



01674  
UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PRUEBAS INTRADERMICAS EN EL PERRO:  
CONCENTRACION DE EXTRACTOS ALERGENICOS

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION  
Y DE LA SALUD ANIMAL  
P R E S E N T A  
LUIS RAMON NOLASCO ESPINOSA

TUTOR: FERNANDO CONSTANTINO CASAS  
COMITE TUTORAL: ROBERTO A. CERVANTES OLIVARES  
NURIA DE BUEN DE ARGUERO

MEXICO, D.F.

2000





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

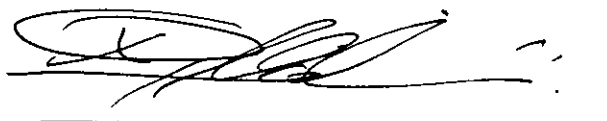
**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## DECLARACIÓN

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.



MVZ. Luis Ramón Nolasco Espinosa

**DEDICATORIA**

**A mi esposa Rosy  
y  
a nuestro futuro bebé  
con amor**

## **AGRADECIMIENTOS**

Por su apoyo para la realización de este trabajo

Dr. Fernando Constantino Casas

Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y  
Zootecnia de la U.N.A.M.

Dr. Modesto Orea Solano

Servicio de Inmunología y Alergia del Hospital Regional Adolfo López  
Mateos ISSSTE.

MVZ. Fernando Viniegra Rodríguez

Bioterio del Departamento de Cirugía Experimental del Hospital Regional  
20 de Noviembre ISSSTE.

MVZ. Katuska Olmos Jiménez

Bioterio del Departamento de Cirugía Experimental del Hospital Regional  
20 de Noviembre ISSSTE.

MVZ. José Alberto Gómez Blando

Clínica Privada

MVZ. Luis Nuñez Ochoa

Laboratorio de Patología Clínica Experto

MVZ. Agustín Montes de Oca Acosta

Laboratorio de Patología Clínica Experto

Tec. Guadalupe Juárez

Hospital General de la Secretaría de Salud

A los miembros del Jurado por el tiempo dedicado a la revisión del trabajo

Por el financiamiento del proyecto

Laboratorios APHI de México

Laboratorios Pfizer de México

## ÍNDICE

Lista de cuadros.....	VIII
Lista de figuras.....	IX
Lista de anexos.....	X
Capítulo 1.- Introducción.....	1
1.1. Antecedentes de alergias y de la utilización de las pruebas intradérmicas para su diagnóstico en perros.....	1
1.2. Respuesta cutánea a las pruebas intradérmicas.....	4
1.2.1. Vasoconstricción capilar transitoria.....	5
1.2.2. Vasodilatación capilar con extravasación de líquido y células inflamatorias.....	5
1.2.3. Respuesta neurovascular.....	6
1.3. Características y clasificación de los alérgenos utilizados en las pruebas intradérmicas.....	6
1.3.1. Pólenes.....	8
1.3.2. Hongos.....	9
1.3.3. Ambientales.....	10
1.3.4. Insectos.....	11
1.4. Elaboración de los extractos alérgicos.....	11
1.5. Selección de los alérgenos y concentración a utilizar en las pruebas intradérmicas.....	14
1.6. Técnica e interpretación de las pruebas intradérmicas.....	16
1.7. Situación actual de las pruebas intradérmicas en medicina veterinaria en México.....	19
Objetivos.....	22
Hipótesis.....	23

Capítulo 2.- Material y Métodos.....	24
2.1. Lugar donde se realizó el estudio.....	24
2.2. Testigos (negativo y positivo) y alergenos.....	24
2.3. Perros utilizados en el estudio.....	25
2.4. Realización e interpretación de las pruebas intradérmicas.....	25
2.5. Biopsias.....	27
2.6. Análisis histopatológico.....	27
2.7. Análisis estadístico.....	28
Capítulo 3.- Resultados.....	30
Capítulo 4.- Discusión y conclusiones.....	38
Capítulo 5.- Referencias.....	47

**LISTA DE CUADROS**

Cuadro 3.1. Reacciones positivas a los 15 minutos posinoculación intradérmica de las diferentes diluciones de los alérgenos.....	31
Cuadro 3.2. Hallazgos histopatológicos a los 30 minutos en testigo negativo, testigo positivo, extractos alérgicos y reacciones positivas.....	34



**LISTA DE FIGURAS**

Figura 3.1. Reacciones a los 15 minutos posinoculación intradérmica de los testigos y las diferentes diluciones de <i>Mucorínea</i> .....	35
Figura 3.2. Reacciones a los 15 minutos posinoculación intradérmica del testigo negativo y positivo.....	35
Figura 3.3. Hallazgos histopatológicos en dermis superficial.....	36
Figura 3.4. Hallazgos histopatológicos en dermis superficial.....	36
Figura 3.5. Hallazgos histopatológicos en dermis superficial.....	37
Figura 3.6. Hallazgos histopatológicos en dermis superficial.....	37

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Alergenos utilizados en el estudio.....	52
Anexo 2. Elaboración de las diluciones.....	53
Anexo 3. Orden de aplicación de los alergenos.....	54
Anexo 4. Selección de las biopsias.....	55
Anexo 5. Testigo negativo y positivo. Mediciones en milímetros a los 15 y 30 minutos.....	56
Anexo 6. Pólenes. Mediciones en milímetros a los 15 minutos.....	57
Anexo 7. Pólenes. Mediciones en milímetros a los 30 minutos.....	58
Anexo 8. Hongos. Mediciones en milímetros a los 15 minutos.....	59
Anexo 9. Hongos. Mediciones en milímetros a los 30 minutos.....	60
Anexo 10. Ambientales. Mediciones en milímetros a los 15 minutos.....	61
Anexo 11. Ambientales. Mediciones en milímetros a los 30 minutos.....	62
Anexo 12. Insectos. Mediciones en milímetros a los 15 minutos.....	63
Anexo 13. Insectos. Mediciones en milímetros a los 30 minutos.....	64
Anexo 14. Testigo positivo. Hallazgos histopatológicos.....	65
Anexo 15. Testigo negativo. Hallazgos histopatológicos.....	66
Anexo 16. Pólenes. Hallazgos histopatológicos.....	67
Anexo 17. Hongos. Hallazgos histopatológicos.....	68
Anexo 18. Ambientales. Hallazgos histopatológicos.....	69
Anexo 19. Insectos. Hallazgos histopatológicos.....	70
Anexo 20. Reacciones positivas. Hallazgos histopatológicos.....	71

## RESUMEN

**Introducción:** Las pruebas intradérmicas son utilizadas para el diagnóstico de dermatitis atópica en humanos y perros. Sin embargo, en México no son utilizadas en animales de compañía. Si los alérgenos están muy concentrados, causarán una reacción positiva en individuos no alérgicos. Por esta razón, los extractos alérgicos se deben probar en algunos perros sanos. Si la reactividad de cualquiera de los alérgenos es del 10% o más, se debe disminuir la concentración. **Material y métodos:** con el fin de determinar la concentración a la cual los extractos alérgicos se deben de utilizar para el diagnóstico de dermatitis atópica en perros de la Ciudad de México, se inyectaron vía intradérmica diluciones seriadas de 30 extractos alérgicos en 30 perros sanos, las reacciones se midieron a los 15 y 30 minutos y se tomaron biopsias para determinar los hallazgos histopatológicos. **Resultados:** las diluciones de los extractos alérgicos que causaron reacciones positivas en menos del 10% de los perros fueron pólenes, hongos, ambientales, pulga y mosquito. Se observaron reacciones positivas en más del 10% de los perros cuando los extractos de hormiga y cucaracha fueron inoculados. El tamaño de la reacción causada por la inoculación del testigo positivo y negativo no varió cuando se midió a los 15 y 30 minutos ( $p > 0.05$ ), pero la reacción provocada por los extractos alérgicos sí se modificó, siendo más pequeña a los 30 minutos ( $p \leq 0.05$ ). Los hallazgos histopatológicos incluyeron edema, fragmentación de fibras de colágena e infiltrado inflamatorio de mastocitos, neutrófilos y eosinófilos en la dermis superficial. El testigo positivo y las reacciones positivas presentaron mayor edema y cantidad de polimorfonucleares ( $p \leq 0.05$ ). **Conclusiones:** estos resultados indican que la dilución a la cual los extractos se deben de utilizar para el diagnóstico de dermatitis atópica en perros de la Ciudad de México, es para pólenes 1:1,000 P/V, hongos, ambientales, pulga, mosquito y cucaracha 1:2,000 P/V y hormiga 1:3,000 P/V. Las reacciones se deben de leer a los 15 minutos posinoculación. No se pudo confirmar que los hallazgos histopatológicos puedan ser útiles para diferenciar entre una reacción irritante de una alérgica.

**Palabras claves:** dermatitis atópica, extractos alérgicos, pruebas intradérmicas, hallazgos histopatológicos.

## SUMMARY

**Introduction:** intradermal skin testing is used to diagnose atopic dermatitis in humans and dogs. However, it is not used on companion animals in Mexico. If the allergens are too concentrated, they will cause a positive reaction in nonallergic individuals. For this reason, allergenic extracts should be used on some healthy dogs. If the reactivity for any allergen is 10% or more, the concentration must be decreased. **Material and Methods:** in order to determine the concentration at which the allergenic extracts should be used for the diagnosis of canine atopic dermatitis in Mexico City, serial dilutions of 30 allergenic extracts were injected intradermally in 30 healthy dogs, the reactions were measured at 15 and 30 minutes and biopsies were taken to determine the histopathological findings. **Results:** the allergenic extract dilutions that caused positive reactions in less than 10% of the dogs were pollens, molds, environmental, flea and mosquito. Positive reactions in more than 10% of the dogs were observed when ant and cockroach extracts were inoculated. The size of the reaction caused by the inoculation of the positive and negative controls was not different when measured at 15 and 30 minutes ( $p > 0.05$ ), however, the reaction caused by the allergenic extracts did change with time, being smaller at 30 minutes ( $p \leq 0.05$ ). The histopathological findings of the superficial dermis included edema, collagen fragmentation and inflammatory infiltrate of mast cells, neutrophils and eosinophils. Edema and polymorphonuclear cells were more pronounced in positive control and positive reaction wheals ( $p \leq 0.05$ ). **Conclusions:** these results indicate that the dilution of the allergenic extracts that should be used for the diagnosis of canine atopic dermatitis in Mexico City is for pollens 1:1,000 P/V, molds, environmental, fleas, mosquito and cockroach 1:2,000 P/V, and for ant 1:3,000 P/V. The reaction should be measured after 15 minutes of being inoculated the allergens. It could not be confirmed that histopathological findings were useful to differentiate an irritant reaction from an allergic one.

**Keywords:** Atopic dermatitis, allergenic extracts, intradermal skin testing, histopathological findings.

## Capítulo 1.- INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes de Alergias y de la Utilización de las Pruebas Intradérmicas para su Diagnóstico en Perros

El primer informe que se tiene de la utilización de las pruebas intradérmicas como herramienta diagnóstica en los procesos alérgicos data de 1865, cuando Blackley, quien sufría de fiebre de heno, escarificó una pequeña porción de su brazo y aplicó una solución de polen de pasto en el, ésto le provocó la formación de una roncha eritematosa y pruriginosa<sup>1</sup>.

En 1872, Wyman confirmó que el polen de las plantas era la causa de la fiebre de heno, y en 1906 Von Pirquet introdujo el término alergia e hipersensibilidad<sup>2</sup>.

Sin embargo, el desconocimiento de la patogenia de las enfermedades alérgicas ocasionó que las pruebas cutáneas fueran utilizadas hasta 1908, cuando Schloss las implementó para detectar los estados de alergia inmediata en humanos<sup>1</sup>.

En 1921, Praustnitz y Küstner lograron sensibilizar en forma pasiva la piel humana utilizando suero de una persona alérgica<sup>2,3,4</sup>. Dos años después, Coca y Cooke introdujeron en medicina humana el término atopia tomado de la palabra griega *atopos* (enfermedad extraña) para describir un complejo alérgico conformado por rinitis alérgica o fiebre del heno, asma y dermatitis atópica, el cual se encontraba asociado a sustancias o alergenios ambientales<sup>3,5,6,7</sup>.

Una vez que se aceptó que la atopia en humanos era causada por la exposición a sustancias que normalmente son inofensivas para la mayoría de las personas, la reexposición del individuo a la sustancia sospechosa, a través de su inoculación intradérmica, se volvió una práctica común para establecer el diagnóstico de esta alteración<sup>1</sup>.

El reconocimiento de las reacciones alérgicas y, por ende, la utilización de las pruebas intradérmicas en animales, fue más difícil que en humanos<sup>6,7</sup>.

Durante mucho tiempo se consideró que únicamente el humano podía desarrollar alergias en forma espontánea. No obstante, en 1933 Burns y en 1934 Pomeroy detectaron, en estudios independientes, la presencia de alergia alimentaria en perros<sup>4,6,7</sup>.

En este período varios investigadores intentaron realizar pruebas intradérmicas con alérgenos de la dieta y, aunque en algunos casos se obtuvieron resultados positivos, la opinión general fue que las pruebas cutáneas eran poco confiables y que la única vía para realizar el diagnóstico era a través de dietas de eliminación<sup>7</sup>.

Cuatro años más tarde Kissileff identificó a las pulgas como causa de alergia estacional en perros<sup>7</sup>.

A pesar de que la alergia alimentaria y a la saliva de pulga se reconocieron como factores etiológicos en el perro, no existía prueba alguna de que la atopia afectara a esta especie, incluso Coca, quien introdujo el término atopia, en 1938 afirmó que no había evidencia de que ésta ocurriera en animales<sup>7</sup>.

Sin embargo, en 1941 Whittich describió el primer caso de atopia en perros claramente documentado. El perro presentaba episodios estacionales de estornudos, lagrimeo excesivo, inflamación conjuntival y prurito generalizado. El paciente tuvo reactividad en la piel a las pruebas intradérmicas frente a ambrosía, amaranto, cardo ruso y salvia de pradera, asimismo, el suero dio resultados positivos a la prueba de Prausnitz-Küstner tanto en un perro sano como en un receptor humano y respondió en forma favorable a la hiposensibilización<sup>3,5,6,7,8</sup>.

A pesar de lo anterior, el siguiente caso de atopia en perros fue publicado por Patterson en 1959<sup>5,6,7,8,9</sup>.

Aún cuando los informes sobre atopia en perros se incrementaron, a mediados de los 60's todavía existía poca inclinación por parte de los médicos

veterinarios para emplear las pruebas intradérmicas para el diagnóstico de atopia y para realizar la hiposensibilización como parte del tratamiento<sup>10</sup>.

Lo anterior se debió a que muchos veterinarios aún dudaban que las dermatitis en perros pudieran ser causadas por procesos alérgicos asociados a pólenes y hongos. Así pues, se cuestionaba el valor diagnóstico de las pruebas intradérmicas y de la hiposensibilización, y, por lo tanto, desconocían sus principios, la técnica de aplicación y su interpretación<sup>10</sup>.

Por esta razón, no fue sino hasta finales de los años 60's e inicio de los 70's en que se prestó mayor atención a las alergias en perros. El interés creciente de los veterinarios por las enfermedades alérgicas vino del estudio de la patogenia de atopia en humanos y los descubrimientos similares hechos en perros<sup>5,6,7,8,9</sup>.

En 1963, Gell y Coombs hacen una clasificación de los estados de hipersensibilidad, indicando que las reacciones alérgicas estaban asociadas a la tipo I<sup>2,4,9,11,12,13</sup>.

Los anticuerpos, los mastocitos o células cebadas y la liberación de histamina por éstas ya se habían descubierto con anterioridad, pero fue hasta 1967 cuando Ishizaka identificó a la Inmunoglobulina E (IgE) como responsable de las reacciones alérgicas en humanos<sup>2</sup>. Seis años más tarde, Halliwell establece la asociación de IgE con las células cebadas en el perro<sup>4,9,11,13</sup>.

Por otra parte, se realizaron varios estudios, tanto en humanos como en perros, donde se observó que no todos los individuos tienen la capacidad para desarrollar una respuesta por IgE, indicando que tiene que existir una tendencia de tipo genética<sup>4,7,11,13,14</sup>.

Lo anterior ocasionó que la utilización de las pruebas intradérmicas se hiciera una práctica rutinaria en la clínica de pequeñas especies, y a finales de los 70's se publican los primeros artículos que establecen la frecuencia de la dermatitis atópica en el perro, los alérgenos más comúnmente involucrados y la respuesta a la hiposensibilización<sup>15,16,17</sup>.

En humanos, la enfermedad atópica se sospecha cuando el paciente manifiesta signos y síntomas relacionados a ésta, aunados a resultados positivos en las pruebas intradérmicas, sin embargo, en algunos casos, la elevación en las concentraciones séricas de IgE confirma el diagnóstico<sup>1,4,6,9,18</sup>.

A pesar de que la elevación de IgE puede confirmar el diagnóstico de atopia en humanos, se ha observado, en diferentes estudios, que la medición de esta inmunoglobulina es de poco valor diagnóstico en los perros atópicos, ya que los niveles de IgE en ellos pueden ser normales o incluso subnormales<sup>19,20,21,22,23</sup>.

Asimismo, se ha visto que los valores de IgE, tanto en humanos como en perros, se pueden encontrar elevados por causas no alérgicas, tal es el caso de las parasitosis gastrointestinales por helmintos<sup>19,20,21,22,23</sup>.

Por otro lado, en otros estudios se demostró que un subtipo de IgG (IgG<sub>4</sub>) también tiene la capacidad de unirse a los alérgenos y provocar la desgranulación de los mastocitos<sup>24,25</sup>.

Estos descubrimientos complementaron la definición de atopia postulada por Coca y Cooke, dando origen a la definición actual: predisposición genéticamente determinada para producir, en forma espontánea y exagerada, inmunoglobulinas IgE o IgG<sub>4</sub> hacia sustancias ambientales normalmente inocuas, lo que da como resultado la desgranulación excesiva de las células cebadas<sup>6,26,27,28</sup>.

Actualmente, la utilización de las pruebas intradérmicas, en humanos y perros, confirma el diagnóstico de atopia, y permite seleccionar en forma adecuada los antígenos para la hiposensibilización<sup>1,4,6,18,27,29,30,31,32</sup>.

## **1.2. Respuesta Cutánea a las Pruebas Intradérmicas**

El objetivo de las pruebas intradérmicas es producir una reacción alérgica pequeña, controlada y fácilmente visible al inyectar una cantidad conocida de un extracto alérgico<sup>1,3,4,6,27,32,33,34</sup>.



Las pruebas intradérmicas revelan la presencia de inmunoglobulinas (IgE o IgG<sub>4</sub>) alérgeno específicas, al permitir que el alérgeno pase la capa de queratina de la piel y provoque la desgranulación de las células cebadas<sup>1,3,4,5,8,10,11,27,32,35</sup>.

La unión alérgeno anticuerpo y la subsecuente activación de las células cebadas ocasiona cambios vasculares y celulares que dan como resultado la formación de una roncha eritematosa que puede ser medida a los 15 ó 30 minutos<sup>1,4,5,6,7,18,27,32</sup>.

En años recientes el conocimiento de los mecanismos por los cuales los alérgenos pueden inducir reacciones en la piel se ha incrementado considerablemente<sup>1,36</sup>.

La respuesta de la piel al alérgeno se ha dividido, para su estudio, en 3 fases: vasoconstricción capilar transitoria, vasodilatación capilar seguida de extravasación de líquido y células inflamatorias, y respuesta neurovascular<sup>1,32,36</sup>.

#### 1.2.1. Vasoconstricción capilar transitoria

Una vez que el alérgeno inoculado entra en contacto con la dermis ocurre una vasoconstricción capilar en los primeros 15 a 30 segundos, ésta incrementa en intensidad al minuto y desaparece después de 3 a 6 minutos<sup>1</sup>.

