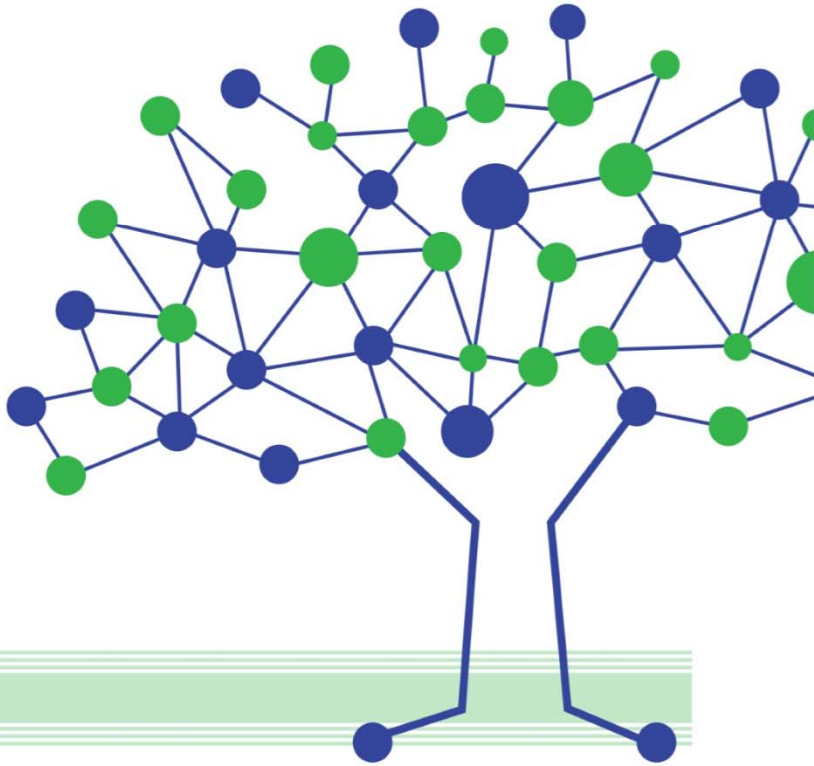
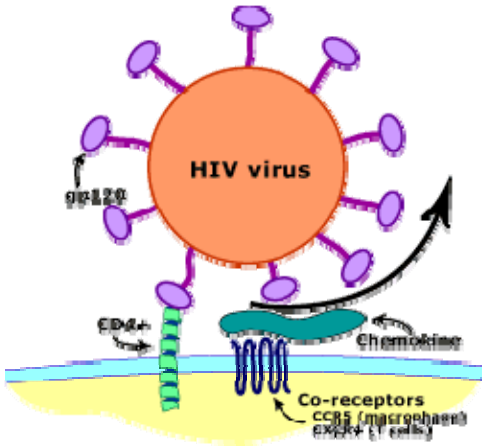
Проточная цитофлуориметрия в мониторинге ВИЧ-инфекции



Захаров А.В., АО «БиоХимМак Диагностика», август 2023г.

CD4+ и ВИЧ



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

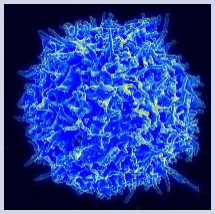
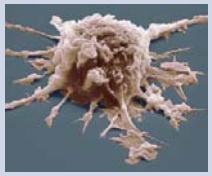
  Newman JT, Nicodemus DS, Ordonez GA, Stone MJ. ***Lymphocyte phenotyping by fluorescence microscopy and flow cytometry: Results in homosexual men and heterosexual controls.*** *AIDS Res 1983-1984;1(2):127–134.*

Abstract

Absolute numbers of peripheral blood T3, T4 and T8 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 T4/T8 ratio. FACS methodology yielded a lower number of T4 positive cells and a lower T4/T8 ratio in the homosexual subjects. Two homosexual men had normal T4/T8 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.

