

**DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LINFOCITOS T (CD3-CD4-CD8) EN MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA CON VARIABLES DE TIEMPO Y TEMPERATURA A TRAVÉS DE CITOMETRÍA DE FLUJO EN EL LABORATORIO SYNLAB 2021**

*Durango Cindy<sup>1</sup>, Hurtado Leidy<sup>1,2,\*</sup>, Jaramillo Patricia<sup>2</sup>, Vanegas Johanna<sup>3</sup>, Rojas Mauricio<sup>4</sup>, Tamayo Gabriel<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>. Centro Especializado en 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, Facultad de Medicina Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

## **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. **Materiales y métodos:** se evaluaron 50 muestras de sangre total con EDTA, provenientes de Medellín. Cada una fue expuesta bajo condiciones de temperatura (4-8°C) y (20-25 °C) y mediciones de tiempo (<12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas). **Resultados:** variables como la temperatura y el tiempo influyen en los recuentos de las diferentes subpoblaciones linfocitarias. La expresión CD4 fue el marcador más estable; por cada día que se evaluó se redujo 0.08 cél/μL. El marcador CD45, presentó reducción en el recuento absoluto en promedio de 0.53 cél/μL. La viabilidad evaluada en los linfocitos totales permaneció alta a temperatura de 4-8 °C durante 96 horas, con una mediana de 72.7%. **Conclusión:** Este es uno de los pocos estudios realizados en Colombia sobre viabilidad de linfocitos T. Los datos arrojados demostraron que factores como el tiempo y la temperatura tienen un impacto en las subpoblaciones linfocitarias e indican que la cuantificación de linfocitos T puede ser realizada hasta 4 días (96 horas) después de la recolección, a una temperatura de 4-8°C, sin afectar su viabilidad y expresión.

**Palabras clave:** Viabilidad, citometría, linfocitos T, temperatura.

## INTRODUCCIÓN

Los linfocitos T son un grupo heterogéneo de células específicas para el reconocimiento de antígenos (1). 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). Por tanto, el recuento por citometría de flujo (CMF) de los linfocitos T CD4, es un parámetro útil para estadificar la infección y guiar la toma de decisiones en cuanto a la conducta clínica a seguir (2). 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 (3); por lo cual, la pérdida de estabilidad se traduce en cambios de expresión de los marcadores y en alteraciones de los recuentos, ocasionando imprecisiones o fallos en las decisiones clínicas (4). 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.

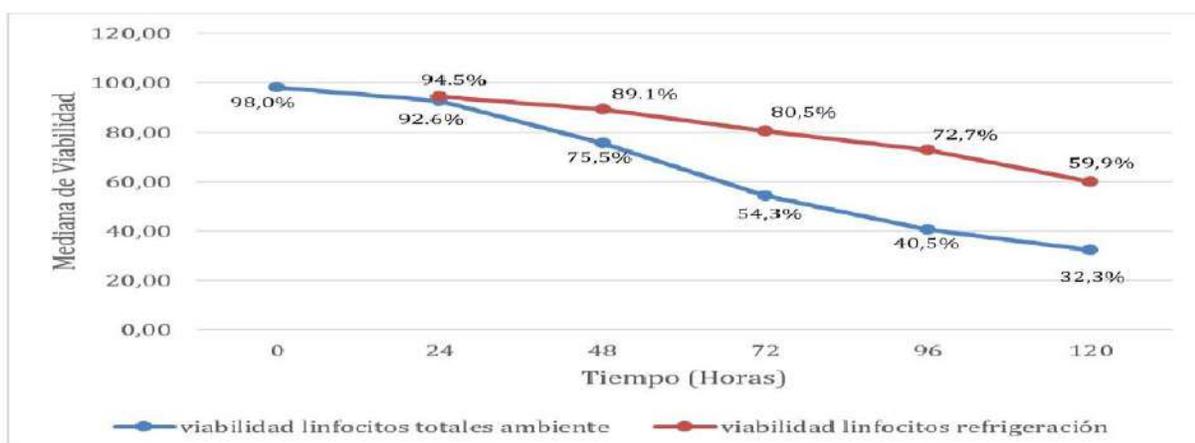
## MATERIALES Y MÉTODOS

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. Cada muestra se evaluó en 6 momentos (<12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas) y en dos temperaturas (4-8 °C y 20-25 °C). Para la viabilidad, se utilizó el reactivo 7AAD.

## RESULTADOS

De las muestras estudiadas el 80% correspondió a hombres, con una mediana de edad de 34 años (RIC: 26-39). 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).

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



Los resultados obtenidos en el recuento de linfocitos totales (CD45 +), se evidenció una reducción en promedio de 0.53 cél/ $\mu$ L y una pérdida de 9.4% a temperatura ambiente y 2.3% a temperatura de refrigeración a las 120 horas. Respecto a los linfocitos T CD3+, se observó que por cada día que pasó, en promedio disminuyeron 0.24 cél/ $\mu$ L y que el porcentaje de pérdida fue de 1.79 y 3.5, a temperatura ambiente y de refrigeración respectivamente. Finalmente, para los linfocitos T CD4+, se observó una disminución en promedio de 0.8 cél/ $\mu$ L y un porcentaje de pérdida de 9.7 a temperatura ambiente y 5.9 en refrigeración. (Tabla 1).

**Tabla 1.** 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 (4-8 °C y 20-25 °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

## DISCUSIÓN

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.(5), en el que encontraron que para las muestras VIH+ 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+ y menor en los CD3+ y CD4+. 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. 7AAD; ésta última no es tan brillante como el PI (6). 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+, bajó 9.7% a las 120 horas, respecto al recuento basal, similar al recuento CD8+, que bajó 7.4% a las 120 horas en comparación con la medición inicial. Sin embargo, los cambios encontrados en el recuento de CD4+ se pueden atribuir a la variabilidad biológica intraindividual que en la literatura se reporta en un 25%(7). 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 (8). Entre los estudios que tenían similitud en la metodología de la prueba, está el propuesto por Olteanu(9) en el que utilizando gate (ventanas) específicos y aprovechando las propiedades de los linfocitos, se seleccionó de forma apropiada la población; permitiendo una expresión uniforme y de alta densidad de CD45, demostrando valores de células T que se mantienen hasta las 72 horas a 4 °C y hasta las 96 horas a 21 °C. Las diferencias con el presente estudio podrían atribuirse a la evaluación en el rango de tiempo, ya que a temperatura de refrigeración sólo evaluaron hasta 72 horas.

## **CONCLUSIÓN**

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 (96 horas) después de la recolección, sin comprometer los resultados.

## **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 Med 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. 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.
5. 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.
6. Zemruski NCL, Stache V, Haefeli WE, Weiss J. 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. *Anal Biochem.* 2012;429(1):79-81.
7. 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.
8. 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.
9. 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.