ELISEO DE BUEN LOZANO

**COLORACION
CON SOLUCION ACUOSA
DE EOSINA DESECADA
PARA EL RECUESTO
DE EOSINOFILOS**

DESDE HACE algunos años, y después de una serie de estudios destinados a obtener un buen método de colorante en seco para el recuento directo de eosinófilos, empleamos en el laboratorio de análisis clínico de Benéfica Hispana, por sus buenos resultados, uno cuyo fundamento consiste en desecar 6 gotas de solución de eosina al 1 por ciento en alcohol etílico absoluto. Este procedimiento tiene la ventaja de conservar el colorante indefinidamente una vez desecado en los tubos.

En la actualidad se nos ocurrió ensayar soluciones acuosas de eosina al 1 por ciento y disminuir el número de gotas a 2, en lugar de 6, como hacíamos antes con la solución alcohólica de eosina. Con esta finalidad hemos hecho el estudio siguiente:

Preparamos dos soluciones de eosina al 1 por ciento, empleando como disolventes alcohol etílico absoluto en una (testigo), y agua destilada en la otra (problema).

En una serie de cien tubos de 10 X 75 mm., echamos 6 gotas de la solución alcohólica de eosina antes preparada, que se deja secar a la temperatura ambiente (tubos testigos).

En otros cien tubos del mismo tamaño a los anteriores, echamos 2 gotas de la solución acuosa de eosina al 1 por ciento, que desecamos al horno (tubos problema).

Obtenemos sangre total por punción venosa, recibéndola en un tubo con anticoagulante.

Jefe del Laboratorio de Análisis Clínico de Benéfica Hispana. Técnico del Laboratorio de Análisis Clínico del Sanatorio Español. Oficial Sanitario de la Escuela Nacional de Sanidad de Madrid. Antiguo Director del Instituto Antipalúdico y de Higiene Rural de Navalmoral de la Mata (España).

ESTUDIO DE SOLUCIONES DESECADAS DE EOSINA PARA LA COLORACIÓN DE EOSINÓFILOS

	A	B		A	B		
	(Solución acuosa desecada)	(Solución alcohólica desecada)	A—B	(Solución acuosa desecada)	(Solución alcohólica desecada)	A—B	
1	6	4		51	13	13	0
2	18	21	—	52	10	7	3
3	4	3		53	8	5	3
4	8	10	—	54	4	5	— 1
5	7	5		55	15	20	— 5
6	30	30		56	28	21	7
7	7	6		57	26	25	1
8	15	12		58	8	5	3
9	14	17	—	59	11	7	4
10	6	4		60	17	21	— 4
11	9	4		61	99	80	19
12	36	29		62	10	6	4
13	33	37	—	63	21	21	0
14	22	25	—	64	25	20	5
15	6	5		65	9	5	4
16	3	3		66	136	124	12
17	10	4		67	15	15	0
18	38	30		68	12	11	1
19	2	2		69	36	38	— 2
20	10	11	—	70	10	13	— 3
21	6	4		71	11	7	4
22	22	24	—	72	8	11	— 3
23	45	48	—	73	1	1	0
24	11	8		74	8	5	3
25	8	9	—	75	15	11	4
26	24	22		76	2	4	— 2
27	9	12	—	77	4	6	— 2
28	15	17	—	78	19	23	— 4
29	25	20		79	4	1	3
30	13	13		80	16	19	— 3
31	15	15		81	15	14	1
32	50	45		82	11	8	3
33	17	21	—	83	16	11	5
34	24	20		84	7	6	1
35	5	4		85	2	1	1
36	14	16	—	86	7	6	1
37	13	13		87	5	5	0

ESTUDIO DE SOLUCIONES DESECADAS DE EOSINA PARA LA COLORACIÓN DE EOSINÓFILOS

	A	B		A	B		
	(Solución acuosa desezada)	(Solución alcohólica desezada)	A—B	(Solución acuosa desezada)	(Solución alcohólica desezada)	A—B	
38	12	10	2	88	16	20	— 4
39	10	8	2	89	23	25	— 2
40	8	6	2	90	6	2	4
41	68	67	1	91	5	3	2
42	9	12	— 3	92	16	14	2
43	6	4	2	93	7	6	1
44	22	18	4	94	18	18	0
45	33	31	2	95	26	30	— 4
46	54	57	— 3	96	19	14	5
47	5	3	2	97	9	6	3
48	37	23	14	98	54	60	— 6
49	11	9	2	99	28	31	— 3
50	12	17	— 5	100	36	33	3

Para hacer el estudio ponemos 10 gotas de la sangre obtenida en un tubo con solución alcohólica desecada de eosina (tubo testigo), y 8 gotas de la misma sangre en otro tubo con solución acuosa desecada de eosina (tubo problema).

Los dos tubos testigo y problema, correspondientes a cada una de las sangres estudiadas, se mantienen en posición vertical en una gradilla durante 10 minutos a la temperatura ambiente, agitándolos de cuando en cuando.

Transcurridos los 10 minutos, se agitan los tubos durante un minuto para mezclar bien, y se aspira la sangre ya coloreada en una pipeta para recuento de leucocitos hasta la señal 1, y después se aspira agua destilada hasta la señal 11; es decir, para obtener una solución acuosa al 1:10 de la sangre coloreada.

Los eritrocitos se hemolizan con gran rapidez —en escasos minutos— y entonces, imprimiendo movimientos de rotación a las pipetas durante un minuto para obtener una buena suspensión de leucocitos y despreciando las 4 primeras gotas que se expulsan de la pipeta, se llena una cámara cuentaglobulos doble de Neubauer y se hace el recuento de eosinófilos en el microscopio, empleando objetivo seco débil con abundante iluminación.

