

# Validación del método de plataforma simple para el seguimiento de linfocitos T CD4+ por citometría de flujo en el contexto de infección por VIH, Caracas, Venezuela

## Validation of the simple platform method for monitoring CD4+ T lymphocytes by flow cytometry in the context of HIV infection, Caracas, Venezuela

Soriuska Mayora Hernández<sup>1a</sup>, Francis Crespo Serrano<sup>2a</sup>, Wendy Martínez Vasquez<sup>3a</sup>, Christian Medina García<sup>4a</sup>, Inirida Belisario Gomez<sup>5a</sup>, Juan Bautista De Sanctis<sup>6b</sup>, Alexis García Piñero<sup>7a</sup>

### RESUMEN

*La citometría de flujo es un método altamente preciso para determinar el recuento absoluto de linfocitos T CD4+ en personas infectadas por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Este recuento es esencial para evaluar el estado inmunológico, estratificar riesgos y determinar la necesidad de intervenciones profilácticas frente a infecciones oportunistas. En el presente estudio se validó la utilidad de la tecnología de plataforma simple (PTS) en comparación con la estrategia convencional de plataforma doble (PTD), empleando un protocolo volumétrico con anticuerpos monoclonales anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 y anti-CD45. Se analizaron 103 muestras de pacientes procedentes del Instituto*

*de Inmunología “Dr. Nicolás Bianco”, sometidas previamente a un hemograma completo (equipo Mindray BC30) y posteriormente a marcaje in vitro para ser evaluadas en el citómetro de flujo Novocyte Advanteon (Agilent®). Se determinaron las correlaciones y la concordancia entre ambos métodos mediante gráficos de Bland-Altman, hallándose que los recuentos de leucocitos totales fueron comparables ( $6\,374 \pm 2\,405$  células/mm<sup>3</sup> en PTD vs.  $6\,283 \pm 2\,292$  células/mm<sup>3</sup> en PTS) con una alta correlación ( $R^2 = 0,99$ ) y un sesgo de 18,8. Con estos resultados se concluye que la tecnología de plataforma simple constituye una alternativa confiable, con menor variabilidad y mayor facilidad operativa, lo que la hace especialmente valiosa en contextos de recursos limitados.*

**Palabras clave:** Citometría de flujo, linfocitos T CD4+, VIH, plataforma simple.

DOI: <https://doi.org/10.47307/GMC.2025.133.2.15>

ORCID 0000-0002-7194-7264<sup>1</sup>

ORCID 0000-0003-2720-0435<sup>2</sup>

ORCID 0000-0002-6598-3509<sup>3</sup>

ORCID 0000-0003-2056-0075<sup>4</sup>

ORCID 0000-0002-1183-3927<sup>5</sup>

ORCID 0000-0002-5480-4608<sup>6</sup>

ORCID 0000-0002-2354-0160<sup>7</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Inmunología Dr. Nicolás Enrique Bianco Colmenares, Universidad Central de Venezuela, Facultad de Medicina, Caracas-Venezuela.

<sup>b</sup>Instituto de Medicina Molecular y Traslacional, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Palacky, 779 00 Olomouc, República Checa.

Recibido: 15 de enero 2025

Aceptado: 19 de mayo 2025

Autor de correspondencia: Alexis García Piñero. E-mail: [alexisgarcia27@gmail.com](mailto:alexisgarcia27@gmail.com)

## SUMMARY

*Flow cytometry is a highly precise method for determining the absolute count of CD4+ T lymphocytes in HIV-infected individuals. This parameter is essential for immunological evaluation, risk stratification, and prophylactic management of opportunistic infections. This study validates the usefulness of single-platform technology (PTS) compared with the standard dual-platform (PTD) approach, using a volumetric protocol with anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, and anti-CD45 monoclonal antibodies. A total of 103 patient samples from the Instituto de Inmunología "Dr. Nicolás Bianco" were processed, with a complete blood count performed on the Mindray BC30 and an in vitro surface marker labeling followed by evaluation on the Novocyte Advanteon flow cytometer (Agilent®). Correlation and agreement between both methods with Bland-Altman analysis, showed comparable total leukocyte counts ( $6,374 \pm 2,405$  cells/mm<sup>3</sup> in PTD vs.  $6,283 \pm 2,292$  cells/mm<sup>3</sup> in PTS) with a high correlation ( $R^2 = 0.99$ ) and a bias of 18.8. Therefore, the single-platform method is a reliable alternative with lower variability and operational simplicity, making it especially advantageous in resource-limited settings.*

**Keywords:** Flow cytometry, CD4+ T lymphocytes, HIV.

## INTRODUCCIÓN

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es un lentivirus perteneciente a la familia retroviridae, siendo el responsable de la pandemia del VIH/SIDA desde los años 80s. Se han identificado diversas variaciones genéticas y antigénicas, clasificando el virus en dos tipos: VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 es el tipo más virulento y extendido mundialmente. VIH-1 es responsable de la pandemia mundial; siendo el subtipo B el más encontrado en el continente americano; mientras que el VIH-2 se limita principalmente a África occidental.

Se estima que 39,9 millones de personas viven con la infección por VIH en todo el mundo, según la actualización global de sida del Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA) para el año 2024 (1-3). Aproximadamente 84,2 millones han sido infectados y 40,1 millones han muerto desde el comienzo de la epidemia. África subsahariana tiene la mayor prevalencia de infección por VIH y

representa más del 70 % de la carga mundial. Para el 2023, tres regiones experimentaron un aumento de casos, Europa del este, Asia central, Medio Oriente, África del norte y Latinoamérica. En Latinoamérica se ha visto un aumento del número anual de nuevas infecciones de un 9 % entre 2010 y 2023, con una estimación de 1,9 millones de personas viviendo con VIH. Según los datos reportados a ONUSIDA, en Venezuela para el año 2023, habían 100 000 personas viviendo con VIH, de los cuales el 75 % cumplía tratamiento antirretroviral (TARV) (3). A pesar de diversas dificultades, Venezuela sigue avanzando en la ampliación de los servicios y la educación sobre el VIH para las poblaciones clave y los jóvenes con el apoyo estratégico del Programa Conjunto. Se actualizaron los algoritmos nacionales de pruebas del VIH en consonancia con las directrices mundiales y se adquirieron cerca de 40 000 kits de pruebas del VIH y reactivos de laboratorio, así como 23 equipos GeneXpert que permitirán al país diagnosticar 7 806 nuevos casos de VIH en 2022-2023 (4).

Los linfocitos T cooperadores o linfocitos T CD4+, llamados así por su grupo de diferenciación 4, son células importantes del sistema inmunológico y juegan un papel clave en la activación de la respuesta efectiva contra agentes infecciosos. El VIH infecta a las células CD4+, predominantemente a los Linfocitos T CD4+. La unión a este receptor es el paso inicial y más importante del ciclo vital del virus al lograr una invasión exitosa. La glicoproteína de la envoltura viral, gp120, interactúa con el receptor CD4+ en la superficie de los linfocitos T y con los receptores de quimiocinas C-C tipo 5 (CCR5) o C-X-C tipo 4 (CXCR4), según el tropismo viral. Esta interacción desencadena un cambio conformacional en gp120, permitiendo la exposición de la glicoproteína 41 (gp41), la fusión con la membrana celular y la creación del poro de fusión (5,6).

