

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**COMPROBACION DE LA EFECTIVIDAD DE SIETE DIFERENTES METODOS
PARA EL CONTEO DE EOSINOFILOS EN SANGRE DE BOVINOS,
EQUINOS Y CANINOS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
Médico Veterinario Zootecnista
P R E S E N T A
Catalina Valencia Velasco

México, D. F.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

" COMPROBACION DE LA EFECTIVIDAD DE SIETE DIFERENTES METODOS
PARA EL CONTEO DE EOSINOFILOS EN SANGRE DE BOVINOS, -
EQUINOS Y CANINOS".

A mis Padres:

JESUS VALENCIA VELAZQUEZ

CATALINA VELASCO DE VALENCIA

Con profundo cariño y agradecimiento
por todo lo que de ellos he recibido
y por su gran ejemplo de unión y
superación.

A mis Hermanos:

Ma. de Lourdes

Jesús

Ma. Eugenia

Arturo

A mi Amiga:

PATRICIA AGUILAR OLVERA

por la sincera y leal amistad

que me ha brindado.

Con agradecimiento:

A la Dra. ALINE S. DE ALUJA

por la ayuda prestada durante
mi estancia en el Departamento
de Patología.

Al M.V.Z.

Fernando Quintana

por la ayuda prestada
para la elaboración de
este trabajo.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio Clínico del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina - Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M. bajo la dirección de los M.V.Z. Armando Garma A., Hedberto Ruíz S. y Fernando Quintana A.

C O N T E N I D O

- I. INTRODUCCION
- II. MATERIAL Y METODOS
- III. RESULTADOS
- IV. DISCUSION
- V. CONCLUSIONES
- VI. RESUMEN

I N T R O D U C C I O N

La aplicación de A.C.T.H., se ha utilizado en humanos (Costello, 1969), y en animales (Martín et al, 1954; - Kaneko et al, 1960), como prueba de funcionamiento - - adrenal. En individuos normales la administración de la hormona estimula a la glándula adrenal a que secrete corticosteroides, lo que provoca la disminución del número de eosinófilos en la sangre, lo cual sirve de - base para poder evaluar la función de la corteza adrenal en base a la cifra de eosinófilos cuya determina-- ción deberá ser lo más exacta posible.

En la actualidad se usan dos métodos para contar los leucocitos eosinófilos: a) el método directo que utiliza un colorante especial y un hemocitómetro y b) el método indirecto en el cual se obtiene la cifra de - - eosinófilos a partir de la cuenta total de leucocitos y el porcentaje de eosinófilos encontrados en el frotis (diferencial).

En general se piensa que el método directo es preferible para determinaciones más rápidas y exactas (Speirs, 1962; Carper & Schalm, 1962; Costello, 1969; Vaughn, - 1952). Esto es debido a que en el método indirecto ade más de error inherente a la cuenta diferencial se agre ga el error del hemocitómetro (Carper & Schalm, 1962).

Para hacer la cuenta de leucocitos eosinófilos con el procedimiento directo, se han utilizado diferentes diluentes (Discombe, 1946; Dunger, 1910; Hinkleman, 1959; Manners, 1957; Mc. Nary 1958; Rud, 1947; y Thorn, 1948).

El presente trabajo se hizo con el fin de comparar los resultados obtenidos por los diferentes métodos directos contra aquellos obtenidos por el método indirecto.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

Se colectaron 5ml. de sange con anticoagulante EDTA-K2 (0.2 mg/ml) de la vena radial o safena de 30 caninos, y de la vena yugular de 30 equinos y 30 bovinos.

Se efectúo una cuenta total y diferencial de leucocitos eosinófilos con el método indirecto descrito por Schalm (1965); y una cuenta total directa de acuerdo con los métodos descritos por Discombe (1959), Dunger (1910), - Hinkleman (1959), Manners (1957), Mc. Nary (1958), Rud (1947), y Thorn (1948); para comparar la exactitud y re produccibilidad de cada uno de los métodos en las diferentes especies en comparación con el método indirecto.

Las formas de los diluentes utilizados fueron las siguientes:

Diluyente según Discombe

Eosina y acuosa 1%.....	5 ml.
Acetona	5 ml.
Agua destilada	90 ml.

Diluyente según Dunger

Eosina acuosa	0.1 g.
Acetona	10 ml.
Agua destilada c.b.p.	100 ml.

Diluyente según Hinkleman

Eosina Y	0.5 g.
Formalina	0.5 ml.
Fenol 95%	0.5 ml.
Agua destilada c.b.p.	100 ml.

