

# ПРОТОЧНАЯ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИЯ В МОНИТОРИНГЕ ВИЧ- ИНФЕКЦИИ

---

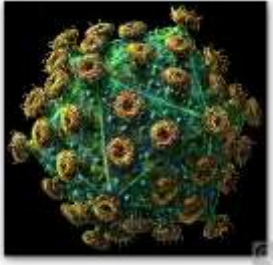
Пичугина Л.В.

к.м.н., АО «БиоХимМак Диагностика»

[flow@bcmd.ru](mailto:flow@bcmd.ru)

Санкт-Петербург, 5 октября 2018

# CD4+ и ВИЧ



- 1983 г – впервые описано снижение количества Т-хелперов (CD4+) у ВИЧ-инфицированных

*Newman JT, Nicodemus DS, Ordonez GA, Stone MJ. Lymphocyte phenotyping by fluorescence microscopy and flow cytometry: Results in homosexual men and heterosexual controls. AIDS Res 1983-1984;1(2):127-134.*

## **Abstract**

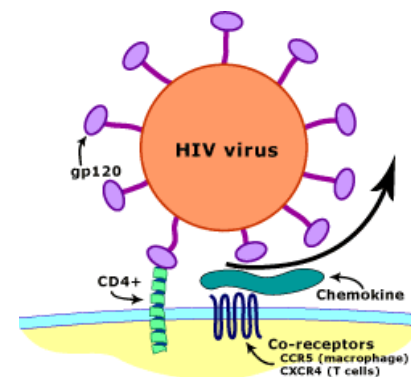
*Absolute numbers of peripheral blood T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> and T<sub>8</sub> positive cells from 15 homosexual men and concurrent controls were determined by fluorescence microscopy (FM) and by a fluorescence-activated cell sorter (FACS). A significant difference in the number of positive cells was observed between FM and FACS in the control group for all three monoclonal antibodies and for the T<sub>4</sub>/T<sub>8</sub> ratio. FACS methodology yielded a lower number of T<sub>4</sub> positive cells and a lower T<sub>4</sub>/T<sub>8</sub> ratio in the homosexual subjects. Two homosexual men had normal T<sub>4</sub>/T<sub>8</sub> ratios by FM but were found to have low ratios by FACS. The reasons for the disparate results obtained by the two methods are unclear, but such findings are important to bear in mind when evaluating male homosexuals for immunologic abnormalities.*

- 1983 г - была доказана инфекционная природа ВИЧ-инфекции. Проф. Л. Монтанье и группа их американских коллег, возглавляемых Р. Галло (2008г. – Нобелевская премия).
- 1995г - появление коммерчески доступных, одобренных FDA, тестов на вирусную нагрузку

**Вирусная нагрузка + абсолютное количество CD4+клеток**

*Основные лабораторные показатели мониторинга ВИЧ-инфицированных*

# Мишени ВИЧ



Молекулы, необходимые для инфицирования	Клетки-экспрессанты		
CD4			
CXCR4 (CD184) (увеличение экспрессии при активации бактериальными продуктами)	Т-хелпер	Моноцит	Макрофаг
CCR5			
		Дендритная клетка	

# Подсчет CD4 и CD8 на проточном цитофлуориметре

**ПРИКАЗ Минздрава от 24 декабря 2012 г. N 1511н**

*A12.06.001.002 Исследование CD4+ лимфоцитов*

*A12.06.001.003 Исследование CD8+ лимфоцитов*

## **Методическое письмо "Правила постановки диагноза ВИЧ-инфекции, 10 августа 2007 года N 5922-РХ**

*Диагностика ВИЧ-инфекции включает в себя два последовательных этапа.*

- 1. Установление собственно диагноза ВИЧ-инфекции, то есть определение состояния инфицирования ВИЧ.*
- 2. Установление развернутого клинического диагноза, то есть определение стадии, характера течения ВИЧ-инфекции, наличия вторичных (развившихся вследствие ВИЧ-инфекции) и сопутствующих заболеваний, определение маркеров прогрессирования ВИЧ-инфекции (уровня CD4-клеток в крови и уровня РНК ВИЧ в крови).*

Неспецифические лабораторные признаки ВИЧ-инфекции

При ВИЧ-инфекции может наблюдаться: снижение количества лимфоцитов, особенно CD4-лимфоцитов, увеличение процентного содержания CD8-лимфоцитов, инверсия соотношения CD4/CD8 (снижение этого значения ниже 1), возрастание количества иммуноглобулинов и другие изменения. Обнаружение этих признаков является дополнительным свидетельством в пользу диагноза ВИЧ-инфекции...

