

# Absolute lymphocyte count as a predictor of CD4+ Tcell count in children with HIV infection

Vivi Sinulingga<sup>a</sup>, Rita Evalina<sup>b</sup>, Yazid Dimyati<sup>c</sup>

<sup>a</sup> vivisinulingga@gmail.com

<sup>a</sup>Resident of Departement of Child Health Medical School, University of North Sumatera/ Adam Malik Hospital, Medan

<sup>b</sup>Allergy and Immunology Consultant of Departement of Child Health Medical School, University of North Sumatera/ Adam Malik Hospital, Medan

<sup>c</sup>Neurology Consultant of Departement of Child Health Medical School, University of North Sumatera/ Adam Malik Hospital, Medan

## Abstract

**Background:** TCD4+ cells are target of HIV and an important parameter to determine immunodeficiency status. This laboratory test can only in limited centers, expensive and cannot be done in emergency unit. The absolute lymphocytes count can be alternative test that acceptable and has diagnostic value.

**Objective:** This study aims to find correlation between absolute lymphocyte count and CD4+ count in children with HIV infection.

**Methods:** We conducted a cross sectional analytical study at Haji Adam Malik Hospital, Medan, by taking patient medical record data from 2016-2020. Samples were excluded children <12 months, suffering from malignancy or bone marrow disease and receiving chemotherapy or steroids. Blood sample were collected and analyzed on the same day according to the procedure. The Spearman correlation and linear regression analysis was performed.

**Results:** A total of 304 hematological data met the inclusion criteria with an age range of 12-214 months. Overall strong correlation strength ( $r=0.668$ ), moderate correlation at 12-35 months ( $r=0.441$ ), strong correlation at 36-59 months ( $r=0.679$ ), and strong correlation at  $\geq 60$  months ( $r=0.714$ ). The coefficient determination ( $R^2$ ) of each is 0.414, 0.233, 0.481 and 0.488. Overall AUC area was 77.7%, age 12-35 months 53.2%, age 36-59 months 74.5% and age  $\geq 60$  84.3%. Cut off point to determine the presence of an overall immunodeficiency 3.100/ $\mu$ l with a sensitivity of 64.8% and a specificity of 68.3%, 36-59 months 4.145/ $\mu$ l with a sensitivity of 71% and a specificity of 81.8% and  $\geq 60$  months of 2.775/ $\mu$ l with a sensitivity of 78.6% and specificity of 79.1%.

**Conclusion:** There is a correlation between the absolute lymphocyte count and the CD4+ count in children with HIV infection with increasing strength at a later age. The absolute lymphocyte count can be used as a predictor of CD4+ count.

Published by IJRP.ORG.Selection and/or peer-review under responsibility of International Journal of Research Publications (IJRP.ORG)

**Keyword:** HIV; CD4+; Absolute lymphocyte; Children

## 1. Introduction

Human immunodeficiency virus (HIV) infection has become a serious issue in the field of child health (UNAIDS, 2016). Indonesia has declared HIV care as a sustainable development goal (SDGs) 2030, which has not been achieved in the Millennium Development Goals (MDGs) 2000-2015 (BPSI, 2016).<sup>2</sup> Infeksi HIV merupakan penyakit infeksi kronis yang membutuhkan pemantauan. Sel TCD4+ merupakan sel target dari infeksi HIV serta memiliki peran sentral pada sistem imun. Jumlah sel TCD4+ digunakan untuk menentukan derajat imunodefisiensi dan memantau respon terapi (Kementerian Kesehatan RI, 2014). Pemeriksaan jumlah sel TCD4+ relatif mahal dan hanya dapat dilakukan oleh sentra tertentu. Studi analisis biaya pasien HIV di

Indonesia mencatat 65% biaya saat inisial pengobatan dihabiskan untuk pemeriksaan laboratorium Siregar, 2015). Beberapa negara dengan sumber daya pemeriksaan jumlah sel TCD4+ yang terbatas, sering menggunakan jumlah absolut limfosit sebagai alternatif pemeriksaan jumlah sel TCD4+. Hal ini berdasarkan rekomendasi WHO tahun 2003, jika pemeriksaan jumlah sel TCD4+ tidak tersedia maka dapat digunakan jumlah absolut limfosit sebagai alternatif pada pasien HIV untuk memulai terapi ARV, meskipun saat ini WHO sudah merekomendasikan ARV diberikan pada semua pasien HIV tanpa melihat jumlah CD4+ (WHO, 2004). Beberapa penelitian pada pasien HIV dewasa menunjukkan hubungan jumlah absolut limfosit sebagai prediktor jumlah sel TCD4+. Jumlah absolut limfosit merupakan pemeriksaan mudah dan murah yang menunjukkan sensitivitas dan spesifisitas cukup tinggi sebagai alternatif pemeriksaan CD4+. Namun, beberapa studi masih menunjukkan variasi dari nilai batas yang memiliki sensitivitas dan spesifisitas paling baik serta terbatasnya penelitian pada pasien dewasa (Agrawal, 2016; WHO, 2004).

