

## Revista Mexicana de Patología Clínica

Volumen  
Volume 46

Número  
Number 2

Abril-Junio  
April-June 1999

*Artículo:*

### Citometría capilar volumétrica Nueva alternativa en la determinación de subpoblaciones linfocitarias

Derechos reservados, Copyright © 1999:  
Federación Mexicana de Patología Clínica, AC

**Otras secciones de  
este sitio:**

-  [Índice de este número](#)
-  [Más revistas](#)
-  [Búsqueda](#)

***Others sections in  
this web site:***

-  [Contents of this number](#)
-  [More journals](#)
-  [Search](#)



[www.medigraphic.com](http://www.medigraphic.com)

# Citometría capilar volumétrica

## Nueva alternativa en la determinación de subpoblaciones linfocitarias

**Palabras clave:** Citometría capilar volumétrica, citometría de flujo, subpoblaciones linfocitarias, células CD4+.

**Key words:** Volumetric capillary cytometry, flow cytometry, lymphocyte subpopulations CD4+ cells.

Nohemí Patricia Castillo Torres,\* Gustavo Barriga Angulo,\* Carlos Arumir Escorza,\* Alejandra Aceves Rosas\*

\* Laboratorio Clínico, Hospital de Infectología, Centro Médico Nacional «La Raza» IMSS.

Correspondencia:

Nohemi Patricia Castillo Torres

Laboratorio Clínico, Hospital de Infectología, CMN «La Raza», IMSS  
Jacarandas y Vallejo, Col. La Raza, 02990, México, D.F.

### Resumen

La determinación de células T CD4+ y CD8+ por citometría de flujo es uno de los métodos de laboratorio de mayor utilidad en el manejo de los pacientes infectados con los virus de la inmunodeficiencia humana; sin embargo, su complejidad técnica e instrumental y su elevado costo han limitado su empleo, lo que ha llevado a la búsqueda de tecnologías alternativas lo suficientemente precisas y costo-efectivas como para poder emplearlas en cualquier nivel de atención médica. En este trabajo, el estudio de una de estas tecnologías alternativas la citometría capilar volumétrica (Equipo IMAGN 2000, Imagin Co)<sup>®</sup> comparada con la citometría de flujo (Equipo Epics Profile II, Coulter Co)<sup>®</sup> en la determinación de subpoblaciones linfocitarias CD4+ y CD8+ en 29 pacientes con SIDA, mostró en términos de precisión y reproducibilidad 100% de correlación en los resultados obtenidos con ambos métodos en los niveles de células CD4+ y CD8+. La citometría capilar volumétrica demostró ser una alternativa precisa, totalmente automatizada, sencilla en su manejo, sobre todo para clínicas y hospitales que habitualmente no realizan citometría de flujo.

### Introducción

La infección con los virus de la inmunodeficiencia humana, independientemente de su estadio clínico, produce numerosos indicadores biológicos: de

### Abstract

We compared the performance of the IMAGN 2000 System (Biometric Imagin Co)<sup>TM</sup> volumetric capillary cytometry method which provides absolute enumeration of CD4+ and CD8+ lymphocytes counts with a flow cytometry method Coulter Epics Profile II (Coulter Co)<sup>TM</sup> in 29 AIDS patients specimens that were tested by both methods.

This evaluation demonstrated that the IMAGN 2000 system provides CD4+ and CD8+ counts in AIDS patients comparable to flow cytometry in terms of accuracy and reproducibility; and the advantages of fully automated operation, easy use, simple instrumentation, lack of a requirement for highly trained personnel or additional hematology equipment and suggests that the volumetric capillary cytometry offers a practical alternative to flow cytometry for the determination of absolute CD4+ and CD8+ T cell counts in HIV infected persons. This technology may be particularly well suited for small laboratories, clinics and hospitals that not currently performing flow cytometry.

