

Determinación de valores de linfocitos TCD3+, CD3+/CD4+ y CD3+/CD8+ por citometría de flujo en adultos donantes de sangre del Hospital Universitario San Ignacio de Bogotá

Susana Barrero, Adriana Cuéllar, Nelly Susana Rueda, Claudia Cardozo, John Mario González
• Bogotá, D.C.

Objetivo: determinar los valores de linfocitos T CD3+, CD3+/CD4+ y CD3+/CD8+ por citometría de flujo en una población adulta de donantes del Banco de Sangre del Hospital Universitario San Ignacio de Bogotá.

Material y métodos: se seleccionaron 60 muestras de sangre periférica a las cuales se les analizó la población de leucocitos mediante los métodos de recuento manual total y diferencial, así como el recuento diferencial de linfocitos utilizando características morfológicas o la expresión de CD14 y CD45 por citometría de flujo. Las subpoblaciones de linfocitos fueron determinadas utilizando mareaje con tres fluorocromos para CD3, CD4 y CD8.

Resultados: los porcentajes de linfocitos totales seleccionados mediante la expresión de CD45 o mediante el tamaño y la granularidad fueron similares. Los valores de linfocitos T CD3+ expresados en porcentaje presentaron un promedio de 64.9, con percentiles 5 y 95 de 50.1 - 79.4 y en valores absolutos (células/ml), el promedio fue 1358.8 células/ml, con percentiles de 743.7 - 2,259.8. Para los linfocitos TCD3+/CD4+ en porcentaje el promedio fue de 33.8 con percentiles de 23.0 - 44.5, un promedio de 702 células con percentiles de 349.3 - 1,256.3. Finalmente para los linfocitos T CD3+/CD8+ expresados en porcentaje el promedio fue 28.3 con percentiles 16.3 - 41.7 y un promedio de 555.6 células/ul con percentiles 225.7 y 1,011.2.

Conclusiones: utilizando la metodología descrita en la que se combina sistemas automatizados y manuales, se demostró que los valores de linfocitos T son similares a los reportados a nivel nacional como internacional. (*Acta Med Colomb* 2001; 26: 280-285).

Palabras claves: linfocitos T, citometría de flujo

Introducción

Los linfocitos T son un grupo heterogéneo de células específicas para el reconocimiento de antígenos. Sus precursores se originan en la médula ósea y maduran posteriormente en el timo. Los linfocitos T expresan marcadores comunes como CD3 y el receptor específico para antígenos (TCR). Además, presentan otros marcadores de superficie que definen subpoblaciones como CD4, para linfocitos T ayudadores (Th) y CD8 para T citolíticos (CTLs) (1,2). Los niveles de estas subpoblaciones celulares en sangre periférica, son cuantificados mediante el uso de anticuerpos

monoclonales específicos para estos marcadores celulares. Estas determinaciones son de gran importancia en el diagnóstico, el pronóstico y el esclarecimiento de la fisiopatología de ciertas enfermedades que se caracterizan por alteraciones en el número de linfocitos. Dichas alteraciones en los valores de los linfocitos se observan en enfermedades

Uvc0' Uwucpc" Dettgtq< Gwuf lepg" fg" Dcevgtkmqi "fc" Ftgut0' Cftkpc" Ew? mct." P gmf " Uwucpc" Twgrf c." Lqj p" O ctq" T qpl " ngl <I twr q" fg" fpo wqddkqni "fc" { "F gr ctvco gpvq" fg" O letqdkmqi "fc." H?ewncf " fg" Elkpeku." Rqp?w?ekc" Wpkxgtukf cf " Lcxgtkpc" Ew? wf k" Ectf qj q< Rcv?nqi c." Ncdqtcvqlq" Ew? fpleq" { " Dcpeq" fg" Ucp? tg." J qur ksci" Wpkxgtuksetkq" Ucp" K pcelq0' Dqi q? . " F?E0'

crónicas, enfermedades autoinmunes, inmunodeficiencias primarias o secundarias, y especialmente en el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), causado por la infección con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). En el SIDA, la medición de los linfocitos CD4+/CD8+ por citometría de flujo se utiliza para clasificar la enfermedad, determinar el tratamiento del paciente, realizar el monitoreo de la eficacia del tratamiento y la progresión de la enfermedad (3-7).