#### 1.2.2. Vasodilatación capilar con extravasación de líquido y células inflamatorias

Después de la fase de vasoconstricción capilar transitoria, el alérgeno se une a 2 moléculas de IgE alérgeno específicas, las cuales, a su vez, se encuentran unidas a las células cebadas. La unión alérgeno anticuerpo provoca que estas células liberen mediadores químicos inflamatorios<sup>1,11,12,13,36,37</sup>.

Los mediadores químicos son de dos tipos: los preformados que están localizados en los gránulos de las células cebadas y basófilos (histamina, serotonina, heparina, proteasas, factor activador plaquetario y factor quimiotáctico de neutrófilos y eosinófilos) y los de nueva formación derivados del ácido araquidónico (prostaglandinas y leucotrienos)<sup>1,11,12,13,36,37</sup>.

La liberación de la histamina inicia aproximadamente a los 5 minutos de haber inoculado el alérgeno<sup>1,11,36,37</sup>, pero su actividad, al igual que la de los otros mediadores químicos, alcanza su pico máximo a los 30 minutos, lo anterior da como resultado un incremento en la permeabilidad capilar con la consiguiente extravasación de plasma y de células inflamatorias al espacio intersticial<sup>1,11,12,35,36,37</sup>.

El análisis histopatológico de las reacciones positivas causadas por la inyección de los alérgenos, en pacientes atópicos, demuestra la aparición de edema a los 5 minutos seguido por la presencia de células cebadas y otras células inflamatorias (predominantemente eosinófilos y neutrófilos) a los 10 minutos<sup>1,12,38,39</sup>.

Estos hallazgos son diferentes a los encontrados en las biopsias de piel de individuos atópicos, que se toman con fines diagnósticos, donde se aprecia una predominancia de linfocitos e histiocitos, números variables de mastocitos, pequeñas cantidades de neutrófilos y rara vez eosinófilos<sup>5,18,40,41,42</sup>.

### 1.2.3. Respuesta neurovascular

En algunas ocasiones se puede observar, en pacientes alérgicos, una zona de eritema alrededor de la roncha que se ha denominado "llamarada eritematosa", esta reacción es causada por una respuesta neurovascular<sup>1,4,32,36,38,39,43</sup>. A pesar de que esta manifestación es común en humanos, los perros raramente la presentan<sup>4,18,29,32</sup>.

Se cree que la histamina estimula a las fibras nerviosas simpáticas adyacentes para que liberen sustancia P, y este neuromediador estimula, aún más, la secreción de histamina por las células cebadas provocando una retroalimentación positiva<sup>1,36,37,38,39,43</sup>.

Por otro lado, algunos pacientes presentan una sensibilidad cutánea exagerada. Bajo estas condiciones existe reactividad a todos los alérgenos

inoculados. A esta condición se le conoce como "dermografismo", y al igual que la respuesta neurovascular, es rara en perros<sup>1,3,4,29,32,44</sup>.

### **1.3. Características y Clasificación de los Alergenos Utilizados en las Pruebas Intradérmicas**

Los extractos alérgicos son una mezcla compleja de componentes antigénicos, pero sólo un número pequeño de éstos son los responsables de desencadenar la respuesta alérgica<sup>1,4,5,33,45,46,47,48,49</sup>.

Por lo general, los alergenos son proteínas o glicoproteínas hidrosolubles, con un peso molecular que varía de 10,000 a 70,000 daltons y un tamaño de 2 a 60  $\mu\text{m}$ <sup>4,5,11,15,16,18,45</sup>.

Aún cuando algunos alergenos han sido purificados y se ha caracterizado su secuencia de aminoácidos, a la fecha no se conocen todos los antígenos relacionados al proceso alérgico<sup>4,45,46,47,48,49</sup>.

Los alergenos pueden entrar al organismo por inhalación, ingestión, inoculación o vía percutánea, desencadenando un estado de hipersensibilidad tipo I en pacientes susceptibles<sup>3,4,18,27,34,49</sup>.

Por lo tanto, si se utilizan los alergenos adecuados, las pruebas intradérmicas pueden ser útiles para confirmar el diagnóstico de las enfermedades alérgicas<sup>4,29,44,45</sup>.

Sin embargo, los resultados obtenidos a través de las pruebas intradérmicas para el diagnóstico de hipersensibilidad alimentaria, a diferencia de humanos, no son concluyentes en perros<sup>4,6,7,14,18</sup>.

Algunos investigadores han demostrado que la cocción, la digestión y el metabolismo pueden alterar la composición antigénica de los alergenos alimentarios o pueden favorecer la formación de moléculas alérgicas. Por ejemplo, ciertos perros alérgicos a la leche presentan resultados negativos a las pruebas intradérmicas, pero son positivos al producto resultante de la digestión

de la  $\beta$ -lactoglobulina. Por tal motivo, la única forma de diagnóstico de esta alteración es a través de la administración de una dieta de eliminación<sup>50,51,52,53,54,55</sup>.

Así pues, los alérgenos que se usan en perros para la realización de las pruebas cutáneas son los asociados a atopia, a los cuales se les ha denominado "alérgenos aéreos" o "aeroalérgenos"<sup>4,5,7,14,18,45</sup>.

Taxonómicamente los "alérgenos aéreos" se han clasificado en: pólenes, hongos, ambientales e insectos<sup>1,44,45</sup>. Para que estas sustancias puedan ser consideradas como causa de alergia deben de encontrarse suspendidas en el aire en cantidades abundantes y ser alérgicas<sup>4,5,6,18</sup>.

### 1.3.1. Pólenes

El polen es esencial para la reproducción de las plantas y es considerado como la causa más importante de alergias estacionales, encontrándose en mayor cantidad en el exterior de la casa. Existen 2 tipos de plantas de acuerdo a su modo de polinización: entomófilas y anemófilas<sup>4,5,6,32,45</sup>.

Las plantas entomófilas producen pequeñas cantidades de polen, tienen flores llamativas, aroma fragante y néctar. Debido a que sus granos de polen son grandes y pesados, su polinización se lleva a cabo por insectos acarreadores, y, aún cuando no son una fuente importante de alérgenos, representan un riesgo potencial para aquellas personas o animales que tienen contacto frecuente con ellas<sup>4,5,6,32,45</sup>.

Por otro lado, a diferencia del polen de las plantas entomófilas, las plantas anemófilas (pastos, árboles y arbustos) pueden liberar millones de granos de polen ligero, por lo que el viento es el encargado de la polinización. Como regla general se acepta que, en climas templados, el pico máximo de liberación de polen ocurre durante la primavera, no obstante, en zonas cálidas se puede observar durante todo el año<sup>4,5,6,32,45</sup>.

Se ha establecido que la cantidad de granos de polen que debe de existir en el aire para desencadenar una respuesta alérgica es de 30 granos por metro

cúbico. En las épocas de polinización, una sola planta puede producir un millón de granos<sup>4,5,6</sup>.

Además, se sabe que los pólenes pueden ser transportados por el aire a una distancia de hasta 60 km de su origen, por lo que los individuos alérgicos pueden tener contacto con ellos aún cuando las plantas, causantes de su enfermedad, no estén cerca<sup>4,5,6</sup>.

La mayoría de los pólenes asociados a atopia pertenecen a este grupo, y por esta razón, sus alergenios han sido los más estudiados<sup>4,5,6,45</sup>.

El polen de ambrosía, por ejemplo, contiene aproximadamente 50 antígenos y se ha comprobado que sólo 20 son alérgicos. El pasto inglés contiene 40, pero únicamente 5 son importantes<sup>8,45,46,47,48</sup>.

### 1.3.2. Hongos

Varias especies de hongos están asociadas a la presentación de reacciones alérgicas estacionales o continuas, lo cual dependerá, en gran parte, si se encuentran en el exterior (*Alternaria*, *Drechslera* y *Hormodendrum*) o en el interior de la casa (*Aspergillus*, *Mucorinea* y *Penicillum*)<sup>4,32,45</sup>.

La mayoría de los hongos causantes de alergia pertenecen a un grupo taxonómico denominado "hongos imperfectos" (asexuales), por lo general, son saprófitos no patogénicos, sus esporas son parte de las partículas suspendidas en el aire y crecen en una gran variedad lugares (suelo, excretas de animales, comida almacenada, plástico, papel, madera, hojas de plantas en descomposición, frutas y superficies húmedas de baños, sótanos y refrigeradores)<sup>4,5,6,45</sup>.

El crecimiento de los hongos y la liberación de sus esporas tiende a aumentar en condiciones de humedad, por lo tanto, durante la primavera y el otoño se favorece su presencia. Sin embargo, se les puede encontrar en cualquier época del año, ya que cuando la humedad atmosférica es baja, pueden encontrar agua libre, especialmente en lugares oscuros, y crecer<sup>4,5,6,32,45</sup>.

A pesar de que la liberación de esporas depende de la presencia de agua, su dispersión en el aire requiere de una disminución en la humedad. Por esta razón, la dispersión máxima ocurre en días soleados, y cuando el problema es estacional se observa en el verano<sup>4,5,6,32,45</sup>.

Los hongos presentan una gran cantidad de antígenos, pero no se ha podido determinar cuantos de ellos actúan como alérgenos. Actualmente se han purificado y caracterizado parcialmente los alérgenos de *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus* y *Hormodendrum*<sup>4,45</sup>.

### 1.3.3. Ambientales

El grupo de alérgenos ambientales incluye una gran variedad de sustancias como polvo, ácaros, células descamadas, plumas, etcétera, que se han relacionado con alergias estacionales o continuas. Cuando el problema es estacional se presenta principalmente en la época de invierno, ya que durante este tiempo la concentración de ellos aumenta dentro de la casa al mantener las puertas y ventanas cerradas<sup>4,5,6,45</sup>.

El polvo de casa contiene ácaros, células de descamación, hongos, detritus de insectos, bacterias, material vegetal, restos de alimento y muchas otras sustancias. Con todos estos constituyentes, ha sido imposible determinar un alérgeno en particular<sup>4,5,6,45</sup>.

Los ácaros del polvo viven en las células de descamación de los animales, levaduras, hongos y partículas de alimento<sup>4,5,6,56</sup>. Existen más de 36 especies pero sólo dos parecen ser importantes (*Dermatophagoides farinae* y *D. pteronyssinus*)<sup>4,5</sup>. A la fecha, se han detectado 2 alérgenos en los dermatofagoides, uno se encuentra en las excretas y el otro en el cuerpo del ácaro<sup>4,5,45,56</sup>.

Los alérgenos epidérmicos también han sido estudiados. Se sabe que los animales pueden producir 5 gramos de células descamadas a la semana, por lo

que los individuos alérgicos pueden estar expuestos a grandes cantidades de estos alergen<sup>4,5</sup>.

Algunos de los determinantes alergénicos de este grupo han sido purificados y se ha visto que la fuente principal de éstos son la saliva y orina<sup>4,45,57,58,59,60,61</sup>.

Los alergen<sup>4,60,61</sup> epidérmicos se pueden encontrar suspendidos en el aire por tiempos prolongados sin sufrir alteraciones. Asimismo, pueden existir altas concentraciones de ellos en lugares donde los animales no tienen acceso<sup>4,60,61</sup>.

Existen otros alergen<sup>4,5,32</sup> ambientales como lana, plumas y algodón, pero su importancia como causantes de alergia es cuestionable<sup>4,5,32</sup>.

#### 1.3.4. Insectos

Los insectos pueden ocasionar alergias estacionales o continuas a través de la presencia de sus detritus en el ambiente (mariposas, mosquitos, moscas, cucarachas y termitas) y por inoculación de su veneno (avispas, abejas y hormigas) o de su saliva (pulgas). Por lo tanto, estos insectos pueden estar asociados a la respuesta atópica o a la hipersensibilidad a insectos, y al igual que en otros casos, solamente algunos de sus alergen<sup>4,45</sup> han sido purificados<sup>4,45</sup>.

#### 1.4. Elaboración de los Extractos Alergénicos

Las pruebas intradérmicas deben de tener alta sensibilidad, es decir poder identificar a todos aquellos pacientes que presenten atopia, y alta especificidad, o sea evitar la posibilidad de obtener resultados, tanto positivos como negativos, falsos<sup>1,4,5,6,7,18,26,30,31</sup>.

Para lograr el objetivo anterior, los extractos alergénicos deben de tener la habilidad específica para detectar todas las clonas de IgE o IgG<sub>4</sub> que el individuo posea contra cualquier epít<sup>45</sup>ope de ellos<sup>45</sup>.

Por lo tanto, lo ideal sería que lo extractos alergénicos tuvieran todas las moléculas asociadas a la respuesta alérgica del alergen<sup>45</sup>o a probar, ya que

cualquiera puede ser potencialmente alergénica, y que carecieran de material irrelevante o no alergénico, debido a que esto podría disminuir su capacidad antigénica<sup>1,4,5,45</sup>.

La preparación de los extractos alergénicos requiere de la colección del material, la extracción de los alérgenos y la mezcla con estabilizadores<sup>4,45</sup>.

La colección se puede realizar bajo condiciones naturales o en cultivos, y debe de llevarse a cabo por personas calificadas que puedan identificar y valorar la calidad de dicho material<sup>62</sup>.

El procedimiento de extracción de los alérgenos no debe desnaturalizar a las proteínas ni alterar en forma significativa la proporción de ellas, por lo que se realiza en condiciones controladas de pH, fuerza iónica y temperatura. Además, se deben utilizar bactericidas y fungicidas para evitar contaminaciones<sup>4,45,62,63</sup>.

Se recomienda no incluir material irrelevante, es decir, moléculas de bajo peso molecular ( $\leq 5000$  daltons), ésto se logra a través de varias técnicas como la diálisis, ultrafiltración o la cromatografía, y se debe verificar que cualquier sustancia excluida realmente sea no antigénica<sup>45,62</sup>.

A la solución final se le agregan agentes estabilizadores como el glicerol, fenol o albúmina sérica humana y se almacena liofilizado a 4-8°C o en forma acuosa a temperaturas de -20 a -80°C<sup>45,62</sup>.

Una vez que un lote de extractos alergénicos se ha producido se realizan pruebas de control de calidad con el fin de evitar variaciones al momento de ser utilizado para el diagnóstico y la hiposensibilización<sup>45,62,64</sup>.

Para llevar a cabo dicho control se deben de seguir los siguientes pasos: determinar la composición del extracto alergénico (que todos los alérgenos estén presentes), cuantificar los alérgenos (asegurar una concentración constante) y cuantificar la actividad alergénica total (mantener una potencia constante)<sup>62,64</sup>.

La determinación de la composición del extracto alergénico se puede llevar a cabo por electroforesis en gel de poli(acrilamida) con dodecilsulfato sódico, enfocamiento isoeléctrico o inmunoelectroforesis cruzada<sup>56,57,58,59,60,61,62,63,64,65</sup>. La



cuantificación de los alérgenos se realiza por Inmunolectroforesis en cohete (Rocket) o ELISA<sup>56,62,64,65</sup>. La cuantificación de la actividad alérgica total se hace a través de técnicas de inhibición de inmunoensayo, pruebas intradérmicas o de liberación de histamina<sup>62,64,65</sup>.

Desafortunadamente, las técnicas empleadas para la elaboración de los extractos alérgicos no están estandarizadas, ya que, como se mencionó anteriormente, las moléculas alérgicas no han sido completamente identificadas, por este motivo, los extractos se venden expresados en diferentes unidades dependiendo del laboratorio que los produzca. Estas unidades representan la potencia biológica del alérgeno y no guardan relación directa entre ellas, por lo que la potencia de los extractos de un mismo alérgeno puede variar de una compañía a otra<sup>1,3,4,5,6,7,8,11,14,18,31,33,34,45</sup>.

Actualmente las unidades que se utilizan son: unidades Noon (UN), peso/volumen (PV), unidades de nitrógeno protéico (UNP), unidades alérgicas (UA), unidades biológicas (UB), unidades de calidad estandarizada (UCE) y unidades internacionales (UI)<sup>4,5,6,7,18,45,65</sup>.

En medicina veterinaria las unidades más utilizadas son PV, UNP (Estados Unidos de Norte América y Europa) y UN (Europa)<sup>4,6,18</sup>.

La concentración PV se determina dividiendo el peso del alérgeno desengrasado sobre el volumen del diluyente, por ejemplo, un gramo de alérgeno diluido en 1,000 mililitros de diluyente origina una solución 1:1,000<sup>4,6,18,65</sup>.

La concentración UNP se establece extrayendo la proteína del alérgeno. Por definición, un miligramo de proteína alérgica es igual a 100,000 UNP<sup>4,6,18,65</sup>.

Una UN se define como un mililitro de un extracto hecho de un miligramo de polen en un litro de líquido de extracción<sup>4,6,18,65</sup>.

Ninguno de los métodos da una indicación real de la potencia biológica del extracto alérgico. Con la UNP y la UN se asume que todas las proteínas presentes son antigénicamente activas y que no existen antígenos no proteicos, lo cual no es real. Cuando se utilizan unidades PV se desconoce la cantidad de

material no proteico, por lo que si existe una cantidad significativa de éste, el extracto probablemente será menos potente de lo que indica la concentración<sup>4,6,18,65</sup>.

Por otro lado, los extractos se venden como alergenos individuales o mezclas de ellos. Cuando se utilizan las mezclas se pueden probar una mayor cantidad de alergenos a un menor costo, pero su potencia puede variar en forma significativa<sup>4,5,6,7,9,14,18,45</sup>.

En algunos casos, cuando los alergenos utilizados en la mezcla no comparten determinantes antigénicos, la respuesta puede ser débil, dando resultados falsos negativos en pacientes alérgicos. Sin embargo, si los epítopes son compartidos, se pueden observar reacciones cruzadas que dan origen a resultados falsos positivos. Por esta razón, es más recomendable utilizarlos en forma individual<sup>4,5,6,7,8,9,14,18,45</sup>.

### **1.5. Selección de los Alergenos y Concentración a Utilizar en las Pruebas Intradérmicas**

Antes de emplear las pruebas intradérmicas, para el diagnóstico de atopia en perros, es necesario seleccionar los alergenos debido a que éstos varían de acuerdo al área geográfica, y determinar la concentración de los extractos a utilizar para evitar la posibilidad de falsos positivos, ya que si están muy concentrados provocarán una reacción irritante en individuos no alérgicos<sup>1,4,6,7,18</sup>.

Como regla general el panel de pruebas intradérmicas debe consistir de 30 alergenos, éstos deben incluir 20 de los pólenes locales más importantes, 4 ó 5 hongos, polvo de casa, ácaros del polvo, 2 epidérmicos, plumas, así como un testigo positivo (fosfato de histamina 1:10,000 ó 1:100,000) y uno negativo (salina con fenol al 0.4%)<sup>4,5,6,7,14,18,33</sup>.

Actualmente se encuentran comercialmente disponibles alrededor de 425 extractos de alergenos no alimentarios. No obstante, inocular todos éstos en un paciente no es práctico<sup>4,6,7,18</sup>.

Aún cuando algunos de ellos no se encuentran en ciertas zonas, y de este modo, pueden ser fácilmente eliminados de la prueba, el número de alérgenos restantes puede resultar todavía excesivo<sup>4,6,7,18</sup>.

Existen varios estudios que indican la frecuencia de los alérgenos en diferentes áreas<sup>4,5,17,66,67,68</sup>, pero la importancia de un alérgeno en particular puede variar considerablemente debido a las diferencias botánicas y climatológicas de cada región<sup>3,4,5,6,7,18</sup>.

Por lo tanto, la mejor manera de elegir los alérgenos a utilizar es a través de la asesoría de médicos alergólogos locales, ya que los alérgenos involucrados en la enfermedad atópica en humanos son los mismos que afectan a los perros<sup>3,4,5,6,7,9,18</sup>.

