

# Determinación de la estabilidad de linfocitos T con variables de tiempo y temperatura a través de citometría de flujo en el laboratorio Synlab 2021

Determination of the stability of T-lymphocytes with time and temperature variables through flow cytometry in the Synlab 2021 laboratory

Hurtado LJ<sup>1</sup>, Jaramillo P<sup>2</sup>, Vanegas JM<sup>3</sup>, Rojas M<sup>4</sup>, Tamayo G<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro Especializado de Patología Oncohematológica, Laboratorio Clínico Synlab SAS, Medellín-Colombia

<sup>2</sup> Universidad de Antioquia, Medellín-Colombia

<sup>3</sup> Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín-Colombia

<sup>4</sup> Instituto de Investigaciones Médicas, Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética (GICIG).

johana.hurtado@udea.edu.co

Fecha recepción: 18/7/2022

Fecha aprobación: 21/12/2022



ARTÍCULO ORIGINAL

HEMATOLOGÍA

Volumen 26 n° 3: 20-27

Septiembre - Diciembre 2022

**Palabras claves:** viabilidad, citometría, linfocitos T, temperatura.

**Keywords:** viability, cytometry, T lymphocytes, temperature.

## Resumen

**Introducción:** la cuantificación de subconjuntos de linfocitos T se realiza de manera rutinaria en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (VIH) por citometría de flujo, con el fin de estadificar la infección y la respuesta a la terapia antirretroviral. Aunque algunas casas comerciales sugieren procesar las muestras en un período de 48 horas a 20-25 °C, no hay consenso acerca de las condiciones de tiempo y temperatura en las cuales no hay afectación de los linfocitos T. **Materiales y métodos:** se evaluaron 50 muestras de sangre total con anticoagulante EDTA, provenientes del área metropolitana de Medellín. Cada una fue expuesta bajo condiciones de temperatura y tiempo de conservación antes de su procesamiento. Los puntos de tiempo incluyeron < 12 horas (muestra inicial), 24, 48, 72, 96 y

120 horas. Y a temperatura ambiente (20-25 °C) y refrigeración (4-8°). **Resultados:** variables como la temperatura y el tiempo influyen en los recuentos de las diferentes subpoblaciones linfocitarias; son más críticos los efectos de la temperatura ambiente sobre el recuento y demás variables, que el paso del tiempo. La expresión CD4 fue el marcador más estable; por cada día que se evaluó se redujo 0.08 cél/μl y no fue estadísticamente significativo (IC 95%: 0.10-0.01; p = 0.104). El marcador CD45, presentó mayor reducción en el recuento absoluto. Con el paso de los días, en promedio, disminuyeron 0.53 cél/μl, dato que fue estadísticamente significativo (IC 95%: -0.97-0.09; p = 0.016). Respecto a la viabilidad evaluada en los linfocitos totales, ésta permaneció alta a temperatura de 4-8 °C durante 96 horas, con una mediana de 72.7%.

## Abstract

**Introduction:** quantification of T-lymphocyte subsets is routinely performed in patients with acquired immunodeficiency syndrome (HIV) by flow cytometry, in order to stage infection and response to antiretroviral therapy. Although some commercial houses suggest processing the samples in a period of 48 hours at 20-25 °C, there is no consensus about the conditions of time and temperature in which the T lymphocytes are not affected. **Materials and methods:** fifty whole blood samples with EDTA anticoagulant from the Medellín metropolitan area were evaluated. Each one was exposed under conditions of temperature and storage time before processing. Time points included < 12 hours (initial sample), 24, 48, 72, 96 and 120 hours. And at room temperature (20-25 °C) and refrigeration (4-8 °C). **Results:** variables such as temperature and time influence the counts of the different lymphocyte subpopulations; the effects of ambient temperature on the count and other variables are more critical than the passage of time. CD4 expression was the most stable marker; For each day that was evaluated, it was reduced by 0.08 cells/ $\mu$ l and it was not statistically significant (95% CI: 0.10-0.01;  $p = 0.104$ ). The CD45 marker presented a greater reduction in the absolute count. Over the days, on average, 0.53 cells/ $\mu$ l decreased, a fact that was statistically significant (95% CI: -0.97-0.09;  $p = 0.016$ ). Regarding the viability evaluated in total lymphocytes, it remained high at a temperature of 4-8 °C for 96 hours, with a median of 72.7%

