



Determinación de intervalos de referencia de linfocitos CD3, CD4, CD8 y razón CD4/CD8 por citometría de flujo en población adulta sana mexicana

Gustavo Barriga Angulo,* Carlos Arumir Escorza,† Alicia Antonia Pomares González,§ María de los Ángeles Peralta Jiménez,|| Amalia Díaz Bruno¶

Palabras clave:

Citometría de flujo, linfocitos CD3, CD4, CD8, valores de referencia, síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

Key words:

Flow cytometry, CD3, CD4, CD8, lymphocyte reference ranges, acquired immunodeficiency syndrome.

* Médico Patólogo Clínico, Jefe del Laboratorio.

† Químico Farmacobiólogo, Jefe de Sección Inmunología.

§ Técnico Laboratorista, Sección Inmunología.

|| Química Farmacobióloga, Sección Inmunología.
¶ Química Bióloga Parasitóloga, Sección Inmunología.

Hospital de Infectología Centro Médico Nacional «La Raza» del Instituto Mexicano del Seguro Social. Laboratorio Clínico «Dr. Pablo Mendoza Hernández».

Correspondencia:
Gustavo Barriga Angulo
Circuito Interior S/N y Seris,
Col. La Raza,
02990, México, D.F.
Tel. 57245900, ext. 23925
E-mail: gustavo.barriga@imss.gob.mx

Recibido:
03/11/2015
Aceptado:
08/01/2016

RESUMEN

Introducción: La determinación del número y porcentajes de subpoblaciones linfocitarias es fundamental para la clasificación, pronóstico y tratamiento de pacientes con SIDA. Los avances logrados en la metodología e instrumentación en su determinación, han permitido establecer un elevado nivel de sensibilidad, especificidad y precisión; sin embargo, es necesario contar con valores de referencia específicos de cada población estudiada. **Objetivos:** Establecer valores de referencia específicos, de subpoblaciones linfocitarias en personas adultas sanas en nuestra población, determinar la existencia o no de diferencias derivadas de: la instrumentación utilizada, del género y de los diferentes periodos estudiados. **Material y métodos:** Se efectuó el análisis estadístico de los resultados obtenidos, en la realización de subpoblaciones linfocitarias, en 141 personas adultas de ambos sexos, utilizando dos citómetros de flujo: uno analógico y otro digital; y de los obtenidos en tres estudios previos realizados en el servicio, durante los años 2003, 2009 y 2015. **Resultados:** Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los resultados obtenidos en personas de diferentes sexos (43% de los parámetros estudiados) y las de los tres estudios de los años 2003, 2009 y 2015. No se encontraron diferencias de los obtenidos al emplear un citómetro de tipo analógico o uno digital. **Conclusiones:** Es necesario que los laboratorios clínicos que realicen determinaciones de subpoblaciones linfocitarias a través de citometría de flujo, establezcan sus propios valores de referencia, en forma separada de acuerdo con el género, y los actualicen periódicamente.

ABSTRACT

Introduction: The determination of the numbers and percentages of lymphocyte subpopulations is fundamental for the diagnosis, therapeutics and classification of AIDS patients, the methodological and instrumental advances in the last years has been outstanding, however its necessary obtain the specific reference values for the studied populations. **Objectives:** To establish the specific reference values of lymphocyte subpopulations in healthy adults in our population, and the effect derived from the use of different flow cytometer equipment, the influence of different periods of study times, and the specific gender. **Material and methods:** We made a statistical analysis review about the values obtained in the determination of specific reference values of lymphocyte subpopulations in 141 healthy adults of both sexes, using two different flow cytometers techniques; analogical and digital, and in three different periods of time 2003, 2009, 2015. **Results:** We found statistical significant differences in the results of specific reference values of the lymphocyte subpopulations between males and females, 43% of the analyzed parameters, and in the results of the years 2003, 2009 and 2015. We do not find differences in the results using an analogical or digital flow cytometer. **Conclusions:** Based in the results obtained in this study, we think that it's mandatory that all clinical laboratories that determined lymphocyte subpopulations must establish periodically, his reference values for his own particular population, and by specific gender.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La tipificación inmunológica de linfocitos sanguíneos, con anticuerpos monoclonales específicos y citometría de flujo, es un

poderoso instrumento en el diagnóstico y manejo¹ de los síndromes de inmunodeficiencia adquiridos y congénitos, y en los pacientes con linfomas y leucemias. Esto ha sido particularmente relevante en el caso de la infec-