Diluyente según Manners

Urea	50 g.
Citrato trisódico	0.06 g.
Floxina	0.1 g.
Agua destilada c.b. p.	100 ml.

Diluyente según Mc. Nary

Púrpura de bromocresol	50 mg.
Agua destilada c.b.p.	100 ml.

Diluyente según Rud

Rojo Magdala.....	0.02 gr.
Acetona	12 ml
Bicarbonato de Sodio al 10%	1 a 2 ml.
Agua destilada	90 ml.

Diluyente según Thorn

Eosina acusa	0.1 g.
Acetona	5 ml.
Agua destilada	95 ml.

Con cada líquido descrito se hizo una dilución 1:20 por medio de una pipeta para leucocitos, se contaron los - 18 mm^2 del hemocitómetro. La cifra final se obtuvo dividiendo la cifra encontrada en el hemocitómetro entre 18 y multiplicándola por 100. Todas las cuentas de eosinófilos fueron hechas dentro de un lapso de media hora.

Con los resultados de las cuentas se calculó un análisis de varianza para comparar los métodos, líneas de regresión, coeficientes de correlación, media y desviación standard; utilizando las instalaciones del Centro de Cómputo de la U. N. A. M.

R E S U L T A D O S

Los resultados obtenidos en el presente trabajo se muestran en las Tablas de la No. 1 a la No. 5

Tabla No. 1.- Se muestra la media y desviación standard para cada método en las tres especies estudiadas.

Tabla No. 2.- Se muestran los análisis de varianza de los diferentes métodos.

Tabla No. 3.- Se muestran los coeficientes de correlación y regresión obtenidos entre los métodos indirecto y directos en Bovinos.

Tabla No. 4.- Se muestran los coeficientes de correlación y regresión obtenidos entre los métodos indirecto y directos en Equinos.

Tabla No. 5.- Se muestran los coeficientes de correlación y regresión obtenidos entre los métodos indirecto y directo en Caninos.

TABLA No. 1

RESULTADOS OBTENIDOS CON SIETE DIFERENTES METODOS PARA CONTAR EOSINOFILOS EN BOVINOS, EQUINOS Y CANINOS.

METODO	BOVINOS		EQUINOS		CANINOS	
	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
DUNGER	318.61	478.30	142.60	91.80	151.93	195.30
HINKLEMAN	324.00	469.90	158.60	134.82	219.80	213.60
Mc. NARY	363.63	503.10	138.93	101.20	162.10	211.22
MANNERS	270.12	400.60	143.80	181.80	123.43	206.70
THORN	118.87	164.02	93.33	70.50	114.80	161.00
RUD	36.70	92.40	64.90	55.40	49.63	67.00
DISCOMBE	283.87	386.04	125.63	73.63	171.93	218.80
EOSINOFILOS	566.60	821.30	327.50	308.00	375.30	394.40

X = MEDIA

σ = DESVIACION STANDARD

T A B L A No. 2

ANALISIS DE VARIANZA DE LOS DATOS OBTENIDOS CON SIETE DIFERENTES METODOS PARA CONTAR EOSINOFILOS EN BOVINOS, EQUINOS Y CANINOS.

ESPECIE	F. CALCULADA	F. TABULADA CON 7-232 G.L. P= 0.05
BOVINOS	3.42*	2.05
EQUINOS	8.24**	2.05
CANINOS	5.47***	2.05

* = DIFERENCIA SIGNIFICATIVA A UNA $P < 0.05$

* = DIFERENCIA SIGNIFICATIVA A UNA $P < 0.05$

* = DIFERENCIA SIGNIFICATIVA A UNA $P < 0.05$

T A B L A No. 3

COEFICIENTE DE CORRELACION Y REGRESION ENTRE
METODOS DIRECTOS E INDIRECTO EN BOVINOS.

METODO	CORRELACION METODO DIRECTO METODO INDIRECTO	ECUACION DE REGRE- SION METODO DIRECTO
DUNGER	0.62	$X = 225.40 + 1.07 Y_1$
HINKLEMAN	0.69	$X = 177.86 + 1.20 Y_2$
Mc. NARY	0.74	$X = 127.06 + 1.21 Y_3$
MANNERS	0.77	$X = 140.09 + 1.58 Y_4$
THORN	0.74	$X = 126.00 + 3.17 Y_5$
RUD	0.18	$X = 508.04 + 1.60 Y_6$
DISCOMBE	0.70	$X = 143.30 + 1.50 Y_7$

X=PREDICION DE NUMERO DE EOSINOFILOS CALCULADOS
POR CONTEO INDIRECTO.