## Introducción

Los linfocitos T son un grupo heterogéneo de células específicas para el reconocimiento de antígenos<sup>(1)</sup>. Dado su papel determinante en el establecimiento de las respuestas adaptativas de la respuesta inmune, su recuento es de gran importancia en enfermedades que se caracterizan por alteraciones en su número y frecuencia, como en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (VIH). Con la citometría de flujo (CMF) se estima el número de células CD4, parámetro crítico útil para estadificar la infección y guiar la toma de decisiones en cuanto a la conducta clínica a seguir<sup>(2)</sup>. Uno de los puntos críticos de la fase preanalítica de la CMF es el tiempo que transcurre desde la toma de la muestra hasta su procesamiento y la temperatura a la que esté expuesta, debido a que las muestras se remiten a laboratorios de referencia

desde otros lugares<sup>(3)</sup>. La casa comercial recomienda realizar la tinción de las muestras en un plazo de 48 horas<sup>(4)</sup>, mientras que otros proveedores aconsejan analizar las muestras a las 24 horas<sup>(5)</sup>, autores como Glencross, et al.<sup>(6)</sup> indican que utilizar estrategias de análisis citométrico, como el “*panleucogating*”, facilita la medición precisa de CD4, incluso después de la pérdida de las propiedades de dispersión directa, hasta cinco días luego de flebotomía.

La pérdida de estabilidad se traduce en cambios de expresión de los marcadores, lo cual ocasiona alteraciones en los resultados que pueden conducir a imprecisiones o fallos en las decisiones clínicas<sup>(7)</sup>. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la estabilidad de los linfocitos T CD45, CD3, CD4 y CD8 en diferentes condiciones de temperatura y tiempo.

## Materiales y métodos

### Población

Se evaluaron 50 muestras de sangre periférica con anticoagulante EDTA, provenientes del área metropolitana de Medellín durante el año 2021, que tenían solicitud para el recuento de linfocitos T CD3, CD8, CD45 y CD4, y cuyo tiempo de toma de muestra fuera menor a 12 horas. El procesamiento se desarrolló en el laboratorio Synlab SAS. Las 50 muestras correspondieron a 36 pacientes con diagnóstico previo de VIH (carga viral por PCR tiempo real) y 14 pacientes que no contaban con datos de carga viral en la institución. Cada muestra se evaluó en 6 momentos en el tiempo (< 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas) y en dos temperaturas (4-8 °C y 20-25 °C), para un total de 550 mediciones de linfocitos T, para esto se realizaron 10 alícuotas con 250  $\mu$ l de sangre total con EDTA, en tubos plásticos Eppendorf de 1.5 ml. Este proyecto cuenta con el aval de la institución, no hubo contacto directo con el participante, ni se tomó información sensible de su historia clínica, ni datos personales que puedan identificar al paciente, por lo tanto, se respetaron los principios de confidencialidad y la custodia de datos sensibles. Asimismo la institución, en el consentimiento informado que aplica a todo paciente que se realiza un examen, contempla lo establecido en la Ley Colombiana 1581 de 2012, sobre la protección de datos, por lo tanto, el compromiso con la institución fue de uso exclusivo para esta investigación científica que sólo implica un estudio de calidad de muestra y no incluye estudios

genéticos, ni modificaciones a la muestra de otro uso.

### Cuantificación de linfocitos T CD3, CD8, CD45 y CD4

Para la cuantificación de los linfocitos T CD3, CD8, CD45 y CD4 se realizó el siguiente procedimiento: se depositaron 50 µl en los tubos BD Truocunt. Luego se adicionaron 20 µl del reactivo BD multitest, que contiene anticuerpos monoclonales marcados con diferentes fluorocromos: anti-CD3 con FITC clon SK7, anti-CD8 marcado con PE clon SK1, anti-CD45 con PerCP clon 2D1 y CD4 marcado con APC clon SK3 y se analizó por el citómetro de flujo BD FACSLyric™, utilizando el programa BD facs clinical.