La infección termina en la muerte de la célula huésped. Este evento aunado a factores inmunológicos del hospedador (Factor de Necrosis Tumoral, Fas ligando, otros) y la liberación de factores virales (proteínas virales con efecto citopático como Tat, Vpr, Nef) conducen eventualmente al agotamiento de los linfocitos T CD4+. Dado que los linfocitos T CD4+ son los reguladores del sistema inmunológico adaptativo,

su depleción debilita efectivamente el sistema inmunológico, lo que lleva a la adquisición del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) por la infección (5,7).

Desde el comienzo de la epidemia de SIDA, los científicos comenzaron a analizar los subconjuntos de leucocitos en muestras de sangre para medir el grado de inmunodeficiencia en pacientes infectados por el VIH. El conteo de linfocitos T CD4+ (específicamente, la cantidad de células CD4+ en sangre periférica) es un indicador crucial en el seguimiento de la infección por VIH y fue parte fundamental de la definición de caso de SIDA de 1986 establecida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) (8). El conteo de linfocitos T CD4+ en sangre periférica de personas VIH+ rápidamente se convirtió en una práctica común en los laboratorios clínicos como una herramienta importante en el manejo de la enfermedad por VIH. Esta técnica permitía medir el grado de inmunodeficiencia, para posteriormente evaluar la elegibilidad para recibir tratamiento antirretroviral (TARV) y profilaxis antimicrobiana, y finalmente monitorear la restauración inmune en pacientes que reciben TARV (9).

El recuento de linfocitos T CD4+ basado en la citometría de flujo (CMF) ha tenido una importancia sustancial en la gestión clínica del VIH desde los primeros días del descubrimiento del virus. Además, ha desempeñado un papel crucial a la hora de determinar la idoneidad para iniciar la terapia antirretroviral y administrar un tratamiento profiláctico contra las infecciones oportunistas. Todos los informes de definición de caso de SIDA incluyeron la presencia de infecciones oportunistas y la pérdida progresiva del recuento de linfocitos T CD4+, el cual se consideró un factor de riesgo importante para desarrollar tuberculosis (TB) e infección por *Pneumocystis jiroveci* (10,11).

La OMS y ONUSIDA, en su continua lucha para lograr el diagnóstico y el tratamiento universal del VIH, ha dado como resultado un aumento de pruebas diagnósticas y tratamientos contra el VIH. En los países industrializados, el inicio del TARV se basaba en criterios inmunológicos como el conteo de linfocitos

TCD4+, mientras que, en la mayoría de los países con recursos limitados, donde el acceso a las pruebas por CMF es escaso, el criterio clínico y no el inmunológico constituye el estándar de atención. En este contexto, es importante señalar que existen diferencias significativas entre la evaluación clínica e inmunológica, lo que ocasiona resultados inferiores en pacientes que inician el TARV basándose solo en criterios clínicos (12). Desde la publicación de la OMS en el 2016 acerca de las nuevas directrices de tratamiento para el VIH, el papel central del conteo de linfocitos T CD4+ dejó de tener relevancia en la introducción del TARV, en vista de la política “prueba y tratamiento” o inicio rápido de TARV. Sin embargo, el monitoreo del estado inmunológico de los pacientes que viven con infección por VIH continúa siendo una herramienta útil e inestimable para guiar el tratamiento de las infecciones oportunistas o en caso de no respuesta inmunológica después de iniciar del TARV (13,14).

En los últimos años, se han producido avances notables en el desarrollo de tecnologías sencillas de recuento de linfocitos T CD4+ en el punto de atención. Estas tecnologías de nueva generación utilizan principalmente casetes de microfluidos y analizadores digitales basados en imágenes, con el objetivo de mejorar la disponibilidad de un seguimiento rentable para las personas infectadas por el VIH en los países de ingresos bajos y medios. Un ejemplo de ello es el ensayo Omega VISITECT CD4 Advanced Disease (Omega Diagnostics, Alva, Reino Unido), que no requiere ningún instrumento y es un ensayo desechable para determinar el recuento de linfocitos T CD4+ como  $< 200$  o  $> 200$  células/mm<sup>3</sup>. En el escenario actual del programa “prueba y tratamiento universal”, este ensayo semicuantitativo de recuento de linfocitos T CD4+ resulta prometedor para ofrecer un tratamiento profiláctico de las infecciones oportunistas, especialmente en entornos con recursos limitados, donde la carga viral plasmática (CVP) a menudo resulta inaccesible (10,15). Las pruebas de CD4+ semicuantitativas en los puntos de atención, han demostrado ser prometedoras para reducir las tasas de abandono de la terapia antirretroviral y mejorar la mortalidad general en entornos con recursos limitados (12). La citometría de flujo es una biotecnología única en el sentido que

proporciona información muy precisa sobre cada individuo a partir de una mezcla compleja de partículas. La precisión de la CMF se debe a su capacidad única de medir simultáneamente cada evento individual, con cada vez más parámetros, habitualmente de seis a ocho, pero a veces incluso más (15). Permite analizar a gran velocidad varias células y clasificar cuantitativamente las subpoblaciones linfocitarias; brindando una oportunidad de analizar diversidad de fenotipos celulares proporcionando información útil sobre el estado inmunitario específica que protege al organismo frente a la infección por VIH (15). Sin embargo, estos avances se ven amenazados por la reciente reacción política y económica en todo el continente americano, lo que se suma a los retos que se avecinan para controlar la epidemia del VIH. El control preciso de los recuentos absolutos de linfocitos T CD4+ y CD8+ en las personas seropositivas al VIH es fundamental para el tratamiento de esta enfermedad, y existen diversas causas por las que el recuento de linfocitos T CD4+ puede alterarse. Se han observado variaciones diurnas y no patológicas en las mediciones de CD4+; por lo tanto, las diferencias técnicas en las metodologías deben reducirse al mínimo (16).