Una vez que se ha hecho la selección de los alérgenos se debe determinar la concentración a utilizar<sup>4,5,6,7,18</sup>. Se considera como la concentración ideal aquella que no es irritante en perros sanos, y que al utilizarla en pacientes alérgicos da reacciones evidentes (formación de una roncha eritematosa)<sup>4,6,7,18,29</sup>.

A pesar de que la selección de los alérgenos es la misma que en humanos, las concentraciones utilizadas en ellos pueden ser irritantes en los perros<sup>4,6,7,11,14</sup>.

Debido a que los extractos alérgicos se venden expresados en diferentes unidades de potencia (ya que las técnicas para su elaboración no están estandarizadas), a que éstas unidades no son equiparables (pudiendo variar la potencia de un mismo alérgeno de una compañía a otra) y a que los extractos se pueden adquirir en forma individual o mezclada, la información que existe sobre la concentración a la cual se deben de utilizar es controvertida<sup>4,6,7,14</sup>.

Algunos estudios sugieren, cuando los extractos se obtienen expresados en UNP, utilizar la concentración de 1,000 UNP/ml para todos los alérgenos<sup>5,66,67</sup>, sin embargo, los resultados obtenidos en otros trabajos indican que esta concentración puede ser muy irritante para el caso de alérgenos de hongos mezclados, ambientales e insectos, por lo que la dilución requerida, para éstos, puede ser de 250 a 500 UNP/ml<sup>3,4,5,6,7,8,14,31,32,33,35,44,69,70,71</sup>. Estudios recientes han

demostrado que la concentración que se debe de utilizar para polvo de casa y dermatofagoides, varía de 25 a 50 UNP/ml<sup>14,33,44,70</sup>.

Lo mismo ocurre cuando se utilizan alergenios expresados en unidades de PV, algunos autores recomiendan utilizar la concentración de 1:1,000 PV para todos los alergenios<sup>3,31</sup>, mientras que otros opinan, que para el caso de hongos ambientales e insectos, ésta sea de 1:2,000 PV<sup>14,18,32,33,44,71</sup>. No obstante, se ha observado que para el polvo de casa y los ácaros del polvo la dilución debe ser mayor a 1:50,000 PV<sup>5,70</sup>.

Existen pocos estudios con extractos expresados en UN, sin embargo la mayoría de los veterinarios, en Europa, utilizan la concentración de 1,000 UN/ml<sup>4,29,68</sup>.

Con base en lo anterior, cuando los extractos alérgicos se van a utilizar por primera vez, se recomienda aplicar diferentes diluciones de un mismo alergenio a una muestra de perros sanos. La concentración se debe ajustar, de tal modo, que la frecuencia de reacciones positivas sea menor al 10%. En caso de que sea mayor o igual a este porcentaje, se considera que la dilución es irritante y que, por lo tanto, puede causar resultados falsos positivos en pacientes no alérgicos<sup>4,5,6,7,14,18</sup>.

## **1.6. Técnica e interpretación de las pruebas intradérmicas**

El sitio ideal para realizar la inoculación de los alergenios es la piel lateral del tórax, en algunos casos se puede utilizar la piel del abdomen, pero algunos autores han observado que esta zona presenta mayor reactividad<sup>4,5,6,7,8,14,18</sup>.

El área a utilizar se rasura con una cuchilla del número 40, se puede limpiar con una toalla húmeda, pero se debe evitar frotar y utilizar sustancias antisépticas debido a que ésto puede producir irritación en la piel afectando la interpretación de los resultados<sup>4,5,6,7,8,14,18</sup>.

Se aconseja tranquilizar o anestésicar al paciente si no permite la manipulación<sup>4,5,18</sup>, ya que la liberación de epinefrina y de glucocorticoides endógenos pueden provocar variaciones en los resultados<sup>1,72</sup>.

Los fármacos tranquilizantes y anestésicos que han probado no afectar la reacción de la piel a las pruebas intradérmicas son: xilacina, tiletamina-zolazepam, ketamina, barbitúricos de corta acción, halotane e isofluorane<sup>4,7,18,33,73,74,75,76</sup>.

El paciente se coloca en recumbencia lateral y se señalan las zonas de aplicación con un marcador de tinta permanente. La distancia que debe de existir entre cada sitio de inoculación es de 2 a 4 cm<sup>4,5,6,7,8,14,18</sup>.

Los testigos (negativo y positivo) y las diluciones de los extractos alérgicos se mantienen en refrigeración entre 4 y 8°C, y sólo se retiran 15 ó 30 minutos antes de aplicarlos con el fin de evitar incomodidad al inyectarlos fríos<sup>1,4,5,6,7,14,18</sup>.

Para la aplicación se utilizan jeringas de insulina, con una aguja calibre 26 ó 27 ga. Se debe utilizar una jeringa para cada alérgeno con el objeto de evitar la mezcla de los antígenos. No es necesario desechar las jeringas, al menos de que las agujas se contaminen o pierdan su filo<sup>4,5,6,7,8,14,18</sup>.

Al momento de cargar la jeringa se debe evitar la presencia de burbujas de aire, ya que la introducción de éstas dificulta la interpretación de la reacción<sup>1,4,5,6,7,8,14,18</sup>.

La introducción de la aguja en la piel se debe de hacer con el bisel dirigido hacia arriba manteniendo un ángulo aproximado de 45° hasta que el bisel quede totalmente cubierto. Mientras se introduce la jeringa se puede estirar la piel para facilitar la acción<sup>1,4,5,6,7,14,18</sup>.

Al inocular la solución se forma una ampola translúcida, si ésta no se aprecia, la inoculación fue muy profunda y se debe de aplicar en otra área. Asimismo, si se aprecia hemorragia o la introducción de burbujas de aire, la prueba se debe repetir<sup>1,4,5,6,7,14,18</sup>.

Antes de aplicar los alérgenos se evalúa la reactividad de la piel a los testigos. Se considera una reactividad adecuada a la histamina (testigo positivo) cuando se forma una roncha de 10 a 20 mm de diámetro a los 15 ó 30 minutos de la inyección, si esta reacción no existe, se debe de posponer la prueba, ya que, seguramente, la piel no va a responder a los alérgenos<sup>1,4,5,6,7,14,18</sup>.

Por otro lado, la ampolla formada por la inoculación del testigo negativo, debe de desaparecer a los 15 ó 30 minutos posinoculación, o en su defecto mantenerse del mismo tamaño, si por el contrario, se forma una roncha de un diámetro similar al del testigo positivo, indica que la piel es muy sensible (dermografismo) y que los resultados obtenidos serán poco confiables<sup>1,4,5,6,7,14,18</sup>.

La cantidad tanto de los testigos como de los alérgenos a inocular varía entre 0.01 y 0.1 ml. La mayoría de los médicos utilizan 0.05 ml<sup>1,4,5,6,7,14,18</sup>.

A pesar de que el diámetro de la roncha, al momento de la lectura, depende de la concentración a la cual los extractos alérgicos se están utilizando, el volumen inoculado también juega un papel importante en la reacción final<sup>1</sup>.

Por esta razón, se recomienda, con el fin de evitar la formación de ronchas demasiado grandes y, con ello, el riesgo de que puedan ser interpretadas como positivas, que la ampolla formada tras la inoculación de los testigos y de los extractos alérgicos mida de 2 a 4 mm de diámetro ("roncha mínima")<sup>1,3,5,8,14</sup>.

La mayoría de los autores concuerdan, que al igual que en humanos, la respuesta a la inoculación intradérmica de los extractos alérgicos, en perros, es dependiente del tiempo, por lo que recomiendan realizar la lectura a los 15 minutos<sup>1,3,4,5,6,7,9,14,32,33,35</sup>, mientras que otros sugieren que no hay diferencia si ésta se lleva a cabo a los 30 minutos<sup>8,11,18,31,66</sup>.

Existen varios criterios para interpretar los resultados de las pruebas intradérmicas<sup>1,4,5,6,7,8,14,18</sup>.

Si el médico está interesado únicamente en saber si el paciente presentó una reacción positiva se pueden comparar las ronchas provocadas por la

inoculación de los extractos alérgicos con las del testigo negativo o positivo<sup>4,5,6,7,8,14,18</sup>.

En el caso de utilizar el testigo negativo existen dos criterios de positividad. Uno considera que la roncha provocada por el extracto, a los 15 minutos de haberlo aplicado, debe ser por lo menos 3 mm mayor que la ampulla causada por la aplicación del testigo negativo. El otro criterio establece que la reacción debe ser mayor a 5 mm. Si se utiliza al testigo positivo, la roncha debe ser mayor o igual a éste para considerarla positiva<sup>4,5,6,7,8,14,18</sup>.

Si se está interesado en saber la intensidad de la reacción se utiliza una escala de 0 a 4 cruces, donde 0 corresponde a una roncha con un diámetro menor a 5 mm, 1 cuando la roncha mide 5 mm de diámetro, 2 cuando el diámetro es de 10 mm, 3 corresponde a 15 mm, y 4 a 20 mm. Las reacciones que se consideran de importancia diagnóstica son a partir de 2 cruces<sup>1,4,5,6,7,8,14,18</sup>.

Asimismo, las ronchas se evalúan en forma subjetiva a través del eritema y la induración, considerando que entre mayor sea su manifestación la reacción es más positiva<sup>1,4,5,6,7,8,14,18</sup>.

Algunas ronchas pueden manifestar pseudópodos, la mayoría de los autores consideran que éste es un signo altamente sugerente de positividad, sin embargo, a diferencia del humano, los perros raramente los desarrollan<sup>4,5,6,7,8,14,18</sup>.

### **1.7. Situación Actual de las Pruebas Intradérmicas en Medicina Veterinaria en México**

En México las pruebas intradérmicas no son utilizadas en medicina veterinaria, aún cuando existen compañías que producen los alérgenos para llevarlas a cabo.

El Hospital Veterinario para Pequeñas Especies de la F.M.V.Z.-U.N.A.M. recibe alrededor de 10,500 casos al año, de estos, del 40 al 50% son presentados por algún problema de tipo dermatológico, y se considera, que aproximadamente el 50% de estos pacientes sufren de alguna afección alérgica.

Entre las alergias más comunes se encuentran, en orden de importancia, la hipersensibilidad a la saliva de pulga, dermatitis atópica, hipersensibilidad alimentaria e hipersensibilidad por contacto<sup>4,6,7,14,17,18,33</sup>.

De estos procesos alérgicos el único que requiere de tratamiento con fármacos antipruríticos a largo plazo es la dermatitis atópica. Las otras formas de hipersensibilidad se controlan eliminando al agente causal<sup>4,6,7,14,17,18,33</sup>.

Desafortunadamente, los signos clínicos de atopia, hipersensibilidad alimentaria y por contacto pueden ser los mismos (prurito en las zonas ventrales del cuerpo)<sup>4,6,14,17,18,33</sup>, por lo que a pesar de que atopia ocupa el segundo lugar en importancia, su diagnóstico, en México, se lleva a cabo descartando los otros procesos alérgicos.

Lo anterior ocasiona que el diagnóstico de atopia sea un proceso tardado, ya que los pacientes tienen que pasar por una etapa de aislamiento que dura 15 días y la administración de una dieta hipoalérgica durante un período de 3 meses, con el fin de eliminar la posibilidad de hipersensibilidad por contacto y alimentaria respectivamente.

En el mejor de los casos, cuando los propietarios siguen las indicaciones en forma adecuada, el diagnóstico de atopia se establece en 3 meses y medio. Sin embargo, en muchos casos existen errores en el procedimiento diagnóstico, requiriendo períodos que fluctúan entre los 8 y 12 meses.

Así pues, el principal inconveniente de esta forma de diagnóstico es que los propietarios se desesperan, ocasionando que el diagnóstico quede inconcluso o que el paciente reciba terapia antiprurítica innecesaria.

En los Estados Unidos de Norte América y en varios países de Europa las pruebas intradérmicas se han utilizado, en perros, durante los últimos 25 años para el diagnóstico de atopia<sup>4,18,26,27,33,34</sup>.

La ventaja de realizar estas pruebas es que el diagnóstico se puede establecer en 30 minutos, evitando la pérdida de tiempo al aislar y administrar dietas hipoalérgicas en pacientes que no requieren de este manejo.



Además, con los resultados obtenidos se puede identificar y retirar el alérgeno causal, u optar por otras alternativas terapéuticas como la hiposensibilización, con lo que se reducirá el número de pacientes que reciben fármacos antipruríticos, especialmente glucocorticoides.

Es importante destacar que la dermatitis atópica que afecta tanto a humanos como a perros comparte ciertas características como:

- a) Una alta frecuencia<sup>34,77</sup>.
- b) Predisposición racial y familiar, lo cual indica bases hereditarias<sup>4,7,18,19,77</sup>.
- c) La enfermedad es ocasionada por la exposición a alérgenos ambientales<sup>3,4,7,9,14,18</sup>.
- d) Variaciones regionales y estacionales relacionadas con la presencia de los alérgenos<sup>3,4,5,7,9,18,78,79</sup>.
- e) Resultados positivos a las pruebas intradérmicas a uno o más alérgenos<sup>4,6,7,34</sup>.
- f) Incremento en el número de células cebadas, linfocitos e histiocitos en la piel<sup>20,80,81</sup>.
- g) El prurito es el signo principal<sup>4,12,77,78,79</sup>.
- h) Alta predisposición a padecer piodermas recurrentes<sup>7</sup>.

Debido a las similitudes que existen entre la dermatitis atópica de humanos y perros, la implementación de las pruebas intradérmicas no sólo beneficiará a los perros que la presenten, sino que será el inicio de futuras líneas de investigación, en las cuales, el perro puede ser utilizado como modelo experimental para beneficio de pacientes humanos que sufran de esta alteración.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General:**

Determinar la concentración de los extractos alergénicos a utilizar para el diagnóstico de dermatitis atópica en perros de la Ciudad de México.

### **Objetivos Específicos:**

1. Determinar la concentración de los extractos alergénicos que no es irritante en perros clínicamente sanos.
2. Determinar las variaciones en el tamaño de las reacciones provocadas por la inoculación intradérmica de la solución de Evans (testigo negativo), histamina a una concentración 1:100,000 P/V (testigo positivo) y las diferentes diluciones de extractos alergénicos a diferentes tiempos de medición (15 y 30 minutos).
3. Identificar los hallazgos histopatológicos, en perros clínicamente sanos, en los sitios de aplicación de los testigos (negativo y positivo) y las diluciones de los diferentes grupos de extractos alergénicos recomendadas para el diagnóstico de atopia a los 30 minutos.
4. Identificar los hallazgos histopatológicos de las reacciones positivas a los 30 minutos posinoculación del alérgeno.
5. Comparar las variaciones de los hallazgos histopatológicos.

## **HIPÓTESIS**

### **Hipótesis:**

La concentración de los extractos alergénicos que se debe utilizar para el diagnóstico de dermatitis atópica es para pólenes 1:1,000 P/V y para hongos, ambientales e insectos 1:2,000 P/V.

## **Capítulo 2.- MATERIAL Y MÉTODOS**

### **2.1. Lugar donde se realizó el estudio**

El estudio se llevó a cabo en la Ciudad de México en las instalaciones del Bioterio del Departamento de Cirugía Experimental del Hospital Regional 20 de Noviembre ISSSTE, Sección de Patología Clínica del Hospital Regional 20 de Noviembre ISSSTE, Hospital General de la Secretaria de Salud y laboratorio de Patología Clínica Experto.

### **2.2. Testigos (negativo y positivo) y Alergenos**

Se obtuvieron viales de 10 ml de Solución de Evans (salina con fenol al 0.4%)<sup>1</sup>, fosfato de histamina a una concentración de 1:1,000 PV<sup>1</sup> y 30 alergenos aéreos a una concentración 1:100 PV<sup>1</sup> (Anexo1).

La selección de los alergenos se tomó de los extractos alergénicos utilizados en el Servicio de Alergia e Inmunología Clínica del Hospital Regional Adolfo López Mateos ISSSTE.

La solución de Evans se utilizó como testigo negativo y para elaborar las diluciones tanto de la histamina como de los extractos alergénicos.

El fosfato de histamina se diluyó para obtener una concentración de 1:10,000 PV (Anexo 2).

Se realizaron seis diluciones de cada alergeno obteniendo las siguientes concentraciones: 1:500, 1:1,000, 1:1,500, 1:2,000, 1:2,500 y 1:3,000 PV (Anexo 2).

La solución de Evans, la histamina y las diluciones de los extractos alergénicos se mantuvieron en refrigeración a 4°C, retirándolas del refrigerador 15 minutos antes de ser aplicadas en los perros.

---

<sup>1</sup> Laboratorios APHI de México

### **2.3. Perros utilizados en el estudio**

Se seleccionaron en forma aleatoria 30 perros, en su mayoría mestizos, del Bioterio del Departamento de Cirugía Experimental del Hospital Regional 20 de Noviembre ISSSTE que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión.

1. Perros machos y hembras entre 1 y 10 años de edad. La edad se determinó por dentición.
2. Hembras que no presentaran estro, gestación o pseudociesis.
3. Perros clínicamente sanos, lo cual se determinó por examen físico y pruebas de laboratorio rutinarias (hemograma, perfil bioquímico completo y examen general de orina). Las pruebas de laboratorio se realizaron en la Sección de Patología Clínica del Hospital Regional 20 de Noviembre ISSSTE.

### **2.4. Realización de la técnica e interpretación**

1. A los perros seleccionados se les rasuró un área de 34 por 18 cm en ambas zonas paracostales utilizando máquina eléctrica con cuchilla del número 40 una hora antes de la inoculación de los alérgenos.
2. Los perros se canalizaron con solución Hartman vía vena cefálica utilizando un catéter endovenoso calibre 22 ga. por 1 pulgada, administrando volumen de mantenimiento (40 ml/kg/hr) durante todo el procedimiento.
3. Los perros fueron anestesiados con pentobarbital sódico<sup>2</sup> a dosis de 26 mg/kg vía endovenosa.
4. Con un marcador de tinta permanente se señalaron las zonas de inyección del testigo positivo, testigo negativo y de las diferentes diluciones de los extractos, dejando un espacio de 2 cm entre cada zona de aplicación.
5. Antes de aplicar las diluciones de los extractos alérgicos se inyectó vía intradérmica, tanto en la zona paracostal derecha como izquierda, 0.02 ml del testigo negativo y positivo realizándose la lectura de la reacción a los 15 y 30

---

<sup>2</sup> Laboratorios Ttokkyo de México

minutos. Para la inoculación se utilizaron jeringas de insulina calibre 27 ga. por  $\frac{1}{2}$  pulgada y para la medición un vernier. La medición se realizó por la misma persona.

6. Se estableció que se excluirían del estudio los perros que no presentaran reactividad de la piel al testigo positivo o que manifestaran reactividad al testigo negativo. Se consideró como falta de reactividad a la histamina (testigo positivo) cuando la roncha formada midió menos de 10 mm después de 15 minutos de la aplicación, y como reactividad a la solución de Evans (testigo negativo) cuando la reacción midió igual o más que el testigo positivo a los 15 minutos.
7. Posteriormente se inocularon, en la zona paracostal derecha las 6 diluciones de 15 alergenos y en la zona paracostal izquierda las 6 diluciones de los 15 alergenos restantes. El orden de la aplicación de los alergenos se realizó de la misma manera en todos los perros (Anexo 3).
8. El volumen inoculado y las características de las jeringas fueron igual que en los testigos. Se usaron jeringas diferentes para cada una de las diluciones inoculadas.
9. Se realizó la medición del diámetro mayor de las ronchas a los 15 y 30 minutos de aplicación utilizando un vernier. Estos datos se concentraron en una hoja de registro. La medición se realizó por la misma persona.
10. Se contó con equipo rojo (difenhidramina<sup>3</sup> y adrenalina acuosa 1:10,000<sup>4</sup>) con el fin de tratar a los pacientes que presentaran choque anafiláctico.
11. Se consideró como reacción positiva a cualquier roncha cuyo diámetro mayor a los 15 minutos fue mayor o igual al testigo positivo o que tuviera signos evidentes de eritema y turgencia.

