiquen el o los alérgenos mayoritarios. Además del extracto alérgico, las pruebas siempre deben acompañarse de controles positivos y negativos. Su uso permite descartar los falsos positivos y falsos negativos debidos a errores de la técnica o por la distinta reactividad cutánea. La metodología para la realización

de las pruebas cutáneas consiste en la colocación del extracto antigénico sobre la piel para, luego, introducirlo por punción en la epidermis. Previamente debe corroborarse que el paciente no esté recibiendo medicamentos que interfieran con los resultados y que el área cutánea donde se va a realizar la prueba no tenga alteraciones. La lectura de la reacción inmediata se realiza 15 a 20 minutos después. La prueba se considera positiva si el diámetro de la pápula es mayor o igual a 3 mm en comparación con el control negativo.²¹⁻²³

En México existen pocos estudios que hayan estimado la correlación entre la reactividad cutánea para el antígeno de *Blomia tropicalis* con otros antígenos de ácaros. Partiendo de la hipótesis de que los antígenos derivados de especies del mismo orden pudieran determinar reactividades equivalentes o equiparables, el presente estudio pretendió estimar la correlación entre la reactividad cutánea para el antígeno de *Blomia tropicalis*, *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Dermatophagoides farinae* en términos de la dirección, magnitud y sentido del estadístico.^{15, 25}

El objetivo de este estudio fue: determinar la correlación entre la reactividad cutánea para antígenos de ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Dermatophagoides farinae*, con *Blomia tropicalis* en pacientes con alergia respiratoria del servicio de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital Universitario de Puebla.

MÉTODOS

Estudio transversal, observacional, prolectivo e interpretativo realizado en pacientes de la consulta externa del servicio de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital Universitario de Puebla durante un periodo de seis meses. Se incluyeron pacientes de 2 a 58 años de edad, de uno y otro sexo, con sospecha clínica de enfermedad alérgica, que no estuvieran recibiendo tratamiento con antihistamínico anti H1 de segunda generación siete días antes de realizar las pruebas cutáneas; antidepresivos tricíclicos y antiH2 un día antes; esteroides tópicos tres semanas previas, en sitios donde se aplicarían las pruebas cutáneas y que el paciente se encontrara controlado con síntomas mínimos de su proceso alérgico. Se excluyeron quienes tuvieron: comorbilidades que modificaran la reactividad cutánea, hubieran ingerido medicamentos

contraindicados para realizar pruebas cutáneas, que estuvieran en tratamiento con inmunoterapia y los que rechazaron participar en el estudio.

A todos los pacientes incluidos se les realizó prueba cutánea por técnica de prick, con extractos estandarizados del laboratorio IPI-ASAC®, con extractos de *Dermatophagoides pteronyssinus* (58.500 unidades biológicas (UB/mL), *Dermatophagoides farinae* (20.175 unidades biológicas (UB/mL) y *Blomia tropicalis* (37.650 unidades biológicas (UB/mL). La lectura de las pruebas se hizo a los 15 minutos y se consideró como resultado positivo una pápula con un diámetro mayor de 3 mm en relación con el control negativo.²⁴

El tamaño de la muestra se determinó en función del promedio de las variables dependientes. Se implementó estadística inferencial y se propuso una hipótesis nula de dos extremos y un valor de $p < 0.05$. El valor de “r” se estimó a partir del estadístico “F”, que se calculó mediante el método estadístico producto-momento de Pearson y la interpretación en concordancia con las propuesta por Guilford; se preestableció que la magnitud de “r” era importante si su valor era igual o mayor a 0.70, según los criterios publicados.²⁵

RESULTADOS

Se incluyeron 110 pacientes, con edad promedio de 24.1 años ($DE \pm 16.25$), el 50% eran hombres. El 92% de procedencia urbana y 7.3% rural. Respecto a la frecuencia de la patología alérgica 2.7% tenía asma, 73.6% rinitis alérgica y 23.6 % ambos diagnósticos.

Tuvieron reactividad cutánea positiva 59.1% de los pacientes (figura 1), de los que 24.5% correspondieron al antígeno de *Blomia tropicalis*. En relación con la positividad de reactividad cutánea para *Blomia tropicalis* con *Dermatophagoides pteronyssinus* fue de 10.03% y *Blomia tropicalis* con *Dermatophagoides farinae* de 7.29. Los resultados del coeficiente de correlación se resumen en la tabla 1.

Dado el valor de $p < 0.05$ se acepta que las dos variables están relacionadas. La dirección de “r” indica una variación directa y que la magnitud de este último estadístico se encontró en los rangos de una correlación baja, por lo que se concluye que existe una relación definida pero pequeña.