infección, de replicación viral y de alteración de la respuesta inmune; estos son susceptibles de ser evaluados en el laboratorio clínico a través de diversas pruebas necesarias para su diagnóstico, manejo y tratamiento, algunas de ellas de elevado costo y tecnología como el caso de la determinación de los niveles de células CD4+. La técnica más empleada para este

objeto ha sido la citometría de flujo; sin embargo, su complejidad técnica e instrumental y su elevado costo han limitado su empleo. Esta situación y la necesidad de manejar un número cada vez mayor de casos ha motivado la búsqueda de tecnologías alternativas lo suficientemente precisas y costo-efectivas como para poder emplearlas en cualquier nivel de atención médica.<sup>1-4</sup> De una de estas alternativas, la citometría capilar volumétrica, se ha reportado que permite realizar mediciones con la misma precisión que la citometría de flujo, a un menor costo y con una instrumentación más simple.<sup>5-7</sup> En este trabajo se presentan los resultados de un estudio comparativo en la determinación de subpoblaciones linfocitarias en pacientes con SIDA utilizando citometría de flujo: equipo Coulter Epics Profile II (Coulter Electronics)<sup>®</sup> y citometría capilar volumétrica: equipo Imagin 2000 (Biometric Imagin Co)<sup>®</sup>

## Material y métodos

70

Se obtuvieron muestras de sangre total periférica de 29 pacientes con diagnóstico clínico y de laboratorio de SIDA, utilizando el sistema Vacutainer (Becton Dickinson)<sup>®</sup> y como anticoagulante EDTA; se observaron las precauciones universales contra el riesgo biológico en todas ellas tanto en su toma como en su procesamiento; todas las muestras se conservaron a temperatura ambiente (18-22 °C) hasta su procesamiento dentro de las dos primeras horas después de su toma.

Para la citometría de flujo se utilizó el equipo Epics Profile II (Coulter Electronics)<sup>®</sup> y anticuerpos monoclonales de dos colores (Coulter C);<sup>®</sup> la cuenta de leucocitos y linfocitos totales y porcentuales se llevó a cabo en un equipo semiautomatizado T-540 (Coulter Electronics);<sup>®</sup> la muestra para citometría de flujo se preparó utilizando un amortiguador y un lisante (Q-Prep-Immunoprep Coulter Co).<sup>®</sup>

Para la citometría capilar volumétrica se utilizó el equipo IMAGN 2000 (Imagin Co);<sup>®</sup> la muestra de sangre total (100 microlitros en cada pozo) se colocó directamente en el pozo de reacción, se introdujo el

número de identificación del paciente y se cerró la puerta, el procesamiento fue totalmente automático; los resultados aparecieron en la pantalla e impresos a los pocos minutos de incubación (*figura 1*).

La citometría de flujo se consideró como el estándar de oro para las mediciones de células CD4+ y CD8+; la precisión de la técnica de citometría capilar volumétrica fue evaluada midiendo la diferencia entre los resultados obtenidos de CD4+ y CD8+, con ambos procedimientos aplicados a la misma muestra. La variabilidad fue estimada como el por ciento del coeficiente de variación calculado como promedio de la desviación estándar por 100 en muestras replicadas de las determinaciones de células T CD4+ y CD8+ y la prueba pareada de muestras de Wilcoxon.

## Resultados

Se analizaron 29 muestras en total, encontrando 100% de correlación en los resultados obtenidos



**Figura 1.** Equipo Imagin 2000.

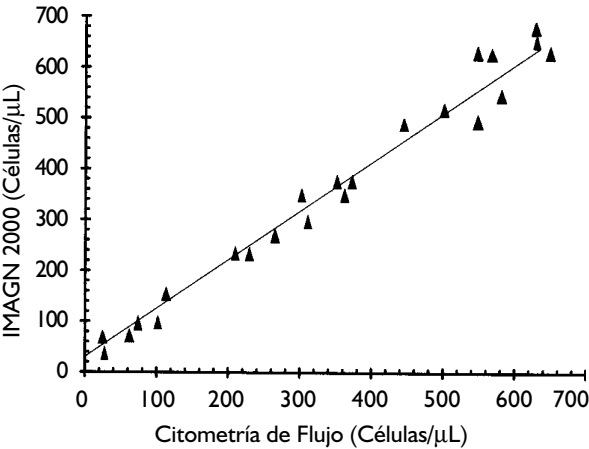


Figura 2. Citometría de flujo vs IMAGN 2000. Correlación CD4+.