## 2. Method

### 2.1. Study Design

Penelitian ini menggunakan desain observasional analitik *cross sectional* dengan pendekatan retrospektif pada anak dengan infeksi HIV di RSUP Adam Malik Medan dengan mengambil data rekam medis.

### 2.2. Population and Sample

Sampel adalah sebagian anak dengan infeksi HIV yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi dari tahun 2016-2020. Kriteria inklusi yaitu anak dengan infeksi HIV yang mendapat pemeriksaan jumlah absolut limfosit dan jumlah CD4+ pada hari yang sama di rumah sakit H. Adam Malik. Kriteria eksklusi yaitu berusia dibawah 12 bulan, didiagnosis menderita kelainan sumsum tulang atau menderita keganasan, mendapat pengobatan kortikosteroid atau kemoterapi, atau data rekam medis tidak lengkap.

### 2.3. Assesment Procedure

- 2.3.1. Peneliti melakukan evaluasi data rekam medis pada anak dengan infeksi HIV yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.
- 2.3.2. Dilakukan pengumpulan data jumlah absolut limfosit dan jumlah CD4+ dari rekam medis pasien. Data dibagi menjadi 3 kelompok berdasarkan usia penuh yaitu 12-35 bulan, 35-59 bulan dan  $\geq 60$  bulan.
- 2.3.3. Pemeriksaan serum kadar sel T CD4+ di laboratorium RSUP Adam Malik Medan dilakukan dengan alat ukur yang sama yaitu FACS Calibur Becton Dickinson®.
- 2.3.4. Pemeriksaan serum jumlah absolut limfosit di laboratorium RSUP Adam Malik Medan dilakukan dengan alat ukur yang sama yaitu automatic cell counter analyzer Sysmex XN-1000.
- 2.3.5. Data hematologi pada satu pasien dapat diambil kembali dalam rentang pemeriksaan minimal 6 bulan.
- 2.3.6. Dilakukan pengolahan dan analisis data

### 2.4. Ethical Consideration

This study received approval from the Research Ethics Committee of the Faculty of Medicine, University of North Sumatera / Haji Adam Malik General Hospital.

### 2.5. Statistical Analysis

Data yang terkumpul diolah dan dianalisis dengan interval kepercayaan 95% dan kemaknaan  $P < 0.05$ . Sebaran data diuji dengan uji normalitas Kolmogorov-smirnov dan Shapiro-wilk. Jika data terdistribusi normal maka data diuji dengan uji korelasi Pearson. Jika data tidak terdistribusi normal maka diuji dengan uji korelasi Spearman. Data dilanjutkan dengan uji korelasi linier untuk menentukan kekuatan dan rumus prediktor. Untuk menentukan *cut off point* jumlah absolut limfosit dengan menggunakan kurva ROC dan ditentukan sensitivitas dan spesifisitas terhadap adanya imunodefisiensi. Data diolah dengan komputerisasi.

### 3. Result

Penelitian ini menggunakan 304 data hematologi anak dengan infeksi HIV di Rumah Sakit H. Adam Malik Medan dari tahun 2016-2020. Data dikelompokkan berdasarkan kategori usia yaitu usia 12 – 35 bulan sebanyak 43 data, usia 36 – 59 bulan sebanyak 53 data dan  $\geq 60$  bulan sebanyak 208 data. Profil hematologi seluruh data penelitian yang dikelompokkan berdasarkan kategori usia. Data demografi subjek penelitian ditampilkan pada tabel 1.