### Viabilidad de linfocitos T totales

Se utilizó un tubo de poliestireno, se dispensaron 50 µl de la muestra por pipeteo inverso y se adicionaron 5 µl de CD45 FITC y 5 µl del reactivo de viabilidad actinomicina D (7AAD), luego fue analizado en el citómetro BD FACSLyric™, utilizando el programa BD facs suite.

Se realizó la evaluación de dos niveles de control CD check plus, el cual es un control de sangre completo, con análisis de valores (absolutos y relativos) de linfocitos T CD45, CD3, CD4 y CD8, disponible en dos niveles clínicamente relevantes de células CD4<sup>+</sup>(8). Además, el laboratorio cuenta con el control externo del Colegio Americano de Patólogos (CAP), que aprueba de manera satisfactoria.

### Análisis estadístico

Todas las variables cuantitativas fueron expresadas con la mediana y el rango intercuartil, las diferencias en la mediana de los recuentos absolutos de CD45, CD4, CD8 y CD3 en el tiempo, fueron comparadas con la prueba de rango de Wilcoxon para muestras pareadas. Se analizó cada una de las temperaturas evaluadas (ambiente 20-25 °C y refrigeración 4-8 °C). Por otro lado, y con el fin de comparar el efecto independiente de las variables de tiempo y temperatura en los desenlaces de interés (viabilidad de los linfocitos T totales, recuento de valores absolutos, e intensidad media de fluorescencia de los linfocitos T CD45, CD4, CD8 y CD3), se utilizó un modelo de ecuaciones de estimación generalizada (GEE, del inglés *generalized estimating equations*).

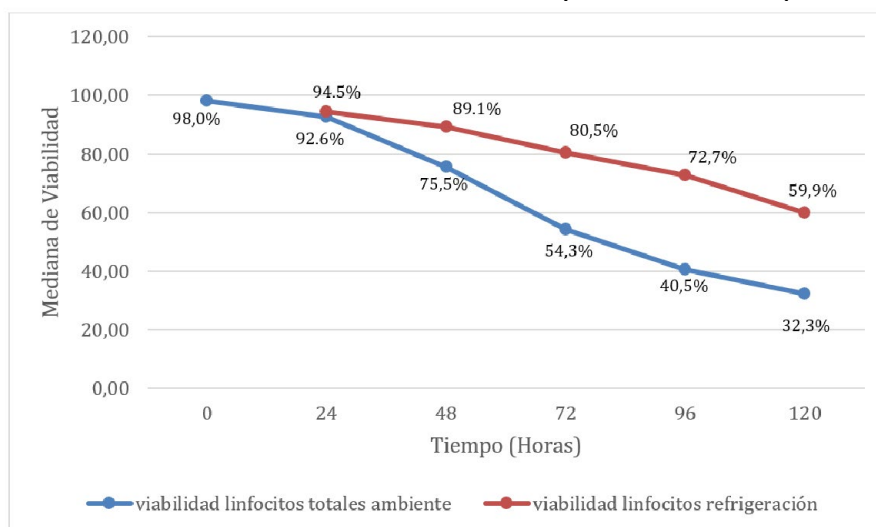
### Resultados

De 50 muestras estudiadas, la mayoría correspondió a hombres (80%; n = 40), con una mediana de edad de 34 años (RIC: 26-39).

### Viabilidad de linfocitos T totales

En la observación de la viabilidad de linfocitos totales con CD45 FITC y 7AAD se encontró que los resultados de las medianas son mayores a temperatura de refrigeración (Figura 1). Dicha viabilidad disminuye, en promedio, 0.51% por cada día que pasa según el modelo GEE (Tabla 2). Respecto a la temperatura, se evidenció mayor reducción a temperatura ambiente, con 22.24 % (IC 95%: -22.24 a -20.05; p < 0.001) (Tabla 1).