Algunos equipos utilizan un sistema completamente automatizado para el conteo de linfocitos CD3+, CD4+ y CD8+ (8). Este sistema permite la utilización de sangre completa, hace la selección automática de la población de linfocitos y no necesita que se realicen pruebas hematológicas adicionales como el diferencial y el conteo de leucocitos. Sin embargo, aunque ventajosa por la sencillez, esta automatización limita la posibilidad de estudiar poblaciones independientes como CD3+/CD4+ o CD3+/CD8+ u otras poblaciones de interés como células CD3- (8). En los últimos años la citometría de flujo ha sido la herramienta de mayor utilidad para realizar la determinación de las poblaciones celulares (6). Con el uso del citómetro, se amplía la posibilidad de analizar una mayor cantidad de marcadores para definir subpoblaciones celulares. Tiene algunas desventajas como la necesidad de realizar lisis de glóbulos rojos y en ocasiones, requiere la realización de pruebas hematológicas como el extendido de sangre y el conteo manual de leucocitos, cuando no se usan sistemas comerciales de conteo automático (9, 10). En la actualidad, existen varios protocolos definidos por consenso entre diferentes entidades, incluyendo el Centro para el Control de Enfermedades de Estados Unidos (CDC), para la realización de pruebas destinadas a determinar los valores de linfocitos en pacientes con VIH (11-13). En estos protocolos, se establecen parámetros y estándares como la toma de la muestra, tipos de anticoagulantes, tiempo de realización de la prueba, almacenamiento, normas de seguridad, tipos de monoclonales, población celular a estudiar y aseguramiento de la calidad, entre otros (14).

En la literatura se encuentran valores de referencia publicados a nivel internacional (15-17) y nacional (10). Este último trabajo obtiene los valores de linfocitos utilizando un equipo completamente automatizado, de tal manera que no se encuentran variaciones en cuanto a la operación del mismo. En la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana, se viene realizando la tipificación de linfocitos por medio de citometría de flujo, utilizando las facilidades de un citómetro con dos láseres que permiten la determinación de anticuerpos marcados con cuatro fluorocromos distintos, lo cual representa una ventaja para la determinación simultánea de cuatro marcadores. Sin embargo, el equipo debe ser manipulado por un operador, con el fin de establecer las condiciones adecuadas de compensación para la detección independiente de las longitu-

des de onda emitidas por los diferentes fluorocromos y para la selección manual de la población en estudio.

El objetivo de este trabajo fue determinar los valores de linfocitos CD3+, CD4+ y CD8+ utilizando un citómetro de flujo, en una población sana entre 18 y 45 años que acudió al Banco de Sangre del Hospital Universitario San Ignacio (HUSI) en Bogotá. Los métodos utilizados en este estudio fueron el recuento total en hemocitómetro, el recuento diferencial utilizando extendidos coloreados con Wright y el recuento diferencial por citometría de flujo comparando tamaño, granularidad de las células y expresión de marcadores CD14 y CD45. Los resultados obtenidos con esta metodología que combina aspectos manuales y automáticos fueron comparados con los valores publicados en la literatura nacional (10, 18) e internacional (15-17).

Material y métodos

Población de estudio

Se estudiaron 60 individuos que acudieron al Banco de Sangre del HUSI como donantes voluntarios. Los individuos incluidos en este estudio fueron aquellos que, según los criterios de esta entidad, son considerados aptos para donación. Se incluyeron en el estudio 35 hombres y 25 mujeres donantes entre 18 y 45 años, con un promedio de edad de 28.4 (± 6.6) y 29.8 (± 9.4) años, respectivamente.

Recuentos celulares

De cada donante se obtuvo una muestra de sangre periférica anticoagulada. Esta muestra fue obtenida de los pilotos de bolsas de sangre con CPDA (citrato, fosfato, dextrosa y adenina) como anticoagulante; el piloto fue homogenizado cinco veces antes de retirar la muestra. A la muestra de sangre se le realizó el recuento total de leucocitos en hemocitómetro y el recuento diferencial por observación de extendidos teñidos con el colorante de Wright. La lectura de estas pruebas descritas fue realizada por dos observadores de forma independiente. También se realizó el recuento diferencial de leucocitos usando citometría de flujo como se mencionará más adelante.