ción con los virus de la inmunodeficiencia humana, en donde la determinación y cuantificación de los niveles y porcentajes de las células CD3, CD4, CD8 y la razón CD4/CD8, constituyen uno de los marcadores más importantes en su pronóstico, clasificación y tratamiento,² así como en la prevención de las infecciones por gérmenes oportunistas asociados.³ Los avances logrados en la metodología y equipamiento para su determinación, han permitido lograr un elevado nivel de sensibilidad y especificidad; sin embargo, es necesario contar con valores específicos de referencia para la población estudiada, ya que la mayoría de los utilizados se basan en datos provenientes de poblaciones diferentes a las analizadas.⁴⁻⁶ Existen numerosos reportes de estudios en los que los valores de referencia para subpoblaciones linfocitarias muestran una gran variabilidad de país a país.⁷⁻¹⁰ En México existen muy pocos estudios publicados al respecto,^{11,12} y la mayoría se remonta a varios años atrás; por este motivo consideramos necesario el establecer valores de referencia actualizados de estos parámetros en población sana mexicana, y comparar también las posibles variaciones derivadas de utilizar equipos de citometría de flujo analógica o digital en su determinación, los valores de referencia obtenidos en años previos, y las posibles variaciones inherentes al género.^{13,14}

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizó un total de 141 muestras de sangre, obtenidas del mismo número de donadores de sangre, clínicamente sanos, 71 del sexo femenino y 70 del sexo masculino, con edades entre 20 y 53 años, que acudían al Banco de Sangre del Centro Médico Nacional «La Raza» del Instituto Mexicano del Seguro Social, y quienes voluntariamente aceptaron participar en el estudio a través de un documento de consentimiento informado. Las muestras se recolectaron al azar durante un periodo de 15 días, a través de punción venosa utilizando el Sistema Vacutainer (Becton Dickinson®), y colocadas en tubos conteniendo EDTA como anticoagulante.

Para la determinación de las células T, CD3, CD4, CD8 y la razón CD4/CD8, se utilizaron los equipos: BD FACSCanto II y BD FACSCalibur (Becton Dickinson®), y los reactivos, controles, calibradores, soluciones y procedimientos recomendados por el fabricante de ambos equipos. Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos, se emplearon los métodos de Anderson-Darling y el de Momentos; para los datos paramétricos los coeficientes de correlación de Pearson y para los no paramétricos, los de Spearman.^{15,16}

Para el cálculo de los límites inferior y superior, en las poblaciones con distribución semejante a la normal (DSN), se empleó la media y la desviación estándar; y en el caso de los resultados con una distribución diferente a la normal (DDN), los porcentajes: P_5 , P_{50} y P_{95} .

Adicionalmente, en forma retrospectiva se realizó la comparación con la de datos poblacionales que se habían obtenido previamente en el servicio, realizados también en donadores sanos de ambos sexos, en los años: 2009 (66 muestras) utilizando el equipo BD FACSCanto II (Becton Dickinson®) y 2003 (60 muestras) en donde se utilizó el equipo Epics XL (Coulter Corp®). Para la comparación de los tres grupos de valores de referencia (2003, 2009 y 2015), se empleó la prueba de análisis de varianza (ANOVA); en los casos en que los tres grupos de datos presentaron una DSN y varianzas semejantes (VS), o su alternativa no paramétrica, la prueba de Kruskal-Wallis, cuando presentaron una DDN y/o varianzas diferentes (VD). Si el resultado de la primera conclusión estadística planteaba el rechazo H_0 , se realizaban pruebas adicionales de Scheffé (Complementaria a ANOVA); o t de Student (para grupos DSN y VS) o la U de Mann-Whitney^{15,16} (para grupos DDN y o VD), para establecer igualdad o diferencia estadística entre pares de grupos.

RESULTADOS

Comparación entre el citómetro BD FACSCanto II y el BD FACSCalibur

Como primer paso, para los datos de hombres y mujeres, se estableció el tipo de distribución de los datos obtenidos en los siete parámetros ensayados, así como el valor medio y los límites inferior y superior.

Con este análisis, se determinó que los hombres en ambos citómetros, presentaron una DSN (p -valor > 0.05) en todos los porcentajes, así como el número de células/ μL (6 de 7 parámetros), siendo la excepción la razón CD4/CD8, que con ambos equipos, presentó una DDN (p -valor < 0.01) (cuadro I).

En el caso de los datos de las mujeres, en ambos citómetros, los % y células/ μL para CD3, CD8; y % CD4, tuvieron una DSN (5 de 7 parámetros con p -valor > 0.5); en tanto que las células/ μL para CD4 y la razón CD4/CD8, lo hicieron con una DDN (p -valor entre 0.05 y 0.01) (cuadro II).

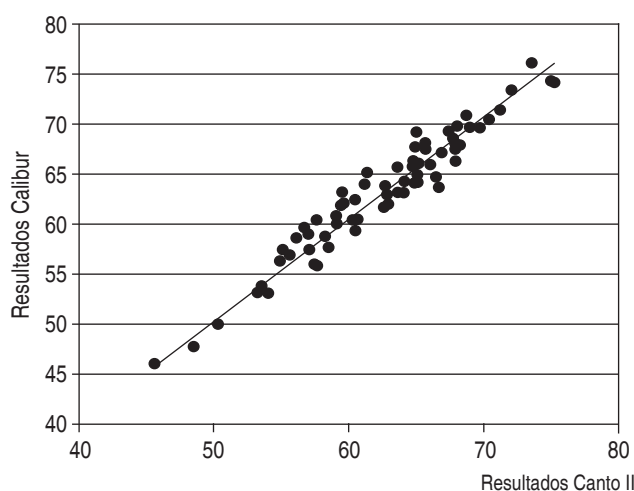
Al comparar los coeficientes de correlación que presentaron los datos en el BD FACSCanto II y en el BD FACSCalibur, se observó que éstos fluctuaron en

Cuadro I. Comparación de resultados de muestras de hombres, ensayadas en dos citómetros de flujo.