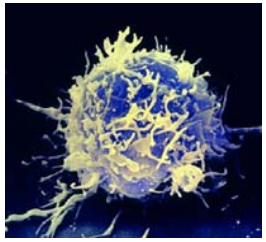
- **1983 г - была доказана инфекционная природа ВИЧ-инфекции. Проф. Л. Монтанье и группа американских коллег, возглавляемых Р. Галло (2008г. – Нобелевская премия).**
- **1995г - появление коммерчески доступных, одобренных FDA, тестов на вирусную нагрузку**

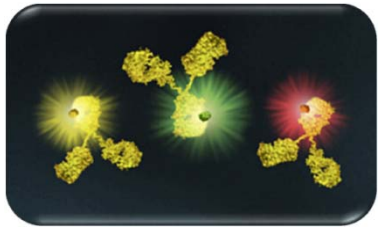
Мишени ВИЧ

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

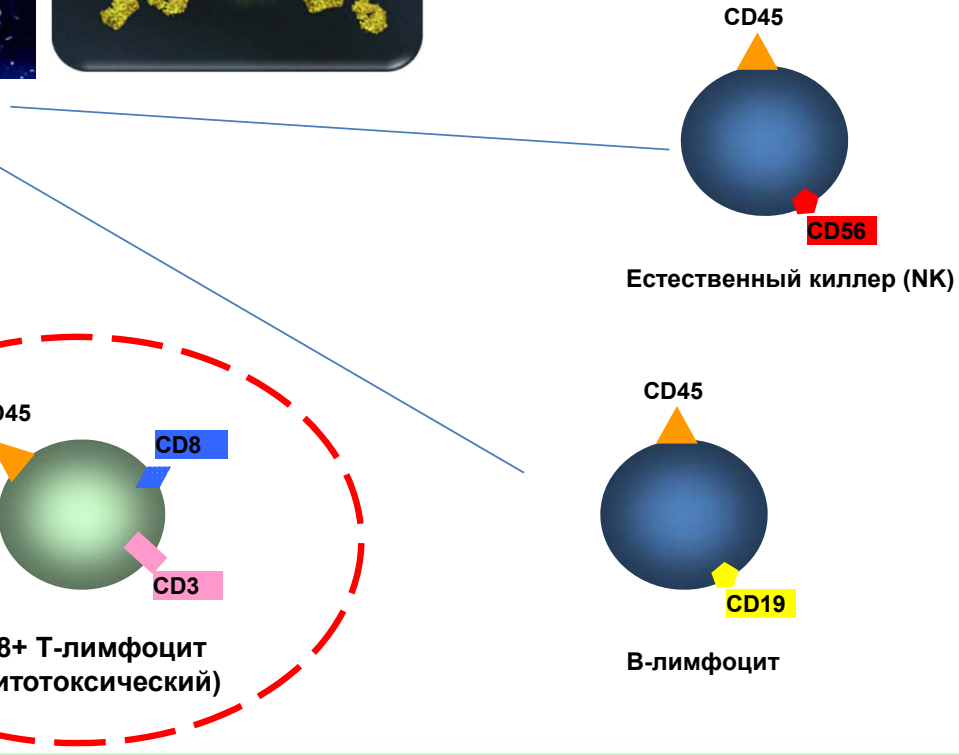
Субпопуляции лимфоцитов

Лимфоциты (CD45)





Антитела с флуоресцентной меткой



Исследование CD4 и CD8

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПРИКАЗ

30 мая 2005 г.

N 374

ОБ УТВЕРЖДЕНИИ СТАНДАРТА МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ ДЕТЯМ, БОЛЬНЫМ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(Минздрав России)

ПРИКАЗ

23 июня 2022 г. № 438н

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ЗАРЕГИСТРИРОВАНО
Регистрационный № 69394
от "28" июля 2022 г.

Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи взрослым при ВИЧ-инфекции (диагностика, лечение и диспансерное наблюдение)

Клинические рекомендации

ВИЧ-инфекция у беременных

Кодирование по Международной статистической классификации болезней и проблем, связанных со здоровьем: **B20, B21, B22, B23, B24, Z21, F02.4, R75, O98.7, Z11.4, Z20.6, Z21, Z71.7, Z83**

Возрастная категория: **взрослые**
Год утверждения: **2021**

Метод	код услуги
CD4+	A12.06.001.002
CD8+	A12.06.001.003

Клинические рекомендации "ВИЧ-инфекция у взрослых" (утв. Министерством здравоохранения РФ, 2020 г.)

