



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη δεικτών ανοσοπαράλυσης στους ασθενείς με COVID-19
λοίμωξη στη μονάδα εντατικής θεραπείας και συσχέτιση με την
έκβαση

Νικόλαος-Μιχαήλ Τσερλικάκης

Ειδικευόμενος Αναισθησιολογίας

ΑΜ: 1130088

Ηράκλειο, Φεβρουάριος 2022



UNIVERSITY OF CRETE - SCHOOL OF MEDICINE



POSTGRADUATE STUDY PROGRAMME – Master of Science

Emergencies and Intensive Care in Children Adolescents

and Young Adults

DIPLOMA THESIS

«Study of immunoparalysis markers in covid-19 critically ill patients at ICU and correlation with outcome»

Nikolaos -Michail Tserlikakis

Anaesthesia Trainee

ID number: 1130088

Heraklion, February ,2022

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Κατερίνα Βαπορίδη , Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Εντατικής
Θεραπείας , Ιατρική σχολή , Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Κατερίνα Βαπορίδη , Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Εντατικής
Θεραπείας

Ευμορφία Κονδύλη, Καθηγήτρια Εντατικής Θεραπείας

Γιώργος Νότας, Αναπληρωτής Καθηγητής Επείγουσας
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

1.Κατερίνα Βαπορίδη , Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Εντατικής
Θεραπείας

2. Ευμορφία Κονδύλη, Καθηγήτρια Εντατικής Θεραπείας

3. Γιώργος Νότας, Αναπληρωτής Καθηγητής Επείγουσας Ιατρικής

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Εντατικής Θεραπείας κα. Βαπορίδη Κατερίνας για την πολύτιμη καθοδήγηση και την αμέριστη κατανόησή της κατά την παραμονή μου για 6 μήνες στην ΜΕΘ Πα.Γ.Ν.Η. αλλά και για την εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας. Η ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας θα ήταν ανέφικτη δίχως την υποστήριξη και τη συμβολή της σε όλα τα στάδια της έρευνας.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην Καθηγήτρια Εντατικής Θεραπείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, κα. Ευμορφία Κονδύλη, για την επιστημονική καθοδήγηση και συμβουλευτική της σε όλα τα στάδια της μελέτης.

Ευχαριστώ πολύ τον αναπληρωτή καθηγητή Επείγουσας Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης κο Νότα Γεώργιο , για την επιστημονική καθοδήγηση και συμβουλευτική του σε όλα τα στάδια της μελέτης.

Θερμά ευχαριστήρια στον κ.Τσατσάνη , Καθηγητή Κλινικής βιοχημείας και την κα. Ιωάννα Πανταζή για την καταλυτική βοήθεια τους στην μελέτη των δειγμάτων.

Στην καθηγήτρια μου κα. Παπαιωάννου , Αναπ. Καθηγήτρια Αναισθησιολογίας για την αμέριστη συμπαράσταση της σε όλη αυτή τη περίοδο.

Θα ήθελα να εκφράσω επίσης τις θερμές ευχαριστίες μου σε όλο το προσωπικό της ΜΕΘ του Πα.Γ.Ν.Η για την κατανόηση τους και την προθυμία που έδειξαν καθ' όλη την συλλογή δειγμάτων από τους ασθενείς.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την αδιάλειπτη υπομονή και προσφορά τους.

Η παρούσα εργασία είναι αφιερωμένη στην γυναίκα μου και τον γιό μας .

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Πίνακας περιεχομένων

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	6
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	10
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	11
Εισαγωγή.....	11
Σκοπός.....	11
Μεθοδολογία.....	11
Αποτελέσματα	12
Συμπεράσματα.....	12
Abstract.....	15
Introduction	15
Objective	15
Methodology.....	15
Results.....	16
Conclusions	16
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	17
Γενικό Μέρος	18
Εισαγωγή.....	18
Φλεγμονώδης αντίδραση (SIRS).....	18
Σύνδρομο Αντιφλεγμονώδους Απόκρισης Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome (CARs).....	19
Ανοσοπαράλυση	21
Τα μονοκύτταρα και ο ρόλος τους στην ανοσολογική αντίδραση και στην ανοσοπαράλυση	21
Ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις στους βαρέως πάσχοντες ασθενείς	23
Πνευμονία που σχετίζεται με τον Μηχανικό αερισμό (ventilator-associated pneumonia, VAP)	23
Λοιμώξεις της κυκλοφορίας του αίματος που σχετίζονται με ενδοαγγειακούς καθετήρες Catheter Related Bloodstream Infection (CRBSI)	24
SARS-CoV-2	25
Διαταραχές της Ανοσολογικής Αντίδρασης έναντι του ιού SARS-CoV-2 που σχετίζονται με σοβαρή νόσο	26
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	27
Εισαγωγή.....	28
Σκοπός.....	28
Θεωρητικό υπόβαθρο	28