Tamaño n = 70	CD3 Tot %		CD3 cel./ μ L		CD8Tot %		CD8 cel./ μ L		CD4Tot %		CD4 cel./ μ L		Razón CD4/CD8	
	Canto II	Calibur	Canto II	Calibur	Canto II	Calibur	Canto II	Calibur	Canto II	Calibur	Canto II	Calibur	Canto II	Calibur
Límite inferior	50.32	50.77	762	834	14.03	14.43	217	249	23.75	23.50	372	404	0.75	0.71
Valor central	62.44	63.01	1525	1572	25.78	26.20	629	654	34.24	34.24	838	860	1.27	1.30
Límite superior	74.57	75.24	2288	2309	37.53	37.98	1042	1059	44.73	44.99	1305	1316	2.51	2.47
DE	6.18	6.24	389.3	376.4	6.00	6.01	210.6	206.7	5.35	5.48	237.9	232.7	----	----
Tipo distribución	DSN	DSN	DSN	DSN	DSN	DSN	DSN	DSN	DSN	DSN	DSN	DSN	DDN	DDN
Anderson-Darling	0.37	0.29	0.18	0.32	0.21	0.21	0.52	0.60	0.26	0.36	0.31	0.25	1.61	1.54
p-valor	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	< 0.01	< 0.01
Coef. Correlación	0.97		0.96		0.98		0.96		0.97		0.97		0.97	0.97
R ²	0.94		0.92		0.95		0.93		0.94		0.94		0.95	0.95
α para r	< 0.01		< 0.01		< 0.01		< 0.01		< 0.01		< 0.01		< 0.01	< 0.01

Cuadro II. Comparación de resultados de muestras de mujeres, ensayadas en dos citómetros de flujo.

Tamaño n = 70	CD3 Tot %		CD3 cel./ μ L		CD8Tot %		CD8 cel./ μ L		CD4Tot %		CD4 cel./ μ L		Razón CD4/CD8	
	Canto II	Calibur	Canto II	Calibur	Canto II	Calibur	Canto II	Calibur	Canto II	Calibur	Canto II	Calibur	Canto II	Calibur
Límite inferior	54.34	53.92	854	871	16.02	15.14	274	258	27.30	26.71	570	571	0.92	0.86
Valor central	66.23	65.94	1639	1693	26.04	26.07	645	667	38.43	37.96	915	933	1.46	1.49
Límite superior	78.12	77.96	2423	2515	36.05	37.01	1015	1077	49.56	49.21	1616	1607	2.55	2.52
DE	6.07	6.13	400.26	419.22	5.11	5.58	189.18	208.94	5.68	5.74	----	----	----	----
Tipo distribución	DSN	DSN	DSN	DSN	DSN	DSN	DSN	DSN	DSN	DSN	DSN	DSN	DDN	DDN
Anderson-Darling	0.36	0.26	0.65	0.70	0.40	0.72	0.80	0.92	0.41	0.45	0.87	0.77	1.12	0.80
p-valor	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	< 0.01	< 0.01
Coef. correlación	0.97		0.95		0.95		0.96		0.97		p < 0.01	p < 0.01	0.96	0.96
R ²	0.94		0.90		0.91		0.92		0.93		0.94		0.92	0.92
α para r	< 0.01		< 0.01		< 0.01		< 0.01		< 0.01		< 0.01		< 0.01	< 0.01



Ejemplo del tipo de distribución de datos, al correlacionar los resultados obtenidos de 70 muestras de hombres adultos sanos, ensayadas en los citómetros: BD FACSCanto II y BD FACSCalibur.

Figura 1. Correlación CD3 Tot % en hombres.

hombres, entre: 0.96 y 0.98 (*cuadro I y figura 1*); y en mujeres entre: 0.94 y 0.97 (*cuadro II*). En todos los casos se comprobó que los coeficientes de correlación fueron significativamente diferentes de cero ($\alpha < 0.01$), a través de la prueba t para correlación; por lo que se puede afirmar que los resultados presentan una muy buena correlación y no son, por tanto, afectados por el tipo de procesamiento de datos (analógico o digital),

Cuadro III. Tamaño de las muestras en tres estudios del sexo femenino.