con ambos métodos tanto en los niveles de CD4+ como de CD8+ (figuras 2 y 3):

CD4+:  $y = 0.3332 x + 6.5237$   $R^2 = 0.9343$

CD8+:  $y = 0.8103 x + 4.6492$   $R^2 = 0.958$

Lo mismo sucedió en los estudios de reproducibilidad realizados de una muestra con valores bajos de células CD4+ (176 - 225 por  $\mu\text{L}$ ) y de otra con valores intermedios (450 - 550 por  $\mu\text{L}$ ) (cuadros I y II).

La determinación de linfocitos CD4+ y CD8+ por citometría capilar volumétrica no requirió de equipo hematológico adicional para los conteos de

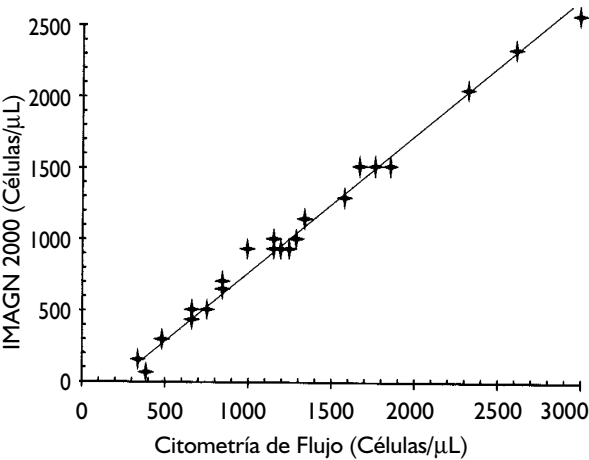


Figura 3. Citometría de flujo vs IMAGN 2000. Correlación CD8+.

Cuadro I. Estudio de reproducibilidad.

| Muestra 07 con especificaciones de valor para CD4+ de 175 - 225 células/ $\mu\text{L}$ |                                |                                |                       |             |             |
|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------|-------------|-------------|
| Muestra 07                                                                             | CD4+<br>Células/ $\mu\text{L}$ | CD8+<br>Células/ $\mu\text{L}$ | Relación<br>CD4+/CD8+ | CD4+<br>ILB | CD8+<br>ILB |
| 701                                                                                    | 224                            | 1360                           | 0.16                  | 561         | 555         |
| 702                                                                                    | 217                            | 1326                           | 0.16                  | 545         | 540         |
| 703                                                                                    | 222                            | 1353                           | 0.16                  | 539         | 538         |
| 704                                                                                    | 238                            | 1320                           | 0.18                  | 536         | 534         |
| 705                                                                                    | 240                            | 1358                           | 0.18                  | 539         | 540         |
| 706                                                                                    | 215                            | 1304                           | 0.16                  | 541         | 530         |
| 707                                                                                    | 240                            | 1342                           | 0.18                  | 543         | 541         |
| 708                                                                                    | 211                            | 1354                           | 0.16                  | 537         | 541         |
| 709                                                                                    | 236                            | 1280                           | 0.18                  | 538         | 538         |
| 710                                                                                    | 243                            | 1312                           | 0.19                  | 545         | 550         |
| Suma                                                                                   | 2,286                          | 13,309                         | 1.71                  | 5,424       | 5,407       |
| D.S.                                                                                   | 12.04                          | 26.96                          | 0.01                  | 7.26        | 7.20        |
| Promedio                                                                               | 228.60                         | 1,330.90                       | 0.17                  | 542.40      | 540.70      |
| CV                                                                                     | 5.27                           | 2.03                           | 7.00                  | 1.34        | 1.33        |

ILB= Intensidad lineal basal o fluorescencia de fondo

leucocitos y linfocitos totales, ni de linfocitos porcentuales ya que el equipo proporcionó conteos absolutos, a diferencia de la citometría de flujo que sí requirió de esta determinación adicional. El rango lineal del ensayo por citometría capilar volumétrica fue de 2 a 2000 células por microlitro de muestra.