La CMF es un método preciso pero costoso para determinar los recuentos absolutos de linfocitos T CD4+ en personas que viven con VIH. Los recuentos de CD4+ y CD8+ pueden determinarse en un citómetro de flujo mediante tecnología de plataforma simple (PTS) o plataforma doble (PTD) (Cuasro 1). La tecnología de PTD utiliza un analizador hematológico para obtener un recuento total de leucocitos y un recuento absoluto de linfocitos. A continuación, se calculan los valores absolutos de CD4+ y CD8+ a partir de los resultados positivos porcentuales obtenidos del citómetro de flujo. La tecnología de PTS utiliza o bien perlas de látex de una concentración predefinida o se apoyan en mediciones volumétricas, eliminando así la necesidad de utilizar un analizador adicional. Los analizadores hematológicos en la PTD son la mayor fuente de variabilidad en los recuentos de linfocitos T CD4+ (17,18). Además, los recuentos de linfocitos determinados en instrumentos de hematología de distintos centros muestran diferencias significativas (16). Estas discrepancias pueden afectar el resultado final de

los recuentos absolutos de CD4+ y CD8+ porque los distintos analizadores hematológicos aplican tecnologías diferentes para medir el recuento total de leucocitos y el recuento absoluto de linfocitos. Recomendaciones recientes proponen a la tecnología de PTS como el estándar de oro para la medición de los linfocitos T CD4+, ya que ofrece mejores coeficientes de variación entre laboratorios (19).

El objetivo de este estudio fue validar la utilidad y precisión del método de plataforma simple (PTS) para el recuento de linfocitos T CD4+ mediante citometría de flujo, en comparación con el método tradicional de plataforma doble (PTD), en el contexto de la infección por VIH en pacientes atendidos en Caracas, Venezuela. Para ello se procedió a:

- Determinar la correlación y concordancia entre los recuentos absolutos de linfocitos T CD4+ obtenidos por PTS y PTD, utilizando herramientas estadísticas (por ejemplo, análisis de Bland–Altman y coeficientes de correlación).
- Analizar el coeficiente de variación interensayo de ambos métodos, identificando si la PTS reduce la variabilidad derivada de la manipulación y del recuento hematológico externo.
- Analizar el tiempo de procesamiento, la cantidad de reactivos y el costo operativo asociados a la implementación del método PTS comparado con la PTD, considerando la realidad de recursos limitados en centros de salud venezolanos.
- Evaluar si la implementación de la PTS permite un seguimiento continuo y confiable de los linfocitos T CD4+ en pacientes con VIH, contribuyendo a una mejor toma de decisiones clínicas en la gestión del TARV.

La validación y adopción del método basado en plataforma simple no solo representa un avance tecnológico, sino que constituye también una respuesta necesaria a las limitaciones impuestas por la realidad operativa y económica de los laboratorios en Venezuela. La implementación de este método podría mejorar significativamente el seguimiento y la toma de decisiones clínicas en el manejo del VIH, garantizando una monitorización



Cuadro 1. Diferencias de métodos de citometría de flujo basados en plataforma doble y plataforma simple para la medición de contejo de CD4+.

PLATAFORMA DOBLE (PTD)	PLATAFORMA SIMPLE (PTS)
Estima los recuentos absolutos de linfocitos T CD4+ mediante una fórmula matemática que utiliza dos parámetros independientes: - El porcentaje de linfocitos T CD4+ obtenido por citómetro de flujo y los recuentos de linfocitos totales (WBC) y diferenciales estimados por un analizador hematológico o un hemocitómetro.	Permite obtener directamente recuentos absolutos de linfocitos T CD4+ sin necesidad de un analizador hematológico, eliminando así las variaciones derivadas del uso de diferentes analizadores hematológicos.
Dado que el porcentaje de linfocitos T CD4+ se obtiene a partir de las poblaciones de linfocitos de referencia, la pureza de la Ventana de linfocitos es lo más esencial	Esto puede evaluarse contando las poblaciones de linfocitos T CD4+ en un volumen de sangre determinado con precisión o utilizando el número conocido de microperlas fluorescentes mezcladas con un volumen conocido de sangre teñida con CD4+.

inmunológica más precisa y eficiente en entornos con recursos limitados.

### Citometría de Flujo en el Seguimiento del VIH

Desde el principio del descubrimiento del VIH a principios de los años ochenta quedó claro que esta infección estaba asociada con la pérdida de linfocitos T CD4+ en sangre periférica (20). El recuento de linfocitos TCD4+ en sangre periférica de personas que viven con VIH+ se convirtió en una práctica habitual en los laboratorios clínicos como herramienta importante en el tratamiento y seguimiento de la infección. El desarrollo de tecnologías específicas para el recuento de linfocitos T CD4+ estuvo impulsado por las necesidades imperantes de la pandemia.

El progreso técnico en el campo de la citometría de flujo tuvo un impacto significativo en el inmunofenotipado de linfocitos T CD4+ a lo largo de los años. Originalmente, se contaban en células mononucleares de sangre periférica purificados en gradiente de densidad, en lugar de sangre total, utilizando un anticuerpo anti CD4+ humano de ratón sin marcar en combinación con un segundo anticuerpo conjugado con fluoresceína para visualizar los linfocitos T CD4+ (21). A medida que los citómetros de

flujo se hicieron más potentes y versátiles, y se dispuso de anticuerpos monoclonales conjugados directamente con fluorocromos, se introdujo la citometría de flujo de doble y triple color en el análisis de subconjuntos de linfocitos en la investigación a principios de los años 80 (22). Estos avances fueron empleados en los métodos de cuantificación de linfocitos T CD4+ reduciendo el tiempo de lectura y lo laborioso de los ensayos. Mediante el análisis de multicolor se mejoró la capacidad de resolución para identificar linfocitos T CD3+ y T CD4+ (23). En 1992, la CDC publicó unas directrices para la realización de determinaciones de linfocitos T CD4+ en personas con VIH basadas en la citometría de flujo de doble color y la lisis de hematíes. Esto mejoró la calidad del análisis y permitió analizar muestras de sangre con período postextracción mayor (17,24).

El método aún prevalente para el recuento de linfocitos T CD4+ en el pasado ha sido el análisis dual o multiplataforma. El cual consiste en realizar tres mediciones clínicas: un recuento de leucocitos, un porcentaje de linfocitos (diferencial) y una medición de linfocitos T CD4+ mediante inmunofenotipado por citometría de flujo. La precisión y fiabilidad de las tres

mediciones dependen de los procedimientos de garantía de calidad establecidos para la realización de pruebas clínicas, el equipo utilizado, la experiencia del personal técnico que realiza las mediciones y la calidad de las muestras. Cuando se tienen en cuenta todas estas variables y se multiplican las tres mediciones, cualquier imprecisión o error aumenta (25). En el 2003, la CDC publicó una revisión para abordar específicamente la necesidad de proporcionar directrices para la realización de determinaciones absolutas de linfocitos T CD4+ con una sola plataforma empleando la estrategia de gating para la identificación de linfocitos mediante CD45 (24). Las pruebas de PTS permiten una gran precisión porque los resultados dependen únicamente de una medición realizada en un citómetro de flujo (Figura 1).

Gradualmente se hizo posible un recuento asequible de linfocitos T CD4+ mediante el uso de una nueva generación de citómetros de flujo que funcionan como instrumentos volumétricos de plataforma única sin el uso de costosas microperlas.