---

<sup>3</sup> Laboratorios Bayer de México

<sup>4</sup> Laboratorios Brovel de México

## **2.5. Biopsias**

Después de realizar las mediciones de los 30 minutos se tomaron 3 biopsias de piel de cada perro para examen histopatológico de las siguientes zonas: testigo negativo, testigo positivo y una biopsia de las ronchas, seleccionada en forma aleatoria de la dilución alérgica recomendada para el diagnóstico de atopia (1:1,000 P/V para pólenes y 1:2,000 P/V para hongos, ambientales e insectos) abarcando la totalidad de los alérgenos utilizados en el estudio (Anexo 4).

Además se tomaron algunas biopsias en aquellos perros que presentaron reacciones clínicamente positivas a la dilución recomendada para el diagnóstico de atopia.

Las zonas de biopsia se suturaron con puntos simples separados utilizando nylon monofilamento 2-0 y las muestras se colocaron sobre una base de cartón para posteriormente fijarlas en formalina al 10% amortiguada a un pH 7.2-7.4.

Las muestras se procesaron por las técnicas histológicas de rutina tiñéndolas con hematoxilina-eosina (H-E). El procesamiento de las muestras se realizó en el Hospital General de la Secretaría de Salud.

## **2.6. Análisis histopatológico**

Los cortes histológicos se revisaron con microscopio fotónico utilizando oculares 10X de campo amplio y objetivos 10X y 40X.

Se evaluó la dermis superficial por la presencia de edema, fragmentación de fibras de colágena, tipo y cantidad de células inflamatorias presentes y exocitosis.

Para la evaluación se revisaron 12 campos de cada muestra sin incluir los extremos, zonas de hemorragia o áreas con artificios. Asimismo, se evitó que los campos de conteo y evaluación se empalmaran, para lo cual se dejó un campo libre pasando al siguiente.

El edema se clasificó como abundante, moderado y leve. Se consideró abundante cuando éste se presentó en todos los campos revisados, moderado cuando se observó en 3 ó 4 campos y leve en menos de 3 campos.

La fragmentación de las fibras de colágena también fue clasificada como abundante, moderada y leve, siguiendo el mismo criterio utilizado para el edema.

En cada muestra se contaron un total de 100 células inflamatorias (mastocitos, polimorfonucleares y mononucleares). La cantidad de células inflamatorias presentes se clasificó como abundante, moderada y leve. Se consideró una celularidad abundante cuando el conteo se realizó abarcando 5 campos, moderada cuando se necesitó revisar de 6 a 8 campos y leve cuando se ocuparon más de 8 campos.

Los datos obtenidos se concentraron en una hoja de registro.

## 2.7. Análisis estadístico

Para llevar a cabo el análisis estadístico, se utilizó el programa Minitab.TM.

Las reacciones clínicamente positivas a los 15 minutos posinoculación de las diferentes diluciones de extractos alérgicos y los hallazgos histopatológicos en los sitios de inoculación después de 30 minutos de la aplicación del testigo negativo, el testigo positivo, las diluciones de alérgenos recomendadas para el diagnóstico de atopía y en las ronchas clínicamente positivas fueron descritos a través de frecuencias y promedios<sup>83,84,85,86,87</sup>.

El comportamiento de las diferentes diluciones a los 15 minutos posinoculación de los extractos alérgicos se determinó por análisis de varianza, donde la hipótesis alterna ( $H_a$ ) fue  $\mu_j \neq \mu_k$  y la hipótesis nula  $\mu_j = \mu_k$ . Se fijó una significancia de 0.05 y la regla de decisión fue si  $F$  calculada es mayor o igual a  $F$  tabulada ( $F_c \geq F_t$ ) se rechaza la  $H_0$ <sup>83,84,85,86,87</sup>.

Para determinar si existía diferencia en el tamaño de las reacciones a los 15 y 30 minutos posinoculación del testigo negativo, el testigo positivo y las diferentes diluciones de extractos alérgicos, y saber si existían diferencias en



los hallazgos histopatológicos entre los testigos (negativo y positivo), los diferentes grupos de extractos alergénicos y las ronchas clínicamente positivas se utilizó la prueba de t apareada, donde la  $H_a$  fue  $\mu_1 \neq \mu_2$  y la  $H_0$   $\mu_1 = \mu_2$ . Se fijó una significancia de 0.05 y la regla de decisión fue si t calculada es mayor o igual a t tabulada ( $t_c \geq t_t$ ) se rechaza la  $H_0$ <sup>83,84,85,86,87</sup>.

### Capítulo 3.- RESULTADOS

De los 30 extractos alergénicos utilizados en este estudio 19 no provocaron ronchas clínicamente positivas a ninguna dilución a los 15 minutos de su inoculación, y en 11 éstas se observaron a diferentes diluciones, sumando un total de 63 reacciones positivas (Cuadro 3.1).

Los extractos alergénicos que causaron reacciones positivas en el 10% o más de los perros inoculados fueron cucaracha y hormiga. En el caso de cucaracha estas diluciones fueron: 1:500 (13%), 1:1,000 (10%) y 1:1,500 (10%), y con el extracto de hormiga 1:500 (16.6%), 1:1,000 (16.6%), 1:1,500 (13.3%), 1:2,000 (13%) y 1:2,500 (10%).

Dos perros presentaron ronchas con pseudópodos, uno fue con *Mucorinea* a las diluciones 1:500, 1:1,000, 1:1,500 y 1:2,000, y otro con hormiga a las diluciones 1:500, 1:1,000 y 1:1,500 (Figura 3.1).

Ninguno de los perros utilizados presentó dermografismo, "llamarada eritematosa" ni choque anafiláctico.

En este estudio se observó que las diluciones de los diferentes extractos alergénicos que provocan reacciones estadísticamente similares a las recomendadas para el diagnóstico de atopia son: para pólenes (1:500 y 1:1,500), hongos (1:1,500) y ambientales (1:1,000 y 1:1,500) ( $p > 0.05$ ).

En el caso de insectos, debido a los porcentajes de positividad de cucaracha y hormiga, se analizaron por separado las diluciones de pulga y mosquito encontrando variaciones estadísticamente significativas entre estas ( $p \leq 0.05$ ).

Las mediciones de las reacciones a los 15 y 30 minutos posinoculación del testigo negativo, el testigo positivo y las diferentes diluciones de los extractos alergénicos se encuentran en los Anexos 5 al 13.

**Cuadro 3.1. Reacciones positivas a los 15 minutos posinoculación intradérmica de las diferentes diluciones de los alérgenos.**

<b>Alergeno</b>	<b>No. Perro</b>	<b>Dilución</b>	<b>No. Positivos</b>	<b>%</b>
<b>Pólenes</b>				
<i>Pirúl (Schinus molle)</i>	16	1:500	1	3.3
	16	1:1,000	1	3.3
	16	1:1,500	1	3.3
<b>Hongos</b>				
<i>Alternaria alternata</i>	25	1:500	1	3.3
	25	1:1,000	1	3.3
	25	1:1,500	1	3.3
	25	1:2,000	1	3.3
	25	1:2,500	1	3.3
	25	1:3,000	1	3.3
<i>Mucorinea</i>	25	1:500	1	3.3
	25	1:1,000	1	3.3
	25	1:1,500	1	3.3
	25	1:2,000	1	3.3
	25	1:2,500	1	3.3
	25	1:3,000	1	3.3
<i>Penicillium expansum</i>	25	1:500	1	3.3
	25	1:1,000	1	3.3
	25	1:1,500	1	3.3
	25	1:2,000	1	3.3
	25	1:2,500	1	3.3
	25	1:3,000	1	3.3
<b>Ambientales</b>				
Gato	22	1:500	1	3.3
Perro	22	1:500	1	3.3
Plumas	22	1:500	1	3.3
<i>Dermatophagoides farinae</i>	22	1:500	1	3.3
Algodón	25	1:500	1	3.3
	25	1:1,000	1	3.3
<b>Insectos</b>				
<i>Cucaracha (Periplaneta americana)</i>	16,19,25,27	1:500	4	13
	16,19,27	1:1,000	3	10
	16,19,27	1:1,500	3	10
	16,27	1:2,000	2	6.6
	16,27	1:2,500	2	6.6
	27	1:3,000	1	3.3
<i>Hormiga (Formica spp)</i>	2,16,19,25,27	1:500	5	16.6
	2,16,19,25,27	1:1,000	5	16.6
	2,16,19,25	1:1,500	4	13.3
	2,16,19,25	1:2,000	4	13.3
	2,16,19	1:2,500	3	10

El promedio de las reacciones a los 15 minutos posinoculación del testigo positivo fue de 10.5 mm, y del testigo negativo 3.9 mm (Figura 3.2.). En este estudio no existió diferencia estadísticamente significativa en el tamaño de las reacciones a los 15 y 30 minutos posinoculación de los testigos negativo y positivo ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, en los extractos alergénicos si se observó diferencia significativa, siendo el promedio de las ronchas menor a los 30 minutos ( $p \leq 0.05$ ).

Los hallazgos histopatológicos en los sitios de aplicación analizados después de 30 minutos de la inoculación del testigo negativo, el testigo positivo, las diluciones recomendadas para el diagnóstico de atopia y en las ronchas clínicamente positivas comprendieron: edema, fragmentación de fibras de colágena, infiltración de células inflamatorias (principalmente mastocitos y eosinófilos) y exocitosis (Anexos 14 al 20) (Figuras 3.3 a 3.6).

Los porcentajes de las reacciones de cada grupo que presentaron edema, fragmentación de fibras de colágena y exocitosis, y los promedios de las células inflamatorias, así como la cantidad de éstas, se encuentran en el Cuadro 3.2.

En las ronchas causadas por la inoculación del testigo positivo y en las clínicamente positivas se observó que el edema y el número de polimorfonucleares fue mayor que cuando se inocularon el testigo negativo y los diferentes grupos de extractos alergénicos ( $p \leq 0.05$ ).

Por otro lado, el sitio de inoculación del testigo positivo presentó mayor fragmentación de fibras de colágena y exocitosis que el del testigo negativo, los extractos alergénicos y en las ronchas clínicamente positivas ( $p \leq 0.05$ ).

El promedio de mastocitos fue mayor en los sitios de inoculación del testigo negativo y de los extractos alergénicos que en los del testigo positivo y en las ronchas clínicamente positivas ( $p \leq 0.05$ ).

La inoculación del testigo negativo provocó un promedio mayor de mononucleares en comparación con el testigo positivo ( $p \leq 0.05$ ), sin embargo, no



**Figura 3.1.** Reacciones a los 15 minutos posinoculación intradérmica de los testigos y las diferentes diluciones de *Mucorinea*. De izquierda a derecha: testigo negativo, testigo positivo, *Mucorinea* 1:500, 1:1,000, 1:1,500, 1:2,000, 1:2,500 y 1:3,000. Presencia de pseudópodos a las diluciones 1:500, 1:1,000, 1:1,500 y 1:2,000.



**Figura 3.2.** Reacciones a los 15 minutos posinoculación intradérmica del testigo negativo (0 mm) y positivo (11 mm).



**Figura 3.3.**  
Edema abundante con fragmentación de fibras de colágena y presencia de mastocitos (flechas) en la dermis superficial (H.E.) (400X).



**Figura 3.4.**  
Infiltrado de polimorfonucleares, principalmente eosinófilos (flechas), en la dermis superficial (H.E.) (400X).

**Figura 3.5.**  
Infiltrado de mastocitos y polimorfonucleares,  
principalmente eosinófilos (flechas), en la  
dermis superficial (H.E.) (400X).



**Figura 3.6.**  
Exocitosis focal de polimorfonucleares y  
mononucleares (flecha) (H.E.) (400X).



**Cuadro 3.2. Hallazgos histopatológicos a los 30 minutos en testigo negativo, testigo positivo, extractos alergénicos y reacciones positivas.**

Hallazgo	T (+) n-30	T (-) n-30	Pólenes n-12	Hongos n-6	Ambientales n-5	Insectos n-4	Positivos n-11
Edema A (%)	40	13.3	16.6	0	25	0	27.2
Edema M (%)	56.7	33.3	25	6.6	37.5	25	72
Edema L (%)	3.3	50	50	66	37.5	75	0
Frag. Colag. A (%)	0	0	0	0	0	0	0
Frag. Colag. M (%)	23.3	6.6	8.3	0	12.5	0	0
Frag. Colag. L (%)	53.3	30	33.3	50	25	0	63.6
Mastocitos (Prom)	47.1	56.6	58.3	44	40.1	64.7	41.6
PMN (Prom)	45	31	27.2	48	44.6	25.5	47.2
Mononucleares (Prom)	7.9	12.6	15.2	8.2	15.1	9.7	11.2
Exocitosis A (%)	0	0	0	0	0	0	0
Exocitosis M (%)	16.6	0	0	16.6	12.5	0	0
Exocitosis L (%)	0	0	0	0	12.5	0	9
Celularidad A (%)	53.3	43.3	41.6	50	50	0	63.6
Celularidad M (%)	40	33.3	50	50	25	50	36.3
Celularidad L (%)	6.7	2.3	8.3	0	25	50	0

A (Abundante); M (Moderado); L (Leve); Frag. Colag. (Fragmentación de fibras de colágena); PMN (Polimorfonucleares); Prom (Promedio).



existió diferencia estadísticamente significativa entre los testigos, los extractos alergénicos y las ronchas clínicamente positivas ( $p > 0.05$ ).

En la celularidad presentada por la aplicación del testigo negativo, el testigo positivo, los extractos de pólenes, hongos y ambientales y en las ronchas clínicamente positivas no existió diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ).

Las zonas de inoculación de los extractos de insectos presentaron menor fragmentación de fibras de colágena y cantidad de células inflamatorias que los testigos, los extractos de pólenes, hongos y ambientales y en las ronchas clínicamente positivas ( $p \leq 0.05$ ).

## Capítulo 4.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las pruebas intradérmicas confirman el diagnóstico de dermatitis atópica en perros<sup>4,6,18,27,29,30,31,32</sup>. Cuando los extractos alergénicos se van a utilizar por primera vez, con fines diagnósticos, es necesario determinar la concentración a la cual se deben de emplear, ya que, si están muy concentrados se pueden obtener resultados falsos positivos<sup>4,5,6,7,18,35</sup>.

Considerando que los perros sanos no responden a la inoculación de los alergenos, salvo que éstos sean irritantes, el criterio que se toma para conocer la dilución a utilizar, es que ésta no provoque reacciones positivas en una muestra de ellos. En caso de que la cantidad de respuestas positivas sea mayor o igual al 10% se considera que la dilución es irritante y, por consiguiente, los resultados obtenidos en pacientes sospechosos de alergia no serán confiables<sup>4,5,6,7,18,29,44</sup>.

En estudios previos, Willemse y Van den Brom<sup>29</sup> y August<sup>44</sup> encontraron que la dilución de los extractos de mezclas de pólenes, recomendada para el diagnóstico de atopia (1,000 UN/ml y 1,000 UNP/ml), provocó un alto porcentaje de reacciones positivas en perros clínicamente sanos. Asimismo, August<sup>44</sup> observó un alto porcentaje de positividad cuando utilizó mezclas de hongos e insectos a las concentraciones recomendadas (1,000 UNP/ml). Sin embargo, los extractos ambientales que probó, a excepción de polvo de casa, lana y seda, no provocaron ronchas clínicamente positivas a esta dilución, y en algunos casos, éstas se observaron en menos del 10% de los perros utilizados.

Por otro lado, algunos autores han encontrado un número elevado de reacciones positivas a los extractos de *Dermatophagoides farinae* y *D. pteronyssinus*<sup>4,29,33,44,70</sup>.

En este estudio la mayoría de los extractos de pólenes, hongos y ambientales no causaron reacciones positivas a las diluciones recomendadas para el diagnóstico (1:1,000 P/V para pólenes y 1:2,000 P/V para hongos y ambientales), un perro las manifestó con el extracto de pirúl y otro con los de

*Alternaria alternata* , *Mucorinea* y *Penicillium expansum*, por lo que, para estos alérgenos, la positividad fue menor del 10%.

A concentraciones mayores a las que la literatura recomienda, para el diagnóstico de atopia, el perro que presentó positividad para los extractos de hongos también respondió a algodón a las diluciones 1:500 y 1:1,000, y otro reaccionó a los extractos de gato, perro, plumas y *Dermatophagoides farinae* a la dilución 1:500, de este modo, las reacciones positivas, para estas concentraciones, también fueron menores al 10% .

Estos resultados concuerdan con las observaciones realizadas por Anderson<sup>5</sup> y DeBoer<sup>66</sup>, quienes indican que los extractos de pólenes, hongos (cuando son utilizados en forma individual) y ambientales no producen irritación, por lo que las reacciones positivas son las más específicas y de alto significado clínico. Por lo tanto, es probable que el perro que presentó reacciones al extracto de pirúl y el que reaccionó a los de hongos eran alérgicos aún cuando no manifestaban signos clínicos de enfermedad.

Lo anterior se puede deber a que ciertos individuos alérgicos pueden presentar signos en forma estacional, o bien, pueden manifestar mejoría clínica cuando son trasladados a otra zona al no estar en contacto con el alérgeno<sup>3,4,5,6,7,8,9,14,15,16,17,18,26,27,33,34</sup>.

Se sabe que las concentraciones más altas de pólenes se encuentran en el exterior de las casas durante la primavera<sup>4,5,6,32,45</sup>. Los perros utilizados en el estudio habían permanecido dentro de las instalaciones del bioterio durante 4 meses y el trabajo se llevó a cabo en el otoño, por lo tanto, la probabilidad de que el perro que respondió a pirúl tuviera contacto con el alérgeno era baja.

Lo mismo pudo ocurrir con el perro que respondió a *Alternaria*, ya que este hongo se localiza principalmente en el exterior de las casas y sus esporas se encuentran en mayor cantidad en el verano<sup>4,5,6,32,45</sup>.

Por otro lado, aún cuando las concentraciones de esporas de *Mucorinea* y *Penicillium* son mayores en el interior de las casas, se ha visto que sus niveles en

el aire tienden a ser bajos<sup>4,45</sup>, por lo que es probable que la cantidad de esporas en el ambiente no haya sido lo suficientemente abundante como para desencadenar la presentación de los signos clínicos.

Las respuestas positivas observadas en el perro que reaccionó al algodón y en el que respondió a los epidérmicos y al ácaro del polvo pudo ser de tipo irritativa, ya que únicamente se presentaron a las concentraciones más altas (1:500 P/V).

Anderson<sup>5</sup> observó que los extractos de alergenios epidérmicos por lo general no causan irritación. No obstante, Willemse y Van den Brom<sup>78</sup> y Scott<sup>79</sup>, encontraron algunos resultados positivos frente a la caspa de animales, pero no pudieron determinar si estas reacciones eran el resultado de una reactividad cruzada antigénica en perros alérgicos o de un bajo umbral irritativo en la piel, por lo que el significado de una reacción positiva, a estos extractos, es incierto cuando no se tiene historia de exposición a ellos.

Se ha considerado que los extractos más irritantes son los de lana, polvo de casa y ácaros del polvo<sup>7,14,33,44,66,70</sup>. Anderson<sup>5</sup> observó que la capacidad irritativa de estos extractos varía ampliamente dependiendo de la compañía que los produzca, por lo que es posible que los extractos, de estos alergenios, utilizados en este estudio hayan tenido una concentración menor a los empleados en otros trabajos.

Por otro lado, en este estudio se observó que aún cuando los extractos de pulga y mosquito no causaron reacciones positivas, a la dilución recomendada (1:2,000 PV), con el extracto de hormiga éstas se detectaron en el 13.3% de los perros inoculados y con el de cucaracha en el 6.6%.