## **"Методическое письмо. Проведение лабораторного обследования на ВИЧ-инфекцию (в том числе исследование иммунитета и вирусной нагрузки при ВИЧ-инфекции)"**

**4 августа 2006 г. N 4174-РХ**

*«Выбор методики для подсчета CD4 должен осуществляться с учетом особенностей и возможностей данной лаборатории. Рекомендуемыми являются 3- и 4-цветный анализы с гейтированием по CD45 или методика PLG. Предпочтительным является одноплатформенный метод подсчета абсолютных значений...»*

## **Эпидемиологический надзор за ВИЧ-инфекцией**

**Методические указания МУ 3.1.3342—16** .—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2016.—75 с.

*«...уровень CD4-лимфоцитов у впервые выявленных пациентов и находящихся на наблюдении...»*

# Рекомендованный протокол исследования

(ВИЧ-инфекция, информационный бюллетень №28, 2006)

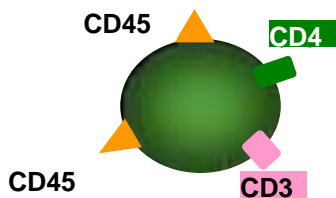
- Использование безотмывочной пробоподготовки
- Использование счетных частиц или волюметрический счет (одноплатформенная технология)
- Гейтирование по панлейкоцитарному маркеру CD45

**"Методическое письмо. Проведение лабораторного обследования на ВИЧ-инфекцию (в том числе исследование иммунитета и вирусной нагрузки при ВИЧ-инфекции)"**

**4 августа 2006 г. N 4174-РХ**

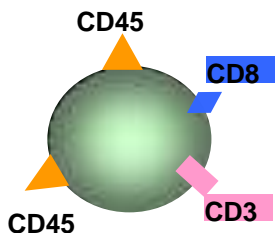
«Выбор методики для подсчета CD4 должен осуществляться с учетом особенностей и возможностей данной лаборатории. Рекомендуемыми являются 3- и 4-цветный анализы с гейтированием по CD45 или методика PLG. Предпочтительным является одноплатформенный метод подсчета абсолютных значений...»

CD45/CD4/CD3



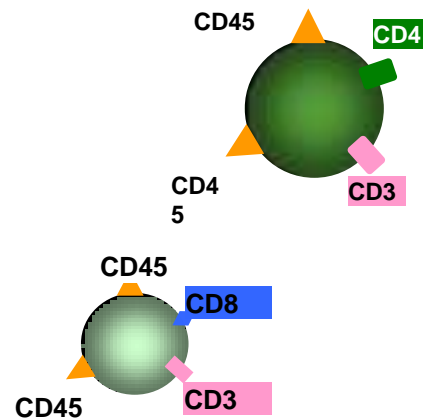
CD4+ Т-лимфоцит  
(Т-хелпер)

CD45/CD8/CD3



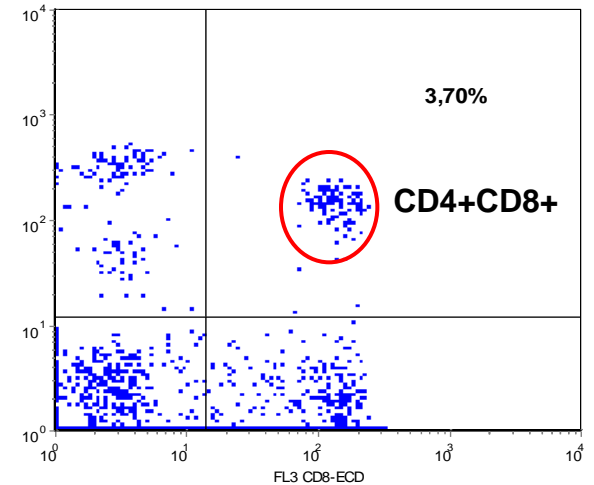
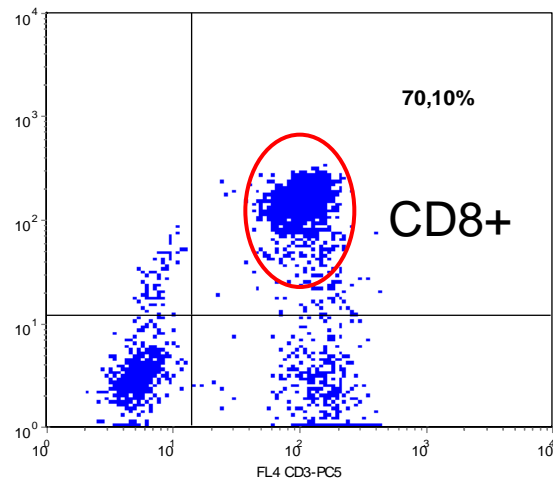
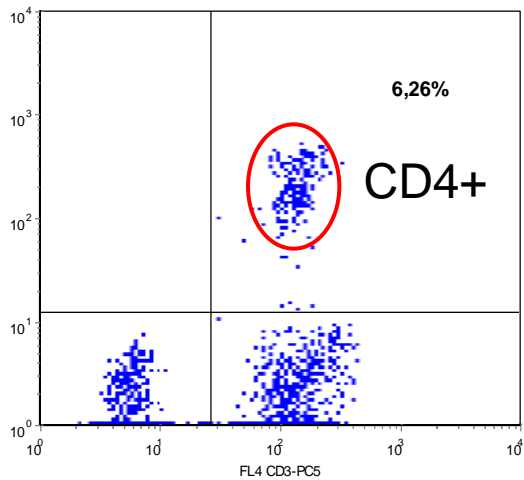
CD8+ цитотоксический  
Т-лимфоцит