Tipificación de linfocitos por citometría de flujo

Se realizó mareaje con anticuerpos monoclonales, de acuerdo a la concentración óptima para cada uno de ellos, anti-CD14.PE (ficoeritrina), anti-CD45.PerCP (peridín clorofila proteína), y TriTest que contiene anti-CD3.PerCP, anti-CD4.FITC (fluoresceína), anti-CD8.PE (todos de Becton Dickinson). Para el control de isotipo, se utilizaron anticuerpos de ratón marcados IgG1.FITC e IgG1.PE (Becton Dickinson). Se utilizaron tres tubos por muestra, uno para el control de isotipo, un segundo tubo para CD 14/CD45 y un tercer tubo para CD3/CD4/CD8, respectivamente. A cada tubo se añadieron 50 mn de sangre total y se llevaron a incubar a 4°C en oscuridad durante 30 minutos. Los glóbulos rojos fueron lisados con la solución Facs

Lysing Solution (Becton Dickinson) y se mantuvieron durante 10 minutos en oscuridad a 4°C. Posteriormente, se realizaron dos lavados con la solución de lavado que contiene PBS 1X- azida de sodio al 0.5%. Después de la centrifugación 750 g durante cinco minutos, el sobrenadante fue descartado y el botón celular se resuspendió en solución fijadora que contiene PBS 3X - paraformaldehído 0.5% y la adquisición de la muestra se realizó 24 horas después (19, 20). La muestra fue leída en el Citómetro de Flujo FACSCalibur, utilizando el programa Cell Quest (Becton Dickinson). Por cada muestra, se adquirieron 5.000 células para la lectura, en la región de los linfocitos.

Análisis estadístico

Para evaluar la presencia de valores aberrantes y su posible exclusión en los resultados de leucocitos totales y linfocitos expresados tanto en porcentaje como en $m\mu$ se aplicó la fórmula del rango estadístico de Dixon (21). Se utilizó la prueba T-student (dos colas para datos no pareados) y la prueba estadística de Kruskal-Wallis, con el fin de definir si existían diferencias significativas entre los valores de leucocitos, linfocitos y sus subpoblaciones entre individuos de diferente género.

Los resultados obtenidos se expresaron en valores absolutos (ml) y valores relativos (%). Se interpretaron a través de medidas de tendencia central como la media y medidas de dispersión como desviación estándar (DS) y percentiles 5 y 95; los cálculos estadísticos se obtuvieron a partir del empleo de bases de datos en Excel 7.0 y el programa Epi-Info 6.04 (CDC, Atlanta, U. S. A., 1997).

Resultados

La Figura la representa una gráfica de puntos donde se observan las poblaciones celulares de acuerdo al tamaño (FSC) y la complejidad interna (SSC), la región 1 (R1) corresponde a células de baja complejidad y poco granulares como los linfocitos, la región 2 (R2) a células de tamaño intermedio y alta complejidad interna como los granulocitos y la región 3 (R3) a células de tamaño y complejidad intermedia como los monocitos. En la Figura 1b se observa la distribución de las poblaciones celulares de acuerdo a la

expresión de CD 14 y CD45. Con base en esta gráfica, se evaluó el porcentaje diferencial de leucocitos; la región 4 (R4) corresponde a los linfocitos que son CD14-/CD45+, la región 5 (R5) a los granulocitos que son CD14^{intermedio}/CD45+ y la región 6 (R6) a los monocitos que son CD 14+/CD45+.

Finalmente se obtiene la población de células CD3+ realizando una gráfica de puntos entre SSC y CD3, Figura le, donde se seleccionó la población CD3+ (R7), sobre la cual se hizo un análisis de la expresión de CD4 versus CD8 (Figura Id). Los cuadrantes para definir las poblaciones positivas y negativas, se establecieron con base en el control de isotipo.

El conteo diferencial de leucocitos se realizó por tres métodos: extendido de sangre periférica teñida con Wright, delimitaciones de regiones en la gráfica de puntos SSC versus FSC y delimitación de regiones en la gráfica CD 14 versus CD45, estas dos últimas con el uso del citómetro. Cuando se analizaron los datos de los porcentajes de las poblaciones obtenidos con las tres pruebas, mediante un coeficiente de correlación (R^2), se encontró que las lecturas con el citómetro fueron las más concordantes con 0.91 (IC 95% 0.85-0.94). Debido a que la separación es más clara utilizando marcadores de superficie, se seleccionó el diferencial basado en la separación de CD14/CD45 para obtener los valores de leucocitos totales, linfocitos valores relativos (%) y linfocitos valores absolutos (ml).