En el 2005 fue introducido el citómetro de flujo Auto40 desarrollado en Reino Unido, diseñado originalmente para aplicaciones militares. El Auto40 se basa en el procedimiento nolyse, que evita el paso de lisis de los glóbulos rojos, reduciendo así la variabilidad del ensayo debido a los cambios en las condiciones del mismo (tiempo y temperatura de incubación), así como a las diferencias en la susceptibilidad de las células a la lisis (26).

En países de primer mundo, el recuento de linfocitos T CD4+ se realiza principalmente de acuerdo con las directrices de la CDC u otras directrices nacionales (27,28). Para garantizar la alta calidad de las pruebas de laboratorio, en la mayoría de los ensayos africanos financiados por subvenciones del primer mundo es obligatorio seguir estos principios rectores. Dichos esfuerzos son particularmente relevantes, puesto que la mayoría de laboratorios del tercer mundo luchan actualmente para implementar tecnologías de medición de linfocitos T CD4+ que sean accesibles y rentables. En la actualidad, las guías de la OMS no consideran para iniciar TARV el conteo de linfocitos T CD4+, sin embargo, el seguimiento del mismo como medida de estado

inmunológico del paciente, debe ser considerado y garantizado en centros de atención primaria de entornos con recursos limitados, para decisiones terapéuticas de profilaxis antimicrobiana, así como otros factores que alteren el valor de los mismos. Para esto se estableció como recomendación primordial el uso de CMF por medio de PTS para la evaluación del valor de los linfocitos T CD4+, aunque la PTD continua siendo aceptada (29).

La CMF también ha sido utilizada para la detección de células T positivas para el antígeno p24 en pacientes VIH+ y ha confirmado los resultados de la PCR al demostrar la correlación directa del antígeno p24 intracelular con el estadio de la enfermedad e inversamente con el recuento de células TCD4+, así como su reducción durante el tratamiento antirretroviral. Sin embargo, la sensibilidad de la detección intracelular del antígeno p24 en células T depende en gran medida del protocolo de tinción intracelular, incluido el método de fijación y permeabilización (30).

Recientemente se ha estudiado la incorporación de nuevas tecnologías basadas en citometría de flujo, como la citometría de flujo de imágenes para la caracterización de la respuesta de los linfocitos T CD4+ a la infección por VIH. La citometría de flujo de imágenes es única porque no sólo mide la fluorescencia (luz emitida por los fluoróforos), sino que también captura imágenes de cada célula analizada. Esto permite a los investigadores ver dónde se localiza la fluorescencia dentro de la célula y estudiar con detalle su forma y estructura. Además, este método puede combinarse con herramientas informáticas para analizar grandes cantidades de datos de forma más eficiente. Gracias a esto, se ha podido investigar diversos elementos como la expresión génica del VIH e interacciones de las proteínas del VIH con las proteínas de la célula huésped (31).

### **Recuento celular por citometría de flujo**

Los recuentos absolutos de subconjuntos celulares mediante CMF pueden realizarse utilizando técnicas de doble plataforma y de plataforma única. La técnica de plataforma dual utiliza la CMF para proporcionar el porcentaje de un subconjunto celular determinado entre el total



Figura 1. Línea de tiempo sobre el uso de la Citometría de flujo (CMF) para el seguimiento de personas que viven con infección por VIH.

de leucocitos o linfocitos de la sangre (es decir, un denominador de referencia elegido) junto con un analizador hematológico. A continuación, esta segunda plataforma proporciona un CMB absoluto con un recuento diferencial de leucocitos de tres o cinco partes, en su caso, que debe incluir el denominador de referencia.

La técnica de PTS proporciona directamente los recuentos celulares absolutos mediante el recuento de las células de interés identificadas (es decir, las poblaciones CD45+) en un volumen sanguíneo determinado con precisión. Por lo tanto, no es necesario definir un denominador de referencia. Existen características comunes en las diferentes tecnologías que incluyen procedimientos de identificación celular y recuento de subconjuntos mediante selección electrónica de las células. Sin embargo, los pasos específicos a los que se hace referencia con mayor frecuencia como estrategia de gating (27) son diferentes para cada procedimiento (9).

## MÉTODOS

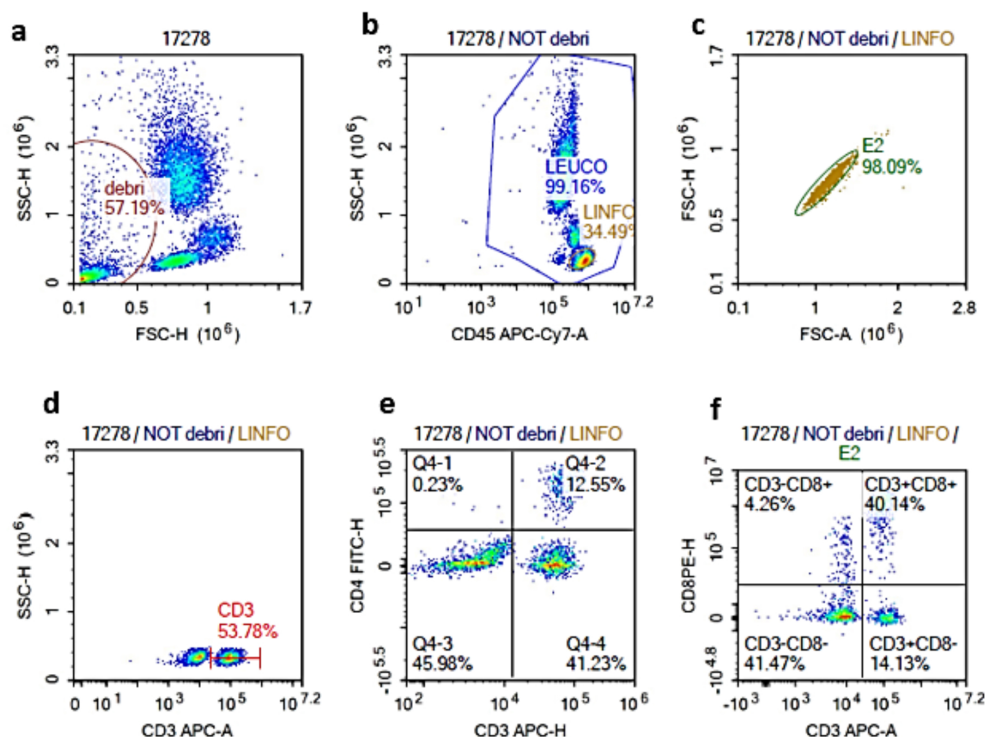
### Muestras y procesamiento

Se incluyeron muestras provenientes de pacientes que ingresaron de manera voluntaria al servicio de laboratorio clínico del Instituto de Inmunología “Dr. Nicolás Enrique Bianco Colmenares” de la Universidad Central de Venezuela y quienes requerían de la cuantificación de la subpoblación linfocitaria T como parte del seguimiento de su estatus inmunológico. Se utilizaron muestras de sangre venosa anticoagulada con EDTA, se le realizaron hematología completa con el equipo Mindray BC-300 y marcaje de superficie con los siguientes anticuerpos de la casa comercial Biolegend: CD45 APC/Cy7, CD3 APC, CD4 FITC, CD8 PE. Estos procedimientos se realizaron a menos de 4 horas posterior a la extracción de la muestra. Para el

lisado de glóbulos rojos se utilizó el método de lisado sin lavado.