**Figura 1.** Medianas de la viabilidad de linfocitos a temperatura ambiente y de refrigeración.



### Recuento absoluto de linfocitos totales

A temperatura ambiente (20-25 °C), la mediana de la medición basal (< 12 horas) del recuento absoluto de CD45 fue de 1727 cél/μl y disminuyó a medida que pasó el tiempo (Figura 2), con una mediana de 1564.5 cél/μl a las 120 horas y una pérdida de 9.4% de células (Tabla 2). Por su parte, a 4 °C se observó un ligero incremento del recuento a las 48 horas, con una mediana de 1840 cél/μl confrontado con la medición basal, que luego disminuyó a las 72 horas

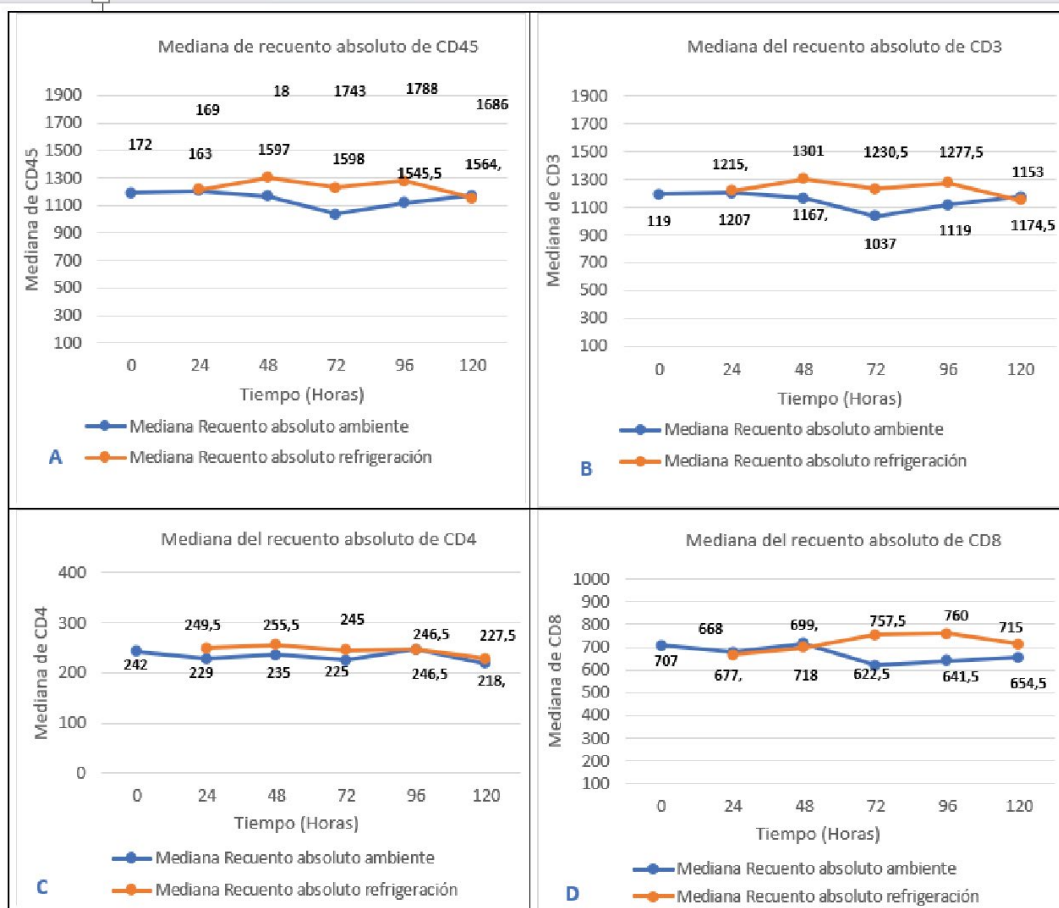
(Tabla 2). Los resultados obtenidos por el modelo GEE evidenciaron asociación estadísticamente significativa entre el tiempo y el recuento de linfocitos totales. De esta manera, por cada día que la muestra fue almacenada, hubo una reducción en promedio de 0.53 cél/μl (IC 95%: -0.97 a -0.09, p = 0.016) independiente de la temperatura. Además, el marcador CD45 presentó mayor reducción del recuento absoluto a temperatura ambiente, en comparación con los demás anticuerpos evaluados (Tabla 3).