**Table 1. Subjects Characteristics (n=31)**

<b>Profil Hematologi Median (min-mak)</b>	<b>12 – 35 bulan (n = 43)</b>	<b>36 – 59 bulan (n = 53)</b>	<b><math>\geq 60</math> bulan (n = 208)</b>
Hemoglobin, g/dl	10,5 (2,30-13,80)	10,9 (6,20-14,50)	11,6 (4,40-15,80)
Leukosit, $10^3/\text{ml}$	9,5(0,24-20,68)	8,7 (3,97-18,92)	7,06 (1,9-19,63)
Hematokrit, %	33 (5,4-39,6)	33 (18,0-39,0)	34 (5,8-38,7)
Trombosit, $10^3/\text{ml}$	315 (50-631)	315 (50-631)	358 (29-782)
Neutrofil Absolut, $10^3/\mu\text{l}$	2,9 (0,80-12,37)	2,8 (1,30-13,56)	2,95 (0,10-13,29)
Limfosit Absolut, $10^3/\mu\text{l}$	4,7 (1,26-12,47)	4,2 (0,65-7,41)	2,8 (0,30-7,06)
Monosit Absolut, $10^3/\mu\text{l}$	0,8 (0,26-1,64)	0,7 (0,37-2,07)	0,56 (0,9- 7,68)
Eosinofil Absolut, $10^3/\mu\text{l}$	0,29 (0,01-7,6)	0,35 (0,00-6,61)	0,26 (0,00-3,27)
Basofil Absolut, $10^3/\mu\text{l}$	0,04 (0,01-0,18)	0,03 (0,00-0,09)	0,03 (0,00-0,83)
CD4, %	19 (1,0-43,0)	23 (1,0-46,0)	21 (1-47)
CD4 Absolut, sel/ $\text{mm}^2$	716 (8,0-3668)	720 (6,0-3.443,0)	557 (2-2295,0)

Hasil analisis menggunakan uji korelasi Spearman untuk seluruh kelompok usia menunjukkan korelasi positif yang signifikan, artinya peningkatan jumlah limfosit absolut akan diikuti peningkatan nilai CD4+ absolut, namun dengan nilai korelasi yang berbeda-beda. Perbedaan kekuatan korelasi dapat dilihat pada tabel 2.

**Table 2. Korelasi Jumlah Limfosit Absolut dan CD4+ absolut**

		<b>CD4+ Absolut</b>		
		<b>n</b>	<b>P</b>	<b>r</b>
Seluruh Pasien	Jumlah Limfosit Absolut	304	<0,001	0,668
Usia 12 – 35 bulan	Jumlah Limfosit Absolut	43	0,006	0,441
Usia 36 – 59 bulan	Jumlah Limfosit Absolut	53	<0,001	0,679
Usia $\geq 60$ bulan	Jumlah Limfosit Absolut	208	<0,001	0,714

Pada tabel 3 menampilkan hasil analisis kurva ROC untuk memprediksi status imunodefisiensi pada pasien anak dengan HIV menggunakan jumlah limfosit absolut. Luas kurva ROC juga bervariasi berdasarkan usia. Pada kelompok 12-35 bulan, jumlah limfosit absolut tidak dapat memprediksi status imunodefisiensi.

**Table 3. Analisis kurva ROC untuk memprediksi status imunodefisiensi menggunakan jumlah absolut limfosit**

Kelompok	P	AUC	95% IK
Seluruh Usia	<0,001	0,777	0,653 – 0,901
Usia 12 – 35 bulan	0,532	0,532	0,322 – 0,829
Usia 36 – 59 bulan	0,001	0,745	0,612 – 0,877
Usia $\geq$ 60 bulan	<0,001	0,843	0,787 – 0,899

Pada tabel 4 ditampilkan nilai cut off point yang didapat berdasarkan analisis statistik. Nilai cut off point didapat lebih tinggi pada kelompok usia yang lebih muda dan lebih rendah pada usia yang lebih tua.

**Table 4. Sensitivitas, spesifisitas, positive dan negative predictive value dari jumlah limfosit absolut terhadap status imunodefisiensi.**

Jumlah Limfosit Absolut, $10^3/\mu\text{l}$	Status Imunodefisiensi		Sens.	Spes.	NPP	NPN
	Ya	Tidak				
Seluruh Usia						
$\leq 3,1$	107	44	64,8%	68,3%	70,9%	62,1%
$> 3,1$	58	95				
Usia 36-59 bulan						
$\leq 4,145$	22	4	71%	81,8%	84,6%	66,7%
$> 4,145$	9	18				
Usia $\geq$ 60 bulan						
$\leq 2,775$	77	23	78,6%	79,1%	77%	80,6%
$> 2,775$	21	87				