	Tamaño de la muestra en mujeres	Citómetro	Población
Estudio de 2003	30	Coulter XP	p ₁
Estudio de 2009	35	BD Canto II	p ₂
Estudio de 2015	71	BD Canto II	p ₃

Cuadro IVa. Distribución de las subpoblaciones linfocitarias de tres estudios en mujeres.

Año del estudio	CD3 Tot %			CD3 Tot cel./ μ L			CD8 Tot %			CD8 Tot cel./ μ L		
	2003	2009	2015	2003	2009	2015	2003	2009	2015	2003	2009	2015
Distribución	DSN	DSN	DSN	DSN	DSN	DSN	DSN	DDN	DSN	DSN	DSN	DSN
Límite inferior	44.39	56.89	54.34	1037	841	854	12.02	18.05	16.02	315	273	274
Valor central	63.70	68.79	66.23	1698	1957	1639	22.81	23.91	26.04	603	733	645
Límite superior	83.00	80.70	78.12	2359	3073	2423	33.60	42.48	36.05	891	1193	1015
Anderson-Darling	0.43	0.48	0.36	0.52	0.62	0.65	0.50	1.25	0.40	0.55	0.62	0.80
p-valor	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	< 0.01	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05

Cuadro IVb. Distribución de las subpoblaciones linfocitarias de tres estudios en mujeres.

Año del estudio	CD4 Tot %			CD4 Tot cel./ μ L			Razón CD4/CD8		
	2003	2009	2015	2003	2009	2015	2003	2009	2015
Distribución	DSN	DSN	DSN	DSN	DDN	DDN	DSN	DDN	DDN
Límite inferior	23.33	27.41	27.30	511	700	570	0.79	0.77	0.92
Valor central	36.95	41.05	38.43	991	1047	915	1.70	1.58	1.46
Límite superior	50.56	54.69	49.56	1471	2219	1616	2.61	2.78	2.55
Anderson-Darling	0.31	0.70	0.41	0.48	1.44	0.87	0.79	1.25	1.12
p-valor	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	< 0.01	0.05 > p < 0.01	> 0.05	< 0.01	< 0.01

Cuadro V. Tamaño de las muestras en tres estudios del sexo masculino.

	Tamaño de la muestra en hombres	Citómetro	Población
Estudio de 2003	30	Coulter XP	p ₁
Estudio de 2009	31	BD Canto II	p ₂
Estudio de 2015	70	BD Canto II	p ₃

presentado inclusive, el mismo tipo de distribución de datos en todos los parámetros.

Comparación retrospectiva de datos poblacionales

Adicionalmente y de forma retrospectiva, se realizó la comparación de los datos poblacionales obtenidos en el BD FACSCanto II en dos años diferentes: 2015 y 2009; y los del año 2003, trabajados en un citómetro de flujo Epics XL (Epics Profile, Coulter Corp.), en mujeres y hombres. En los datos de 2009 y 2003, también se determinó el valor medio y los límites superior e inferior, de cada subpoblación.

En los datos de mujeres del 2003, todas la subpoblaciones (% y cel./ μ L) presentan una DSN (7 de 7), mientras que los del 2009, sólo lo hacen en 4 de 7 parámetros, teniendo % de células CD8, cel./ μ L para CD4 y la razón CD4/CD8, una DDN (*cuadros III, IV a y IV b*).

En el caso de los hombres, todos los datos del 2003 tuvieron una DSN (7 de 7), y en los del 2009 únicamente CD4 en % y cel./ μ L y la razón CD4/CD8, presentaron una distribución DDN (4 de 7) (*cuadros V, VI a y VI b*).

Al comparar el límite superior e inferior (*figuras 2 y 3*), para las células CD3, CD4 y CD8, en los tres grupos poblacionales (hombres y mujeres), se observa a simple vista que los del año 2009 destacan; siendo en conjunto mayor su límite superior, en 5 de 6 ocasiones, y únicamente en 3 de 6 el límite inferior. El siguiente paso fue comprobar estadísticamente las igualdades o diferencias entre los datos de estos tres estudios poblacionales (*cuadros VII y VIII*).

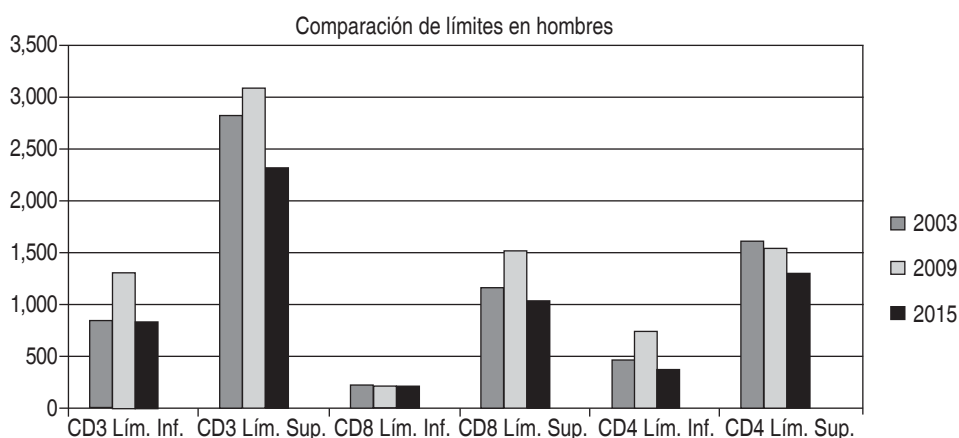
Al comparar los tres grupos de valores de referencia (*cuadro VII*), los datos de las mujeres muestran ser estadísticamente iguales (se acepta Ho), en 4 de los 7 parámetros analizados; y en los 3 casos donde se rechaza Ho; las pruebas adicionales, mostraron que en cada parámetro medido, sólo uno de los 3 pares comparados, resultó ser diferente (en las tres ocasiones fueron los datos del 2015).