Μέθοδος	28
Κριτήρια εισαγωγής.....	29
Κριτήρια αποκλεισμού.....	29
Συλλογή δειγμάτων και ανάλυση	30
Περιγραφή μεθόδου ELISA	31
ΔΕΟΝΤΟΛΟΓΙΑ-ΒΙΟΗΘΙΚΗ.....	32
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	32
Αποτελέσματα	33
1 ^ο ερώτημα.....	33
2 ^ο ερώτημα.....	33
Χαρακτηριστικά των ασθενών.....	33
Δείκτες ανοσοκαταστολής.....	35
Δείκτες ανοσοκαταστολής – επίπεδα IL-10 ορού.....	37
Συζήτηση	40
Περιορισμοί της μελέτης	42
Προοπτική της μελέτης.....	42
Συμπεράσματα.....	43
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	45

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΜΕΘ	Μονάδα Εντατικής Θεραπείας
VAP	Ventilator Associated Pneumonia
CRBSI	Catheter-related bloodstream infection
IL-10	Interleukin-10
TNF α	Tumor Necrosis Factor - α
CARS	Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome
HAI	Healthcare Associated infections
LPS	Lipopolysaccharide
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
IFN	Interferons
SIRS	Systemic Inflammatory response Syndrome
ΕΛ	Ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns,
LPS	Lipopolysaccharide
GSF	Granulocyte colony-stimulating factor
ARDS	Σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή

Στους βαρέως πάσχοντες ασθενείς με σήψη, ή άλλη απειλητική για τη ζωή νόσο ή τραύμα, η οξεία φάση ακολουθείται από γενικευμένη δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού, αναφερόμενη συχνά ως ανοσοκαταστολή της βαριάς κατάστασης ή ανοσοπαράλυση. Η ανοσοπαράλυση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα ευπάθεια στις ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις, που είναι και η κυριότερη αιτία νοσηρότητας και θνητότητας στις μονάδες εντατικής θεραπείας. Η παθογένεια της ανοσοπαράλυσης δεν είναι γνωστή, ενώ η ανάγκη εύρεσης διαγνωστικών και θεραπευτικών μέσων είναι επιτακτική. Οι ασθενείς με νόσο Covid-19 αποτελούν μια ομάδα ασθενών με ιδιαίτερο ενδιαφέρον, στους οποίους η παρουσία ανοσοπαράλυσης δεν έχει ακόμα μελετηθεί. Τα μονοκύτταρα/μακροφάγα είναι κεντρικοί μεσολαβητές της φυσικής ανοσίας. Συμβάλλοντας στην αναγνώριση των παθογόνων, την αντιγονοπαρουσίαση, και την καταστροφή των μικροοργανισμών τα μακροφάγα αποτελούν τους κύριους ρυθμιστές της φλεγμονώδους αντίδρασης. Σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς έχουν περιγραφεί ενδείξεις δυσλειτουργίας των μακροφάγων, όπως μειωμένη παραγωγή κυτταροκινών και μειωμένη έκφραση HLA υποδοχέων, και συσχετίζεται με δυσμενή έκβαση των ασθενών. Στους ασθενείς με Covid-19 που νοσηλεύονται επί μακρόν στη ΜΕΘ η λειτουργικότητα των μονοκυττάρων δεν έχει μελετηθεί.