Cuando se compararon las variables edad y género de las 60 muestras, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la población ($p > 0.05$ Kruskal-Wallis).

Al comparar los promedios de leucocitos totales de los individuos por género, se observaron valores más altos (7,587.1/ml) en hombres que en mujeres (7,020/ml), pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p = 0.22$). Los valores de linfocitos totales tanto en porcentaje ($p = 0.05$) como por $m\mu$ ($p = 0.004$), presentaron diferencias significativas al ser comparados por género. Sin embargo, al comparar los valores de los linfocitos CD3+, no se observa diferencia con significancia estadística (CD3+ % $p = 0.5$ y CD3+ $m\mu$ $p = 0.12$) (Tabla 1).

Tabla 1. Valores de leucocitos, linfocitos totales, linfocitos CD3+, CD3+/CD4+ y CD3+/CD8+.

Población	Hombres				Mujeres				Total			
	%		ml		%		ml		%		ml	
	X	DS	X	DS	X	DS	X	DS	X	DS	X	DS
Leucocitos Totales **			7,587.1	1,791.8			7,020.0	1,691.1			7,367.5	1,742.1
Linfocitos Totales	29.7	7.7	2,216.0	688.3	26.2	5.1	1,856.2	633.9	28.4	6.8	2,082.0	670.6
Linfocitos CD3+*	64.4	9.5	1,440.4	529.5	65.9	8.1	1,227.3	479.4	64.9	9.0	1,358.8	506.3
Linfocitos CD3+/CD4+*	31.6	7.1	709.0	289.5	36.9	5.3	681.4	236.6	33.8	6.9	702.0	262.3
Linfocitos CD3/CD8+*	28.0	8.9	627.3	280.5	23.8	6.4	450.0	216.0	26,3	8,2	555.6	265.6

* Los porcentajes de los linfocitos CD3+, CD3+/CD4+ y CD3-/CD8+ están dados con respecto al valor de linfocitos totales.
 ** Los valores de leucocitos totales fueron obtenidos por conteo en hemocitómetro