ВСМ
БИОХИММАК

«Определение степени иммуносупрессии (по абсолютному и процентному содержанию CD4 и CD8)»

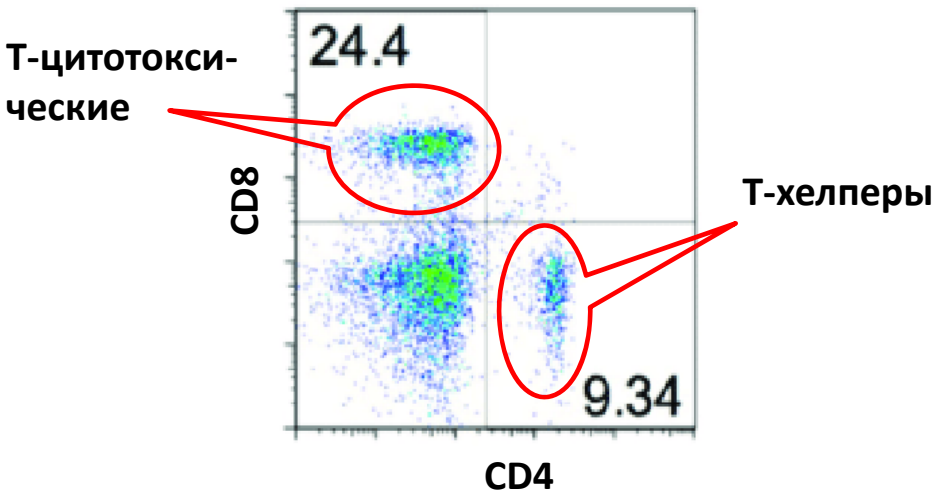
Иммунорегуляторный индекс

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

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

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.

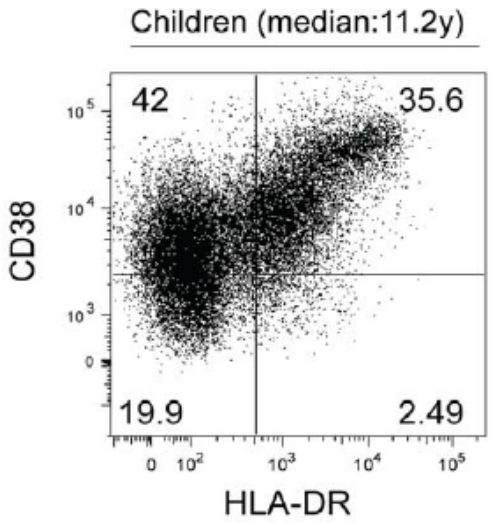
Sauter R et all. CD4/CD8 ratio and CD8 counts predict CD4 response in HIV-1-infected drug naive and in patients on cART. Medicine (Baltimore) 2016 Oct;95(42):e5094.



↓ **ИРИ**

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

Активация – *ключевой аспект патогенеза ВИЧ инфекции*



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

CD38 – ценный прогностический маркер

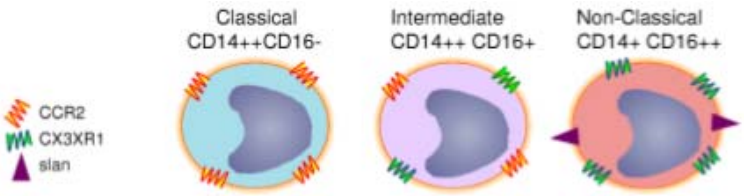
У пациентов с низким уровнем CD8+CD38+HLA-DR+ необходимость назначения антиретровирусной терапии возникает позже *(Cossarizza A. et al., (2012) T Cell activation but Not Polyfunctionality after Primary HIV Infection Predicts Control of Viral Load and Length of the Time without Therapy. PLoS ONE 7(12): e50728)*