Los porcentajes de expresión se obtuvieron a través del uso del citómetro de flujo Novocyte Advanteon de la casa comercial Agilent y los valores absolutos se obtuvieron de dos maneras: 1. Por medio de cálculos matemáticos utilizando los valores de leucocitos totales y porcentaje de linfocitos totales obtenidos en la hematología completa como método de referencia, 2. En forma volumétrica directamente del citómetro

de flujo utilizando la estrategia de gating basada en la expresión del marcador panleucocitario CD45. La expresión del antígeno CD45 es la característica común de todos los glóbulos blancos, y la intensidad de la tinción CD45 más la dispersión lateral (SS) distingue linfocitos, monocitos y granulocitos. En la Figura 2, se representa el análisis por CMF de la muestra de una persona viviendo con VIH, particularmente con baja cantidad de células CD3+/CD4+ circulantes.





### Evaluación de la precisión inter-ensayo

Se evaluó la precisión inter-ensayo la cual incluye la variación inducida por el pipeteo y errores del analista. Se realizó repitiendo todo el proceso de pipeteo, marcaje y adquisición y análisis de la muestra, empleando el control comercial Check Plus de la marca Streck Check cat:213391, al menos 12 veces (12 corridas). La precisión se expresó como el coeficiente de variación (CV) obtenido como el cociente de la desviación estándar entre el promedio de las mediciones multiplicado por 100.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se calcularon las correlaciones entre ambas plataformas utilizando el software GraphPad Prism versión 9. Se estudiaron los recuentos absolutos de linfocitos CD4+ y CD8+ y los porcentajes de estos subconjuntos entre leucocitos y linfocitos. Los gráficos de Bland-Altman (o de sesgo) examinan si dos métodos tienen suficiente concordancia para ser utilizados indistintamente. La diferencia media entre los 2 métodos, denominada sesgo, se marcó en el gráfico mediante una línea horizontal.

### RESULTADOS

Se evaluaron un total de 103 muestras de pacientes. El 7,8 % (8) de los pacientes pertenecieron a individuos menores de 18 años y el 92,2 % (95) correspondieron a individuos mayores de 18 años, con una edad promedio de 41 años y una Desviación Estándar: 14.

#### Recuento de linfocitos T CD4+

Se investigó la concordancia entre los recuentos generados de linfocitos CD4+ basado en el recuento absoluto de glóbulos blancos y linfocitos totales por medio de la expresión del CD45+ y los arrojados por un analizador hematológico en el laboratorio de citometría de flujo de nuestra institución. El promedio del conteo de leucocitos totales mediante PTD fue de  $6\,374 \pm 2\,132$  células/mm<sup>3</sup>, mientras que en la PTS

resultó  $6\,283 \pm 2\,292$  células/mm<sup>3</sup> (Cuadro 2). El análisis de la medición del recuento de linfocitos T CD4+ expresado en números absolutos, mostró una elevada correlación ( $R^2=0,99$ ) y una estrecha concordancia entre ambos métodos de recuento (Bias 18,8) (Figura 3).

### Evaluación de la precisión inter-ensayo

Para ello se realizaron 12 mediciones del control Streck Check CD-Chex Plus cat:213391 en diferentes días, obteniéndose los valores de conteo absoluto para cada una de las poblaciones celulares evaluadas y se definió el coeficiente de variación el cual debe ser menor al 10 %. Se determinó que para el conteo de leucocitos totales el CV correspondió a 1,99 % ( $6\,374 \pm 126,67$ ), mientras que para el recuento de Linfocitos T CD4+ el CV fue de 3,65 % ( $872 \pm 29,76$ ) (Cuadro 2).

Los valores reflejan los promedios y desviación estándar de la evaluación de 103 muestras de sangre periférica utilizando los métodos de plataforma doble y plataforma simple para la cuantificación de los valores absolutos de subpoblaciones linfocitarias.

### DISCUSIÓN

La PTD como método de seguimiento para conteo de linfocitos T CD4+ sigue siendo utilizada en muchos países en vías de desarrollo, incluido Venezuela, debido al costo-efectividad y compatibilidad que posee con los programas de garantía de calidad externa. Sin embargo, esta posee gran variabilidad en el conteo absoluto de los linfocitos T CD4+, comparado con la PTS, debido a la falta de coincidencia entre los porcentajes de linfocitos determinados por los contadores de células de hematología automatizado y técnicas de citometría de flujo (32,33). En nuestro estudio se demuestra la gran practicidad del conteo absoluto de linfocitos T CD4+ mediante PTS con el citómetro de flujo Novocyte Advanteon de la casa comercial Agilent, siendo el promedio del conteo de leucocitos totales mediante plataforma doble de  $6\,374 \pm 2\,405$  células/mm<sup>3</sup>, mientras que en la plataforma simple resultó  $6\,283 \pm 2\,292$  células/mm<sup>3</sup>, demostrándose

# VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE PLATAFORMA SIMPLE

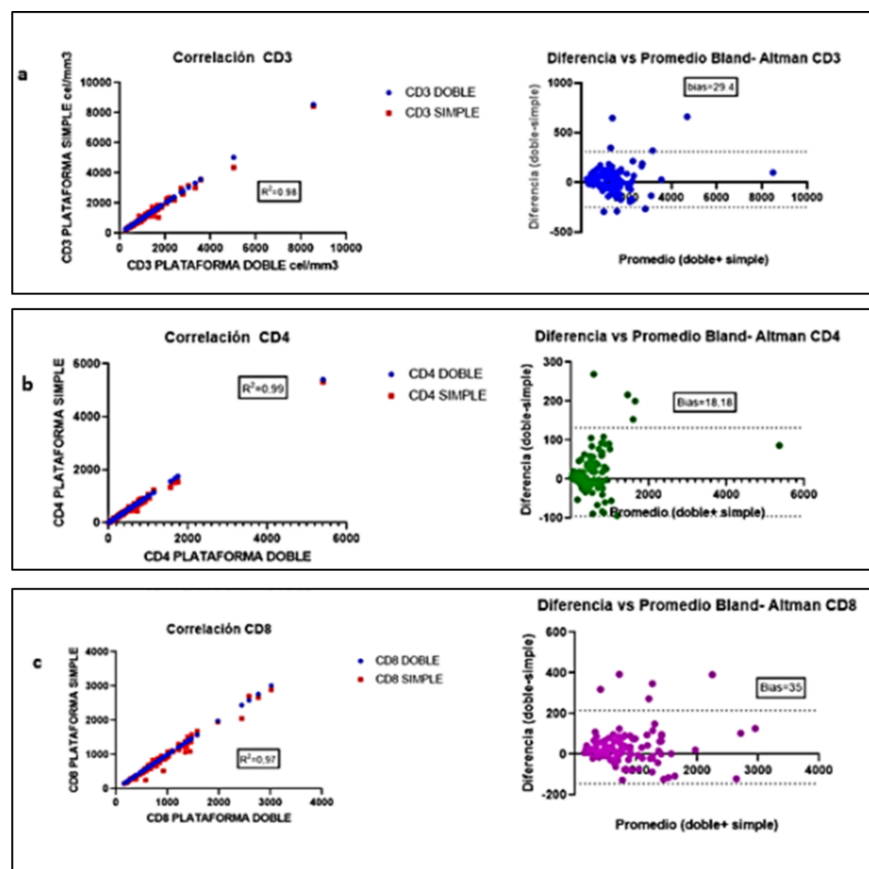


Figura 3. Análisis estadístico de correlación de las tres variables, CD3, CD4 y CD8 entre las dos metodologías. (a) Gráfico de correlación para la medición de linfocitos CD3+ mediante la plataforma doble y simple. (b) Correlación de los datos obtenidos para la medición de Linfocitos CD3+/CD4+. (c) Correlación de los datos obtenidos para la medición de Linfocitos CD3+/CD4+. A la derecha de la figura la Diferencia vs. Promedio Bland Altman para cada parámetro. La concordancia de los métodos se analizó mediante el gráfico de Bland- Altman. La diferencia media entre los 2 métodos, denominada sesgo, se marcó en el gráfico mediante una línea horizontal.

Cuadro 2. Evaluación del contejo absoluto de poblaciones de linfocitos T en sangre periférica utilizando los métodos de plataforma simple y plataforma doble por citometría de flujo.

	Plataforma doble Cel/mm <sup>3</sup>	$\sigma$	Plataforma simple Cel/mm <sup>3</sup>	$\sigma$
<b>LEUCOCITOS TOTALES</b>	6374	2405	6283	2292
<b>LINFOCITOS TOTALES</b>	2132	1433	2088	1392
<b>LINFOCITOS CD3+</b>	1498	1033	1459	1016
<b>LINFOCITOS CD4+</b>	574	595	556	578
<b>LINFOCITOS CD8+</b>	872	543	871	613

que está metodología es una alternativa confiable para la medición de linfocitos T CD4+ en el seguimiento inmunológico por su alto nivel de concordancia, permitiendo así estar alineados con las recomendaciones de la OMS de rutina para adultos y niños infectados por el VIH en entornos con recursos limitados. Los resultados obtenidos en nuestra investigación son similares a los obtenidos por Gossez y col., 2011, quienes compararon el uso de citómetro de flujo AQUIOS con PTS de enfoque volumétrico y el citómetro FC 500 basado en perlas de rutina, mostrando una excelente correlación y concordancia en cuanto a los valores de linfocitos T CD4+; a pesar de los rendimientos similares el enfoque volumétrico de AQUIOS presenta importantes ventajas para el uso diario, es más simple que el basado en perlas, no depende de pasos críticos como pipeteo, estabilidad en el tiempo de las perlas, recalibración regular y mantenimiento estricto por ingenieros de servicio. AQUIOS realiza automáticamente el proceso a partir de sangre completa, el tiempo de procesamiento para dar resultado es menor, exposición es limitada a materiales potencialmente peligroso y menor manipulación de muestras biológicas (34).

Se considera entonces, que la técnica de citometría de flujo por método de PTS es más confiable y reproducible que las mediciones por PTD. En estudios de seguimientos de personas que viven con VIH, los recuentos absolutos de linfocitos T CD4+ obtenidos por PTD contribuyeron a una mayor variabilidad de los valores porcentuales de linfocitos T CD4+ (33,34). Se ha indicado que la principal fuente de discordancia es el recuento de linfocitos resulta del uso de diferentes contadores hematológicos automatizados (18). Para corregir este sesgo, en nuestro estudio decidimos realizar la medición de linfocitos T CD4+ en citometría de flujo a través de enfoque volumétrico de PTS utilizando anticuerpos monoclonales antiCD3, antiCD4, antiCD8 y antiCD45, identificando mediante selección primaria la población CD45+, dentro de éstos los linfocitos CD3+ y CD4+ o linfocitos CD3+ y CD8+. Permitiendo la separación e identificación de los linfocitos T CD4+ de forma independiente. Finalmente, para garantizar el control de calidad del inmunofenotipado celular realizado, se utilizaron los mismos reactivos durante todo el estudio, con igual fecha de caducidad y el análisis de las

muestras por citometría de flujo fue realizada por el mismo operador. Como punto de observación de la calidad de los resultados se realizó la evaluación de resultados de las corridas pertenecientes a un control comercial de valores conocidos de leucocitos totales, linfocitos totales y linfocitos T CD4+, se determinó la precisión interensayo, obteniéndose un coeficiente de variación menor al 10 %, lo cual demuestra la reproducibilidad de los resultados y la precisión del ensayo en cada una de las plataformas evaluadas. Mbopi-Kéou y col. realizaron un estudio similar en Francia, utilizando un citómetro de flujo Auto40 concluyendo que con un operador capacitado el uso de CMF de PTS reduce la variabilidad intra e intercorrida, menos del 10 %, lo cual es aceptable en la práctica habitual, confirmando que las PTS son más reproducibles (35).

Investigaciones recientes han intentado mejorar el potencial de la CMF a través de PTD. Noulisri y col. (33) realizaron la comparación de recuentos de linfocitos T CD4+ obtenidos mediante CMF de PTD versus CMF estándar de PTS, utilizando factor de corrección (FC) para el porcentaje de linfocitos en ambos métodos, con la finalidad de reducir el sesgo en la diferencia del valor absoluto de conteo de linfocitos T CD4+, concluyendo que el uso del FC junto con PTD reduce el sesgo medio de los recuentos absolutos de linfocitos T CD4+, en comparación con la PTS estándar. Al reducir los porcentajes de linfocitos no compatibles, se mejoró la precisión de los recuentos absolutos de linfocitos T CD4+ para alcanzar el nivel del PTS estándar. Lo cual resultaría fácil de determinar y asequible para aquellos laboratorios donde se realiza PTD de forma rutinaria para la determinación del recuento absoluto de linfocitos T CD4+. Sin embargo, el uso de FC no mostró una reducción dramática en el sesgo entre la PTD y la PTS (33). Por lo tanto, continúa siendo esta última el método más confiable y preferido.