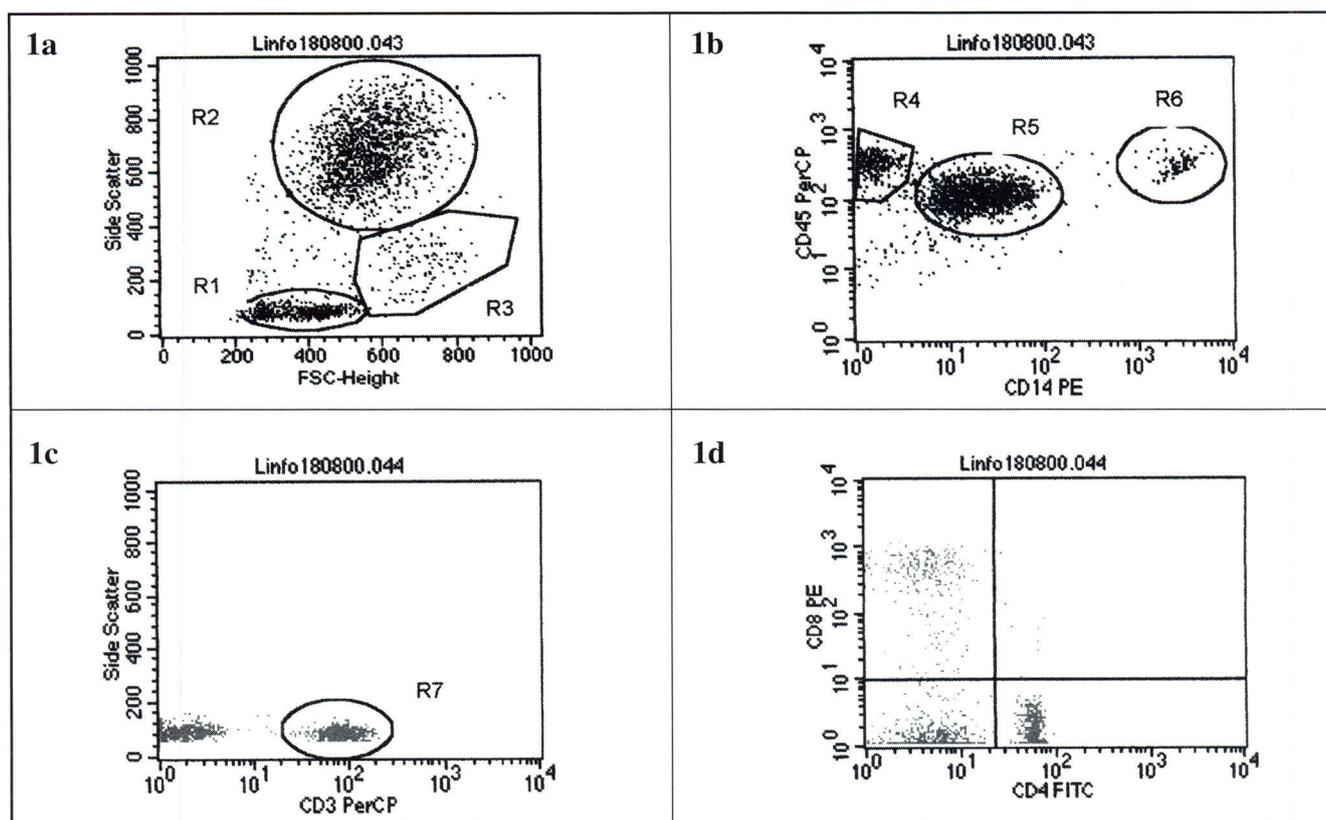


Figura 1. Gráficas de puntos por citometría de flujo para definir las diferentes poblaciones de linfocitos. Figura 1a. Leucocitos según tamaño y complejidad interna. En la región R1 se encuentran los linfocitos, en R2 los granulocitos y R3 los monocitos. Figura 1b. Leucocitos según marcadores CD14 versus CD45. En la región R4 se encuentran los linfocitos, en R5 los granulocitos y en R6 los monocitos. Figura 1c. Gráfica de puntos que muestra la distribución de la población linfocitoide, de acuerdo a la complejidad interna y la expresión de CD3+ (R7). Figura 1d. Gráfica de puntos que muestra en 4 cuadrantes la distribución de las células CD3+ marcadas con CD4.FITC (cuadrante inferior derecho) y CD8.PE (cuadrante superior izquierdo). Los cuadrantes se establecieron con base en el control de isotipo

Se utilizó la fórmula del rango estadístico de Dixon, para los datos obtenidos con leucocitos totales, linfocitos totales y linfocitos CD3+. No se encontró ningún dato que debiera ser recalculado o excluido, por lo que se usó el n=60 para la obtención de los valores de leucocitos, linfocitos totales, linfocitos CD3+, CD3+/CD4+ y CD3+/CD8+; estos valores se observan en la Tabla 1.

La diferencia por género entre los valores porcentuales para linfocitos CD3+/CD4+, fue estadísticamente significativa ($p = 0.027$), al contrario de lo que ocurrió con los valores por ml, donde no se encontró ninguna diferencia ($p = 0.65$). Para

linfocitos CD3+/CD8+, comparando los géneros, se encontraron diferencias estadísticamente significativas, tanto para los valores en % ($p = 0.05$), como los valores absolutos por ml ($p = 0.01$).

La razón CD4+/CD8+ para la población de leucocitos en la población total fue de 1.4 (DS±0.6), para los valores obtenidos de mujeres fue de 1.7 (DS±0,5) y para valores obtenidos de los hombres de 1.3 (DS±0.5).

En la Tabla 2, se muestran los resultados obtenidos del cálculo de los percentiles 5 y 95 por género y totales para el recuento de leucocitos totales y diferenciales expresados en valores relativos y absolutos.

Tabla 2. Percentiles 5 al 95 de leucocitos, linfocitos totales, linfocitos CD3+, CD3+/CD4+ y CD3+/CD8+.

Población	Hombres				Mujeres				Total			
	%		ml		%		ml		%		ml	
	Pt5	Pt95	Pt5	Pt95	Pt5	Pt95	Pt5	Pt95	Pt5	Pt95	Pt5	Pt95
Leucocitos Totales			5,185.0	10,970			5,110.0	10,330.0			5,150.0	10,870
Linfocitos Totales	19.9	40.1	1,462.6	3,468.6	19.1	34.6	1,018.3	3,104.1	19.7	39.2	1,137.2	3,371.7
Linfocitos CD3+	49.8	77.3	828.8	2,308.8	54.1	79.0	629.1	1,992.4	50.1	79.4	743.7	2,259.8
Linfocitos CD3+/CD4+	22.4	43.6	348.7	1,221.6	29.2	44.8	361.3	1,174.0	23.0	44.5	349.3	1,256.3
Linfocitos CD3+/CD8+	16.8	44.7	279.8	1,058.7	15.0	31.7	203.3	682.5	16.3	41.7	225.7	1,011.2

Pt 5 y Pt95: Percentiles 5 y 95

Discusión

Mediante el presente trabajo se pretendió analizar una población de donantes adultos con el fin de determinar si el protocolo seguido en nuestra institución arroja resultados similares a la tipificación de linfocitos realizadas por otras instituciones.