**Tabla 1.** Modelo GEE con un intervalo de confianza del 95 % y valor de p de la mediana de viabilidad de linfocitos totales evaluados en un período de tiempo (basal, 24, 48, 72, 96 y 120 horas) a temperatura ambiente y de refrigeración

Variables	Coficiente ajustado	Intervalo de confianza 95%		Valor p
Tiempo	-0.51 <sup>a</sup>	-0.54	-0.48	<0.001*
Temperatura	-22.24 <sup>b</sup>	-24.44	-20.05	<0.001*

a Coeficiente ajustado por la temperatura \*valores de p estadísticamente significativo  
b Coeficiente ajustado por el tiempo.

**Figura 2.** Medianas del recuento absoluto de los linfocitos T CD45 (panel A), CD3 (panel B) CD4 (panel C) y CD8 (panel D), en relación con el tiempo (0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas) a temperatura ambiente y refrigeración



**Tabla 2.** Prueba de rango de Wilcoxon para medianas del recuento de linfocitos T CD45, CD3, CD4 y CD8 en relación con el tiempo (basal, 24, 48, 72, 96 y 120 horas) y en cada una de las temperaturas evaluadas (4 °C y 25 °C)

Recuentos absolutos						
Marcador	Tiempo (Horas n=50)	Mediana recuento absoluto ambiente (20-25 °C)	% de pérdida +	Mediana recuento absoluto refrigeración (4-8 °C)	% de pérdida+	Valor de p
CD45	0(n=50)	1727				
	24(n=50)	1638.5	5.2	1690	2.1	0.119
	48(n=50)	1597	7.5	1840	6.5	0.004
	72(n=50)	1598.5	7.4	1743.5	0.9	<0.001
	96(n=50)	1545.5	10.4	1788	3.5	<0.001
	120(n=50)	1564.5	9.4	1686	2.3	<0.001
CD3	0(n=50)	1196				
	24(n=50)	1207	0.91	1215.5	1.6	0.005
	48(n=50)	1167.5	2.4	1301	8.7	<0.001
	72(n=50)	1037	13.4	1230.5	2.8	<0.001
	96(n=50)	1119.5	6.3	1277.5	6.8	<0.001
	120(n=50)	1174.5	1.79	1153	3.5	<0.001
CD4	0(n=50)	242				
	24(n=50)	229	5.31	249.5	3.0	0.087
	48(n=50)	235.5	2.6	255.5	5.5	<0.001
	72(n=50)	225	7.0	245	1.2	<0.001
	96(n=50)	246.5	1.8	246.5	1.8	<0.001
	120(n=50)	218.5	9.7	227.5	5.9	0.013
CD8	0(n=50)	707				
	24(n=50)	677.5	4.1	668	5.5	0.007
	48(n=50)	718	1.5	699.5	1.0	0.001
	72(n=50)	622.5	11.9	757.5	7.1	<0.001
	96(n=50)	641.5	9.2	760	7.4	<0.001
	120(n=50)	654.5	7.4	715	1.1	<0.001

Valores de p resaltados en negrilla.

+ Porcentaje de pérdida; resultado de la diferencia del valor absoluto de cada marcador evaluado en el tiempo, comparado con la medición basal a temperatura ambiente.

### Efecto del tiempo y la temperatura en el recuento de linfocitos T CD3+

En general se observó reducción en el tiempo del recuento absoluto de linfocitos T CD3+ tanto a temperatura ambiente como de refrigeración (Figura 2). A temperatura ambiente mostró un ligero aumento en la expresión de la mediana de CD3 a las 24 horas (1207 cél/ µl), respecto a la medición inicial (1196 cél/µl) (Tabla 3). Luego disminuyó en los tiempos

subsecuentes, en comparación con la temperatura de 4 °C, en cuyo caso dicho incremento fue hasta las 48 horas (1301 cél/µl) (Tabla 3). En cuanto al modelo GEE, se observó que por cada día que pasó, en promedio disminuyeron 0.24 cél/µl, cifra que no es estadísticamente significativa (IC 95%: -0.58 a 0.09; p = 0.163) (Tabla 4), mientras que cuando las muestras se almacenaron a temperatura ambiente se redujo a 98.9 cél/µl (Tabla 4).