Σκοπός

Σκοπός της μελέτης είναι η διερεύνηση της παρουσίας ανοσοπαράλυσης σε ασθενείς που νοσηλεύονται με νόσο Covid-19 στη ΜΕΘ μετά την 5 η μέρα νοσηλείας, όπως αυτή εκδηλώνεται με μειωμένη παραγωγή TNF μετά από διέγερση με λιποπολυσακχαρίτη και αυξημένη συγκέντρωση ιντερλευκίνης 10. Η μελέτη αυτή εξέτασε δύο ερωτήματα: (1) την διάρκεια παραμονής των ασθενών με νόσο Covid-19 στη ΜΕΘ για να διαπιστώσει τον κίνδυνο εμφάνισης ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων, και (2) την παρουσία ανοσοπαράλυσης σε ασθενείς που νοσηλεύονται με νόσο Covid-19 στη ΜΕΘ μετά την 5 η μέρα νοσηλείας, όπως αυτή εκδηλώνεται με μειωμένη παραγωγή TNFα μετά από διέγερση με λιποπολυσακχαρίτη και αυξημένη συγκέντρωση ιντερλευκίνης 10.

Μεθοδολογία

Στη μελέτη θα συμπεριλάβουμε ενήλικες ασθενείς νοσηλευόμενους στη μονάδα εντατικής θεραπείας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου με λοίμωξη από Sars-CoV-19. Τα δημογραφικά στοιχεία καθώς και τα στοιχεία της πορείας νόσου, της φαρμακευτικής αγωγής, της εμφάνισης λοιμώξεων και της έκβασης των ασθενών θα λαμβάνονται από τον ιατρικό φάκελο των

ασθενών. Για τη συμμετοχή στη μελέτη θα λαμβάνεται έγκριση από τους ασθενείς ή τους νόμιμους εκπροσώπους τους. Σε δείγμα αίματος που θα λαμβάνονται την 5-7η μέρα της νοσηλείας των ασθενών θα εξετάζεται η εμφάνιση ανοσοπαράλυσης, όπως αυτή υποδηλώνεται από την μειωμένη παραγωγή κυτταροκινών στο αίμα μετά από διέγερση με λιποπολυσακχαρίτη. Συγκεκριμένα, δείγμα αίματος του ασθενούς θα επωάζεται για 4 ώρες με λιποπολυσακχαρίτη στους 37 βαθμούς, και στη συνέχεια θα φυγοκεντρείται και θα απομονώνεται ο ορός για μέτρηση επιπέδων TNF α , και IL- 10. Θα γίνεται σύγκριση των συγκεντρώσεων των κυτταροκινών μεταξύ του δείγματος που έχει επωαστεί με λιποπολυσακχαρίτη και δείγματος που έχει επωαστεί χωρίς διέγερση. Η απουσία αύξησης παραγωγής κυτταροκινών θα θεωρηθεί ως δείκτης ανοσοπαράλυσης.

Αποτελέσματα

Η ηλικιακή κατανομή των ασθενών θετικοί στον Sars-CoV 2 που τελικά μελετήθηκαν είναι από 41-88 ετών με μέση τιμή τα 70 έτη και τυπική απόκλιση 12,5. Το 58,33% ήταν άνδρες και το 41.66% γυναίκες , ενώ στην υγιή ομάδα το 85,71% ήταν γυναίκες και το 14.28% άνδρες . Η μέση παραμονή των ασθενών στη ΜΕΘ ήταν 27,5 ημέρες και μόνο το 50% δηλαδή 12 ασθενείς εξήλθαν της ΜΕΘ. Επιπλέον το 83,33 % των ασθενών εμφάνισαν λοίμωξη σχετιζόμενη με υγειονομική περίθαλψη (HAI) και από αυτούς τους ασθενείς οι 17/20 (85%) εμφάνισαν VAP και οι 3/20 (15%) ανέπτυξαν CRBSI . Κατά τη μελέτη οι ασθενείς εμφάνιζαν δευτερογενή λοίμωξη την οποία χωρίσαμε σε δύο κατηγορίες ανάλογα με την ημέρα εμφάνισης της λοίμωξης μετά τη δειγματοληψία . Η πρώτη κατηγορία είναι οι ασθενείς που εμφάνισαν λοίμωξη πριν από τις 5 μέρες από τη δειγματοληψία τους στην ΜΕΘ και απαρτίζουν το 80% (16/20) ενώ στην οι υπόλοιποι ασθενείς 20% (4/20) εμφάνισαν λοίμωξη μετά την 5^η ημέρα από τη δειγματοληψία.