El procesamiento de la muestra fue realizado utilizando mareaje con tres colores, que de acuerdo con la literatura, permite una mejor separación celular y evita artefactos encontrados en marcajes únicos o de dos colores (12, 22-25).

Igualmente, se obtuvo un diferencial de leucocitos utilizando no sólo sus características morfológicas, sino también la expresión de marcadores específicos, lo cual mejora la separación de las poblaciones para obtener el porcentaje de linfocitos en las muestras (26, 27). Sin embargo, se demostró que la delimitación de la región a estudiar con marcadores de superficie, fue altamente correlacionada con el diferencial realizado separando las poblaciones por tamaño y granularidad.

Muchas otras variables fueron tenidas en cuenta en este estudio. Se ha demostrado que el anticoagulante usado en este trabajo (CPDA) no altera los linfocitos e inclusive las muestras son estables por 48 horas (28, 29). Las muestras utilizadas fueron procesadas una vez obtenidas, para evitar variaciones debidas al tiempo y almacenamiento (28, 30, 31). La fijación de la muestra por 24 horas se realizó con el fin de procesar las muestras tal como se haría con muestras de individuos VIH+, como medida de seguridad para el personal del laboratorio, ya que el formaldehído inhibe el virus (19, 20).

Los parámetros usados en el equipo muestran una buena separación de las poblaciones por medio de tamaño y presencia de gránulos, lo mismo que la separación por los tres fluorocromos FITC, PE y PrCP. Los parámetros utilizados en el equipo permitieron un adecuado análisis de las diferentes poblaciones a estudiar y se utilizaron sin ninguna variación en todas las muestras procesadas.

En la población estudiada se encontró un mayor porcentaje de individuos de sexo masculino. Sin embargo, la variable género no fue importante desde el punto de vista estadístico para las poblaciones de leucocitos totales. Las poblaciones de linfocitos totales sí presentaron diferencias por género. De forma interesante los valores de los linfocitos CD3+ tanto en porcentaje como en valores absolutos no presentaron diferencias con significancia estadística.

En cuanto a las subpoblaciones de linfocitos CD3+/CD4+ y CD3+/CD8+, los valores en porcentajes muestran una diferencia significativa al comparar los dos géneros. Sin embargo, al convertir estos porcentajes en valores absolutos, se observa que no hay diferencia para los linfocitos ayudadores, pero sí se encuentran diferencias estadísticas con los linfocitos citotóxicos, siendo más altos los valores en hombres que en mujeres.

Los valores de linfocitos CD3+, aunque difieren un poco de otros reportes nacionales, son cercanos (10). Esta diferencia radica en que nuestros valores fueron obtenidos mediante diversos procesos que implican métodos manuales y la habilidad del operador del citómetro para seleccionar las regiones a evaluar. Al contrario el equipo FACS Count System (Becton Dickinson) con los cuales se realizó otro estudio (10), es completamente automatizado. En este mismo estudio, en las subpoblaciones de linfocitos se conserva la tendencia de mayores niveles en hombres que en mujeres (10). Nuestros valores en media y percentiles del total de muestras se aproximan más a los valores obtenidos por grupos internacionales (17) que son utilizados como parámetros de evaluación de la inmunidad celular por parte de grupos nacionales (18). Esto indica que los valores de referencia obtenidos en nuestra institución podrían ser utilizadas localmente; sin embargo, se necesita una población mayor para ser extrapolada a otros sitios del país.

Summary

Objective: to determine the values of CD3+, CD3+/CD4+ and CD3+/CD8+ T lymphocytes using flow cytometry in an adult population, of blood donors from the Hospital Universitario San Ignacio in Bogotá.