CD45/CD4/CD8/CD3



Доступно только на «больших» цитометрах

# Подсчет CD4 и CD8 на проточном цитофлуориметре



**4-хцветный анализ**

CD4+ абс и %  
CD8+ абс и %  
ИПИ CD4+/CD8+  
CD4+CD8+

# Иммунорегуляторный индекс

## ИРИ (CD4/CD8) – маркер иммунной активации, истощения/старения

Sauter R et al. CD4/CD8 ratio and CD8 counts predict CD4 response in HIV-1-infected drug naive and in patients on cART. *Medicine (Baltimore)* 2016 Oct;95(42):e5094.

the CD8 cell count, but a negative effect if the ratio is below 1. A patient with an imbalanced immune system, for whom the CD4 is below the CD8 cell count, has a lower prediction for the CD4 cells at the next follow-up visit, compared to a patient with equal CD4 count but with a higher CD4/CD8 ratio.

**Пациент с иммунными нарушениями, у которого количество CD4 < CD8, имеет прогноз на следующее исследование хуже, чем пациент, у которого такое же количество CD4, но выше соотношение CD4/CD8**

CD4 cell count response to first-line combination ART in HIV-2+ patients compared with HIV-1+ patients: a multinational, multicohort European study  
*J Antimicrob Chemother* 2017; 72: 2869–2878

A poorer CD4 cell increase during first-line cART was observed in HIV-2+ patients, even after adjusting for pretreatment pVL and other potential confounders. Our results underline the need to identify more potent therapeutic regimens or strategies against HIV-2.

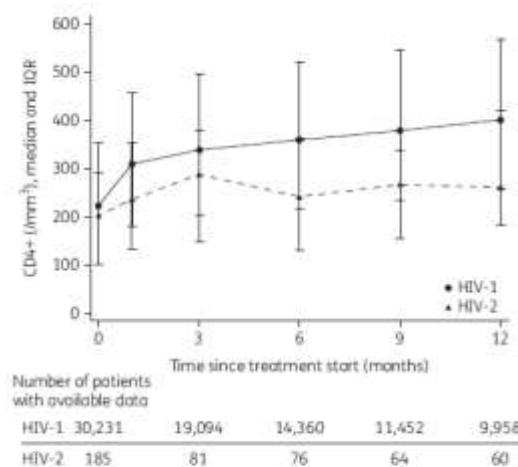


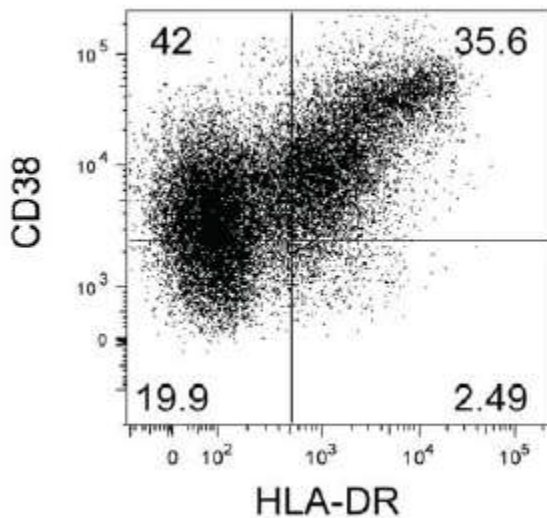
Figure 1. Median observed CD4 cell counts after first-line cART initiation in HIV-2- and HIV-1-infected patients up to 12 months of follow-up. Vertical bars represent the IQR.