**Tabla 3.** Modelo GEE con un intervalo de confianza del 95% y valor de p de la mediana del recuento absoluto de de linfocitos T CD45, CD3, CD4 y CD8 evaluados en un período de tiempo (basal, 24, 48, 72, 96 y 120 horas) a temperatura ambiente y de refrigeración

Variable	Coefficiente ajustado	Intervalo de confianza		Valor de p
<b>Recuento absoluto CD45</b>				
Tiempo	-0.53	-0.97	-0.09	0.016
Temperatura	-123.55	-162.80	-162.80	<0.001
<b>Recuento absoluto de CD3</b>				
Tiempo	-0.24	-0.58	0.09	0.163
Temperatura	-98.97	-131.19	-66.74	<0.001
<b>Recuento absoluto de CD4</b>				
Tiempo	-0.08	-0.19	0.01	0.104
Temperatura	-25.90	-36.75	-15.05	<0.001
<b>Recuento absoluto de CD8</b>				
Tiempo	-0.16	-0.41	0.08	0.186
Temperatura	-61.62	-84.10	-39.13	<0.001
<b>Recuento relativo de CD3</b>				
Tiempo	0.010	0.005	0.016	<0.001
Temperatura	-0.33	-0.72	0.06	<b>0.100</b>
<b>Recuento relativo de CD4</b>				
Tiempo	0.0008	-0.001	0.003	0.451
Temperatura	0.23	0.06	0.41	<b>0.007</b>
<b>Recuento relativo de CD8</b>				
Tiempo	-0.09	-0.47	0.27	0.611
Temperatura	-21.06	-53.12	10.99	<b>0.198</b>

a Coeficiente ajustado por la temperatura.

b Coeficiente ajustado por el tiempo.

Valores de p estadísticamente significativos en negrilla

**Tabla 4.** Modelo GEE con un intervalo de confianza del 95 % y valor de p de la mediana de intensidad de fluorescencia (MFI) de linfocitos T CD45, CD3, CD4 y CD8 evaluados en un periodo de tiempo (basal, 24, 48, 72, 96 y 120 horas) a temperatura ambiente y de refrigeración.

Variabes	Coefficiente ajustado	Intervalo de confianza		Valor de p
<b>Intensidad media de fluorescencia (MFI) de CD45</b>				
Tiempo	<sup>a</sup> -13.61	-14.84	-12.39	< 0.001
Temperatura	<sup>b</sup> -487.05	-487.05	-397.62	< 0.001
<b>Intensidad media de fluorescencia (MFI) de CD3</b>				
Tiempo	<sup>a</sup> -4.66	-5.41	-3.91	< 0.001
Temperatura	<sup>b</sup> -58.82	-114.56	-3.09	<b>0.039</b>
<b>Intensidad media de fluorescencia (MFI) de CD4</b>				
Tiempo	<sup>a</sup> -30.16	-34.86	-25.45	< 0.001
Temperatura	<sup>b</sup> 575.48	226.96	924.00	<b>0.001</b>
<b>Intensidad media de fluorescencia (MFI) de CD8</b>				
Tiempo	<sup>a</sup> -114.47	-125.40	-103.55	< 0.001
Temperatura	<sup>b</sup> -3640.09	-4421.96	-2858.23	< 0.001

a Coeficiente ajustado por la temperatura.

b Coeficiente ajustado por el tiempo.