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

Повышение уровня CD8+CD38+ - неблагоприятный прогноз

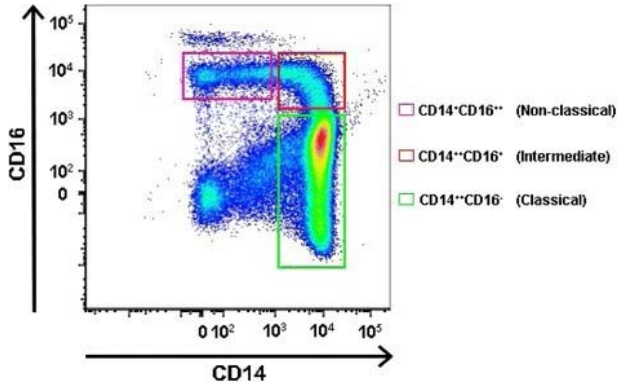
БИОХИММАК

Моноциты – резервуары ВИЧ



Cytokines	IL-10, IL-1	TNF-α, IL-10	⇧TNF-α
Frequency in Peripheral Blood	~80-90%	<15%	<15%

Wacleche VS et all. 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)
- Активация иммунокомпетентных клеток – увеличение количества CD8+CD38+HLA-DR+
- Увеличение количества воспалительных моноцитов

ВСМ
БИОХИММАК

Первый по-настоящему автоматический проточный цитометр

AQUIOS

BECKMAN COULTER
Life Sciences

- **LOAD & GO**
  - Просто загрузите образцы
- **Пробоподготовка**
  - Полностью автоматическая
- **Экономия времени**
  - Больше внимания к результатам
- **Для In vitro диагностики!**

Запуск прибора → Загрузка контролей → Загрузка образцов → Контроль результатов

ВСМ
БИОХИММАК

Полная автоматизация рутинных исследований!

Проточный цитометр Navios EX

3 конфигурации

- **От 1 до 3 лазеров**
- **От 6 до 10 каналов флуоресценции**
- **Улучшенная оптика и электроника**
- **Высокая чувствительность**
- **Наличие автоматических протоколов подсчета CD4/CD8**
- **Высокая производительность**

Проточный цитометр DxFLEX

Для in-vitro Диагностики

7 конфигураций
- от 1 до 3х лазеров
- от 4 до 13 каналов флуоресценции

Компактность – 30 кг (без загрузчика)

Карусельный загрузчик на 32 пробирки

Высокая чувствительность
и производительность

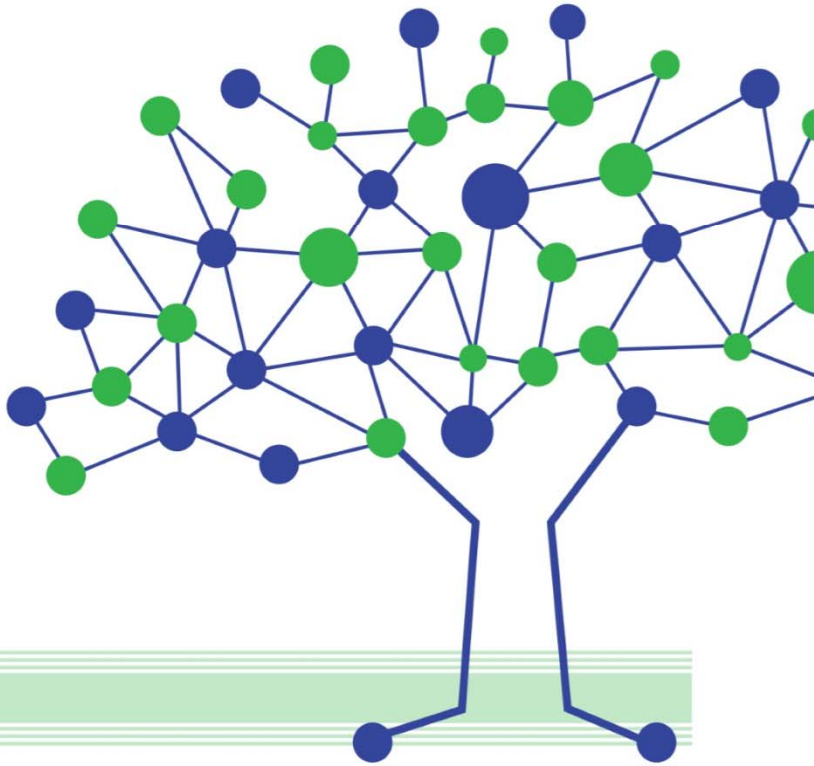
Страна происхождения - Китай

Доступен уже сегодня!

flow@biochemmack.ru

+7 (495) 647-27-40

ГК «БиоХимМак»



Пичугина Л.В., Захаров А.В.