Entre las limitaciones del presente estudio, en la PTS es crucial la técnica del pipeteo y la calibración de la pipeta utilizada, para garantizar el volumen y dispensación precisa de la muestra. Mientras que en la PTD resulta importante el mantenimiento y control del contador hematológico, generando gastos adicionales y mayor tiempo de duración. Asimismo, el proceso adicional de realizar una hematología completa en

la PTD aumenta el riesgo de accidentes laborales ante mayor manipulación de la muestra. Otra cuestión técnica que determina la precisión del recuento absoluto de linfocitos es la preparación de la muestra; dado que ambos métodos tanto PTD como PTS incluyen técnicas de lisis y lavado de eritrocitos o técnica de lisis sin lavado. Varios agentes lisantes de glóbulos rojos pueden afectar poblaciones de leucocitos de manera diferente al alterar sus características de dispersión y tinción de superficie (36-38).

La OMS recomienda fuertemente la publicación de estudios científicos sobre la validación efectiva de medición de linfocitos T CD4+ con tecnologías asequibles recientemente introducidas, realizadas por varios laboratorios de diferentes países en vías de desarrollo, independientemente de los fabricantes (40). A nivel mundial, se ha incrementado los programas sobre TARV, llevando un aumento de la demanda de pruebas de conteo de CD4+ asequibles; sin embargo, los TARV no se proporciona universalmente a todos los individuos infectados con VIH, por lo que la OMS definió prioridades para el inicio del TARV, todos los adultos y adolescentes con enfermedad clínica del VIH grave o avanzada (estadio clínico 3 o 4 de la OMS) y personas con un conteo de  $CD4 \leq 350$  células/mm<sup>3</sup>, así como todos los niños, desde 3 años hasta un máximo de 10 años con enfermedad clínica por VIH grave o avanzada (estadio clínico 3 o 4 de la OMS) (29).

En los entornos de recursos limitados el recuento de linfocitos T CD4+ se mantiene como un marcador biológico importante para el inicio y seguimiento del tratamiento antirretroviral, cuando la carga viral de ARN del VIH-1 no está suficientemente disponible. En Venezuela, el método PTD es caro en términos de su costo inicial y mantenimiento, además que requiere que la muestra sea manipulada de manera doble, primero para su procesamiento por el contador hematológico y luego por el citómetro de flujo, lo cual alarga el tiempo de trabajo empleado en el ensayo y expone la muestra a factores ambientales, siendo esto ineficiente cuando se recibe gran volumen de pacientes ya que se va alargando el tiempo de respuesta o entrega de resultados. Por lo tanto, no es adecuado para el uso rutinario en la mayoría de los laboratorios con instalaciones limitadas, como los de los hospitales o centros de referencia. La velocidad

de implementación de nuevas técnicas de recuento de linfocitos T CD4+ ha aumentado durante los últimos años en países en vías de desarrollo. Aunque algunos factores como, la presencia de personal altamente calificado y la cadena de frío de los diferentes marcadores, son limitantes en mucho de estos países para la implementación de tecnologías más sofisticadas (39,40).

Nuestros resultados demuestran que, tras una validación exitosa en condiciones rutinarias, la CMF mediante método de PTS debido a sus ventajas como la simplificación de procesos y la utilización de un solo equipo, podría ser una herramienta adecuada y viable para los laboratorios que reciben gran cantidad de pacientes, enfrentan procesos de acreditación y limitaciones de recursos. Manteniéndonos apegados a las recomendaciones actuales de la OMS.

## CONCLUSIONES

El presente estudio demuestra que la utilización de la tecnología de plataforma simple (PTS) para el recuento de linfocitos T CD4+ mediante citometría de flujo es una alternativa válida y precisa para el estudio de personas que viven con VIH. En comparación con el método tradicional de plataforma doble (PTD), la modalidad PTS, que emplea un análisis volumétrico directo, mostró una elevada correlación ( $R^2 = 0,99$ ) y una concordancia que reduce la dependencia de recuentos hematológicos paralelos, disminuyendo así la variabilidad técnica.

El uso del citómetro de flujo Novocyte Advantagon (Agilent®), junto con reactivos y anticuerpos monoclonales de alta calidad, permitió obtener resultados consistentes en un menor tiempo de procesamiento. Esta eficiencia operativa es especialmente relevante en entornos con recursos limitados, ya que posibilita un seguimiento inmunológico más ágil y una optimización en la toma de decisiones terapéuticas, sin la necesidad de recurrir a equipos adicionales costosos.

Si bien se reconoce la importancia de mantener controles de calidad rigurosos y una manipulación cuidadosa de las muestras, estos hallazgos avalan la viabilidad de la plataforma simple como

herramienta para la monitorización de la infección por VIH. En consecuencia, se recomienda implementar esta metodología en centros de atención primaria y laboratorios clínicos, ya que posee el potencial de mejorar significativamente el TARV y, en última instancia, la calidad de vida de los pacientes. Por tanto, debe tratar de garantizarse la integración de tecnologías basadas en directrices de la OMS y su rentabilidad para el seguimiento en centros de atención primaria de personas que viven con VIH.