Valores de p estadísticamente significativos en negrilla

## Discusión

La calidad de la muestra es un parámetro importante cuando se realiza una evaluación por citometría de flujo. Se requiere de una muestra de alta calidad para evitar las tinciones no específicas de los marcadores<sup>(7)</sup>. Sin embargo, en la actualidad son pocos los estudios que evalúan la estabilidad de las muestras para cuantificación de linfocitos T y la mayoría no son recientes. En esta investigación la viabilidad de los linfocitos totales permaneció alta a temperatura de 4-8 °C durante 96 horas, con una mediana de 72.7% en comparación al estudio de Ekong et al.<sup>(9)</sup>, en el que encontraron que para las muestras VIH<sup>+</sup> almacenadas a 4 °C las viabilidades de los subconjuntos permanecieron altas (> 92%); asimismo, cuando éstas se almacenaron a 21 °C hubo una pérdida significativa de células viables en los tres subconjuntos, la cual fue mayor en los CD8<sup>+</sup> y menor en los CD3<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>. Por tanto, se propone que la variación en el porcentaje de la viabilidad entre ambos estudios, puede atribuirse a la metodología y al reactivo de viabilidad utilizado, yoduro de propidio (PI) vs. aminoactinomicina D; ésta última no es tan brillante como el PI<sup>(10)</sup>.

Los resultados muestran cómo la temperatura y el tiempo influyen en los recuentos de las diferentes subpoblaciones linfocitarias, siendo más crítica la temperatura. En el caso de las expresiones CD45, CD3, CD4 y CD8 se observó que la mediana del recuento absoluto fue mayor en las muestras que se almacenaron a 4 °C. Sin embargo, en otro estudio publicado por Ekong et al.<sup>(11)</sup> se evidenció un aumento sólo en el recuento de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, hecho que puede atribuirse a las modificaciones en la membrana celular durante el almacenamiento a 4 °C y traducirse en una mayor o menor exposición de los antígenos de superficie cuya disponibilidad para reaccionar con el anticuerpo monoclonal se vería afectada<sup>(12)</sup>.

En el presente estudio se encontró una reducción de la mediana del valor absoluto de las diferentes

subpoblaciones linfocitarias con el paso del tiempo a temperatura ambiente, que, en el caso del recuento de la población CD4<sup>+</sup>, bajó 9.7% a las 120 horas, respecto al recuento basal, similar al recuento CD8<sup>+</sup>, que bajó 7.4% a las 120 horas en comparación con la medición inicial. Sin embargo, los cambios encontrados en el recuento de CD4<sup>+</sup> se pueden atribuir a la variabilidad biológica intraindividual que en la literatura se reporta en un 25%<sup>(13)</sup>. Además, los resultados no causarían implicaciones clínicas para los pacientes, ya que no superan el 30% del conteo absoluto o un incremento o decrecimiento en el porcentaje de células CD4 en 3 puntos o más<sup>(14)</sup>.

Entre los estudios que tenían similitud en la metodología de la prueba y en sus resultados con esta investigación está el propuesto por Olteanu<sup>(15)</sup> en el que, utilizando protocolos de activación de ventanas (*gate*) específicos de linaje que aprovechan la propiedad de los linfocitos mantienen una expresión uniforme y de alta densidad de CD45, que permiten seleccionar de manera apropiada las poblaciones, demostraron valores de células T que se mantienen hasta las 72 horas a 4 °C y hasta las 96 horas a 21 °C. Las diferencias podrían atribuirse a la evaluación en ese rango de tiempo pues a temperatura de refrigeración sólo evaluaron hasta 72 horas. En la investigación realizada por Okomo<sup>(16)</sup> se encontraron recuentos de CD4 reproducibles hasta las 72 horas a temperatura ambiente, a diferencia de los resultados obtenidos en el presente estudio, demostraron que dichas variables como el tiempo y la temperatura tienen un impacto en las diferentes subpoblaciones linfocitarias. Como se pudo demostrar con el paso de los días, hubo una disminución en las subpoblaciones linfocitarias, pese a lo cual la temperatura de 4-8 °C favoreció tanto la estabilidad, como el recuento absoluto y relativo de las mismas. Estos resultados sugieren que la cuantificación de linfocitos T puede hacerse en muestras almacenadas a temperatura de refrigeración hasta 4 días después de la recolección, sin comprometer los resultados.