Las reacciones positivas al extracto de hormiga, que se presentaron en este estudio, pudieron ser causadas por un proceso irritativo o alérgico. En el estudio realizado por August<sup>44</sup> las reacciones de positividad observadas con el extracto de mezclas de insectos fueron relacionadas a la fracción de hormiga,

considerando que ésta era altamente irritante, sin embargo, ésto no pudo ser comprobado.

En humanos los antígenos de cucaracha son causa importante de alergias en todo el mundo<sup>4,45</sup>. En un estudio Nesbit<sup>17</sup> encontró que el 60% de los perros urbanos responden a los antígenos de este insecto, pero debido a que el significado de este hallazgo no se pudo determinar, es probable, que los perros de este trabajo que respondieron al extracto de cucaracha, cursaran con un proceso irritante o alérgico. Por tal motivo, la concentración y la importancia de los alergenos de hormiga y cucaracha en la patogenia de la dermatitis atópica se tendrá que evaluar en la práctica.

A pesar de que las respuestas positivas observadas en este trabajo fueron menores a las obtenidas en trabajos previos, los resultados no se pueden comparar. Esto se debe a que los otros autores utilizaron alergenos manufacturados por otras compañías cuya potencia estaba expresada en otras unidades (UN y UNP) y que en algunos casos eran mezclas de alergenos.

Aún cuando los resultados no pueden ser comparados, existió un factor que pudo estar asociado con el bajo porcentaje de positividad observado en este estudio. Este factor fue el volumen inoculado, ya que se ha visto que las reacciones pueden ser interpretadas como positivas si la ampula formada por la simple inyección de los alergenos es mayor a 4 mm de diámetro<sup>1,3,5,8,14</sup>.

En los estudios de Willemse y Van den Brom<sup>29</sup> y August<sup>44</sup> la cantidad inoculada, tanto de los testigos como de las diferentes diluciones de los extractos alérgicos, fue de 0.05 ml. En este trabajo el volumen fue de 0.02 ml. La razón para aplicar este volumen se debió a que cuando se inyectaron 0.05 ml el diámetro inicial de las ampulas del testigo negativo, del testigo positivo y de los extractos, fue mayor a 6 mm, alcanzando en ocasiones los 8 mm. Al disminuir el volumen se obtuvieron diámetros iniciales entre los 3 y 4 mm. Cabe señalar que los perros que recibieron 0.05 ml (10 en total) fueron excluidos de esta investigación.

Por otro lado, aún cuando el criterio de positividad fue diferente al utilizado en los otros trabajos, las reacciones que fueron consideradas como negativas, en este estudio, también lo fueron cuando se utilizó el criterio de positividad empleado por los otros autores, por lo que es probable que en sus estudios, las ámpulas iniciales fueran mayores a 4 mm de diámetro, y que, por lo tanto, un número elevado de ellas fueran consideradas positivas.

En la presente investigación ninguno de los perros utilizados presentaron dermatografismo, "llamada eritematosa" ni reacciones anafilácticas y únicamente dos manifestaron pseudópodos, uno con *Mucorinea* y otro con hormiga. Lo anterior concuerda con lo mencionado en la literatura donde se establece que estas reacciones son raras en perros, y a pesar de que la formación de pseudópodos en humanos se ha relacionado a una respuesta alérgica, en perros no necesariamente indican positividad<sup>1,3,4,5,6,7,17,18</sup>.

Como se mencionó anteriormente, se considera que una dilución de extractos alérgicos que produce reacciones positivas en el 10% o más de perros clínicamente sanos es irritante y, de este modo, puede ocasionar falsos positivos cuando se utiliza para el diagnóstico de los procesos alérgicos.

Con base en lo anterior, es fácil suponer que cualquier dilución que provoque menos de este porcentaje de positividad puede ser utilizada con fines diagnósticos. Sin embargo, se ha visto que si el extracto se encuentra muy diluido se pueden obtener resultados falsos negativos<sup>1,4,7,17,18</sup>.

Por esta razón, en este estudio se realizaron análisis de varianza para conocer el comportamiento de las diferentes diluciones.

Debido a que los extractos de pólenes, hongos y ambientales no provocaron reacciones positivas importantes, se asume que la dilución recomendada en la literatura para el diagnóstico de atopia puede ser utilizada en perros de la Ciudad de México.

Sin embargo, se observó que en el caso de los extractos de pólenes y ambientales si se utilizan diluciones menores a 1:1,500 el tamaño de la roncha

disminuye en forma significativa, en hongos, ésto ocurre con diluciones menores de 1:2,000, por consiguiente, estas diluciones podrían ocasionar resultados falsos negativos.

Los extractos de pulga y mosquito presentaron variaciones importantes en el tamaño de la roncha a las diferentes diluciones, por lo que se recomienda utilizar la dilución 1:2,000.

Los extractos de cucaracha y hormiga deberán de ser evaluados nuevamente con el fin de saber si las reacciones positivas estuvieron asociadas a irritación o a alergia, pero para el extracto de cucaracha posiblemente se puede utilizar la dilución 1:2,000, y para el de hormiga 1:3,000.

Por otro lado, aún cuando la mayoría de los alergólogos recomiendan realizar la lectura de las pruebas intradérmicas a los 15 minutos, algunos autores sugieren que no hay diferencia si ésta se lleva a cabo a los 30 minutos<sup>8,11,18,31,66</sup>.

A pesar de que en esta investigación no se detectó diferencia significativa entre la medición a los 15 y 30 minutos de la aplicación del testigo negativo y el testigo positivo, en los extractos alérgicos el tamaño de la reacción fue menor a los 30 minutos. Así pues, los resultados de este estudio sugieren que la reacción cutánea a la inyección de los alérgenos, al igual que en humanos, es dependiente del tiempo, por lo que se recomienda realizar la medición a los 15 minutos.

Por otra parte, diferentes estudios en humanos y perros alérgicos han demostrado que las reacciones positivas a las pruebas intradérmicas presentan cambios asociados a la respuesta inflamatoria aguda que incluyen extravasación de plasma y presencia de células inflamatorias (mastocitos y polimorfonucleares)<sup>1,11,20,40,41</sup>.

Los hallazgos histopatológicos, encontrados en esta investigación, en los sitios de aplicación de los testigos (negativo y positivo), de los extractos alérgicos que no provocaron reacciones positivas y de las ronchas clínicamente positivas, no difieren de los descritos en las ronchas clínicamente positivas de los pacientes atópicos. Sin embargo, en esta investigación se observó que las

ronchas provocadas por la inoculación del testigo positivo y las clínicamente positivas manifestaron mayor edema, mayor cantidad de polimorfonucleares y una menor cantidad de mastocitos que lo observado en los sitios de inoculación del testigo negativo y de los diferentes extractos alergénicos que no provocaron reacciones positivas.

Asimismo, se observó que en los sitios de aplicación de los extractos de insectos que no ocasionaron reacciones positivas la cantidad de células fue menor. No obstante, estos extractos, fueron los que más reacciones positivas provocaron. La razón, por la cual estos extractos presentaron menor celularidad no pudo ser explicada en este estudio.

Es probable que las ronchas que fueron clínicamente positivas estuvieran asociadas a una respuesta de tipo alérgica. Se sabe que la migración de leucocitos a los sitios de lesión es independiente de los cambios en la permeabilidad vascular, por lo tanto, para que ésta se pueda llevar a cabo se necesita la participación de una gran variedad de mediadores químicos y citocinas que estimulan la expresión de moléculas de adhesión (que permiten que las células inflamatorias se puedan unir a las células endoteliales) y que actúan como factores quimiotácticos<sup>2,11,12,36,38,80,81</sup>.

Uno de los mediadores químicos más estudiados es la histamina, esta sustancia, aparte de provocar vasodilatación y la subsecuente extravasación de plasma, estimula la expresión de las moléculas de adhesión y actúa como un factor quimiotáctico para polimorfonucleares<sup>2,11,12,36,38,80,81</sup>. Esto explica porque el edema y la cantidad de polimorfonucleares fue mayor en las ronchas ocasionadas por la inoculación intradérmica de histamina.

En un estudio realizado por Nimmo y col.<sup>20</sup> demostraron que la cantidad de histamina en los perros atópicos era mayor que en los no atópicos. A pesar de que DeMora y col.<sup>82</sup> detectaron que los mastocitos de los perros atópicos presentan una concentración mayor de histamina, Jackson y col.<sup>88</sup> encontraron que la cantidad de histamina en las células cebadas de perros atópicos y no



atópicos es estadísticamente igual, pero que en los pacientes atópicos tienen una mayor capacidad para liberarla.

Debido a que las ronchas clínicamente positivas se comportaron en forma similar a las ocasionadas por el testigo positivo y a que los perros atópicos tienen mayor cantidad de histamina, es probable que los perros que reaccionaron en forma positiva a la inoculación de los extractos alérgicos hayan sido atópicos. Desafortunadamente no se tomaron biopsias de las ronchas del perro que respondió a algodón y del que manifestó reacciones positivas a *Dermatophagoides farinae* y a los extractos epidérmicos, en los cuales, por haber respondido únicamente a la concentración mayor, se sospechó que la reacción era de tipo irritativa. Hubiera sido conveniente determinar si existía diferencia en la cantidad de polimorfonucleares entre estas ronchas y las observadas a la dilución recomendada para el diagnóstico de atopia.

Algunos autores han establecido que la única manera de determinar si las ronchas están asociadas a un proceso alérgico o irritante, es a través de la prueba de anafilaxia cutánea pasiva, la cual detecta la presencia de anticuerpos alérgicos específicos<sup>2,7,11,36,37</sup>. Así pues, hubiera sido recomendable realizarla en los perros que tuvieron resultados positivos con el fin de detectar si éstos eran atópicos.

Con base en los resultados de este trabajo se puede concluir que las diluciones recomendadas en la literatura 1:1,000 P/V para los extractos de pólenes y 1:2,000 P/V para hongos, ambientales e insectos, a excepción de hormiga, pueden ser utilizadas para el diagnóstico de dermatitis atópica en perros de la Ciudad de México. En el caso del extracto hormiga la dilución puede ser de 1:3,000.

Las diluciones que se comportan en forma similar a las recomendadas para el diagnóstico de atopia son: para pólenes 1:500 y 1:1,500, para hongos 1:1,500 y para ambientales 1:1,000 y 1:1,500.

En el caso de insectos debido a los porcentajes de positividad y a la variación en el tamaño de las reacciones a las diferentes diluciones, se recomienda utilizar la concentración 1:2,000 para pulga, mosquito y cucaracha, y 1:3,000 para hormiga

Asimismo, el volumen a inocular debe de ser de 0.02 ml con el fin de obtener una ampula inicial de 2 a 4 mm de diámetro y evitar la presentación de falsos positivos asociados al volumen inoculado.

La respuesta de la piel de los perros a la inoculación de los extractos alergénicos, al igual que en humanos, es dependiente del tiempo, por lo tanto, la lectura de la reacción se debe realizar a los 15 minutos.

En este estudio no se pudo comprobar que los hallazgos histopatológicos en las ronchas provocadas por la inoculación de los extractos alergénicos puedan ayudar a determinar si el paciente presenta una reacción asociada a un proceso alérgico o irritativo.

## Capítulo 5.- REFERENCIAS

1. Bousquet J, Michel FB. In vivo methods for study of allergy: skin tests, techniques and interpretation. In: Middleton E, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW, Busse WW, editors. Allergy principles and practice. St. Louis: Mosby, 1993: 573-594.
2. García F. Fundamentos de Inmunobiología. México: UNAM, 1997.
3. Sousa CA. Atopic dermatitis. Vet Clin North Am Sm Anim Pract 1988;18:1049-1059.
4. Reedy LI, Miller WH, Willemse T. Allergic skin diseases of dogs and cats. 2nd ed. Philadelphia: Saunders, 1997.
5. Anderson WN. Canine allergic inhalant dermatitis. 2nd ed. St. Louis: Ralston, 1982.
6. Reedy LI, Miller WH. Allergic skin diseases of dogs and cats., Philadelphia: Saunders, 1989.
7. Halliwell REW, Gorman NT. Enfermedades atópicas. En: Halliwell REW, Gorman NT, editores. Inmunología Clínica Veterinaria. España: Acribia, 1989: 248-270.
8. Reddy LI. El diagnóstico de la enfermedad atópica canina. En: Kirk RW, editor. Terapéutica veterinaria: práctica clínica en especies pequeñas. México: CECSA, 1980: 459-462.
9. Willemse T. Atopic skin disease: a review and a reconsideration of diagnostic criteria. J Small Anim Pract 1986;27:771-778.
10. Baker E. Allergy-testing in the dog. J Am Vet Med Assoc 1966;148:115-118.
11. Tizard IR. Inmunología Veterinaria. 5ª ed. México: McGraw-Hill, 1996.
12. Majno G, Joris I. Cells, tissues and disease: principles of general pathology. Massachusetts: Blackwell Science, 1996.
13. Thompson JP. Basic immunology principles of allergic diseases. Sem Vet Med and Surg Sm Anim 1991;6:247-255.
14. Nesbit GH. Canine and feline dermatology: a systematic approach. Philadelphia: Lea & Febiger, 1983.
15. Chamberlain K. Atopic (allergic) dermatitis. Vet Clin North Am Sm Anim Pract 1974;4:29-39.
16. Austin V. Atopic skin disease. Mod Vet Pract 1976;40:355-361.
17. Nesbitt GH. Canine allergic inhalant dermatitis: a review of 230 cases. J Am Vet Med Assoc 1978;172:55-60.
18. Scott DW, Miller WH, Griffin CE. Small animal dermatology. 5th ed. Philadelphia: Saunders, 1995.
19. Schwartzman RM. Immunologic studies of progeny of atopic dogs. Am J Vet Res 1984;45:375-378.

20. Nimmo Wilkie JS, Yager JA, Eyre P, Parker WM. Morphometric analyses of the skin of dogs with atopic dermatitis and correlations with cutaneous and plasma histamine and total serum IgE. *Vet Pathol* 1990;27:179-186.
21. Hill PB. Levels of total serum IgE, IgA, and IgG in atopic, normal, and parasitized dogs. *Proc Annu Memb Meet Am Acad Vet Dermatol Am Col Vet Dermatol* 1993;9:32-36.
22. Bond R, Thorogood SC, Lloyd DH. Evaluation of two enzyme-linked immunoabsorbent assays for the diagnosis of canine atopic. *Vet Rec* 1994;6:130-132.
23. Vriesendorp HM, Smid-Mercx BMJ, Visser TP. Serological DL-A typing of normal and atopic dogs. *Transpl Proc* 1975;7:375-377.
24. Willemse A, Noordzij A, Rutten VPMG. Induction of non-IgE anaphylactic antibodies in dogs. *Clin Exp Immunol* 1985;59:351-358.
25. Willemse A, Noordzij A, Van den Brom WE. Allergen specific IgGd antibodies in dogs with atopic dermatitis as determined by the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Exp Immunol* 1985;59:359-363.
26. Muller RS. Diagnosis and management of canine atopic disease. *Aust Vet Practit* 1993;23:20-27.
27. Chalmers SA, Medleau L. An update on atopic dermatitis in dogs. *Vet Med* 1994;8:326-341.
28. Codner EC, Griffin CE. Serologic allergic testing for dogs. *Comp Cont Educ* 1996;18:237-249.
29. Willemse A, Van Den Brom WE. Evaluation of the intradermal allergic test in normal dogs. *Res Vet Sci* 1982;32:57-61.
30. Sousa CA, Norton AL. Advances in methodology for diagnosis of allergic skin disease. *Vet Clin North Am Sm Anim Pract* 1990;20:1419-1427.
31. Akerman L. Diagnosing inhalant allergies: intradermal or in vitro testing?. *Vet Med* 1988;20:779-782.
32. August JR. The intradermal test as a diagnostic aid for canine atopic disease. *J Am Anim Hosp Assoc* 1982;18:164-171.
33. Ackerman L. *Pet skin and haircoat problems: tests and treatments*. New Jersey: Veterinary Learning Systems, 1993.
34. Griffin CE. Canine Atopic disease. In: Griffin CE, Kwochka KW, MacDonald JM, editors. *Current veterinary dermatology: the science and art of therapy*. St. Louis: Mosby, 1993: 99-120.
35. Medleau L. Linking chronic steroid-responsive pruritus to allergies. *Vet Med* 1990; 12:259-271.
36. Roitt Y, Brostoff J, Male D. *Inmunología*. 3ª ed. Barcelona: Masson-Salvat, 1993.
37. Gorman NT, Halliwell REW. Mecanismos de lesión inmunológica en las reacciones de hipersensibilidad. En: Halliwell REW, Gorman NT, editores. *Inmunología Clínica Veterinaria*. España: Acribia, 1989: 227-247.

38. Zweiman B. Mediator of allergic inflammation in the skin. *Clin Allergy* 1988;18:419-427.
39. Rebhun J, Potvin J. Histamine flare, a neurovascular response. *Ann Allergy* 1980;45:59-64.
40. Olivry T, Naydan DK, Moore PF. Characterization of the cutaneous inflammatory infiltrate in canine atopic dermatitis. *Am J Dermatopathol* 1997;19:477-486.
41. Wilkie JS, Yager JA, Eyre P, Parker WM. Morphometric analyses of the skin of dogs with atopic dermatitis and correlations with cutaneous and plasma histamine and total serum IgE. *Vet Pathol* 1990;27:179-186.
42. Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ. *Veterinary dermatopathology: a macroscopic and microscopic evaluation of canine and feline skin disease*. St. Louis: Mosby, 1992.
43. Foreman JC. Neuropeptides and the pathogenesis of allergy. *Allergy* 1987;42:1-7.
44. August JR. The reaction of canine skin to the intradermal injection of allergenic extracts. *J Am Anim Hosp Assoc* 1982;18:157-163.
45. Ipsen H, Klysner S, Larsen JN, Matthiesen F, Schou C, Sparholt S. Allergenic extracts. In: Middleton E, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW, Busse WW, editors. *Allergy principles and practice*. St. Louis: Mosby, 1993: 529-553.
46. Belin L. Separation and characterization of birch pollen antigens with special reference to the allergenic components. *Int Arch Allergy* 1972;42:329-333.
47. Dirksen A, Osterballe O. Common compounds in pollen extracts. *Allergy* 1978;33:299-315.
48. Matthiesen F, Lowenstein H. Group V allergens in grass pollens: an investigation of V allergens in pollens from ten grasses. *Clin Exp Allergy* 1991;21:309-314.
49. Frank LA, McEntee MF. Demonstration of aeroallergen contact sensitivity in dogs. *Vet Allergy Clin Immunol* 1995;3:75-80.
50. Ackerman L. Food hypersensitivity: a rare, but manageable disorder. *Vet Med* 1988;7:1142-1148.
51. Halliwell REW. Management of dietary hypersensitivity in the dog. *J Sm Anim Practi* 1992;33:156-160.
52. Kunkle G, Horner S. Validity of skin testing for diagnosis of food allergy in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1992;200:677-680.
53. Rosser EJ. Diagnosis of food allergy in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1993;203:259-262.
54. Fadok VA. Diagnosing and managing the food-allergic dog. *Comp Cont Educ* 1994;16:1541-1545.
55. Jeffers JG, Shanley KJ, Meyer EK. Diagnostic testing of dogs for food hypersensitivity. *J Am Vet Med Assoc* 1991;198:245-250.