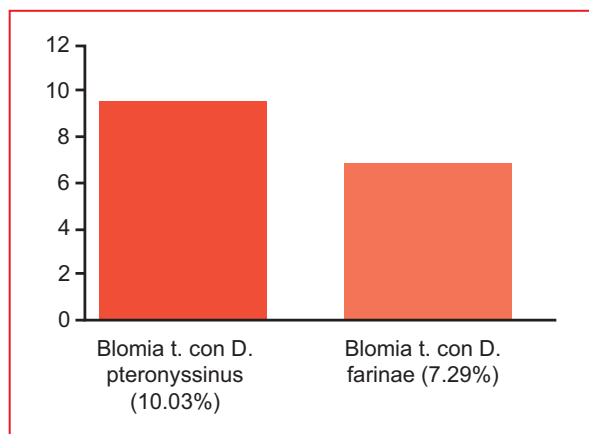


Figura 1. Positividad de reactividad cutánea para *Blomia tropicalis* con *Dermatophagoides pteronyssinus* y *B. tropicalis* con *Dermatophagoides farinae*. En la figura se observa el porcentaje de positividad para ambas relaciones.

Tabla 1. Correlación de pruebas cutáneas positivas entre *D. pteronyssinus* más *B. tropicalis* y *D. farinae* más *B. tropicalis* IC 95%.

	<i>D. pteronyssinus</i>	<i>D. farinae</i>
<i>Blomia tropicalis</i>	$r = 0.36$ $IC = 0.16 - 0.47$ $F = 16.39$ $p < 0.05$	$r = 0.27$ $IC = 0.07 - 0.41$ $F = 8.54$ $p < 0.05$

DISCUSIÓN

Los alérgenos intradomiciliarios representan uno de los factores más importantes en la inducción y desencadenamiento de enfermedades alérgicas respiratorias y la exposición a ácaros del polvo doméstico constituye un factor de riesgo mayor para asma y rinitis alérgica. Diversos estudios han comprobado reacciones cutáneas positivas a diferentes especies de ácaros. Los más importantes en Latinoamérica y Estados Unidos son: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Clortoglyphus arcuatus*, *Blomia tropicalis* y *Lepidoglyphus destructor*. Estas especies son frecuentes en el polvo casero, con variaciones según la altitud y la humedad del ambiente. Los ácaros están distribuidos por todo el mundo, sobre todo en zonas húmedas, y el hábitat de sus especies se superpone a pesar de las

preferencias climáticas, de cada una de ellas, así por ejemplo *Blomia tropicalis* es un ácaro muy común en los ambientes tropicales.¹²⁻¹⁵

En México existen pocos estudios de sensibilización a *Blomia tropicalis*; sin embargo, debido a que en diversas partes del mundo se reporta un incremento de la incidencia de *Blomia tropicalis* en pacientes con alergia respiratoria, además de que tiene reactividad cutánea simultánea con antígenos de *Dermatophagoides*, fue conveniente determinar la correlación entre reactividad cutánea para antígenos de ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, con *Blomia tropicalis* en pacientes con alergia respiratoria, tomando en cuenta la ubicación geográfica.¹⁵⁻²⁰

La reactividad cutánea evidenciada a través de la realización de pruebas epicutáneas es un recurso estratégico en la determinación del antígeno desencadenante de la enfermedad alérgica, por lo que la inclusión de antígenos en los paneles diagnósticos precisa una revisión regular.

Derivado de los resultados aquí presentados se destaca la correlación entre *B. tropicalis* con *D. pteronyssinus* y *D. farinae* con una magnitud baja pero con una misma dirección y sentido, difiriendo de un reporte previo en el que no se encuentra correlación, diferencia que fácilmente se explica por las distintas concentraciones de antígenos utilizados.^{15, 17-20}

A partir de los resultados de este estudio y de acuerdo con los criterios previamente publicados para la evaluación de los resultados del estadístico “r”²⁵ se concluye que la relación de la reactividad cutánea entre *B. tropicalis* y *D. pteronyssinus* así como para *Dermatophagoides farinae* es definida pero pequeña. Por lo tanto, debe asumirse que las reactividades estudiadas no son equivalentes, lo que hace necesario agregar el antígeno de *Blomia tropicalis* al panel de diagnóstico y tratamiento alérgico, sin restarle importancia a los antígenos de ácaros incluidos con anterioridad.

CONCLUSIONES

La mayoría de los pacientes del estudio presentó reactividad cutánea al menos a uno de los tres ácaros probados. Aproximadamente una quinta parte de los pacientes tuvo una prueba cutánea positiva sólo para *Blomia tropicalis*. El porcentaje de pacientes con prueba reactiva para *D.*

Pteronyssinus más *B. tropicalis* y *D. Farinae* más *B. tropicalis* fue muy bajo. Se observó una correlación débil entre las dos especies de *Dermatophagoides* y *Blomia*. La débil correlación de las especies de ácaros probados sugiere que durante la valoración de pacientes con rinitis alérgica y asma se considere a *Blomia tropicalis* en el panel de extractos alérgicos.