## REFERENCIAS

- Deeks SG, Overbaugh J, Phillips A, Buchbinder S. HIV infection. *Nat Rev Dis Primer*. 2015;1(1):15035.
- Bbosa N, Kaleebu P, Ssemwanga D. HIV subtype diversity worldwide. *Curr Opin HIV AIDS*. 2019;14(3):153-160.
- Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). The urgency of now: AIDS at a crossroads.
- UNAIDS. The Urgency of Now: AIDS at a Crossroads. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS; 2024. Open UNAIDS. Venezuela | Results and Transparency Portal. Available from: <https://open.unaids.org/countries/venezuela>.
- Doitsh G, Greene WC. Dissecting How CD4 T Cells Are Lost During HIV Infection. *Cell Host Microbe*. 2016;19(3):280-291.
- Masenga SK, Mweene BC, Luwaya E, Muchaili L, Chona M, Kirabo A. HIV-Host Cell Interactions. *Cells*. 2023;12(10):1351.
- Aldila D, Dhanendra RP, Khoshnaw SHA, Wijayanti Puspita J, Kamalia PZ, Shahzad M. Understanding HIV/AIDS dynamics: Insights from CD4+T cells, antiretroviral treatment, and country-specific analysis. *Front Public Health*. 2024;12:1324858.
- Osborn JE. The changing definition of AIDS. What's in a name? *J Am Health Policy*. 199;1(3):19-22.
- Kestens L, Mandy F. Thirty-five years of CD4 T-cell counting in HIV infection: From flow cytometry in the lab to point-of-care testing in the field. *Cytometry B Clin Cytom*. 2017;92(6):437-444.
- Balakrishnan P, Saravanan S, Vignesh R, Shankar EM. Recent advances in HIV diagnostics: Point-of-care CD4+ T-cell count & viral load assays. *Indian J Med Res*. 2023;158(5-6):447-450.
- Justiz Vaillant AA, Naik R. HIV-1-Associated Opportunistic Infections. 2023 Jan 27. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024. PMID: 30969609.
- Varughese JK, Rosenberg MG, Kim K. HIV in the tropics: staging in the resource-limited setting. *Curr Opin Infect Dis*. 2012;25(5):477-483.
- World Health Organization. Consolidated guidelines on HIV prevention, testing, treatment and service delivery and monitoring. Geneva: World Health Organization; 2021.
- Tadewos Hirigo A. Trends of Immuno-virological Response Among HIV-Infected Patients Receiving Highly Active Anti-retroviral Therapy at Hawassa, Southern Ethiopia. *Clin Med Res*. 2015;4(4):104.
- Lambert C. Flow Cytometry, a Unique Biotechnology in Medical Applications. *J Clin Med*. 2022;11(20):6198.
- World Health Organization. WHO list of prequalified in vitro diagnostic products. Available from: [https://extranet.who.int/prequal/sites/default/files/document/files/231120\\_prequalified\\_IVD\\_product\\_list.pdf](https://extranet.who.int/prequal/sites/default/files/document/files/231120_prequalified_IVD_product_list.pdf), 2023.
- Connelly MC, Knight M, Giorgi J, Kagan J, Landay AL, Parker JW, et al. Standardization of absolute CD4+ lymphocyte counts across laboratories: An evaluation of the Ortho Cytoron Absolute flow cytometry system on normal donors. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)*. 1995;22:200-210.
- Nicholson JKA. Immunophenotyping specimens from HIV-infected persons: laboratory guidelines from the Centers for Disease Control and Prevention. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)*. 1994;18:55-59.
- Mercolino TJ, Connelly MC, Meyer EJ, Knight MD, Parker JW, Stelzer GT, et al. Immunologic differentiation of absolute lymphocyte count with an integrated flow cytometric system: A new concept for absolute T-cell subset determinations. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)*. 1995;22:48-59.
- Sepstrup SE, Sargent JM. Change from dual- to single-platform reporting of CD4/CD8 values: Experience from a small district general hospital laboratory. *Br J Biomed Sci*. 2003;60(2):92-96.
- Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: Evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med*. 1981;305(24):1425-1431.
- Landay A, Gartland GL, Abo T, Cooper MD. Enumeration of human lymphocyte subpopulations by immunofluorescence: A comparative study using automated flow microfluorometry and fluorescence microscopy. *J Immunol Methods*. 1983;58(3):337-347.
- Lanier LL, Loken MR. Human lymphocyte subpopulations identified by using three-color immunofluorescence and flow cytometry analysis: correlation of Leu-2, Leu-3, Leu-7, Leu-8, and



- Leu-11 cell surface antigen expression. *J Immunol.* 1984;132(1):151-156.
24. Liu CM, Muirhead KA, George SP, Landay AL. Flow cytometric monitoring of human immunodeficiency virus-infected patients. Simultaneous enumeration of five lymphocyte subsets. *Am J Clin Pathol.* 1989;92(6):721-728.
  25. Mandy FF, Nicholson JK, McDougal JS. CDC. Guidelines for performing single-platform absolute CD4+ T-cell determinations with CD45 gating for persons infected with human immunodeficiency virus. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep.* 2003;52(RR-2):1-13.
  26. Higgins J, Hill V, Lau K, Simpson V, Roayaei J, Klabansky R, et al. Evaluation of a Single-Platform Technology for Lymphocyte Immunophenotyping. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14(10):1342-1348.
  27. Dieye TN, Diaw PA, Daneau G, Wade D, Sylla Niang M, Camara M, et al. Evaluation of a flow cytometry method for CD4 T cell enumeration based on volumetric primary CD4 gating using thermoresistant reagents. *J Immunol Methods.* 2011;372(1-2):7-13.
  28. CDC. 1997 revised guidelines for performing CD4p T-cell determinations in persons infected with human immunodeficiency virus (HIV). *MMWR Recomm Rep.* 1997;46:1-29.
  29. World Health Organization. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection: recommendations for a public health approach. 2nd edition. Geneva: World Health Organization; 2016. 429.p. Disponible en: <https://iris.who.int/handle/10665/208825>.
  30. Tessema B, Boldt A, König B, Maier M, Sack U. Flow Cytometric Intracellular Detection and Quantification of HIV-1 p24 Antigen and Immune Checkpoint Molecules in T Cells among HIV/AIDS Patients. *HIV.* 2022;14:365-379.
  31. Elfimov KA, Baboshko DA, Gashnikova NM. Imaging Flow Cytometry in HIV Infection Research: Advantages and Opportunities. *Methods Protoc.* 2025;8(1):14.
  32. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly the NCCLS). H42-A2. Enumeration of immunologically defined cell populations by flow cytometry. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute. Approved guideline, 2nd ed. ISBN 1-56238-640-9.
  33. Nounsri E, Abudaya D, Lerdwana S, Pattanapanyasat K. Corrected Lymphocyte Percentages Reduce the Differences in Absolute CD4+ T Lymphocyte Counts between Dual-Platform and Single-Platform Flow Cytometric Approaches. *Lab Med.* 2018 Disponible en: <https://academic.oup.com/labmed/advancearticle/doi/10.1093/labmed/lmy002/4931617>.
  34. Gossez M, Malcus C, Demaret J, Frater J, Poitevin-Later F, Monneret G. Evaluation of a novel automated volumetric flow cytometer for absolute CD4+ T lymphocyte quantitation. *Cytometry B Clin Cytom.* 2017;92(6):456-464.
  35. Mbopi-Kéou FX, Mion S, Sagnia B, Bélec L. Validation of a Single-Platform, Volumetric, CD45-Assisted PanLeucogating Auto40 Flow Cytometer To Determine the Absolute Number and Percentages of CD4 T Cells in Resource-Constrained Settings Using Cameroonian Patients' Samples. *Clin Vaccine Immunol.* 2012;19(4):609-615.
  36. Irani MS, Banez EI. Hematology estimation of CD4 (T-Helper) cell count using an automated hematology analyzer. *Lab Med.* 1990;21(11):746-748.
  37. Bossuyt X, Marti GE, Fleisher TA. Comparative analysis of whole blood lysis methods for flow cytometry. *Cytometry.* 1997;30:124-133.
  38. Macey MG, McCarthy DA, Davies C, Newland AC. The Q-Prep system: Effects on the apparent expression of leucocyte cell surface antigens. *Cytometry.* 1997;30:67-71.
  39. Mandy F, Janossy G, Bergeron M, Pilon R, Faucher S. Affordable CD4 T-cell enumeration for resource-limited regions: A status report for 2008. *Cytometry B Clin Cytom.* 2008;74B(S1):S27-39.
  40. Mossoro-Kpinde CD, Kouabosso A, Mboumba Bouassa RS, Longo JDD, Kokanzo E, Féissona R, et al. Performance evaluation of the touchscreen-based Muse™ Auto CD4/CD4 % single-platform system for CD4 T cell numeration in absolute number and in percentage using blood samples from children and adult patients living in the Central African Republic. *J Transl Med.* 2016;14(1):326.