Tanto en los testigos como en los problemas se cuentan los eosinófilos existentes en una cuadrícula completa, o sea 9 cuadrados grandes, y no hacemos el cálculo para deducir los existentes en un mm. cúbico.

Los resultados del recuento de eosinófilos vienen expresados en la tabla adjunta, donde podemos ver, que en el 57 por ciento de los estudios efectuados, las cifras son más altas empleando solución acuosa de eosina desecada; en el 12 por ciento los resultados son iguales para ambas soluciones alcohólicas y acuosa, y solamente en un 31 por ciento se obtienen cifras más altas empleando la solución alcohólica desecada de eosina. Los resultados positivos de la diferencia A-B (ver tabla) oscilan entre 1 y 19, dominando más (14 veces) las de 2 y siendo la cifra media 3.6; pero, si despreciamos las diferencias cuyos valores sean más de 10, por considerarlas probables errores debidos a una distribución no homogénea de los eosinófilos, resulta solamente una media aritmética de 3 aproximadamente (exacta 2.8). Las diferencias negativas de A-B oscilan entre -1 y -6 , siendo la media -3 aproximadamente (exacta -2.9). Por tanto, aunque en un mayor número de observaciones las cifras obtenidas son más altas en los recuentos hechos empleando solución acuosa desecada de eosina y viendo que las oscilaciones medias (3 y -3) de las diferencias son iguales, tanto para la solución acuosa como para la alcohólica, podemos decir, que con los dos métodos se pueden obtener los mismos resultados, ya que una media aritmética de 3 ó -3 en las diferencias puede considerarse como un error aceptable en el recuento de eosinófilos y más teniendo en cuenta la tendencia de estas células a agruparse.

La solución acuosa de eosina tiene la ventaja de que siempre podemos disponer de agua, aunque no sea precisamente destilada, más que de alcohol etílico absoluto, y además, porque resaltan mejor los eosinófilos en el campo microscópico.

Por el resultado obtenido de este estudio, recomendamos seguir para el recuento directo de eosinófilos la siguiente técnica:

Preparar una solución al 1 por ciento de eosina en agua destilada, que se colocará en un gotero, con preferencia color ámbar.

De la solución que guardamos en el gotero se echan 2 gotas en el fondo de cada uno de una serie de tubos aproximadamente de 10 X 75 mm. (pueden emplearse otros recipientes), que colocados en un soporte en posición vertical, se llevan al horno para desecar las dos gotas de solución de eosina que contienen.

Una vez seca la solución acuosa de eosina contenida en el fondo de

los tubos, se tapan con un tapón cualquiera (algodón, caucho, corcho, plástico, etc.) guardándolos así sin que penetre el polvo en ellos y de esta forma tenerlos dispuestos para su uso.

De la sangre del paciente hecha incoagulable que queremos hacer el recuento directo de eosinófilos, se echan 8 gotas en el fondo de uno de los tubos con solución acuosa desecada de eosina.

Se mezcla bien la sangre del paciente con el colorante, y se deja el tubo en posición vertical durante 10 minutos, agitando suavemente de cuando en cuando.

Transcurridos los 10 minutos, se aspira la sangre ya coloreada en una pipeta para recuento de leucocitos hasta la señal 1, completando posteriormente con agua destilada hasta la marca 11 de la misma pipeta cuenta glóbulos; es decir, se hace una dilución al 1:10.

Cuando se hemolizan los eritrocitos de la sangre contenida en la pipeta cuentaglóbulos, para lo cual solamente son necesarios 1 a 2 minutos, y después de mezclar bien imprimiendo movimientos rotatorios a la pipeta, se llena una cámara doble de Neubauer despreciando las dos primeras gotas que salen por la pipeta cuentaglóbulos y esperamos unos minutos para que sedimenten los leucocitos.

Ya sedimentados los leucocitos, se lleva la cámara de Neubauer al microscopio y examinando con objetivo seco débil, con abundante iluminación, se cuentan los eosinófilos en toda una cuadrícula, o sea 9 cuadrados grandes, más un cuadrado grande de la otra cuadrícula. De esta forma se cuentan diez cuadrados grandes de un mm., y como la altura entre el porte y la cuadrícula es de un décimo de mm., es como si hubiéramos contado en un mm. cúbico; pero como hemos diluido la sangre al 1:10, será suficiente multiplicar por 10 el número obtenido en los 10 cuadrados grandes para tener la cantidad de eosinófilos correspondientes a un mm. cúbico de la sangre en estudio. Es decir, a la cantidad obtenida de eosinófilos en 10 cuadrados grandes de la cámara doble de Neubauer se le agrega un cero y así tenemos el número de eosinófilos por mm. cúbico de sangre.

Los eosinófilos resaltan perfectamente por su color rojo brillante, porque la iluminación intensa hace que se borre la imagen de los otros leucocitos que toman color rosa pálido. No es necesario emplear filtro verde.

Cuando no podamos disponer de un horno o algo semejante para desecar la solución acuosa de eosina, podemos disolverla al 1 por ciento en alcohol etílico absoluto y dejar que se seque a la temperatura ambiente

y después poner en cada tubo 6 gotas de la solución de colorante, en lugar de 2 como se hace con la solución acuosa. Para la solución alcohólica desecada hay que poner en cada tubo 10 gotas de sangre del paciente hecha incoagulable.

RESUMEN

Se estudia un nuevo método de coloración para recuento directo de eosinófilos con solución desecada de eosina al 1 por ciento en agua destilada, comparando los resultados con solución alcohólica del mismo colorante también al 1 por ciento y desecada, técnica ya empleada por el autor desde hace años. Aun siendo los resultados semejantes en ambos procedimientos, se recomienda el de solución acuosa por colorear algo mejor los eosinófilos y creerlo más práctico.