REFERENCIAS

1. Díaz RA, Fabré OD, Coutin MG, González MT. Sensibilización a ácaros. Relación con enfermedades atópicas en escolares de San Antonio de los Baños. Rev Alerg Mex 2009;56:80-85.
2. Navarro PA. Interrelación entre la rinitis y el asma. En: Pelaez HA, Dávila GI, editores. Tratado de Alergología. Madrid: Ergon, 2007;595-603.
3. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz A, Denburg J, Folles W, Togias A, et al. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) workshop report update. Allergy 2008;63:8-160.
4. Álvarez PM, Quirce GS, Olaguibel RJ, Sastre DJ. Vía respiratoria única. Reestructuración de las vías respiratorias. En: Pelaez HA, Dávila GI, Editores. Tratado de Alergología. Madrid: Ergon, 2007; 631-640.
5. Arana MO, Paz MD, López GA. Patogénesis del asma. En: López GA, Papaqui TS, Arana MO, Paz MD. Asma en México: diagnóstico y tratamiento. México: Nieto Editores, 2010;17-20.
6. O'Byrne P, Bateman ED, Bousquet J, Clark T, Ohta K, Paggiaro P, et al. Global strategy for asthma management and prevention 2008 (update). <http://www.ginasthma.com/>
7. Fernández BM, Gómez RF, López VA, Molina PJ, Navarro RD, Plaza MV y col. Guía española para el manejo del asma 2009. GEMA. www.gemasma.com
8. Pomes A, Villalba M. Alérgenos. En: Pelaez HA, Dávila GI, editores. Tratado de Alergología. Madrid: Ergon, 2007;5-26.
9. Iraola V. Introducción a los ácaros (I): Descripción general y principales grupos. Bol.S.E.A. 1998;23: 13-19.
10. Iraola V. Introducción a los ácaros (II): Hábitats e importancia para el hombre. Bol.S.E.A. 2001;28:141-146.
11. Olaguibel JM. Biodiversidad de los ácaros del polvo en la patología alérgica. Alergol Inmunol Clin 1999;14:410-446.
12. Moreno MM, Duque CM. Sensibilidad cutánea a *Blomia tropicalis* en pacientes alérgicos de la ciudad de Medellín. Revista Inmunoalérgica 2001;2:1-4.
13. Huertas AJ, Lavin JR, García AM. Sensibilización a ácaros del género *Blomia* en el aérea urbana de Cartagena de Levante. Alergol Inmunol Clin 2004; 19: 231-236.
14. Feng GY, Wang DY, Ching TO, Tay SL. Identification and characterization of a novel allergen from *Blomia tropicalis*: Blo t 21. J Allergy Clin Immunol 2007;120:105-112.
15. Martínez JN, Aguilar AD, Rojas RE. Prevalencia de la sensibilización a *Blomia tropicalis* y *Dermatophagoides pteronyssinus*, *farinae* y *siboney* en pacientes con rinitis o asma alérgica en una población de la zona metropolitana de la ciudad de México. Rev Alerg Mex 2010;57:3-10.

16. Juárez SM, López GA, Paz MD, Galindo GA, Papaqui TS. Correlación entre prueba cutánea para *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Dermatophagoides farinae* en pacientes alérgicos del Hospital Universitario de Puebla. Rev Alerg Asma Inmunol Pediatr 2000;9:82-85.
17. Castro AR, Morejon MM, Naranjo RR, Navarro VB. Correlation between skin test to *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides siboney* and *Blomia tropicalis* in Cuban asthmatics. Allergol Immunopathol 2006;34:23-26.
18. Gao Y, Wang DY, Chew FT. Co- sensitization not due to cross-reactivity between paralogs of group 5 allergens from *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides farinae*. J Allergy Clin Immunol 2006;117:119-120.
19. Sade K, Roitman D, Kivity S. Sensitization to Dermatophagoides, *Blomia tropicalis*, and other mites in atopic patients. J Asthma 2010;47:849-852.
20. Arduzzo LR, Crisci CD, Bertoya NI. Determinaciones de IgE específica para cinco ácaros en pacientes atópicos y su relación con las pruebas cutáneas. Estudio multicéntrico. Arch Alergia Inmunol Clin 2001; 32:45-51.
21. Ross PA, Fabelo PM, Sarduy RC. Eficacia diagnóstica de la prueba cutánea de Prick con extractos alérgicos de ácaros en pacientes asmáticos. Rev Arch Med Camagüey 2009;13: 1-15.
22. Bacharier LB, Boner A, Carlsen KH, Eigenmann PA, Frischer T, Götz M, y col. Diagnóstico y tratamiento del asma en los niños y adolescentes: informe de consenso del PRACTALL. Reimpresión de Allergy 2008;63:5-35.
23. García RJ, Matheu DV, Sánchez MI, Seoane LJ. Técnicas diagnósticas in vivo. En: Pelaez HA, Dávila GI, Editores. Tratado de Alergología. Madrid: Ergon, 2007;115-144.
24. Larenas LD, Ortega MJ, Del Río NB, Rodríguez PN, Arias CA, Estrada A, Becerril AM y col. Guía Mexicana de Práctica Clínica de Inmunoterapia 2011. Rev Alergia Mex 2011;58(1):3-51.
25. Williams F. Razonamiento estadístico. México: Interamericana, 1982;48-62.