56. Noli C, Bernadina WE, Willemsse T. The significance of reactions to purified fractions of *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* in canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 1996;52:147-157.
57. Boutin Y, Heber H, Vrancken E. Allergenicity and cross-reactivity of cat and dog allergenic extracts. *Clin Allergy* 1988;18:287-293
58. Schou C. Defining allergens of mammalian origin. *Clin Exp Immunol* 1993;23:7-14.
59. Schou C, Svendsen U, Lowenstein H. Purification and characterization of the major dog allergen. *Clin Exp Immunol* 1991;21:321-328.
60. Charpin C, Mata P. Allergen distribution in cat fur and skin. *J Allergy Clin Immunol* 1991;88:77-82.
61. Duffort O, Carreira J, Nito G. Studies on the biochemical structure of major cat allergens. *Mol Immunol* 1991;28:301-309.
62. Lowenstein H. Selection of reference preparation. *Arb Paul Ehrlich Inst* 1987;80:75-84.
63. Lowenstein H, Marsh, DG. Antigens of *Ambrosia elatior* (short ragweed) pollen: crossed immunoelectrophoretic analysis. *J Immunol* 1981;126:943-954.
64. Lowenstein H. Physico-chemical and immunochemical methods for the control of potency and quality of allergenic extracts. *Arb Paul Ehrlich Inst* 1980;75:122-140.
65. Platts-Mills TAE, Chapman MD. Allergen standardization. *J Allergy Clin Immunol* 1991;87:621-639.
66. DeBoer DJ. Survey of intradermal skin testing practices in North America. *J Am Vet Med Assoc* 1989;195:1357-1363.
67. Carlotti DN, Costargent F. Analysis of positive skin test in 449 dogs with allergic dermatitis. *Comp Anim Pract* 1994;4:42-59.
68. Suture GH, Halliwell REW, Thoday KL, Broek AHM, Henfrey JI, Lloyd DH. Canine atopic disease: the prevalence of positive intradermal skin tests at two sites in the north and south of Great Britain. *Vet Immun immunopathol* 1995;44:293-308.
69. Slacek B, Opdebeeck JP. Reactivity of dogs and cats to feeding fleas and to flea antigens injected intradermally. *Aus Vet J* 1993;70:313-316.
70. Codner EC, Tinker MK. Reactivity to intradermal injections of extracts of house dust and house dust mite in healthy dogs and dogs suspected of being atopic. *J Am Vet Med Assoc* 1995;206:812-816.
71. White SD, Ohman JL. Response to intradermal skin testing with four cat allergen preparations in healthy and allergic dogs. *Am J Vet Res* 1988;49:1873-1875.
72. Frank LA, Kunkle GA, Beale KM. Comparison of serum cortisol concentration before and after intradermal testing in sedated and no sedated dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1992;200:507-510.

73. Barbet JL, Halliwell REW. Duration of inhibition of immediate skin test reactivity by hydroxyzine hydrochloride in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1989;194:1565-1569.
74. Beale KM, Kunkle GA, Chalker L, Cannon R. Effects of sedation on intradermal skin testing in flea-allergic dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1990;197:861-864.
75. Moriello KA, Eicker SW. Influence of sedative and anesthetic agents on intradermal skin test reactions in dogs. *Am J Vet Res* 1991;52:1484-1488.
76. Mueller RS, Ihrke PJ, Kass PH, Bettenay SV. The effect of tiletamine-zolazepam anesthesia on the response to intradermally injected histamine in cats. *Vet Derm* 1991;2:119-123.
77. Schultz-Larsen F, Holm K, Henningsen K. Atopic dermatitis: a genetic-epidemiologic study in a population-based twin sample. *J Am Acad Dermatol* 1986;15:487-494.
78. Willemse A, Van den Brom WE. Investigations of the symptomatology and the significance of immediate skin test reactivity in canine atopic dermatitis. *Res Vet Sci* 1983;34:261-263.
79. Scott DW. Observations on canine atopy. *J Am Anim Hosp Assoc* 1981;17:91-96.
80. Slauson DO, Cooper BJ. Mechanisms of disease: a textbook of comparative general pathology. 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1990.
81. Hill PB, Martin RJ. A review of mast cell biology. *Veterinary Dermatology* 1998;9:145-166.
82. DeMora F, García G, Puigdemont A, Arboix M, Ferrer L. Skin mast cell releasability in dogs with atopic dermatitis. *Inflamm Res* 1996;45:424-427.
83. Méndez I, Namihira D, Moreno L, Sosa C. El protocolo de investigación: lineamientos para su elaboración y análisis. México: Trillas, 1984.
84. Pineda B, Alvarado E, Canales F. Metodología de la investigación: manual para el desarrollo de personal de salud. Organización Panamericana de la Salud, 1994.
85. Sepúlveda B, Kumate J, Cravioto J, Jinich H. Aspectos esenciales de la metodología en la investigación clínica. *Gaceta Médica de México* 1970;100:723-769.
86. Mendenhall W, Reinmuth JE. Administración y economía. Iberoamérica, 1981.
87. Daniel WW. Base para el análisis de las ciencias de la salud. México: LIMUSA, 1977.
88. Jackson HA, Miller HR, Halliwell RE. Canine leucocyte histamine release: response to antigen and to anti-IgE. *Vet Immunol Immunopathol* 1996;53:195-206.

## ANEXO 1

### ALERGENOS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO

#### Pólenes

1. *Amarantus paniculatus* (Amaranto)
2. *Ambrosia elatior* (Ambrosia)
3. *Cosmos bipinnatus* (Mirasol)
4. *Lolium perenne* (Pasto inglés)
5. *Cynodon dactylon* (Capriola)
6. *Chenopodium ambrosoides* (Epazote)
7. *Fraxinus* (Fresno)
8. *Heliantus annuus* (Girasol)
9. *Ligustrum lucidum* (Trueno)
10. *Schinus molle* (Pirúl)
11. *Plantago major* (Llantén)
12. *Rumex mexicana* (hierba)

#### Hongos

1. *Aspergillus fumigatus*
2. *Alternaria alternata*
3. *Cladosporium cladosporoides* (Hormodemdrun)
4. *Drechslera* (*Helminthosporium*)
5. *Mucorinea*
6. *Penicillium expansum*

#### Ambientales

1. Algodón (sin proceso)
2. Gato
3. Perro
4. Lana
5. Plumas mezcla (pollo, ganzo y pato)
6. Polvo casero
7. *Dermatofagoides pteronyssinus*
8. *Dermatofagoides farinae*

#### Insectos

1. Cucaracha americana (*Periplaneta americana*)
2. Hormiga roja (*Formica spp*)
3. Mosquito
4. Pulga



## ANEXO 2

## ELABORACIÓN DE LAS DILUCIONES

**Fórmula para determinar la cantidad de alergeno a utilizar:**

$$V_1 C_1 = V_2 C_2$$

Donde:

$V_1$  = Volumen de extracto que se desea preparar

$C_1$  = Concentración del extracto que se desea preparar

$V_2$  = Volumen del extracto necesario para la dilución

$C_2$  = Concentración del extracto que se va a utilizar

**Fórmula para determinar la cantidad de solución de Evans a utilizar:**

$V_1 - V_2$  = Cantidad de diluyente requerido

Concentración	Alergeno (ml)	Obtenido de la Concentración	Solución Evans (ml)	Cantidad Total (ml)
1:500	2.2	1:100	8.8	11.0
1:1,000	3.0	1:500	3.0	6.0
1:1,500	2.0	1:500	4.0	6.0
1:2,000	1.5	1:500	4.5	6.0
1:2,500	1.2	1:500	4.8	6.0
1:3,000	1.0	1:500	5.0	6.0

Histamina 1:100,000: 1 ml de Histamina (1:1,000) + 9 ml de Sol. de Evans

## ANEXO 3

## ORDEN DE APLICACIÓN DE LOS ALERGENOS

ZONA PARAGOSTAL	ALERGENO
Derecha	Testigo negativo Testigo positivo 1. <i>Amarantus paniculatus</i> (Amaranto) 2. <i>Ambrosia elatior</i> (Ambrosia) 3. <i>Cosmos bipinnatus</i> (Mirasol) 4. <i>Lolium perenne</i> (Pasto inglés) 5. <i>Cynodon dactylon</i> (Capriola) 6. <i>Chenopodium ambrosoides</i> (Epazote) 7. <i>Fraxinus</i> (Fresno) 8. <i>Heliantus annus</i> (Girasol) 9. <i>Ligustrum lucidum</i> (Trueno) 10. <i>Schinus molle</i> (Pirúl) 11. <i>Plantago major</i> (Llantén) 12. <i>Rumex mexicana</i> (hierba) 13. <i>Aspergillus fumigatus</i> 14. <i>Alternaria alternata</i> 15. <i>Cladosporium cladosporoides</i> (Hormodemdrun)
Izquierda	Testigo negativo Testigo positivo 1. <i>Drechslera</i> ( <i>Helminthosporium</i> ) 2. <i>Mucorinea</i> 3. <i>Penicillium expansum</i> 4. Algodón (sin proceso) 5. Gato 6. Perro 7. Lana 8. Plumas mezcla (pollo, ganzo y pato) 9. Polvo casero 10. <i>Dermatofagoides pteronyssinus</i> 11. <i>Dermatofagoides farinae</i> 12. Cucaracha americana ( <i>Periplaneta americana</i> ) 13. Hormiga roja ( <i>Formica spp</i> ) 14. Mosquito 15. Pulga

## ANEXO 4

## SELECCIÓN DE LAS BIOPSIAS

No. DE PERRO	BIOPSIA
1	<i>Drechslera (Helminthosporium)</i>
2	<i>Plantago major</i> (Llantén)
3	<i>Penicillium expansum</i>
4	Polvo casero
5	<i>Ambrosia elatior</i> (Ambrosía)
6	Hormiga roja ( <i>Formica spp</i> )
7	<i>Chenopodium ambrosoides</i> (Epazote)
8	<i>Mucorinea</i>
9	Gato
10	<i>Amarantus paniculatus</i> (Amaranto)
11	Pulga
12	Algodón (sin proceso)
13	<i>Aspergillus fumigatus</i>
14	<i>Cladosporium cladosporoides</i> (Hormodemdrun)
15	<i>Fraxinus</i> (Fresno)
16	<i>Lolium perenne</i> (Pasto inglés)
17	<i>Heliantus annuus</i> (Girasol)
18	<i>Dermatofagoides farinae</i>
19	<i>Ligustrum lucidum</i> (Trueno)
20	Lana
21	<i>Cynodon dactylon</i> (Capriola)
22	Mosquito
23	<i>Schinus molle</i> (Pirúl)
24	Cucaracha americana ( <i>Periplaneta americana</i> )
25	Perro
26	Plumas mezcla (pollo, ganzo y pato)
27	<i>Rumex mexicana</i> (hierba)
28	<i>Dermatofagoides pteronyssinus</i>
29	<i>Cosmos bipinnatus</i> (Mirasol)
30	<i>Alternaria alternata</i>

## ANEXO 5

## TESTIGO NEGATIVO Y POSITIVO. MEDICIONES EN MILÍMETROS A LOS 15 Y 30 MINUTOS

No. de perro	T (-) 15 minutos	T (-) 30 minutos	T (+) 15 minutos	T (+) 30 minutos
1	5	0	10	10
2	6	6	12	12.5
3	5	5	10.5	10.5
4	5	5	11.5	12
5	5	5	11	12
6	4	0	11	10
7	6	6	10	10
8	6	6	11	11
9	5.5	4	10	10
10	0	0	10	10
11	5	5	10	10
12	4.5	4.5	10	10
13	0	0	10	10
14	3	3	10.5	10.5
15	0	0	10	10
16	7	6.5	10	11
17	0	0	10	10
18	5	0	10	10
19	7	7	11	12
20	5	5	10	10
21	6	6	11	12
22	7	7	10	10
23	7	7	10	11
24	5	5	11	12
25	6	6	10	11
26	6	6	10	10
27	6	0	10	10
28	5	0	10	10
29	5	6	10	10
30	6	6	10	10

T(+) Testigo positivo; T(-) Testigo negativo.

PÓLENES. MEDICIONES EN MILÍMETROS A LOS 15 MINUTOS

Número de perro	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Amaranto 1:500	5	8	4	5	6	6	5	6	6	5	5	0	4	4	5	7.5	6	5	7	6	6	7	7	7	6	6	6	5	6	5
1 a 1000	5	8	0	5	6	6	5	6	6	5	5	7	0	0	5	7.5	6	5	7	6	6	7	7	7	6	6	6	5	6	5
1 a 1500	5	8	0	5	6	6	4	6	6	5	5	5	4	0	4	7	6	5	7	6	6	5	7	7	6	7	6	5	6	5
1 a 2000	5	7	0	5	6	0	6	6	6	5	5	0	5	0	0	7	6	5	7	6	5	7	7	7	6	7	6	5	6	5
1 a 2500	5	7	0	5	5	0	6	0	6	0	5	0	0	0	0	7	6	5	7	0	5	0	7	7	6	7	6	5	6	5
1 a 3000	3	6	0	3	5	5	0	6	5	0	3	0	0	0	0	7	6	6	7	5	5	7	6	7	6	7	6	5	0	5
Ambrosia 1:500	5	8	4	5	7	5	5	5	5	6	5	5	5	4	5	7	5	7	7	5	7	8	8	7	6	7	6	5	6	5
1 a 1000	5	8	4	5	7	5	5	5	5	6	5	0	5	4	5	6	5	6	7	5	7	7	8	7	6	6	6	5	6	5
1 a 1500	5	8	4	5	7	5	5	5	5	5	5	7	5	4	5	7	5	6	7	5	7	7	8	7	6	6	6	5	6	5
1 a 2000	5	7	4	5	5	0	0	5	0	0	5	5	5	4	0	7	5	6	7	0	5	6	8	7	6	7	6	5	6	5
1 a 2500	5	7	4	5	7	5	0	5	5	0	5	5	5	4	0	7	5	6	7	5	7	6	8	7	6	6	6	5	6	5
1 a 3000	5	6	4	5	5	5	0	5	5	0	5	0	5	4	0	7	5	6	5	5	5	6	8	6	6	6	6	5	8	5
Mirasol 1:500	5	8	4	5	7	5	5	5	5	7	5	7	5	4	5	7.5	5	6	7	5	7	7	8	7	6	7	7	5	6	5
1 a 1000	5	7	4	5	7	5	5	5	5	5	5	7	4	4	5	7.5	5	5	7	5	7	8	7	6	7	7	5	6	5	
1 a 1500	5	7	4	5	7	5	5	5	5	6	5	5	5	4	5	7.5	5	6	7	5	7	8	7	6	7	7	5	6	5	
1 a 2000	0	7	4	0	6	5	0	5	5	5	0	0	5	4	0	7.5	5	6	7	5	6	7	8	7	6	7	7	5	6	5
1 a 2500	5	6	0	5	6	5	0	5	5	5	6	0	0	0	7.5	5	6	7	5	6	7	7	7	6	7	6	5	6	5	
1 a 3000	0	6	0	0	6	5	0	5	5	5	0	5	5	0	0	7.5	5	6	0	5	6	6	7	7	6	6	6	5	0	0
Pasto inglés 1:500	5	6	0	5	8	5	5	5	5	5	5	0	6	0	5	8	5	6	7	5	8	7	7.5	8	7	6	7	6	8	5
1 a 1000	5	6	0	5	8	5	5	5	5	5	5	6	5	0	5	7.5	5	6	7	5	8	7	7.5	8	7	7	6	7	5	
1 a 1500	5	5	0	7	5	0	5	5	5	5	0	0	0	0	7.5	5	6	6	5	7	5	7	8	7	6	7	6	7	5	
1 a 2000	4	5	0	4	6	5	0	5	5	5	4	6	0	0	0	7	5	6	6	5	6	7	7	7	7	6	6	7	5	
1 a 2500	5	5	4	5	6	5	5	5	5	5	5	4	0	4	5	7.5	5	6	5	5	6	5	6	7	7	7	6	6	6	4
1 a 3000	0	5	4	0	6	5	0	5	5	5	0	0	4	4	0	7	5	6	5	5	6	5	7	7	5	7	8	6	6	4
Capriola 1:500	5	7	4	5	8	5	5	7	5	5	5	0	5	0	5	7	7	6	7	5	8	7	7.5	7	6	6	7	6	7	5
1 a 1000	5	7	4	5	6	5	0	7	5	5	5	7	4	0	0	7	7	6	7	5	6	7	7.5	7	7	7	7	8	7	5
1 a 1500	5	7	4	5	6	5	5	6	5	5	5	5	4	0	5	7	6	6	7	5	6	6	7	7	7	7	7	6	7	5
1 a 2000	5	7	4	5	6	5	0	6	5	5	5	0	5	0	5	7	6	6	7	5	6	7	8	7	7	7	6	6	7	4
1 a 2500	5	6	4	5	5	5	6	5	5	5	5	5	0	5	7	6	6	6	5	5	7	7.5	7	0	6	6	6	6	0	
1 a 3000	5	6	4	5	5	5	0	5	5	5	5	5	0	5	7	0	6	7	5	5	7	8	7	0	6	6	6	6	0	
Epazote 1:500	5	7	0	5	6	5	5	7	5	5	5	0	5	0	5	8	7	6	7	5	6	7	7.5	7	6	7	6	6	5	
1 a 1000	5	7	0	5	6	5	5	7	5	5	5	5	0	5	8	7	6	7	5	6	7	7.5	7	6	7	6	7	6	6	5
1 a 1500	0	6	0	0	6	5	0	7	5	5	0	4	4	0	0	8	7	0	7	5	6	7	7.5	7	6	7	7	6	6	5
1 a 2000	5	7	0	5	6	5	5	7	5	5	5	0	4	0	5	8	7	6	7	5	6	6	7.5	7	5	7	7	6	6	0
1 a 2500	5	6	0	5	6	5	0	7	5	5	0	5	0	0	8	7	6	7	5	6	6	7.5	7	5	6	7	6	6	5	
1 a 3000	5	0	0	5	6	5	5	7	5	5	5	5	0	5	7	7	6	7	5	6	6	6	7	5	6	7	6	6	0	
Fresno 1:500	5	8	5	5	7	5	5	6	5	5	5	0	5	5	5	7	6	5	7	5	7	7	7	7	7	6	6	7	6	5
1 a 1000	5	8	5	5	8	5	5	6	5	5	5	0	5	5	5	7	8	5	7	5	6	7	7	7	6	6	6	7	6	5
1 a 1500	5	7	5	5	6	5	5	6	5	5	5	0	5	5	5	6	6	5	7	5	6	5	7	7	6	6	6	7	6	5
1 a 2000	5	7	5	5	5	5	0	6	5	5	5	0	0	5	0	8	6	6	7	5	5	5	7	7	6	6	6	7	6	0
1 a 2500	5	7	5	5	5	5	6	5	5	5	5	0	4	5	5	6	6	5	7	5	5	0	7	7	6	6	6	7	6	0
1 a 3000	0	0	5	0	6	5	5	0	5	5	0	0	5	5	6	0	6	6	5	6	5	7	7	8	8	6	6	7	6	0
Girasol 1:500	5	6	5	5	7	5	5	6	5	5	5	5	5	5	5	8	6	6	7	5	7	7	8	8	9	6	7	7	8	6
1 a 1000	5	6	5	5	7	5	5	6	5	5	5	7	5	5	5	7	0	6	7	5	7	7	8	8	8	6	7	7	7	6
1 a 1500	5	6	0	5	7	5	5	6	5	5	5	0	6	0	5	7	6	6	7	5	7	7	8	8	7	6	6	6	7	6
1 a 2000	5	6	0	5	6	5	0	0	5	5	5	4	6	0	0	7	0	5	7	5	6	7	8	8	7	6	6	6	7	5
1 a 2500	0	6	5	0	5	5	0	6	5	5	0	0	5	5	0	7	6	5	6	5	5	6	8	8	0	6	6	6	7	0
1 a 3000	0	6	0	0	5	5	0	7	5	5	0	0	5	0	0	7	7	5	7	5	5	6	8	8	0	6	6	6	7	5
Trueno 1:500	5	6	0	5	6	6	5	6	6	5	5	0	4	0	5	7.5	6	7	8	6	6	7	8	7	7	6	7	6	8	5
1 a 1000	5	6	0	5	6	6	0	6	6	8	5	5	4	0	0	7.5	6	7	7	6	6	7	8	7	6	6	7	6	7	5
1 a 1500	5	6	0	5	6	6	0	5	6	6	5	0	4	0	0	7.5	5	6	7	6	6	7	7	7	6	6	7	6	7	5
1 a 2000	5	5	0	5	6	6	0	0	6	6	5	0	4	0	0	7.5	0	6	7	6	6	7	7	7	6	6	7	6	6	5
1 a 2500	5	5	0	5	6	6	0	0	6	6	5	5	4	0	0	7.5	5	7	6	6	6	6	7	7	6	6	7	6	6	5
1 a 3000	5	5	0	5	5	0	0	5	0	6	5	0	4	0	0	7	5	6	5	0	5	6	7	7	0	6	7	6	6	0
Pirul 1:500	5	6	4	5	7	6	5	7	6	6	5	0	5	4	5	10	7	7	7	6	7	8	8	7	7	6	7	7	6	5
1 a 1000	5	6	0	5	7	6	5	6	6	6	5	4	5	0	5	8	6	7	7	6	7	8	8	7	6	6	7	7	6	5
1 a 1500	5	6	5	5	6	5	5	6	6	6	5	4	4	5	5	8	5	6	6	6	6	7	8	7	6	6	7	7	6	4
1 a 2000	5	5	5	5	6	6	0	6	6	6	5	4	4	5	0	7	6	6	6	6	6	6	8	7	6	6	7	7	6	0
1 a 2500	5	5	4	5	5	6	0	0	6	6	5	0	0	4	0	7	0	6	6	6	5	6	7	7	5	6	7	6	6	0
1 a 3000	5	5	0	5	5	6	0	0	6	6	5	6	4	0	0	7	0	6	6	6	5	6	6	7	7	5	6	7	6	0
Llanten 1:500	5	7	0	5	7	6	8	5	8	6	5	4	5	0	8	7.5	5	7												