Y_i=No. DE EOSINOFILOS CALCULADOS POR EL IESIMO ME-
TODO.

TABLA No. 4

COEFICIENTE DE CORRELACION Y REGRESION ENTRE METODOS DIRECTOS E INDIRECTO EN EQUINOS.

METODO	CORRELACION METODO INDIRECTO METODO DIRECTO	ECUACION DE REGRESION METODO DIRECTO
DUNGER	0.60	$X = 42.42 + 2.00 Y_1$
HINKLEMAN	0.90	$X = 6.28 + 2.02 Y_2$
Mc. NARY	0.70	$X = 30.02 + 2.14 Y_3$
MANNERS	0.60	$X = 181.18 + 1.02 Y_4$
THORN	0.12	$X = 227.31 + 0.54 Y_5$
RUD	0.02	$X = 320.11 + 0.11 Y_6$
DISCOMBE	0.56	$X = 33.79 + 2.34 Y_7$

X= PREDICCIÓN DE No. DE EOSINOFILOS CALCULADOS POR CONTEO DIRECTO.

Y_i= No. DE EOSINOFILOS CALCULADOS POR EL IESIMO METODO.

TABLA No. 5

COEFICIENTE DE CORRELACION Y REGRESION ENTRE METODOS DIRECTOS E INDIRECTO EN CANINOS.

METODO	CORRELACION METODO INDIRECTO METODO DIRECTO	ECUACION DE REGRESION METODO DIRECTO
DUNGER	0.66	$X = 171.31 + 1.34 Y_1$
HINKLEMAN	0.69	$X = 96.70 + 1.27 Y_2$
Mc. NARY	0.74	$X = 150.85 + 1.38 Y_3$
MANNERS	0.66	$X = 218.78 + 1.27 Y_4$
THORN	0.59	$X = 208.50 + 1.45 Y_5$
RUD	0.71	$X = 166.94 + 4.20 Y_6$
DISCOMBE	0.68	$X = 165.00 + 1.22 Y_7$

X = PREDICCIÓN DE NÚMERO DE EOSINOFILOS CALCULADOS
POR CONTEO INDIRECTO.

Y_i = No. DE EOSINOFILOS CALCULADOS POR EL IESIMO METODO.

D I S C U S I O N

Las alteraciones adrenales primarias son raras en animales domésticos. En general cuando éstas ocurren, son secundarias a otras enfermedades. Las alteraciones, aún cuando son reconocibles en el exámen postmortem no necesariamente originan signos clínicos característicos de mal funcionamiento adrenal. En caninos, la degeneración adrenal es rara, pero cuando aparece puede asociarse con signos clínicos que no siguen el modelo clásico de la enfermedad de Addison. En ca ni no s se ha descrito una hipoplasia cortical congénita.

La inflamación de la corteza adrenal se ha encontrado asociada con edema e hiperemia en animales con enfermedades in fe cc io s a g u d a s. La hipoplasia adrenal se ha encontrado en varias enfermedades crónicas, por ejemplo, piometras. Ninguna de estas condiciones antes mencionadas se encuentran asociadas a trastornos clínicos. El hipercorticismismo adrenal se ha encontrado asociado con tumores de la parte anterior de la hipófisis (generalmente adenomas basofílicos) car ci no m a s a d r e n o c o r t i c a l e s, con un síndrome semejante a la enfermedad de Cushing (Doxey, 1971).

El mal funcionamiento adrenal puede ser investigado a través de la detección de sustancias producidas por la corteza adrenal, o por los cambios relacionados a los efectos de estas sustancias. La corteza adrenal produce esteroides y adrógenos de cuya conjugación en el hígado por medio del ácido glucurónico derivan los 17 cetosteroides y los 17 hidroxicorticoides. Estas sustancias pueden ser detectadas cuantitativamente en orina o plasma para la determinación de alteraciones de las glándulas adrenales, asimismo se utilizan las determinaciones de Na., K., glucosa, número de eosinófilos y linfocitos en sangre.

En años pasados se ha enfocado mucho la atención en la cuenta de eosinófilos y su relación con la función adrenal.

Los estímulos de alarma aplicados a los animales, son seguidos por la disminución en la cuenta eosinófilos circulantes. La tensión libera A.C.T.H., que a su vez estimula la corteza adrenal la cual libera grandes cantidades de hormonas esteroides, los cuales por un meca-

nismo desconocido produce una disminución de eosinófilos (Roche et al, 1950). En la hipofunción adrenocortical se producen pocos esteroides y la tasa de eosinófilos se en cuenta arriba de lo normal.