Methods: sixty samples of peripheral blood from donors attending the blood bank were selected according to the criteria of the institution. Leukocyte population, total and differential count was analyzed manually and lymphocytes were determined by their morphological characteristic or according to the expression of CD 14 and CD45 by flow cytometry. The subpopulation of T-lymphocytes were typed using one tube and three color assays for CD3, CD4 and CD8.

Results: percentage of total lymphocyte population was rather similar using as parameter of selection either expression of CD45 or their size and complexity. The CD3+ lymphocytes values as percentage averaged 64.9, with percentiles 5 and 95 ranging from 50.1 - 79.4 and in absolute values averaged 1,358.8 cells per ml with percentiles of 743.7 - 2,259.8. For CD3+/CD4+ lymphocytes expressed as percentage averaged 33.8 with percentiles of 23.0 - 44.5 and by ml averaged 702 with percentiles of 349.3- 1,256.3. Finally, the average percentage of CD3+/CD8+ lymphocytes was 28.3 with percentiles of 16.3 - 41.7 and values by ml averaged 555.6 with percentiles 225.7 and 1,011.2 .

Conclusions: using the manual and automatic combined methodology described here, we were able to demonstrate that lymphocyte values obtained were quite similar to those reported by other international and national studies.

Key words: T-lymphocytes, flow cytometry

Agradecimientos

A las personas que laboran en el Banco de Sangre del Hospital Universitario San Ignacio de Bogotá por permitir la recolección de muestras de sus donantes para este estudio. Al Dr. Manuel Franco, Instituto de Genética Humana, Pontificia Universidad Javeriana por la revisión del manuscrito.