Cuadro VIa. Distribución de las subpoblaciones linfocitarias de tres estudios en hombres.

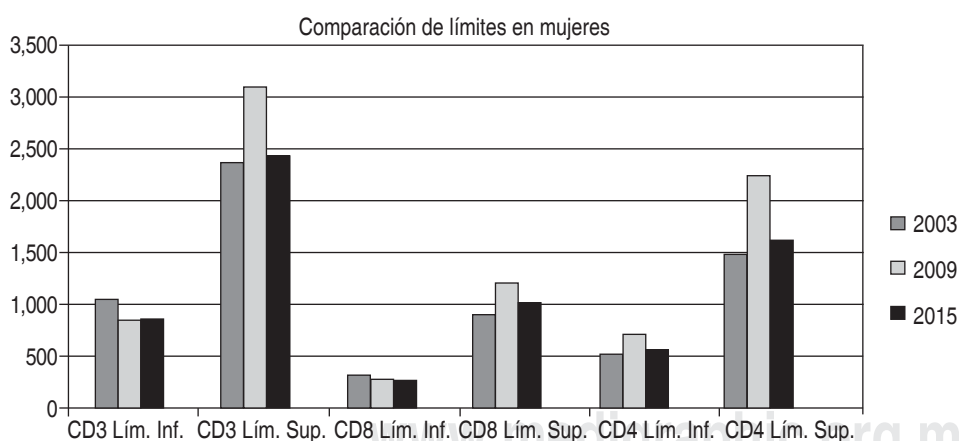
Año del estudio	CD3 Tot %			CD3 Tot cel./ μ L			CD8 Tot %			CD8 Tot cel./ μ L		
	2003	2009	2015	2003	2009	2015	2003	2009	2015	2003	2009	2015
Distribución	DSN	DSN	DSN	DSN	DSN	DSN	DSN	DSN	DSN	DSN	DSN	DSN
Límite inferior	53.99	54.53	50.32	848	1296	834	15.00	15.21	14.03	218	205	217
Valor central	68.83	66.97	62.44	1836	1857	1572	25.81	29.25	25.78	694	860	629
Límite superior	83.66	79.42	74.57	2825	3084	2309	36.62	43.30	37.53	1169	1515	1042
Anderson-Darling	0.33	0.35	0.37	0.46	0.79	0.18	0.29	0.30	0.21	0.33	0.75	0.52
p-valor	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	0.05 < p > 0.01	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05

Cuadro VIIb. Distribución de las subpoblaciones linfocitarias de tres estudios en hombres.

Año del estudio	CD4 Tot %			CD4 Tot cel./ μ L			Razón CD4/CD8		
	2003	2009	2015	2003	2009	2015	2003	2009	2015
Distribución	DSN	DDN	DSN	DSN	DDN	DSN	DSN	DDN	DDN
Límite inferior	27.83	27.95	23.75	465	735	372	0.63	0.73	0.75
Valor central	39.16	35.94	34.24	1042	1005	838	1.61	1.17	1.27
Límite superior	50.49	52.67	44.73	1619	1541	1305	2.58	3.05	2.51
Anderson-Darling	0.29	0.92	0.26	0.57	0.88	0.31	0.72	0.79	1.61
p-valor	> 0.05	0.05 < p > 0.01	> 0.05	> 0.05	0.05 < p > 0.01	> 0.05	> 0.05	0.05 < p > 0.01	< 0.01

**Figura 2.**

Comparación de los valores de los límites inferior y superior, de células/ μ L, de tres subpoblaciones linfocitarias, en tres estudios diferentes.

**Figura 3.**

Comparación de los valores de los límites inferior y superior, de células/ μ L, de tres subpoblaciones linfocitarias, en tres estudios diferentes.

Los resultados en los hombres (*cuadro VIII*), muestran que en ninguno de los tripletes de valores (2003, 2009 y 2015), se acepta H_0 , y en 5 de 7 parámetros, se observan datos diferentes en más de un par comparado. Lo anterior indica que los datos de los tres grupos poblacionales, para hombres, son todos estadísticamente diferentes.