Thorn et al (1948), describieron una técnica que proporciona datos acerca del estado funcional de la corteza -- adrenal. Esta prueba incluye la cuenta de eosinófilos an tes y cuatro horas después de la aplicación intramuscu-- lar de 25 mg. de A.C.T.H., en el hombre. Tales autores - consideraron que una disminución de eosinófilos en cua- tro horas a menos del 50% del valor inicial evidenciaa ba una función adrenal adecuada (Swanson, 1952). Roche et al (1950) encontraron que una eosinopenia semejante pue- de producirse por la inyección de epinefrina en pequeñas dosis de 0.3 mg. la cual estimula el hipotálamo o a la - hipófosis y secundariamente a la corteza adrenal.

La medición de la disminución de eosinófilos cuatro horas después de la inyección de A.C.T.H., o después de la apli cación de pequeñas dosis de epinefrina, forman las bases de las pruebas de funcionamiento adrenocortical y reserva hipofisiaria adrenocortical respectivamente (Roche et al, 1950).

Fisher & Fisher (1951), al estudiar la cuenta de eosinófilos en individuos normales encontraron variaciones - muy amplias, ellos pensaron que sería difícil usar la prueba de Thorn como indicador de variaciones patológicas. También observaron que con dicha prueba las personas respondían en forma diferente a diferentes tiempos y muchas veces cambiaba del rango "respuesta" a "no respuesta" o viceversa. Ellos encontraron que el ayuno - causa disminución de eosinófilos circulantes y que aún en sujetos sin ayuno estos disminuían antes del medio día y aumentaban en la tarde, consideraron que la prueba de Thorn sería una prueba más sensible de funcionamiento adrenal si ésta se realiza en ayuno, de las 13 horas a las 17 horas.

Bonner & Boston (1952), encontraron pacientes con enfermedad de Addison con curvas de eosinófilos semejantes a las normales.

La composición de los diluentes utilizados en la cuenta directa está basada en las propiedades específicas de - tinción de los gránulos de los eosinófilos y de la relativa mayor resistencia a la lisis de los mismos sobre otros leucocitos y eritrocitos (Speirs, 1952).

Con soluciones hipotónicas de eosina y/o acetona tales como las descritas (Thorn, 1948; Rud, 1947), el número de eosinófilos fue siempre bajo, esto es semejante a lo encontrado por Farrington et al (1953), quienes hallaron - que las cuentas de eosinófilos con estos diluentes deben ser hechas inmediatamente, ya que de otra manera -- éstos se rompen y se fragmentan; también observaron que cuando se dejó la pipeta en reposo durante hora y media se encontró una pérdida hasta del 33% y hasta del 50% - a las tres horas.

En la Tabla No. 1, puede observarse que la tasa media - de la cuenta indirecta fue considerablemente más alta que la obtenida en la cuenta directa con todos los métodos; esto probablemente debido a que los errores asociados con la cuenta indirecta son menores que aquellos obtenidos con el método directo, ya que el error de la pipeta se debe agregar el error del hemocitómetro y el - error técnico. Resultados semejantes han sido obtenidos por Carper & Schalm (1962), lo anterior no está de acuerdo con lo mencionado por Sperirs (1952), quien encontró variaciones en el número celular en el frotis sanguíneo, especialmente cuando las cuentas de eosinófilos son bajas.

Así mismo se encontró que utilizando la técnica de Rud (1957) y Thorn (1948), el número de eosinófilos en todas las especies fue más bajo que con los otros diluentes (Tabla No. 1), esto posiblemente sea debido al efecto lítico que tienen las soluciones hipotónicas con acetona y/o carbonato de sodio; esto está de acuerdo con lo reportado por Farrington et al (1953), quienes encontraron que ninguno de los métodos usados para humanos ha probado ser completamente satisfactorio para contarar eosinófilos en perros.

C O N C L U S I O N E S

En este trabajo se encontró que bajo un análisis de varianza existe significación estadística entre los métodos a una $P > 0.05$ (Tabla No. 2).