#### 4. Discussion

Penelitian yang telah dilakukan menunjukkan hubungan antara jumlah limfosit absolut dengan jumlah CD4+ pada semua usia anak. Namun, dijumpai perbedaan kekuatan korelasi yang bergantung pada usia. Hal ini dapat disebabkan tingginya rentang nilai normal limfosit dan jenis limfosit pada usia dini serta dinamikanya perubahan persentase jenis limfosit yang kemudian menjadi stabil dengan bertambahnya usia (Ikinciogullu, 2004; Tosato, 2015). Nilai normal limfosit dan jenis limfosit pada dewasa dan remaja tidak menunjukkan perbedaan bermakna (Valiathan, 2014). Sedangkan variasi paling luas dijumpai pada neonatus dan infan (Indigible, 2010). *European collaborative study* 2005, juga menemukan pola dan jumlah total limfosit, CD4+ dan CD8+ bervariasi berdasarkan umur terutama di tiga tahun pertama kehidupan, tetapi berkurang di usia selanjutnya.

Beberapa studi sebelumnya pada pasien HIV dewasa menunjukkan hasil yang konsisten dan menunjukkan korelasi yang kuat antara jumlah limfosit absolut dan jumlah CD4+.<sup>52,53</sup> Studi yang melibatkan pasien HIV pada rentang usia yang lebih luas dan melibatkan pasien anak dan dewasa menunjukkan kekuatan korelasi yang bervariasi. Paul dkk 2015, melakukan penelitian pada semua usia dengan rentang usia 1-82 tahun menunjukkan kekuatan korelasi yang juga kuat ( $r$  0,565) dan dengan CoP 2009/ $\mu\text{l}$  memiliki sensitivitas

82,28% dan spesifisitas 65,55% untuk nilai CD4+ <350 sel / $\mu$ l. Khanna dkk 2017, melakukan studi pada rentang usia 11 – 78 tahun dan mendapatkan hubungan korelasi positif kuat ( $r$  0,741). Luas ROC untuk jumlah limfosit absolut <200/ $\mu$ l adalah 90,1% dan <350/ $\mu$ l 91,1% yang menunjukkan nilai diagnostik sangat kuat. Pada nilai CoP 1.650/ $\mu$ l menunjukkan sensitivitas 80,22% dan spesifisitas 86,44% untuk jumlah limfosit absolut <200/ $\mu$ l. Daka dkk 2008, juga melakukan studi pada usia 5-65 tahun menunjukkan kekuatan korelasi pada studi ini sedang ( $r$  0,398) dan dengan CoP 1.780 sel/ $\text{mm}^2$  memiliki sensitivitas 61% dan spesifisitas 62% untuk nilai CD4+ <200sel/ $\text{mm}^3$ .

*HIV paediatric prognostic markers collaborative study* 2005, melakukan studi meta analisis pada anak dengan infeksi HIV dan menunjukkan kekuatan korelasi positif lemah ( $r$  0,08-0,19) yang bervariasi berdasarkan umur. Rouet dkk 2006, mengemukakan bahwa jumlah CD4+ bayi HIV memiliki perbedaan signifikan lebih rendah dibandingkan bayi sehat pada usia 3 dan 6 bulan, sedangkan jumlah limfosit absolut tidak memiliki perbedaan yang signifikan.

WHO pada tahun 2007 merekomendasikan jumlah absolut limfosit sebagai alternatif pemeriksaan CD4+ di daerah sentra terbatas. Namun, banyak sekali faktor yang mempengaruhinya jumlah limfosit absolut seperti adanya infeksi malaria dan kecacingan. Selain itu prosedur pemeriksaan harus diperhatikan. Shete dkk 2010, mengemukakan bahwa faktor jenis kelamin, usia, ras, waktu pengambilan spesimen terkait irama diurnal, stres fisik dan psikis, kehamilan serta obat-obatan seperti sefalosporin, kemoterapi, nikotin dan steroid, adanya tuberkulosis dan infeksi virus lain mempengaruhi jumlah CD4+.

## 5. Conclusion

Hasil penelitian ini menunjukkan korelasi antara jumlah CD4+ dengan jumlah absolut limfosit dengan kekuatan yang bervariasi. Studi ini merekomendasikan penggunaan jumlah absolut limfosit sebagai alternatif jika tidak tersedia pemeriksaan CD4+ di sentra terbatas.