Cuadro II. Estudio de reproducibilidad.

| Muestra 10 con especificaciones de valor para CD4+ de 450 - 550 células/ $\mu\text{L}$ |                                |                                |                       |             |             |
|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------|-------------|-------------|
| Muestra 10                                                                             | CD4+<br>Células/ $\mu\text{L}$ | CD8+<br>Células/ $\mu\text{L}$ | Relación<br>CD4+/CD8+ | CD4+<br>ILB | CD8+<br>ILB |
| 1001                                                                                   | 441                            | 586                            | 0.75                  | 533         | 521         |
| 1002                                                                                   | 478                            | 617                            | 0.77                  | 514         | 530         |
| 1003                                                                                   | 413                            | 635                            | 0.65                  | 500         | 522         |
| 1004                                                                                   | 466                            | 558                            | 0.84                  | 518         | 505         |
| 1005                                                                                   | 394                            | 641                            | 0.61                  | 504         | 523         |
| 1006                                                                                   | 474                            | 587                            | 0.81                  | 518         | 528         |
| 1007                                                                                   | 442                            | 667                            | 0.66                  | 489         | 514         |
| 1008                                                                                   | 504                            | 664                            | 0.76                  | 502         | 522         |
| 1009                                                                                   | 394                            | 671                            | 0.59                  | 479         | 522         |
| Suma                                                                                   | 4,006                          | 5,624                          | 6.44                  | 4,575       | 4,687       |
| D.S.                                                                                   | 38.9                           | 41.15                          | 0.09                  | 13.5        | 7.43        |
| Promedio                                                                               | 445.11                         | 624.89                         | 0.72                  | 508.33      | 520.78      |
| CV                                                                                     | 8.74                           | 6.59                           | 12.58                 | 2.66        | 1.43        |

ILB= intensidad lineal basal o fluorescencia de fondo

## Comentarios

La determinación de células CD4+ y CD8+ en forma conjunta con la carga viral ha sido uno de los métodos más utilizados para evaluar la progresión de la enfermedad en las personas infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana; sus niveles han sido también empleados para la subclasificación diagnóstica como criterio de inclusión a estudios clínicos multicéntricos y para la iniciación de terapia profiláctica y antiviral.<sup>1,9,10</sup>

La determinación de valores absolutos de subpoblaciones linfocitarias requiere de tres procedimientos:

- 1) Citometría de flujo para medir la proporción relativa de linfocitos CD4+ ,
- 2) Procedimientos hematológicos para medir la cuenta completa de células sanguíneas, y
- 3) La determinación diferencial del porcentaje de linfocitos.

Los valores absolutos de subpoblaciones linfocitarias son calculados multiplicando el número de leucocitos por su porcentaje y luego multiplicando la cuenta de linfocitos absolutos por la proporción de linfocitos que expresan marcadores específicos.

Aunque se ha logrado un progreso significativo en la estandarización y el control de calidad de la citometría de flujo, la combinación de múltiples tecnologías puede ser motivo de un factor de error adicional;<sup>7,8</sup> asimismo los procedimientos de citometría de flujo son relativamente complejos y requieren de gran capacidad técnica: equipo costoso y técnicos bien adiestrados, lo que ha limitado su disponibilidad a laboratorios clínicos con una infraestructura importante; esto ha motivado la búsqueda de tecnologías alternativas lo suficientemente precisas y costo-efectivas que permitan realizar mediciones con una instrumentación más simple y económica.<sup>2-4</sup>

La disponibilidad de colorantes fluorescentes excitables en rojo<sup>11</sup> ha permitido el desarrollo de instrumentos como el evaluado en este estudio,

que utiliza un láser de bajo poder helio-neón que emite luz a 633 nanómetros permitiendo el uso de un sistema de fluorescencia de dos colores con una sola fuente de excitación y un sistema volumétrico capilar en donde las células blanco sean identificadas con técnicas de procesamiento de imágenes computarizadas.<sup>12,13</sup>

Con el equipo evaluado en este estudio (IMAGN 2000)<sup>®</sup> no se requirió de preparación de las muestras, agregándose éstas en forma de sangre total (200 microlitros) a la charola individual de prueba, ni fue necesario realizar cuentas totales de linfocitos en un analizador hematológico por separado, eliminando así el factor de error adicional ya mencionado.