Συμπεράσματα

Η μέτρηση της ανοσολογικής λειτουργίας σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς με λοίμωξη από Sars-CoV 2 και η συσχέτιση με τα αποτελέσματα με επίκεντρο τον ασθενή είναι μια ανάγκη. Εντός των περιορισμών αυτής της μελέτης, διαπιστώσαμε ότι , πρώτον , οι ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις είναι πολύ συχνές και σημαντικές για την έκβαση των βαρέως πασχόντων ασθενών με λοίμωξη από Sars-CoV 2 και δεύτερον , οι περισσότεροι (90%) από αυτούς τους ασθενείς εμφανίζουν δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού μηχανισμού , όπως αυτή εκτιμάται με την μέτρηση της ιντερλευκίνης 10 και της παραγωγής TNF α μετά από δοκιμασία πρόκλησης με LPS ex-vivo , που μπορεί να σχετίζεται με τις ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις. . Απαιτείται παρόλα ταύτα περαιτέρω μελέτη για την αξιολόγηση της ικανότητας αυτής της ανάλυσης για ποσοτικοποίησή της λειτουργίας του ανοσοποιητικού κατά τη

διάρκεια μιας κρίσιμης νόσου και τη χρησιμότητα άλλων βιοδεικτών για τον χαρακτηρισμό της δυσλειτουργίας του ανοσοποιητικού.

Abstract

Introduction

In critically ill patients with sepsis, or other life-threatening illness or trauma, the acute phase is followed by generalized immune dysfunction, often referred to as severe immunosuppression or immunoparalysis. This immunoparalysis results in susceptibility to nosocomial infections, which is the leading cause of morbidity and mortality in intensive care units. The pathogenesis of immunoparalysis is not known, while the need to find diagnostic and therapeutic means is imperative. Patients with Covid-19 disease are a group of patients of particular interest in whom the presence of immunoparalysis has not yet been fully studied. Monocytes / macrophages are central mediators of natural immunity. Contributing to the identification of pathogens, antigen presentation, and the destruction of microorganisms, macrophages are the main regulators of the inflammatory response. Signs of macrophage dysfunction have been described in critically ill patients, such as decreased cytokine production and decreased HLA receptor expression, and have been associated with adverse patient outcome. Monocyte function has not been studied in Covid-19 long-term ICU patients.

Objective

The aim of the study was to investigate the presence of immunoparalysis in patients treated with Covid-19 disease in the ICU after the 5th day of admission, as manifested by decreased TNF α production after stimulation with lipopolysaccharide and increased concentration of interleukin-10. This study examined two questions: (1) the length of stay of Covid-19 patients in the ICU to determine the risk of nosocomial infections (2) the presence of immunoparalysis in patients treated with Covid-19 disease in the ICU after the 5th day of hospitalization, as manifested by reduced TNF α production after stimulation with lipopolysaccharide and increased interleukin concentration 10.

Methodology

The study included adult patients treated in the intensive care unit of the University Hospital of Heraklion with Sars-CoV-19 infection. Demographics as well as data on disease course, medication, infection and patient outcome are obtained from the patient's medical record. Approval is obtained from patients or their legal representatives to participate in the study. In a blood sample taken on the 5th-7th day of the patients' hospitalization, the appearance of immunoparalysis will be examined, as this is indicated by the reduced production of cytokines in the blood after stimulation with lipopolysaccharide. Specifically, the patients blood sample will be incubated for 4 hours with lipopolysaccharide at 37 degrees, after centrifuge the serum is separated from whole blood and stored for analysis. The cytokine concentrations will be compared the stimulated and non-stimulated sample. The absence of increased cytokine production will be considered as an indicator of immunoparalysis.

Results

The age distribution of Sars-CoV 2 positive patients that were finally studied is from 41-88 years with a mean value of 70 years and a standard deviation of 12.5 , 58.33% were men and 41.66% women, while in the healthy group 85.71% were women and 14.28% men. The mean stay of patients in the ICU was 27.5 days and only 50% 12 patients were discharged from the ICU. In addition, 83.33% of patients developed a health care-related infection (HAI) and of these patients 17/20 (85%) developed VAP and 3/20 (15%) developed CRBSI. During the study, patients had a secondary infection which we divided into two categories depending on the day of onset of the infection after sampling. The first category is the patients who developed an infection before 5 days of sampling in the ICU and make up 80% (16/20) while in the remaining patients 20% (4/20) developed an infection after the 5th day after sampling.