Comparación de resultados por género. Estudio 2015

De los resultados obtenidos de las 141 muestras ensayadas (71 de mujeres y 70 de hombres), en este 2015 en el citómetro BD FACSCanto II, se realizó la comparación, por género, de los límites superior e inferior de los resul-

Cuadro VII. Análisis estadístico comparativo de los valores de tres subpoblaciones linfocitarias, de los años 2003, 2009 y 2015.

Datos mujeres		Ho: $Xp_1 = Xp_2 = Xp_3$	Ha: $Xp_1 \neq Xp_2 \neq Xp_3$		
Parámetro	Prueba estadística	Resultado	1ª Conclusión Estadística	Prueba estadística adicional	2ª Conclusión estadística
CD3 Tot %	Kruskal-Wallis	$H_{\text{corregida}} = 5.470$	Se acepta Ho a $p < 0.05$	-----	-----
CD3 Tot cel./ μL	Kruskal-Wallis	$H_{\text{corregida}} = 6.583$	Se rechaza Ho a $p < 0.05$	U de Mann-Whitney $z_{\text{obs}} = 1.605$ t de Student $t_{\text{obs}} = 0.704$ t de Student $t_{\text{obs}} = 2.861$	$Xp_1 = Xp_2$ a $p < 0.05$ $Xp_1 = Xp_3$ a $p < 0.05$ $Xp_2 \neq Xp_3$ a $p < 0.01$
CD8Tot %	Kruskal-Wallis	$H_{\text{corregida}} = 7.828$	Se rechaza Ho a $p < 0.05$	U de Mann-Whitney $z_{\text{obs}} = 2.237$ t de Student $t_{\text{obs}} = 2.805$ U de Mann-Whitney $z_{\text{obs}} = 0.514$	$Xp_1 \neq Xp_2$ a $p < 0.01$ $Xp_1 = Xp_3$ a $p < 0.01$ $Xp_1 = Xp_3$ a $p < 0.05$
CD8 Tot cel./ μL	Kruskal-Wallis	$H_{\text{corregida}} = 4.682$	Se acepta Ho a $p < 0.05$	-----	-----
CD4Tot %	Kruskal-Wallis	$H_{\text{corregida}} = 5.703$	Se acepta Ho a $p < 0.05$	-----	-----
CD4 Tot cel./ μL	Kruskal-Wallis	$H_{\text{corregida}} = 6.836$	Se rechaza Ho a $p < 0.05$	U de Mann-Whitney $z_{\text{obs}} = 1.513$ U de Mann-Whitney $z_{\text{obs}} = 0.862$ U de Mann-Whitney $z_{\text{obs}} = 2.576$	$Xp_1 = Xp_2$ a $p < 0.05$ $Xp_1 = Xp_3$ a $p < 0.05$ $Xp_2 \neq Xp_3$ a $p < 0.01$
Razón CD4+/CD8+	Kruskal-Wallis	$H_{\text{corregida}} = 3.131$	Se acepta Ho a $p < 0.05$	-----	-----

tados observados (figura 4); y un análisis para determinar si estadísticamente existe igualdad entre estos dos grupos (cuadro IX).

De los datos de comparación por género del estudio del 2015 en el BD FACSCanto II (figura 4), a simple vista se observan resultados más elevados en los límites: inferior y superior (en las mujeres), para las células CD4, concordando con los resultados estadísticos para este parámetro, donde se rechaza Ho (cuadro IX). En las células/ μL para CD3 y CD8, la prueba estadística acepta Ho, respaldando lo observado en la figura 4, para estos casos. Cabe señalar que únicamente en 4 de los 7 grupos de datos ensayados (cuadro IX), se obtuvieron conclusiones estadísticas aceptando Ho.

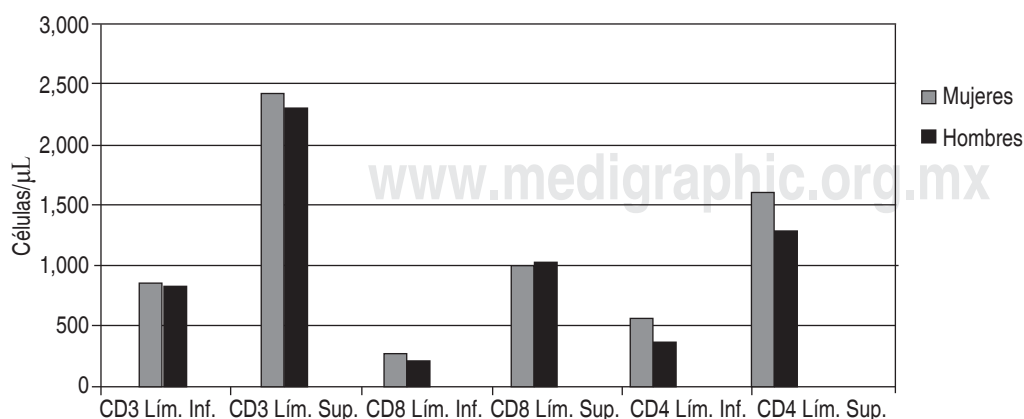
COMENTARIOS Y CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos de este estudio se puede concluir los siguientes puntos:

1. Se deben establecer valores de referencia por separado para cada género, ya que se determinó la existencia de una diferencia significativa de hasta 43% de los parámetros analizados entre ambos sexos.
2. Para esta prueba, se pueden emplear indistintamente citómetros de flujo con tecnología digital o analógica, ya que los resultados obtenidos son concordantes en sus resultados entre los dos en 100%.
3. Los valores de referencia, cuando se realicen, deben de actualizarse periódicamente, ya que en este estudio se pudieron demostrar diferencias estadísticamente significativas en tres periodos de estudio: 2003, 2009 y 2015.
4. Es necesario que los laboratorios que realicen estas determinaciones cuenten con valores propios de referencia, de su población, ya que de la revisión de los reportes de la literatura mundial, muestran valores variables dependiendo principalmente de diferencias genéticas de las poblaciones estudiadas.

Cuadro VIII. Análisis estadístico comparativo de los valores de tres subpoblaciones linfocitarias, de los años 2003, 2009 y 2015.

Datos hombres	Prueba estadística	Ho: $X_{p1} = X_{p2} = X_{p3}$	Ha: $X_{p1} \neq X_{p2} \neq X_{p3}$	Prueba estadística adicional	2ª Conclusión estadística
		Resultado	1ª Conclusión estadística		
CD3 Tot %	ANOVA	F = 11.531	Se rechaza Ho a $p < 0.01$	Scheffé	$X_{p1} = X_{p2}$; $X_{p1} \neq X_{p3}$; $X_{p2} \neq X_{p3}$
CD3 Tot cel./ μ L	Kruskal-Wallis	$H_{\text{corregida}} = 15.647$	Se rechaza Ho; a una $p < 0.01$	U de Mann-Whitney; $Z_{\text{obs}} = 0.563$ t de Student; $t_{\text{obs}} = 2.89$ U de Mann-Whitney; $Z_{\text{obs}} = 3.652$	$X_{p1} = X_{p2}$ a $p < 0.05$ $X_{p1} \neq X_{p3}$ a $p < 0.01$ $X_{p2} \neq X_{p3}$ a $p < 0.01$
CD8Tot %	ANOVA	F = 3.620	Se rechaza Ho; a una $p < 0.05$	Scheffé	$X_{p1} = X_{p2}$; $X_{p1} = X_{p3}$; $X_{p2} \neq X_{p3}$
CD8 Tot cel./ μ L	Kruskal-Wallis	$H_{\text{corregida}} = 10.837$	Se rechaza Ho; a una $p < 0.01$	t de Student; $t_{\text{obs}} = 2.195$ t de Student; $t_{\text{obs}} = 1.323$ t de Student; $t_{\text{obs}} = 3.349$	$X_{p1} \neq X_{p2}$ a $p < 0.05$ $X_{p1} = X_{p2}$ a $p < 0.05$ $X_{p2} \neq X_{p3}$ a $p < 0.01$
CD4Tot %	Kruskal-Wallis	$H_{\text{corregida}} = 14.349$	Se rechaza Ho; a una $p < 0.01$	U de Mann-Whitney; $Z_{\text{obs}} = 2.193$ t de Student; $t_{\text{obs}} = 4.069$ U de Mann-Whitney; $Z_{\text{obs}} = 1.25$	$X_{p1} \neq X_{p2}$ a $p < 0.05$ $X_{p1} \neq X_{p3}$ a $p < 0.01$ $X_{p2} = X_{p3}$ a $p < 0.05$
CD4 Tot cel./ μ L	Kruskal-Wallis	$H_{\text{corregida}} = 17.193$	Se rechaza Ho; a una $p < 0.01$	U de Mann-Whitney; $Z_{\text{obs}} = 0.072$ t de Student; $t_{\text{obs}} = 3.603$ U de Mann-Whitney; $Z_{\text{obs}} = 3.593$	$X_{p1} = X_{p2}$ a $p < 0.05$ $X_{p1} \neq X_{p3}$ a $p < 0.01$ $X_{p2} \neq X_{p3}$ a $p < 0.01$
Razón CD4+/CD8+	Kruskal-Wallis	$H_{\text{corregida}} = 6.752$	Se rechaza Ho; a una $p < 0.05$	U de Mann-Whitney; $Z_{\text{obs}} = 2.626$ t de Student; $t_{\text{obs}} = 1.783$ U de Mann-Whitney; $Z_{\text{obs}} = 1.185$	$X_{p1} \neq X_{p2}$ a $p < 0.01$ $X_{p1} = X_{p2}$ a $p < 0.05$ $X_{p2} = X_{p3}$ a $p < 0.05$

**Figura 4.**

Comparación de los valores de los límites inferior y superior (células/ μ L), para tres subpoblaciones linfocitarias. Estudio 2015.