↓ ИРИ

**Прогрессия ВИЧ-инфекции**  
**Прогрессия сопутствующих инфекций (HCV, HBV, CMV)**  
**↑ риска неинфекционных осложнений (онко, кардио)**

# Активация – ключевой аспект патогенеза ВИЧ инфекции

Children (median:11.2y)

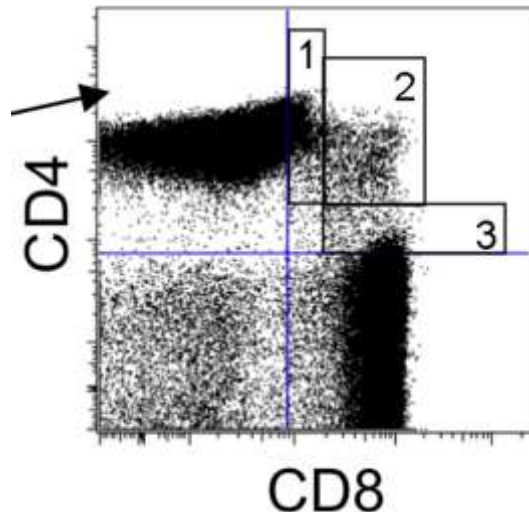


Tandon R et al. Age-Related Expansion of Tim-3 Expressing T Cells in Vertically HIV-1 Infected Children, PLoS ONE 7(9):e45733 Sep2012

**CD38 и HLA-DR – ценные прогностические маркеры**

**Высокий уровень CD8+CD38+ сопряжен с высокой вирусной нагрузкой и прогрессирующим уменьшением количества CD4+ клеток**

**Повышение уровня CD8+CD38+HLA-DR+ - неблагоприятный прогноз**



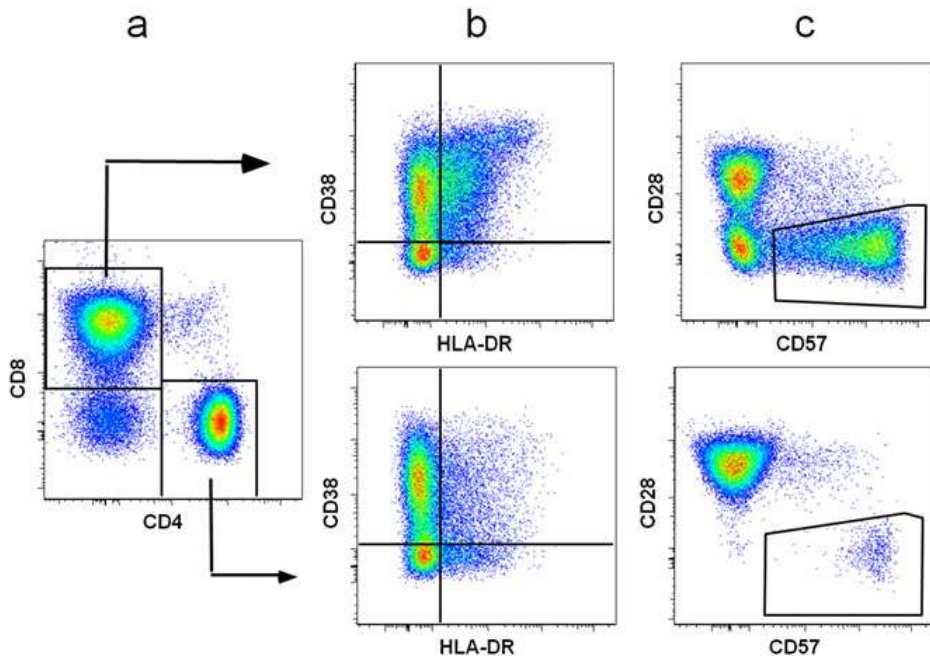
**Увеличение количества дубль-позитивных клеток (CD4+CD8+) – признак активации**

[J Med Virol.](#) 2012 Jun;84(6):845-56 **Study of CD4+CD8+ double positive T-lymphocyte phenotype and function in Indian patients infected with HIV-1.** [Chauhan NK<sup>1</sup>](#), [Vajpayee M](#), [Mojumdar K](#), [Singh R](#), [Singh A](#).