Para BOVINOS se encontró que el método de MANNERS es el que tiene mayor asociación con el conteo por el método indirecto:

$$r = 0.77$$

siendo el que se podría recomendar como sustituto al método indirecto, utilizando como ecuación de predicción:

$$X = 140.09 + 1.58 Y_4$$

Para EQUINOS el método de HINKLEMAN fue el que tuvo mayor asociación con el método indirecto:

$$r = 0.90$$

siendo el que podría recomendarse como sustituto de dicho método utilizando como ecuación de predicción:

$$X = 6.82 + 2.02 Y_2$$

Para CANINOS, el método con mayor asociación y que es recomendable su uso en substitución del método indirecto, - es en este caso el de Mc. NARY:

$$r = 0.74$$

con una ecuación de predicción de número de eosinófilos -
dada por:

$$X = 150.85 + 1.38 \cdot Y_3$$

R E S U M E N

- 1.- Se practicaron determinaciones de cifra total de eosinófilos en tres diferentes especies, por siete diferentes métodos directos: (Discombe, 1946; Dunger, 1910; Hinkleman, 1939; Manners 1951; - - Mc. Nary, 1958; Rud, 1947; y Thorn, 1948). Así mismo se compararon éstos contra un método indirecto (Schalm, 1965).
- 2.- Se observó que todos los métodos dan resultados diferentes y, que por lo tanto no se pueden usar indistintamente.
- 3.- Se encontró una ecuación de regresión que permite comparar resultados obtenidos con cualquiera de los métodos directos con el método indirecto.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Bonner, C. D; Boston, M.D. ; 1952. Eosinophil levels as an index of adrenal responsiveness (Factors that affect value of Eosinophil counts). J.A.M.A. 148 (8); 634-637.
- 2.- Burroughs Corporation; 1974. Burroughs Advanced - - Statistical Inquiry System. Burroughs Corporation; - Detroit, Michigan.
- 3.- Carper, H.A.; Schalm, O.W.; 1962. A comparación of - the direct and indirect methods for estimation of -- eosinophil numbers in blood. The Calif. Vet. 16: 16.
- 4.- Costello, T.; Ronald.; 1970. A Unopette for Eosino- phil counts. Amer J. Clin Path. 54 (2): 249-250.
- 5.- Dunger R.; 1910. Eine Einfache Methode der Zahleingder eosinophilen Leukozyten und der praktische wert - - dieser untersuchung munchen med. Wchnschr. 57:1942.
- 6.- Farrington E. M; Jetter W.W.; 1953. An Improved - - straining solution for counting eosinophils in dogs. Amer J. Clin. Path. 23:836.

- 7.- Fisher, B.; Fisher E.R.; 1957. Observations of the eosinophil count in man; Proposed test of adrenal cortical function. Am. Jour. of Med. Science.
- 8.- Kaneko J. J.; 1960. A Screening test for adrenocortical insufficiency. Calf. Vet. 13 (5): 24.
- 9.- Manners T.; 1951. A new diluting fluid for the eosinophil count. Brit. Med. J. 2: 1429.
- 10.- Martin J. E; Skillen R.C.; Deublen M.J.; 1952. The action of adrenocorticotrophic hormone on circulating eosinophils in dogs.- A proposed screening Method for Evaluating Adrenal Cortical Function. A.J. Vet. Res. - 15 (57): 489.
- 11.- Midway W.; Prier J. E.; Wilkinson J.S.; 1969. Veterinary Clinical Pathology. The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- 12.- Mc. Nary, W.F.; 1958. A new diluting fluid for eosinophil, using Bromocresolepurple. Am. J. Clin. Path 30: 373-374.
- 13.- Ostle B.; 1973. Estadística Aplicada. Editorial Limuza Wiley, S.A., México.
- 14.- Roche, M.; Thorn G.W; & Hisls, A.C. 1950. The levels

- of circulating eosinophils and their response to A.C.T.H. in surgery. *Journal of Medicine* 249 (9) 307-314.
- 15.- Rud F.; 1947. The eosinophil count in health and mental disease. *Acta et Neural Suppl* 40: 443.
- 16.- Schalm O.W.; 1965. *Veterinary Hematology*. Lea & Febiger. Philadelphia.
- 17.- Speirs R.S.; 1952. The principles of Eosinophil diluents. *Blood* 7: 550-554.
- 18.- Swanson N.J.; Bauer W.M.; & Ropes M.; 1952. The evaluation of eosinophil count. *The Lancet* I : 129-132.
- 19.- Thorn G.W.; Forsham P.H.; Pruenty F.T.; Hills, A. G.; 1948. Test for Adrenal Cortical insufficiency; response to pituitary adrenocorticotrophic hormone. *J.A.M.A.* 137:1005.
- 20.- Vaughn J.; 1952. The function of eosinophile leukocyte. *Blood* 8: 1-15.