**Conflictos de interés:** Los autores declaran no poseer conflictos de interés.

### Bibliografía

1. Barrero S, Cuéllar A, Rueda N y col. Determinación de valores de linfocitos T CD3+/CD3+/CD4+ y CD3+/CD8+ por citometría de flujo en adultos donantes de sangre del Hospital Universitario San Ignacio de Bogotá. *Acta Méd Colomb.* 2001;26:280-5.
2. Carbajal-Martel BH, Bu-Figueroa E, Sierra-Santos M. Prevalencia de infecciones oportunistas en pacientes VIH positivo asociados al conteo disminuido de células linfocitos CD4+. Hospital Escuela, 2001. *Rev Me Post XJNAH.* 2002;7.
3. Guevara NM, Tangarife VJ. Fase preanalítica: punto crítico en las pruebas de diagnóstico hematológico. *Med Lab.* 2016;22(9-10):411-46.
4. BD Biosciences. BD Multitest™ CD3 FITC / CD8 PE / CD45 PerCP / CD4 APC reagent. Disponible en: <https://wwwbdbiosciences.com/en-nz/products/reagents/flow-cytometry-reagents/clinical-diagnostics/multicolor-cocktails-and-kits-ivd-ce-ivds/bd-multitest-cd3-fitc-cd8-pe-cd45-percp-cd4-apc-reagent.340499>.
5. Beckman Coulter Life Science. Kit de reactivos Duraclore. Disponible en: <https://www.mybeckman.com/reagents/coulter-flow-cytometry>.
6. Glencross D, Scott LE, Jani I V, Barnett D y col. CD45-assisted Panleucogating for accurate, cost-effective dual-platform CD4+ T-cell enumeration. *Clin Cytom.* 2002;50(2):69-77.
7. Campoverde DJ, López SA, Correa WP y col. Citometría de flujo en el diagnóstico de inmunopatía. *Revista Científica de Investigación Actualización del Mundo de las Ciencias.* 2019;3:218-41.
8. Use IFOR, Use I. CD-Chex Plus CD-Chex Plus. Disponible en; <https://www.streck.com/products/flow-cytometry/cd-chex-plus/#resources>.
9. Ekong T, Hill AM, Gompels M y col. The effect of the temperature and duration of sample storage on the measurement of lymphocyte subpopulations from HIV-1-positive and control subjects. *J Immunol Methods.* 1992;151(1-2):217-25.
10. Zemruski NCL, Stache V, Haefeli WE, Weiss J. 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. *Anal Biochem.* 2012;429(1):79-81.
11. Ekong T, Kupek E, Hill A, Clark C y col. Pinching A. Technical influences on immunophenotyping by flow cytometry. The effect of time and temperature of storage on the viability of lymphocyte subsets. *J Immunol Methods.* 1993;164(2):263-73.
12. Weiblen BJ, Debell K, Giorgio A y col. Monoclonal antibody testing of lymphocytes after overnight storage. *J Immunol Methods.* 1984;70(2):179-83.
13. Hughes MD, Stein DS, Gundacker JP y col. Within-subject variation in CD4 lymphocyte count in asymptomatic human immunodeficiency virus infection: Implications for patient monitoring. *J Infect Dis.* 1994;169(1):28-36.
14. Noda A, Vidal LA, Pérez JE y col. Clinical interpretation of the CD4 positive T lymphocytes count in HIV infection. *Revista Cubana de Medicina.* 2013;52.
15. Olteanu H, Schur BC, Harrington AM y col. Time and temperature stability of T-cell subsets evaluated by a dual-platform method. *Am J Blood Res.* 2012;2(2):128-35.
16. Okomo MC, Brendon G, Ndeh G y col. Effects of storage: whole blood specimens for CD4-T lymphocytes determination in Yaoundé, Cameroon. *Health Science and Disease.* 2017;18(4).



**Atribución – No Comercial – Compartir Igual (by-nc-sa):** No se permite un uso comercial de la obra original ni de las posibles obras derivadas, la distribución de las cuales se debe hacer con una licencia igual a la que regula la obra original. Esta licencia no es una licencia libre.