A significantly higher double positive cell population was observed in the patients with advanced HIV disease (CD4+ T cell counts below 200 cells/ $\mu$ l), as compared to patients with CD4+ T cell counts above 500 cells/ $\mu$ l.



# Старение

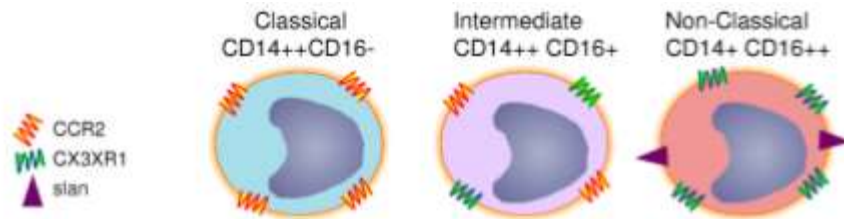


- Увеличение количества CD8+CD28-CD57+ (старяющие)
- Увеличение экспрессии PD-1 и CTLA-4
- Увеличение экспрессии CD95 и CD95L

**Старение T-клеток** - снижение экспрессии костимулирующих молекул (CD28), увеличение экспрессии ингибиторных структур (PD-1, CTLA-1), повышенная готовность к апоптозу (CD95, CD95L)

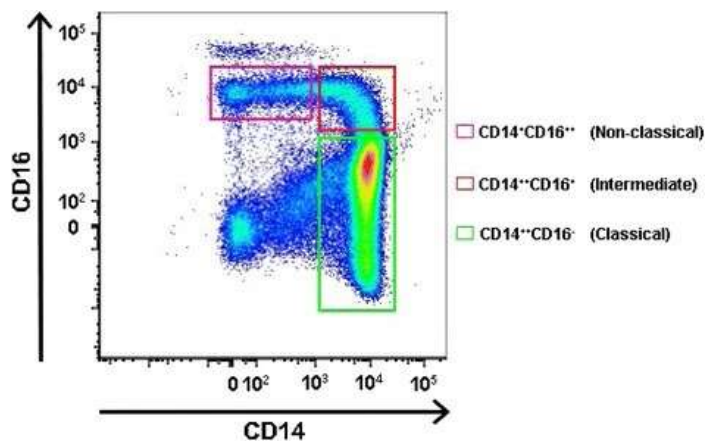
**ВИЧ инфекция характеризуется прогрессивным накоплением активированных, высоко дифференцированных, стареющих клеток.**

# Моноциты и активация



Cytokines	IL-10, IL-1	TNF- $\alpha$ , IL-10	$\uparrow$ TNF- $\alpha$
Frequency in Peripheral Blood	-80-90%	<15%	<15%

Wacleche VS et al. *The Biology of Monocytes and Dendritic Cells: Contribution to HIV Pathogenesis*; *Viruses* 2018, 10, 65; doi:10.3390/v10020065



## Неклассические моноциты:

- низкая фагоцитарная активность
- высокая продукция воспалительных цитокинов
- высокая способность к миграции

- Нарастание популяции неклассических моноцитов
- Повышение экспрессии CCR5 на классических моноцитах
- Нарастание численности неклассической популяции моноцитов коррелирует с возникновением нейрокогнитивных и сердечно-сосудистых нарушений
- Миграция воспалительных моноцитов в ткани способствует распространению инфекции (проникают через ГЭБ)
- Снижение функциональной активности (фагоцитоз и окислительный взрыв)

# Основные изменения, регистрируемые на проточном цитофлуориметре при прогрессии ВИЧ-инфекции

## Активация - Истощение - Старение

- Снижение количества Т-хелперов CD4+
- Инверсия иммунорегуляторного индекса (ИРИ<1)
- Увеличение количества дубль-позитивных клеток CD4+CD8+
- Активация иммунокомпетентных клеток – увеличение количества CD8+CD38+HLA-DR+
- Старение иммунокомпетентных клеток (*снижение экспрессии костимулирующих молекул (CD28), увеличение экспрессии ингибиторных структур (PD-1, CTLA-1), повышенная готовность к апоптозу (CD95, CD95L)*)
- Увеличение количества воспалительных моноцитов

Спасибо за внимание!

Пичугина Л.В., к.м.н.

АО «БиоХимМак Диагностика», Москва

[flow@bcmd.ru](mailto:flow@bcmd.ru)