Se obtuvieron resultados similares a los de citometría de flujo ya que existió 100% de correlación en todas las pruebas realizadas; igual sucedió con los coeficientes de variación y de estudios de reproducibilidad realizados tanto con muestras con valores bajos como normales de CD4+ (*cuadros I y II*).

Otras ventajas adicionales de esta tecnología en comparación con la citometría de flujo fueron: el *ahorro de tiempo* para el técnico, ya que una vez colocada la muestra el proceso fue totalmente automático; un *mayor margen de seguridad biológica*, al manejarse la muestra en forma totalmente cerrada en charolas individuales de reacción; *sencillez en el manejo del equipo*; *no requerir de equipos de refrigeración* para conservar los reactivos; y la posibilidad de su empleo en otro tipo de determinaciones hematológicas como la cuantificación de células CD34+ en sangre periférica y productos de aféresis, de leucocitos residuales en paquetes de eritrocitos y en plasma rico en plaquetas.

De los resultados obtenidos en este estudio es claro que la citometría capilar volumétrica representa una alternativa en la determinación de subpoblaciones linfocitarias en pacientes con SIDA, sobre todo para laboratorios clínicos y hospitales que habitualmente no realizan citometría de flujo.

## Bibliografía

1. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 1997. Revised Guidelines for Performing CD4+ T cell determinations in Persons Infected with Human Immunodeficiency Virus (HIV). *MMWR* 48 No RR-2-1-30.
2. Tei PC, Solmone M, Vanacure P, Giglio A, Brostati C, Carducci M, Mussi A, Chiarotti F, Ameglio F. CD4 lymphocyte enumeration comparison between flow cytometry and enzyme immuno assay. *Cytometry* 1995; 22: 70-74.
3. Johnson D, Hirsehkorn P, Busch MP. Evaluation of four alternative methodology for determination of absolute CD4+ lymphocyte counts. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1995; 10: 522-530.
4. Obremski RJ, Silzel JW, Near IR. New sources, new detectors and new solutions to old problems. In: Cohn G.E. SPIE (Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers) *Ultrasensitive Laboratory Diagnosis. Proceedings Volume 1895, SPIE*. Bellingham Washington 1993; 137-144.
5. Burger D, Gershman R. Acousto-optic laser-scanning- cytometer. *Cytometry* 1988; 9: 101-110.
6. Kamentsky LA, Kamentsky LD. Microscope based multiparameter laser scanning cytometer yielding data comparable to flow cytometry data. *Cytometry* 1991; 12: 381-387.
7. O Gorman MRG, Gelman R. Inter-and Intrainstitutional Evaluation of automated Volumetric Capillary Cytometry for the Quantitation of CD4 and CD8 positive T Lymphocytes in the peripheral Blood of persons Infected with Human ImmunodeficiencyVirus. *Clin and Diagnost Lab Immunol* 1997; 4, 2, 173-179.
8. Koepke J, Landay A. Precision and accuracy of absolute lymphocyte counts. *Clin Immunol Immunopathol* 1989; 52: 19-27.
9. Coffin JM. *HIV viral dynamics AIDS* 1996; 10 (Suppl. 3) 578-584
10. Mellors JW, Rinaldo CR, Gupta P. Prognosis in HIV-1 infections predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 1996; 272: 1167-1170.
11. Waggoner AS, Ernst LA, Mujumdar RB. Method for labeling and detection materials employing arylsulfonate cyanine dyes. *U.S. Patent* 1993; 5, 208, 486.
12. Dietz LJ, Dubrow SR, Manian BS, Sizto NL. Volumetric Capillary Cytometry: A New Method for Absolute Cell Enumeration. *Cytometry* 1996; 23: 177-186.
13. Adams MR, Johnson DK, Busch MP, Schemtri CT, Hartz TP, Heaton WA. Automatic volumetric capillary cytometry for counting white cells in white cell-reduced plateletpheresis components.