## Acknowledgements

The researcher would like to thank all staff of the allergy and immunology division at the Faculty of Medicine, University of North Sumatra and Juliandi, Rina Amalia Saragih, and Tiangsa Sembiring for their time and guidance.

## References

- Agrawal PB, Rane SJ, Jadhav. Absolute lymphocyte count as a surrogate marker of CD4 count in monitoring HIV infected individuals: A prospective study. *J Clin Diag Res* 2016; 10: 17-19.
- Badan Pusat Statistik Indonesia. Potret awal tujuan pembangunan berkelanjutan (*sustainable development goals*) di Indonesia. Jakarta: BPS;2016.
- Buseri FL, Mark D, Jeremiah ZA. Evaluation of absolute lymphocyte count as a surrogate marker for CD4+ cell count for the initiation of antiretroviral therapy (ART) in resource limited settings. *Int J biomed lab scie* 2012;2: 44-9.
- European collaborative study. Age-related standards for total lymphocyte, CD4+ and CD8+ T cell counts in children born in Europa. *Pediatr infectdis J* 2005;24:595-600.
- Daka D, Loha E. Relationship between total lymphocyte (TLC) and CD4 count among peoples living with HIV, Southern Ethiopia: a retrospective evaluation. *AIDS res ther* 2008; 5: 1-5.
- Gautam H, Saini S, Bhalla P, Singh T. Use of total lymphocyte count to predict absolute CD4 count in HIV sero-positive cases. *J intr ascco phys AIDS care* 2010; 9: 292-5.
- HIV paediatric prognostic markers collaborative study. Use of total lymphocyte count for informing when to start antiretroviral therapy in HIV-infected children: a meta analysis of longitudinal data. *Lancet* 2005; 366:1868-74.
- Idigble EO, Audu RA, Iroha EO, Akinsulie AO, Temiye EO, Ezeaka F dkk. T-lymphocyte subsets in apparently healthy children. *Intrn J pediatr* 2010; 1-7.
- Ikinciogullari A, Kendirli T, Dogu F, Egin Y, Sukru IR, Babacan E. Peripheral blood lymphocyte subset in healthy turkish children. *Turkish J pediatr* 2004; 46: 125-130.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Pedoman Penerapan Terapi HIV pada Anak. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia;2014.
- Khanna R, Pahwa V, Manohar C. Absolute lymphocyte count: a probable substitute marker for CD4 count in HIV infected patients in economically restrained countries- Ruchee Khanna- Kastuba Medical Hospital. *J phar nanotech* 2017; 5: 1-2.

- Mofenson LM, Harris DR, Moye J, Bethel J, Korelitz J, Read JS dkk. Alternatives to HIV-1 RNA concentration and CD4 count to predict mortality in HIV-1 infected children in resource poor setting. *Lancet* 2003; 362:1625-27.
- Paul S, Puttaiah P, Rameshkumar K. Utility of absolute lymphocyte count for the monitoring of AIDS patients. *Cur med res practs* 2015;5:153-5.
- Rouet F, Inwoley A, Eouevi DK, Viho I, Becquet R, Sakarovitch C, dkk. CD4 percentages and total lymphocyte counts as early surrogate markers for pediatric HIV-1 infection in resource limited setting. *J trop pediatri* 2006; 52: 346-54.
- Shete A, Thakar M, Paranjape R. A review on peripheral blood CD4+T lymphocyte counts in healthy adult Indians. *Indian J Med Res* 2010;132: 667-75.
- Siregar AYM, Tromp NT, Komarudin D, Wisaksana R, Crevel RV, Ven A dkk. Cost of HIV/AIDS treatment in Indonesia by time of tretment and stage of disease. *BMC health services research* 2015; 15: 1-12.
- Tosato F, Bucciol G, Pantano G, Putti MC, Sanzari MC, Basso G dkk. Lymphocytes subset reference values in childhood. *Cytometry* 2015. 81-5.
- UNAIDS. Children and HIV. Switzerland: UNAIDS; 2016.
- Valiathan R, Deeb K, Diamante M, Ashman M, Sachdeva N, Asthana D. Reference range of lymphocyte subsets in healthy adults and adolescents with special mention of T cell maturation subsets in adults of south florida. *Immunobiology* 2014; 2: 1-10.
- WHO. Laboratory guidelines for enumerating CD4 T lymphocytes in the context of HIV/AIDS. New Delhi: WHO; 2007.
- WHO. Scaling up antiretroviral therapy in resource limited setting: treatment guidelines for a public health approac. Geneva: WHO; 2004