ANEXO 7  
PÓLENES. MEDICIONES EN MILÍMETROS A LOS 30 MINUTOS

Número de perro	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
Amaranto 1:500	5	7	4	5	6	6	5	6	6	0	5	0	4	0	5	7.5	6	5	7	6	6	6	7	7	5	6	6	5	6	5	
1 a 1000	5	7	0	5	6	6	5	6	6	0	5	7	0	0	5	7.5	6	5	7	0	6	6	7	7	5	6	6	5	6	5	
1 a 1500	5	7	0	5	6	6	4	6	6	0	5	5	4	0	0	7	6	5	7	6	6	5	7	7	5	6	6	5	6	5	
1 a 2000	5	7	0	5	6	0	6	6	6	0	5	0	5	0	0	7	6	5	7	5	5	6	7	7	0	6	6	5	6	5	
1 a 2500	5	7	0	5	5	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	7	6	5	7	0	5	0	7	7	0	6	6	5	6	5	
1 a 3000	3	0	0	3	5	5	0	6	5	0	0	0	0	0	0	7	6	0	7	0	5	6	6	7	0	6	6	5	0	5	
Ambrosia 1:500	5	7	4	5	7	5	5	0	5	0	5	5	0	5	7	5	7	7	0	7	8	8	7	6	6	6	5	6	5		
1 a 1000	5	7	4	5	7	5	5	0	5	0	0	0	5	0	5	6	5	6	7	0	6	7	8	7	6	6	5	6	5		
1 a 1500	5	7	4	5	7	5	5	0	5	0	0	7	5	0	5	7	5	6	7	0	7	7	8	7	6	6	5	6	5		
1 a 2000	5	5	4	5	5	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0	7	5	6	7	0	0	6	8	7	6	6	5	6	5		
1 a 2500	5	5	4	5	7	5	0	0	0	0	0	5	5	0	0	7	5	6	7	5	7	6	8	6	6	5	6	5	6	5	
1 a 3000	5	5	4	5	5	5	0	0	5	0	0	0	5	0	0	7	5	6	5	5	6	8	6	6	5	6	5	6	5	6	5
Mirasol 1:500	5	7	4	5	7	5	5	0	5	0	5	6	5	0	5	8	5	6	7	5	6	7	8	7	6	7	7	5	6	5	
1 a 1000	5	7	4	5	7	5	5	0	5	0	5	7	4	0	5	8	5	5	7	5	6	7	7	6	7	7	5	6	5		
1 a 1500	5	7	4	5	7	5	5	0	5	0	5	5	5	0	5	7.5	5	6	7	5	6	7	8	7	5	7	7	5	6	5	
1 a 2000	0	7	4	0	6	5	0	0	5	0	0	0	0	0	0	7.5	5	6	7	5	6	7	8	7	5	7	7	5	6	5	
1 a 2500	5	6	0	5	6	5	0	0	5	0	0	5	0	0	0	7.5	5	5	7	5	6	7	7	7	5	7	6	5	6	5	
1 a 3000	0	6	0	0	6	5	0	0	5	0	0	5	4	0	0	7.5	5	6	0	5	6	6	7	7	5	6	6	5	0	0	
Pasto inglés 1:500	5	5	0	5	8	5	5	5	5	0	5	6	4	0	5	7.5	5	6	7	5	8	7	7.5	9	7	5	7	6	7	5	
1 a 1000	5	5	0	5	8	5	5	5	5	0	5	6	4	0	5	7.5	5	6	7	5	8	7	7.5	9	7	5	7	6	7	5	
1 a 1500	5	5	0	5	7	5	0	4	5	0	5	0	0	0	0	7.5	5	6	8	5	7	5	7	8	7	5	7	6	7	5	
1 a 2000	4	5	0	4	6	5	0	4	5	0	4	6	0	0	0	7	5	8	6	5	6	7	7	7	5	6	6	7	5		
1 a 2500	5	5	4	5	6	5	5	4	5	0	5	4	0	0	0	7.5	5	6	5	5	6	5	6	7	7	5	6	6	6	4	
1 a 3000	0	0	4	0	6	5	0	4	5	0	0	0	0	0	0	7	5	0	5	5	6	5	7	7	0	5	6	6	6	4	
Capriola 1:500	5	7	4	5	8	5	5	5	5	0	5	0	5	0	5	7	7	0	7	5	7	8	7.5	7	6	7	7	6	7	5	
1 a 1000	5	7	4	5	6	5	5	0	5	5	0	5	6	4	0	7	6	7	5	6	8	7.5	7	6	7	7	6	7	5		
1 a 1500	5	7	4	5	6	5	5	5	5	0	5	5	4	0	0	7	6	0	7	5	6	0	7	7	6	7	7	8	7	5	
1 a 2000	5	7	4	5	6	5	0	5	5	0	5	0	4	0	0	7	6	6	7	5	6	6	8	7	5	7	6	6	7	4	
1 a 2500	5	6	4	5	5	5	5	5	5	0	5	5	4	0	0	7	6	6	6	5	5	7	7.5	7	0	6	6	6	6	0	
1 a 3000	5	6	4	5	5	5	5	0	5	5	0	5	4	0	0	7	0	5	7	5	5	7	6	7	0	6	6	6	6	0	
Epazote 1:500	5	7	0	5	6	5	5	7	5	0	0	0	5	0	5	8	7	6	7	0	6	7	7.5	7	6	7	7	6	6	5	
1 a 1000	5	7	0	5	6	5	5	7	5	0	0	5	5	0	0	8	7	6	7	5	6	7	7.5	7	6	7	7	6	6	5	
1 a 1500	0	6	0	0	6	5	0	7	5	0	0	4	4	0	0	8	7	0	6	5	6	7	7.5	7	6	7	7	8	6	5	
1 a 2000	5	7	0	5	6	5	5	7	5	0	5	0	4	0	0	8	7	5	6	5	6	6	7.5	7	5	7	7	6	6	0	
1 a 2500	5	6	0	5	6	5	0	7	5	0	0	4	0	0	0	8	7	6	6	5	6	6	7.5	7	5	0	7	6	6	5	
1 a 3000	5	0	0	5	6	5	5	7	5	0	0	5	4	0	0	7	7	6	6	5	6	6	6	7	5	0	7	6	6	0	
Fresno 1:500	5	8	5	5	7	5	5	5	5	0	0	0	0	0	5	7	5	5	7	5	7	7	7	7	7	6	6	7	6	5	
1 a 1000	5	8	5	5	6	5	5	5	5	0	0	0	5	0	5	7	5	5	7	5	5	7	7	7	7	6	6	6	7	6	5
1 a 1500	5	7	5	5	6	5	5	5	5	0	0	0	5	0	5	6	5	5	7	5	6	5	7	7	6	6	6	7	6	5	
1 a 2000	5	7	5	5	5	5	5	5	5	0	0	0	0	0	0	6	5	5	7	5	5	5	7	7	5	0	6	7	6	0	
1 a 2500	5	7	5	5	5	5	5	5	5	0	0	0	0	0	0	6	5	5	7	5	5	0	7	7	5	0	6	7	6	0	
1 a 3000	0	0	5	0	6	5	5	0	5	0	0	0	0	0	0	5	6	0	6	6	5	6	5	7	7	5	0	6	7	6	0
Girasol 1:500	5	6	5	5	7	5	5	5	5	0	5	5	0	0	5	8	6	6	7	5	7	7	8	7	9	5	7	7	8	6	
1 a 1000	5	6	5	5	7	5	5	5	5	0	5	7	0	0	5	7	0	0	7	5	7	7	8	7	8	5	7	7	7	6	
1 a 1500	5	6	0	5	7	5	5	5	5	0	5	0	5	0	5	7	6	5	7	5	7	7	8	7	7	5	6	8	7	6	
1 a 2000	5	6	0	5	6	5	0	0	5	0	5	5	6	0	0	7	0	5	7	5	6	7	8	7	7	5	6	6	7	5	
1 a 2500	0	6	5	0	5	5	0	0	5	0	0	4	0	0	0	7	6	5	6	5	6	7	7	0	5	6	6	7	0		
1 a 3000	0	6	0	0	5	5	0	5	5	0	0	5	0	0	0	7	6	5	7	5	5	6	7	7	0	5	6	6	7	5	
Trueno 1:500	5	6	0	5	6	6	5	6	6	0	3	0	0	0	5	7	6	7	8	6	6	7	7	7	7	6	7	6	8	5	
1 a 1000	5	6	0	5	6	6	0	6	6	0	5	5	4	0	0	7	5	7	7	6	6	7	7	7	6	6	7	6	7	5	
1 a 1500	5	6	0	5	6	6	0	5	6	0	5	0	4	0	0	6	5	8	7	6	6	6	7	7	6	6	7	6	7	5	
1 a 2000	5	5	0	5	6	6	0	0	6	0	5	0	4	0	0	6	0	8	7	6	6	7	7	7	6	6	7	6	6	5	
1 a 2500	5	5	0	5	6	6	0	5	6	0	5	5	4	0	0	6	5	7	6	0	5	6	7	7	6	6	7	6	6	5	
1 a 3000	5	5	0	5	5	0	0	5	0	0	0	0	4	0	0	6	5	6	5	0	5	6	7	7	0	6	7	6	6	0	
Pirulí 1:500	5	6	4	5	7	6	5	7	6	0	0	0	5	0	5	10	7	7	7	6	7	7	8	7	7	6	7	7	6	5	
1 a 1000	5	6	0	5	7	6	5	6	6	0	0	4	5	0	5	8	6	7	7	6	7	7	8	7	6	6	7	7	6	5	
1 a 1500	5	6	5	5	6	6	5	5	6	0	5	0	4	0	5	8	5	6	6	6	6	6	8	7	6	6	7	7	6	4	
1 a 2000	5	5	5	5	6	6	0	6	6	0	0	0	4	0	0	8	5	6	6	6	6	6	8	7	6	6	7	7	6	0	
1 a 2500	5	5	4	5	5	8	0	0	6	0	0	0	0	0	0	8	0	6	8	6	5	8	6	7	4	6	7	6	6	0	
1 a 3000	5	5	0	5	5	6	0	0	6	0	0	5	4	0	0	8	0	6	6	6	5	6	5	7	4	6	5	6	0	0	
Llantén 1:500	5	7	0	5	7	6	8	5	6	0	0	4	5	0	8	8	5	7	6	6	7	7									

**ANEXO 8**  
**HONGOS. MEDICIONES EN MILÍMETROS A LOS 15 MINUTOS**

Número de perro	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Aspergillus 1:500	5	7	5	5	7	6	5	6	6	5	5	5	5	5	5	7.5	6	5	7	6	7	7	8	7	6	5	6	6	6	5
1 a 1000	5	6	5	5	7	6	5	4	6	5	5	5	5	5	7.5	4	5	7	6	7	7	8	7	6	5	5	6	6	5	
1 a 1500	5	5	0	5	6	6	5	5	6	4	5	0	5	0	5	7.5	5	6	7	6	6	6	6	7	6	5	5	6	6	5
1 a 2000	5	7	5	5	6	6	4	5	6	4	5	0	0	5	4	7.5	5	7	7	6	6	6	6	6	6	5	5	5	6	5
1 a 2500	5	6	0	5	5	6	0	5	6	0	5	0	0	0	0	7.5	5	5	7	6	5	6	6	6	6	5	5	0	6	0
1 a 3000	5	6	5	5	5	6	0	0	6	0	5	5	0	5	0	7.5	0	0	6	6	5	0	6	7	6	5	5	0	6	0
Alternaria 1:500	5	7	5	5	6	5	5	5	5	6	5	4	5	5	5	7	5	6	7	5	6	6	6	7	11	6	5	7	6	4
1 a 1000	5	6	4	5	6	5	5	5	5	6	5	5	5	4	5	7	5	6	6	5	6	6	6	7	10	6	5	7	6	4
1 a 1500	5	6	0	5	5	5	5	5	5	6	5	0	0	0	5	7	5	6	6	5	5	6	6	7	9	6	5	6	6	4
1 a 2000	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6	5	0	5	5	5	7	5	6	6	5	5	6	6	5	9	6	5	6	6	5
1 a 2500	0	5	4	0	5	5	5	5	5	6	0	0	5	4	5	7	5	6	5	5	5	6	6	8	9	6	5	6	6	0
1 a 3000	5	5	4	5	0	5	0	5	5	6	5	4	5	4	0	5.5	5	0	5	5	0	5	6	6	9	6	5	5	6	0
Hormodendrum 1:500	5	8	5	5	6	5	5	5	5	6	5	0	5	5	5	7	5	6	7	5	6	6	6	7	6	6	6	6	4	
1 a 1000	5	7	5	5	6	5	5	5	5	6	5	5	5	5	5	7	5	6	7	5	6	6	6	7	6	6	5	6	6	4
1 a 1500	0	7	0	0	6	5	5	5	5	6	0	5	5	0	5	7	5	6	6	5	6	6	6	7	6	6	5	6	6	4
1 a 2000	5	6	5	5	6	5	5	5	5	6	5	5	5	5	5	7	5	6	6	5	6	6	6	5	6	6	5	5	6	4
1 a 2500	5	6	0	5	6	5	0	5	5	6	5	0	5	0	0	6	5	0	5	5	6	6	6	6	6	6	5	5	6	0
1 a 3000	5	0	5	5	0	5	0	5	5	6	5	0	5	5	0	7	5	0	5	5	0	6	6	6	6	6	5	5	6	4
Drechslera 1:500	5	7	6	5	7	6	5	5	6	6	5	5	5	6	5	7	5	5	7	6	7	7	7	7	6	6	6	6	6	5
1 a 1000	5	7	5	0	7	6	5	5	6	6	0	5	5	5	5	7	5	5	7	6	7	7	7	7	6	6	6	6	6	5
1 a 1500	5	7	0	0	7	6	5	0	6	6	0	5	5	0	5	6	0	5	7	6	7	7	7	7	6	6	6	6	6	5
1 a 2000	5	6	0	0	7	6	0	5	6	6	0	5	4	0	0	7	5	5	6	6	7	7	7	6	6	6	6	6	6	5
1 a 2500	5	6	0	0	7	6	5	5	6	6	0	0	4	0	5	7	5	5	6	6	7	7	7	6	6	6	5	6	6	5
1 a 3000	0	6	0	0	7	0	5	0	0	6	0	0	0	0	5	7	0	5	6	0	7	6	7	6	0	6	5	6	0	5
Mucorinea 1:500	5	7	6	5	7	7	5	5	7	6	5	4	5	6	5	7	5	5	6	7	7	6	7	7	14p	7	6	6	6	5
1 a 1000	5	7	4	5	6	7	5	5	7	5	5	0	5	4	5	7	5	5	6	7	6	6	5	7	12p	7	6	6	6	5
1 a 1500	0	7	4	0	6	6	5	5	6	5	0	4	5	4	5	7	5	5	6	6	6	6	7	10p	7	6	6	6	5	
1 a 2000	0	7	4	0	6	0	5	6	5	5	0	0	5	4	0	7	5	5	6	6	0	6	7	7	10p	7	6	6	6	5
1 a 2500	0	7	0	0	6	6	0	0	6	5	0	0	5	0	0	7	0	5	6	6	6	6	7	7	9	6	6	5	6	5
1 a 3000	0	6	3	0	6	6	0	5	6	5	0	0	3	0	6	5	5	6	6	6	5	7	7	9	6	6	5	6	5	
Penicillium 1:500	5	7	6	5	7	6	5	5	6	5	5	4	5	6	5	7	5	5	6	6	7	6	7	8	12	7	6	6	6	5
1 a 1000	5	6	4	5	7	6	0	5	6	5	5	0	5	4	0	7	5	5	7	6	7	6	6	8	12	7	6	6	6	5
1 a 1500	5	6	4	5	7	6	5	5	6	5	5	4	5	4	5	7	5	5	7	6	7	6	7	8	10	7	6	6	6	5
1 a 2000	5	5	4	5	6	6	5	0	6	5	5	0	5	0	5	7	0	5	6	6	6	6	7	7	9	6	6	6	6	5
1 a 2500	5	5	4	5	0	6	5	0	6	5	5	0	5	4	5	7	0	5	6	6	0	6	7	7	8	6	6	6	5	5
1 a 3000	5	5	4	5	0	6	5	5	6	5	5	0	5	4	5	6	5	0	6	6	0	6	6	6	8	6	5	4	5	5

Rojo (Reacciones positivas); p (Pseudópodos).