Referencias

1. **Janeway CA, Travers P, Hunt S, Walport M.** Immunobiology. The immune system in health and disease. 3ª. ed. New York: Current Biology Ltd. 1996; 6:14-6:27.
2. **Kisielow P, Boehmer H V.** Development and Selection of T Cells Facts and Puzzles. *Advances in immunology* 1995; **58**: 87-175.
3. **Fahey JL, Taylor JMG, Detels R, Hofmann B, Melmed R, Nishanian P, et al.** The prognostic value of cellular and serologic markers in infection with human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med* 1990; **322**: 166-172
4. **Hoover DR, Graham NM, Chen B, Taylor JM, Phair J, Zhou SY, et al.** Effect of CD4+ cell count measurement variability on staging HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992; **5**: 794-802.
5. **Stein DS, Korvick JA, Vermund SH.** CD4+ lymphocyte cell enumeration for prediction of clinical course of human immunodeficiency virus disease: a review. *J Infect Dis* 1992; **165**: 352-363.
6. **Turner BJ, Hecht FM, Ismail RB.** CD4+ T-lymphocyte measures in the treatment of individuals infected with human immunodeficiency virus type 1: a review for clinical practitioners. *Arch Intern Med* 1994; **154**: 1561-1573.
7. **Loken MR, Stall AM.** Flow cytometry as an analytical and preparative tool in immunology. *J Immunol Methods* 1982; **50**: R85-112.
8. **Strauss K, Hannet I, Engels S, Shiba A, Ward DM, Ullery S, et al** Performance evaluation of the FACSCount System: a dedicated system for clinical cellular analysis. *Cytometry* 1996; **26**: 52-59.
9. **Loboguerrero J, Solano M H, González MC.** Subpoblaciones de linfocitos T en individuos con riesgo de contraer Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida. *Acta Med Colomb* 1986; **11**: 248-252.
10. **Avila L M, Gómez C P, Ríos R E, La verde E.** Estandarización de los valores normales de linfocitos CD3, CD4, CD8 y relación CD4/CD8 por citometría de flujo en individuos sanos colombianos. *Acta Med Colomb* 1996; **21**:158-161.
11. **Calvelli T, Denny TN, Paxton H, Gelman R, Kagan J.** Guidelines for flow cytometric immunophenotyping: a report from the National Institutes of Allergy and Infectious Diseases, Division of AIDS. *Cytometry* 1993; **14**:702-715.
12. **Nicholson J, Kidd P, Mandy F, Livnat D, Kagan J.** Three-color supplement to the NIAID DAIDS guideline for flow cytometric immunophenotyping. *Cytometry* 1996; **26**: 227-230.
13. **Central for Diseases Control (CDC).** Revised guidelines for the performance of CD4+ T-cell determinations in persons with human immunodeficiency virus (HIV) infection. *MMWR* 1997;**43**(No. RR-2):1-29.
14. **Schwartz A, Fernandez-Repollet E.** Development of clinical standards for flow cytometry. *Ann N Y Acad sci* 1993; **677**: 28-39.
15. **Parker, JW, Adelsberg B, Azen SP, Boone D, Fletcher, MA, Gjerset, GF.** Leukocyte immunophenotyping by flow cytometry in a multisite study: Standardization, quality control, and normal values in the transfusion safety study. *Clin Immunol Immunopathol.* 1990; **55**: 187-220.
16. **Comans-Bitter WM, de Groot R, van den Beemd R, Neijens HJ, Hop WCJ, Groeneveld K, et al.** Immunophenotyping of lymphocyte subpopulation. *J Pediatr* 1997; **130**: 388-393.
17. **Razo MD, García NJ, Llórente L.** Cuantificación de subpoblaciones de linfocitos de sangre periférica por citometría de flujo. *Rev Mex Patol Clin* 1996; **43**: 21-26.
18. **Salgado H, Montoya C J, Henao J, Orrego J C, López J A, Patiño P J.** Guía de estudio y manejo del paciente sospechoso de presentar alteraciones en la respuesta inmune celular específica. *Asociación Colombiana de Alergia, asma e inmunología* 2000; **9**: 9-13.
19. **Nicholson JKA, Browning SW, Orloff SL, McDougal JS.** Inactivation of HIV-infected H9 cells in whole blood preparations by lysing/fixing reagents used in flow cytometry. *J Immunol Methods* 1993; **160**: 215-218.
20. **Lifson JD, Sasaki DT, Engleman EG.** Utility of formaldehyde fixation for flow cytometry and inactivation of the AIDS-associated retrovirus. *J Immunol Methods* 1986; **86**: 143-149.
21. **Sasse E A.** Valores de Referencia. En: Niño H.V, Barrera L.A., eds. Garantía de calidad en el laboratorio clínico. Santafé de Bogotá: Editorial Panamericana; 1993: p. 45-67.
22. **McCoy JP Jr, Blumstein L, Donaldson MH, Baxter JD, Byrne BC, Gekowski KM.** Accuracy and cost-effectiveness of a one-tube, three-color method for obtaining absolute CD4+ counts and CD4:CD8 ratios. *Am J Clin Pathol* 1994; **101**: 279-282.
23. **Nicholson JK, Jones BM, Hubbard M.** CD4+ T-lymphocyte determinations on whole blood specimens using a single-tube, three-color assay. *Cytometry* 1993; **14**: 685-689.
24. **Mandy FF, Bergeron M, Recktenwald D, Izaguirre CA.** A simultaneous three-color T-cell subsets analysis with single laser flow cytometers using T-cell gating protocol. Comparison with conventional two-color immunophenotyping method. *J Immunol Methods* 1992; **156**: 151-162.
25. **Ekong T, Gompels M, Clark C, Parkin J, Pinching A.** Double-staining artifact observed in certain individuals during dual-colour immunophenotyping of lymphocytes by flow cytometry. *Cytometry* 1993; **14**: 679-684.
26. **Nicholson JKA, Hubbard M, Jones BM.** Use of CD45 fluorescence and side-scatter characteristics for gating lymphocytes when using the whole blood lysis procedure and flow cytometry. *Cytometry* 1996; **26**:16-21.
27. **Loken MR, Brosnan JM, Bach BA, Ault KA.** Establishing optimal lymphocyte gates for immunophenotyping by flow cytometry. *Cytometry* 1990; **11**:453-459.
28. **Paxton H, Bendele T.** Effect of time, temperature, and anticoagulant on flow cytometry and hematological values. *Ann NY Acad sci* 1993; **677**:440-443.
29. **Nicholson JK, Green TA.** Selection of anticoagulants for lymphocyte immunophenotyping: effect of specimen age on results. *J Immunol Methods* 1993; **165**:31-35.
30. **Shield CF III, Manlett P, Smith A, Gunter L, Goldstein G.** Stability of human leukocyte differentiation antigens when stored at room temperature. *J Immunol Methods* 1983; **62**:347-352.
31. **Ekong T, Kupek E, Hill A, Clark C, Davies A, Pinching A.** Technical influences on immunphenotyping by flow cytometry: the effect of time and temperature of storage on the viability of lymphocyte subsets. *J Immunol Methods* 1993; **164**:263-273.