Cuadro IX. Comparación de valores mujeres versus hombres estudio 2015.

Parámetro	Prueba estadística	Resultado	Conclusión estadística
CD3%	t de Student	$t_{obs} = 3.646$	Se rechaza H_0 ; a una $p < 0.01$
CD3 cel./ μ L	t de Student	$t_{obs} = 1.699$	Se acepta H_0 ; a una $p < 0.05$
CD8%	t de Student	$t_{obs} = 0.269$	Se acepta H_0 ; a una $p < 0.05$
CD8 cel./ μ L	t de Student	$t_{obs} = 0.446$	Se acepta H_0 ; a una $p < 0.05$
CD4%	t de Student	$t_{obs} = 4.473$	Se rechaza H_0 ; a una $p < 0.01$
CD4 cel./ μ L	U de Mann-Whitney	$z_{obs} = 2.326$	Se rechaza H_0 ; a una $p < 0.05$
Razón CD4/CD8	U de Mann-Whitney	$z_{obs} = 1.806$	Se acepta H_0 ; a una $p < 0.05$
Ho: $P_m = P_h$. Ha: $P_m \neq P_h$			

REFERENCIAS

- Brown M, Wittwer C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. Clin Chem. 2000; 46 (8 Pt 2): 1221-1229.
- Ray K, Gupta SM, Bala M, Muralidhar S, Kumar J. CD4/CD8 lymphocyte counts in healthy, HIV-positive individuals & AIDS patients. Indian J Med Res. 2006; 124 8: 319-330.
- Noda AAL, Vidal TLA, Pérez LJE, Canete VR. Interpretación clínica del conteo de linfocitos T CD4 positivos en la infección por VIH. Rev Cubana Med. 2013; 52 (2): 118-127.
- Touil N, Hadeif R, Lemnouer A, Zrara A, Sbaili B, Belfquih B et al. Range reference determination of lymphocyte subsets in Moroccan blood donors. Afr Health Sci. 2012; 12 (3): 334-338.
- Vithayasai V, Sirisanthana T, Sakonwasun CH, Suvanpiyasiri C. Flow cytometric analysis of T-lymphocytes subsets in adult Thais. Asian Pac J Allergy Immunol. 1997; 15 (3): 141-146.
- Jiang W, Kang L, Lu HZ, Pan X, Lin Q, Pan Q et al. Normal values for CD4 and CD8 lymphocyte subsets in healthy Chinese adults from Shanghai. Clin Diagn Lab Immunol. 2004; 11 (4): 811-813.
- Mandala WL, MacLennan JM, Gondwe EN, Ward SA, Molyneux ME, MacLennan CA. Lymphocyte subsets in healthy Malawians; Implications for immunologic assessment of HIV infection in Africa. J Allergy Clin Immunol. 2010; 125 (1): 203-208.
- Urassa WK, Mbena EM, Swai AB, Gaines H, Mhalu FS, Biberfeld G. Lymphocyte subset enumeration in HIV seronegative and HIV-1 seropositive adults in Dar es Salaam, Tanzania: determination of reference values in males and females and comparison of two flow cytometric methods. J Immunol Methods. 2003; 277 (1-2): 65-74.
- Bisset LR, Lung TL, Kaelin M, Ludwig E, Dubs RW. Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. Eur J Haematol. 2004; 72 (3): 203-212.
- Avila LM, Gómez CP, Ríos RS, Laverde E. Estandarización de valores normales de linfocitos CD3, CD4, CD8 y relación CD4/CD8 por citometría de flujo en individuos sanos colombianos. Acta Médica Colombiana. 1996; 21 (4): 158-161.
- Pérez FMG, Castrejón VMI, Vargas CME, Guido BRL, Ortiz CF, Galicia TJ y cols. Determinación de concentraciones de subpoblaciones de linfocitos en donadores adultos sanos del CMN 20 de Noviembre, ISSSTE. Rev Esp Med Quir. 2013; 18 (3): 228-234.
- Razo MD, García NJ, Llorente L. Cuantificación de subpoblaciones de linfocitos de sangre periférica por citometría de flujo. Determinación de intervalos de referencia en población adulta sana de la ciudad de México. Rev Mex Patol Clin. 1996; 43 (1): 21-26.
- Jentsch-Ullrich K, Koenigsmann M, Mohren M, Franke A. Lymphocyte subsets' reference ranges in an age- and gender-balanced population of 100 healthy adults. A monocentric German study. Clin Immunol. 2005; 116 (2): 192-197.
- Backteman K, Ernerudh J. Biological and methodological variation of lymphocyte subsets in blood of human adults. J Immunol Methods. 2007; 322 (1-2): 20-27.
- Spiegel MR. Estadística. 2ª Ed. McGraw Hill, 1991.
- Dawson SB, Trapp RC. Bioestadística médica. 2ª ed. El Manual Moderno S.A. de C.V. 1991.

www.medigraphic.org.mx