ANEXO 9  
HONGOS. MEDICIONES EN MILÍMETROS A LOS 30 MINUTOS

Número de perro	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
Aspergillus 1:500	5	7	5	5	7	6	4	6	6	0	5	5	0	0	5	7	5	5	7	6	7	7	8	7	6	5	6	6	5	5	
1 a 1000	5	6	5	5	7	6	4	4	6	0	5	4	0	4	5	7	4	5	7	6	7	7	8	7	6	5	5	6	5	5	
1 a 1500	5	5	0	5	6	6	4	5	6	0	5	0	0	0	5	7	5	5	7	6	6	6	6	7	6	5	5	6	5	5	
1 a 2000	5	7	5	5	6	6	0	5	6	0	5	0	0	4	4	7	5	7	7	6	6	6	6	6	6	5	5	5	5	5	
1 a 2500	5	6	0	5	5	6	0	5	6	0	5	0	0	0	0	7	5	5	7	6	5	6	6	6	6	5	5	0	5	0	
1 a 3000	5	6	5	5	5	6	0	0	6	0	5	5	0	4	0	6	0	0	6	6	5	0	6	7	6	5	5	0	5	0	
Alternaria 1:500	5	7	5	4	6	5	5	5	5	0	5	4	5	5	5	7	5	5	7	5	6	6	6	6	7	11	6	5	7	6	4
1 a 1000	5	6	4	0	6	5	5	5	5	0	5	5	5	4	5	7	5	5	6	5	6	6	6	7	10	6	5	7	6	4	
1 a 1500	5	6	0	0	5	5	0	5	5	0	5	0	0	0	5	7	5	5	6	5	5	6	6	7	9	6	5	6	6	4	
1 a 2000	5	5	5	0	5	5	0	5	5	0	5	0	5	5	5	7	5	5	6	5	5	6	6	5	9	6	5	6	6	5	
1 a 2500	0	5	4	0	5	5	0	5	5	0	0	0	5	4	5	7	5	5	5	5	5	6	6	6	9	6	5	6	6	0	
1 a 3000	5	5	4	5	0	5	0	5	5	0	5	4	5	4	0	5	5	0	5	5	0	5	6	6	9	6	5	5	6	0	
Hormodendrum 1:500	5	8	5	5	6	5	5	5	5	0	5	0	5	5	5	7	5	6	7	5	6	6	6	7	6	6	6	6	6	4	
1 a 1000	5	7	5	5	6	5	0	5	5	0	5	5	5	4	5	7	5	6	7	5	6	6	6	7	6	6	5	6	6	4	
1 a 1500	0	7	0	0	6	5	0	5	5	0	0	5	4	0	5	7	5	6	6	5	6	6	6	7	6	6	5	6	6	4	
1 a 2000	5	6	5	0	6	5	5	5	5	0	5	5	4	4	5	7	5	6	6	5	6	6	5	6	6	5	5	6	4		
1 a 2500	5	6	0	0	8	5	0	5	5	0	0	0	4	0	0	6	5	0	5	5	6	6	6	6	6	6	5	5	6	0	
1 a 3000	5	0	5	0	0	5	0	5	5	0	0	0	0	4	0	7	0	0	5	5	0	6	6	6	6	6	5	5	6	4	
Drechslera 1:500	5	7	6	5	7	6	5	5	6	0	0	5	5	6	5	7	5	5	7	6	7	7	7	7	6	6	6	6	6	5	
1 a 1000	5	7	5	0	7	6	5	5	6	0	0	5	5	5	5	7	5	5	7	6	7	7	7	7	6	6	6	6	6	5	
1 a 1500	5	7	0	0	7	6	5	0	6	0	0	5	5	0	5	6	0	5	7	6	7	7	7	7	6	6	6	6	6	5	
1 a 2000	5	6	0	0	7	6	0	5	6	0	0	0	4	0	0	7	5	5	6	6	7	7	7	6	6	6	6	6	6	5	
1 a 2500	5	6	0	0	7	6	5	5	6	0	0	0	4	0	5	7	5	5	6	6	7	7	7	6	6	6	5	6	6	5	
1 a 3000	0	6	0	0	7	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	5	7	0	5	6	0	7	6	7	6	0	6	5	6	0	5
Mucorinea 1:500	5	7	6	5	7	7	5	5	7	0	0	0	5	5	5	7	5	0	6	7	7	6	7	7	14p	7	6	6	6	5	
1 a 1000	5	7	4	5	6	7	5	5	7	0	0	0	5	0	5	7	5	5	6	7	6	6	5	7	12p	7	6	6	6	5	
1 a 1500	0	7	4	0	6	6	0	5	6	0	0	0	5	0	5	7	5	5	6	6	6	6	7	10p	7	6	6	6	5		
1 a 2000	0	7	4	0	0	6	0	5	6	0	0	0	5	0	0	7	5	5	6	6	0	6	7	7	10p	7	6	6	6	5	
1 a 2500	0	7	0	0	6	6	0	0	6	0	0	0	5	0	0	7	0	5	6	6	6	6	7	9	6	6	5	6	5		
1 a 3000	0	6	3	0	6	6	0	5	6	0	0	0	0	0	0	6	5	5	6	6	6	5	7	9	6	6	5	6	5		
Penicillium 1:500	5	7	6	0	7	6	5	5	6	0	0	0	5	6	5	7	5	5	6	6	7	6	7	8	12	7	6	6	6	5	
1 a 1000	5	6	4	0	7	6	0	5	6	0	0	0	5	0	0	7	5	5	7	6	7	6	8	12	7	6	6	6	5		
1 a 1500	5	6	4	0	7	6	5	5	6	0	0	0	5	0	5	7	5	0	7	6	7	6	7	8	10	7	6	6	6	5	
1 a 2000	5	5	4	0	6	6	5	0	6	0	0	0	5	0	5	7	0	5	6	6	6	7	7	9	6	6	6	6	5		
1 a 2500	5	5	4	0	0	6	5	0	6	0	0	0	5	0	5	7	0	5	6	6	0	6	7	8	6	6	6	0	5		
1 a 3000	5	5	4	0	0	6	5	5	6	0	0	0	5	0	5	6	5	0	6	6	0	6	6	6	8	6	5	4	0	5	

Rojo (Reacciones Positivas); p (Pseudópodos)



**ANEXO 12**  
**INSECTOS. MEDICIONES EN MILÍMETROS A LOS 15 MINUTOS**

Número de perro	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Cucaracha 1:500	5	5	6	5	6	6	6	6	7	5	4	5	6	5	10	6	7	10	6	6	8	7	7	10	6	11	6	6	6	
1 a 1000	5	5	6	5	6	6	6	6	6	5	5	5	6	5	8	6	6	9	6	6	8	6	5	7	7	6	9	6	6	5
1 a 1500	5	5	6	5	6	6	6	6	6	5	4	5	6	5	8	6	6	8	6	6	6	6	6	7	7	6	9	6	6	5
1 a 2000	5	5	6	5	6	6	5	6	6	5	4	5	6	5	7.5	5	6	7	6	6	6	6	6	7	6	6	9	6	5	5
1 a 2500	5	5	5	5	6	0	5	6	5	5	4	5	5	0	7.5	5	6	7	6	5	6	6	7	6	6	8	6	5	5	5
1 a 3000	0	5	5	0	6	0	5	6	5	0	5	5	5	0	6	5	6	7	6	0	6	7	7	5	5	8	6	5	0	
Hormiga 1:500	5	16p	5	5	7	5	5	6	5	6	5	6	5	5	5	10	6	6	11	5	7	7	7	7	11	7	10	6	6	5
1 a 1000	5	13p	4	5	7	5	5	6	5	6	5	0	5	4	5	9	6	6	8.6	5	7	7	7	7	9	6	8	5	6	5
1 a 1500	5	12p	5	5	6	5	5	5	6	5	5	5	5	5	5	8	5	6	8	5	6	6	7	7	8	6	7	5	6	5
1 a 2000	5	9	5	5	6	5	5	5	6	5	5	4	5	5	8	5	6	7	5	6	6	7	7	7	6	7	0	5	5	
1 a 2500	5	8	5	5	6	5	5	5	5	5	5	5	5	5	7	5	6	7	5	6	5	7	7	6	5	7	5	5	5	
1 a 3000	5	6	5	5	4	5	5	5	5	5	0	0	5	5	6	5	6	6	5	4	5	7	7	6	5	6	5	5	0	
Moaquito 1:500	5	5	5	5	7	6	5	0	6	5	5	0	5	5	5	8	0	5	7	6	7	7	7	6	6	6	7	6	5	5
1 a 1000	5	5	5	5	7	6	5	5	6	5	5	5	5	5	5	8	5	5	7	6	7	6	7	6	6	6	7	6	5	5
1 a 1500	0	5	5	0	6	6	5	5	6	5	0	5	5	5	5	7	5	5	7	6	6	6	6	6	6	6	4	7	6	5
1 a 2000	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	5	7	5	0	6	5	5	6	6	6	6	6	5	7	6	5	0
1 a 2500	5	5	4	5	5	5	5	0	5	5	5	4	4	5	6	0	0	7	5	5	6	5	6	6	5	7	5	5	0	
1 a 3000	5	5	4	5	5	6	5	6	5	5	0	0	4	5	5	5	0	6	6	5	5	7	0	6	0	7	5	5	0	
Pulga 1:500	7	7	6	6	6	6	5	6	7	7	7	6	6	6	6	7	6	5	7	5	7	7	6	7	6	6	6	6	5	5
1 a 1000	7	7	6	6	6	6	5	6	6	6	6	6	6	6	6	7	6	5	6	5	6	7	6	6	6	5	6	6	5	5
1 a 1500	6	6	5	5	5	5	5	5	5	6	6	5	5	5	7	6	5	6	5	6	6	6	6	6	6	5	6	6	5	5
1 a 2000	6	6	0	5	5	0	0	0	5	5	5	4	5	0	7	5	5	5	5	6	6	6	6	6	6	5	6	5	5	0
1 a 2500	5	5	0	0	5	5	0	0	5	5	5	4	5	0	6	5	0	5	5	5	5	5	6	6	6	5	6	5	5	0
1 a 3000	5	5	0	0	0	5	0	0	5	5	5	0	0	0	6	5	4	5	5	4	5	6	5	6	5	5	5	5	5	0

Rojo (Reacciones Positivas); p (Pseudópodos)

**ANEXO 13**  
**INSECTOS. MEDICIONES EN MILÍMETROS A LOS 30 MINUTOS**

Número de perro	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
Cucaracha 1:500	5	5	6	5	6	5	6	5	6	6	0	5	4	5	6	0	10	5	7	10	5	6	8	7	7	10	6	11	6	6	0
1 a 1000	5	5	6	5	6	5	6	5	6	6	0	5	5	0	6	5	8	5	6	9	5	6	8	6	7	7	6	9	6	0	
1 a 1500	5	5	6	5	6	0	5	6	6	0	5	4	0	6	5	8	5	6	8	5	6	6	6	7	7	6	9	6	6	0	
1 a 2000	5	0	6	5	6	6	5	5	6	0	5	4	0	6	5	7.5	4	6	7	0	6	6	5	7	6	6	9	6	5	0	
1 a 2500	5	0	5	5	5	6	0	5	6	0	5	4	0	5	0	7.5	4	6	7	0	5	6	5	7	6	6	8	6	5	0	
1 a 3000	0	0	5	0	6	0	5	6	0	0	5	0	5	0	6	0	6	7	0	0	6	7	7	5	5	8	6	5	0		
Hormiga 1:500	5	16p	5	5	7	4	5	6	5	0	0	6	5	5	5	10	6	6	11	5	7	7	7	7	11	7	10	6	6	5	
1 a 1000	5	13p	4	5	7	5	5	6	5	0	5	0	5	4	5	9	5	6	8.5	5	7	7	7	7	9	6	8	5	6	5	
1 a 1500	5	12p	5	5	6	5	5	5	5	0	5	5	5	5	5	8	5	6	8	5	6	6	7	7	8	6	7	5	6	4	
1 a 2000	5	9	5	5	6	5	5	5	5	0	0	5	0	5	5	8	5	6	7	5	6	6	7	7	7	6	7	0	5	5	
1 a 2500	5	8	5	5	6	0	5	5	5	0	0	5	5	5	5	7	0	6	7	5	6	5	7	7	6	5	7	5	5	5	
1 a 3000	5	6	5	5	4	5	5	5	5	0	5	0	0	5	5	6	5	6	6	5	4	5	7	7	6	5	6	5	5	0	
Mosquito 1:500	5	5	5	5	7	6	5	0	6	0	0	0	5	5	5	8	0	5	7	6	7	7	7	6	6	6	7	6	5	5	
1 a 1000	5	5	5	5	7	6	5	5	6	0	0	5	5	5	5	8	5	5	7	6	7	6	7	6	6	6	6	7	6	5	
1 a 1500	0	5	5	0	6	6	5	5	6	0	0	5	5	5	5	7	4	5	7	6	6	6	6	6	6	4	7	6	5	4	
1 a 2000	5	5	5	5	5	5	5	5	5	0	0	5	4	5	5	7	4	0	6	5	5	6	6	6	6	5	7	6	5	0	
1 a 2500	5	5	4	5	5	5	0	5	0	5	0	5	4	4	5	6	0	0	7	5	5	6	0	6	6	5	7	5	5	0	
1 a 3000	5	5	4	5	5	6	5	5	6	0	0	0	0	4	0	5	4	0	6	6	5	5	7	0	6	0	7	5	5	5	
Pulga 1:500	7	7	6	6	6	5	5	6	7	0	0	6	6	6	6	7	4	5	7	5	7	7	6	7	6	6	6	6	5	5	
1 a 1000	7	7	6	6	6	5	5	6	6	0	0	6	0	6	6	7	4	5	6	5	6	7	6	6	6	5	6	6	5	5	
1 a 1500	6	8	5	5	5	5	5	5	5	0	0	8	0	5	5	7	0	5	6	5	6	6	6	6	6	5	6	6	5	0	
1 a 2000	6	6	0	5	5	5	0	0	0	0	0	5	0	5	0	7	5	5	5	5	5	6	5	6	6	5	6	5	5	0	
1 a 2500	5	5	0	0	5	5	0	0	0	0	0	5	0	5	0	6	5	0	5	5	5	5	5	6	6	5	6	5	5	0	
1 a 3000	5	5	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	6	0	4	5	5	4	5	5	5	6	5	5	5	5	0	

Rojo (Reacciones positivas); p (Pseudópodos)

**ANEXO 14**  
**TESTIGO POSITIVO. HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS**

Perro	Edema	Frag. colag.	Masto	PMN	Mono	Exo	Celularidad
1	M	L	44	45	11	-	M
2	A	L	66	27	7	M	A
3	A	L	31	63	6	-	A
4	A	M	55	41	4	-	A
5	M	L	45	38	17	-	M
6	M	-	36	45	19	M	A
7	A	L	58	28	14	M	M
8	M	L	68	31	1	-	A
9	M	-	28	69	3	-	L
10	A	L	39	47	14	-	A
11	M	L	77	16	7	-	M
12	M	L	57	36	7	-	L
13	M	-	51	35	14	-	M
14	A	L	40	58	2	-	A
15	M	L	43	52	5	-	A
16	A	M	43	53	4	-	M
17	M	-	54	43	3	-	M
18	M	M	32	61	7	-	M
19	A	M	46	51	3	-	A
20	M	-	64	31	5	-	M
21	M	L	59	35	6	-	A
22	A	L	59	33	8	M	A
23	M	L	29	69	2	-	A
24	M	-	48	42	10	-	M
25	M	L	52	38	10	M	A
26	A	M	26	68	6	-	A
27	A	M	50	22	28	-	M
28	A	M	29	71	0	-	A
29	L	-	32	60	8	-	A
30	M	L	53	41	6	-	M

Frag. colag. (fragmentación de fibras de colágena); Masto (mastocitos); PMN (polimorfonucleares); Mono (mononucleares); A (abundante); M (moderado); L (leve); Exo (exocitosis).

**ANEXO 15**  
**TESTIGO NEGATIVO. HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS**

Perro	Edema	Frag. colag	Masto	PMN	Mono	Exo	Celularidad
1	-	-	42	41	17	-	M
2	L	-	63	28	9	-	A
3	M	L	55	34	11	-	A
4	A	L	53	37	10	-	A
5	M	L	54	18	28	-	M
6	M	-	52	26	22	-	L
7	A	-	74	14	12	-	L
8	L	-	67	27	6	-	A
9	M	L	69	27	4	-	L
10	L	-	61	27	12	-	L
11	M	L	77	16	7	-	L
12	L	-	60	13	27	-	L
13	L	-	60	29	11	-	M
14	L	-	59	26	15	-	A
15	L	-	64	34	2	-	L
16	L	-	64	22	14	-	M
17	L	-	64	24	12	-	M
18	L	-	52	13	35	-	M
19	M	-	57	38	5	-	A
20	M	-	54	37	9	-	M
21	L	-	64	28	8	-	A
22	M	L	63	21	16	-	A
23	M	L	53	43	4	-	A
24	L	-	54	32	14	-	M
25	M	L	55	38	7	-	A
26	A	M	22	67	11	-	A
27	L	-	46	25	29	-	M
28	A	M	28	65	7	-	A
29	L	-	52	46	6	-	A
30	L	L	59	34	7	-	M

Frag. colag. (fragmentación de fibras de colágena); Masto (mastocitos); PMN (polimorfonucleares); Mono (mononucleares); A (abundante); M (moderado); L (leve); Exo (exocitosis).

## ANEXO 16

## PÓLENES. HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS

Perro	Polen	Edema	Frag. Colag.	Masto	PMN	Mono	Exo	Celulandad
2	LLanten	A	-	55	32	15	-	A
5	Ambrosia	L	-	59	21	20	-	M
7	Epazote	-	-	48	10	42	-	L
10	Amaranto	M	L	59	16	32	-	A
5	Fresno	L	-	54	40	6	-	M
16	Pasto	L	-	75	25	0	-	M
17	Girasol	L	-	60	16	24	-	M
19	Trueno	A	M	50	41	9	-	A
21	Capriola	L	L	72	23	5	-	M
23	Pirúl	M	L	48	47	5	-	A
27	Hierba	M	L	50	27	23	-	M
29	Mirasol	L	-	70	28	2	-	A

Frag. colag. (fragmentación de fibras de colágena); Masto (mastocitos); PMN (polimorfonucleares); Mono (mononucleares); A (abundante); M (moderado); L (leve); Exo (exocitosis).

## ANEXO-17

## HONGOS. HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS

Perro	Hongo	Edema	Frag. Colag.	Masto	PMN	Mono	Exo	Celularidad
1	<i>Drechslera</i>	L		50	34	16		M
3	<i>Penicillium</i>	M	L	36	62	2	M	A
8	<i>Mucorinea</i>	L		35	65	0		A
13	<i>Aspergillus</i>	L		74	15	11		M
14	<i>Homodendrum</i>	M	L	29	61	10		A
30	<i>Alternaria</i>	L	L	40	50	10		M

Frag. colag. (fragmentación de fibras de colágena); Masto (mastocitos); PMN (polimorfonucleares); Mono (mononucleares); A (abundante); M (moderado); L (leve); Exo (exocitosis).

ANEXO 18

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

AMBIENTALES. HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS

Perro	Alergeno	Edema	Frag. Colag.	Masto	PMN	Mono	Exo	Celularidad
4	Polvo	L	-	50	16	34	L	M
9	Gato	L	-	44	48	8	-	L
12	Algodón	L	-	56	9	34	-	L
18	<i>D. farinae</i>	M	L	32	50	18	M	A
20	Lana	M	-	61	34	5	-	M
25	Perro	M	-	39	51	10	-	A
26	Plumas	A	M	25	66	9	-	A
28	<i>D. ptero</i>	A	L	14	83	3	-	A

Frag. colag. (fragmentación de fibras de colágena); Masto (mastocitos); PMN (polimorfonucleares); Mono (mononucleares); A (abundante); M (moderado); L (leve); Exo (exocitosis).

## ANEXO 19

## INSECTOS. HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS

Perro	Insecto	Edema	Frag. Colag.	Masto	PMN	Mono	Exo	Celularidad
6	Hormiga	M	-	48	45	7	-	L
11	Pulga	L	-	69	18	13	-	L
22	Mosquito	L	-	64	21	15	-	M
24	Cucaracha	L	-	78	18	4	-	M

Frag. colag. (fragmentación de fibras de colágena); Masto (mastocitos); PMN (polimorfonucleares); Mono (mononucleares); A (abundante); M (moderado); L (leve); Exo (exocitosis).



## ANEXO 20

## REACCIONES POSITIVAS. HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS

Perro	Alérgeno	Edema	Frag. Colag.	Masto	PMN	Mono	Exo	Celularidad
16	Pirul	M		52	30	18		M
16	Cucaracha	M		24	59	17		M
16	Hormiga	M	L	62	28	10		M
19	Cucaracha	M	L	36	53	11		A
19	Hormiga	M	L	66	21	13	M	A
25	<i>Mucorinea</i>	A	L	37	51	12		A
25	<i>Alternaria</i>	A	L	52	32	16		A
25	Cucaracha	A	L	35	58	7		A
25	Hormiga	M		64	23	13		M
27	Cucaracha	M		15	83	2		A
27	Hormiga	M	L	15	81	4		A

Frag. colag. (fragmentación de fibras de colágena); Masto (mastocitos); PMN (polimorfonucleares); Mono (mononucleares); A (abundante); M (moderado); L (leve); Exo (exocitosis).