Conclusions

Measuring immune function in critically ill patients with Sars-CoV 2 infection and correlating patient-centered outcomes is a necessity. Within the limitations of this study, we found that, firstly, nosocomial infections are very common and important for the outcome of severely ill patients with Sars-CoV 2 infection and secondly, most (90%) of these patients develop dysfunction of the immune system, as assessed by measuring interleukin 10 and TNF α production following an ex-vivo LPS challenge test, which may be associated with nosocomial infections. However, further study is needed to evaluate the ability of this assay to quantify immune function during a critical illness and the usefulness of other biomarkers in characterizing immune dysfunction.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Γενικό Μέρος

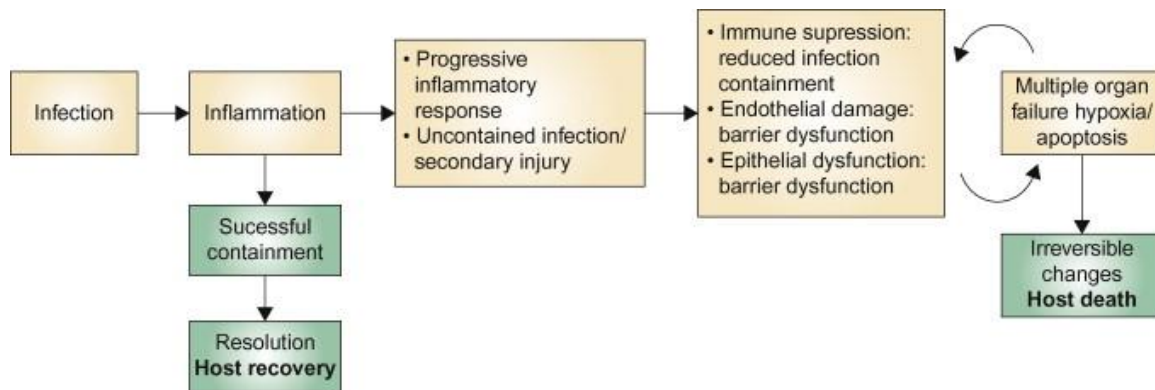
Εισαγωγή

Στους βαρέως πάσχοντες ασθενείς η οξεία φάση που χαρακτηρίζεται από συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) (1), ακολουθείται από αντιφλεγμονώδη αντίδραση (compensatory anti-inflammatory response syndrome, CARS) που συχνά οδηγεί σε γενικευμένη δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού, αναφερόμενη συχνά ως ανοσοκαταστολή της βαριάς κατάστασης ή ανοσοπαράλυση (2). Τα μονοκύτταρα αποτελούν βασικό ρυθμιστή τόσο της συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης, όσο και της ανοσοπαράλυσης(2). Η ανοσοπαράλυση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα ευπάθεια στις ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις, που είναι και η κυριότερη αιτία νοσηρότητας και θνητότητας στις μονάδες εντατικής θεραπείας(2) .

Από τον Ιανουάριο του 2020 η ανθρωπότητα έχει έρθει αντιμέτωπη με την πανδημία από τον ιό Sars-CoV 2 (3). Οι μονάδες εντατικής θεραπείας σε όλο τον κόσμο τα τελευταία δύο χρόνια έχουν κατακλυστεί από βαρέως πάσχοντες ασθενείς με λοίμωξη από τον Sars-CoV 2. Η λεγόμενη νόσος Covid-19, χαρακτηρίζεται από έντονη φλεγμονώδη αντίδραση του οργανισμού στον ιό, σοβαρή αναπνευστική ανεπάρκεια, και συχνά οι ασθενείς έχουν ανάγκη παρατεταμένης νοσηλείας στη ΜΕΘ (4). Έτσι, οι βαρέως πάσχοντες ασθενείς με Covid-19 αποτελούν μια ομάδα ασθενών με ιδιαίτερο ενδιαφέρον, στους οποίους η παρουσία ανοσοπαράλυσης και η σημασία των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων δεν έχει ακόμα μελετηθεί.

Φλεγμονώδης αντίδραση (SIRS)

Το σύνδρομο συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης (SIRS) είναι ένα κλινικό σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από συστηματική φλεγμονή σε βλάβη των ιστών. Το SIRS ορίζεται από διάφορες κλινικές μεταβλητές, όπως θερμοκρασία $>38^{\circ}\text{C}$ ή $<35^{\circ}\text{C}$, καρδιακός ρυθμός >90 παλμοί/λεπτό, αναπνευστικός ρυθμός >20 αναπνοές/λεπτό ή $\text{PCO}_2 < 32$ mmHg και $\text{WBC} > 12000$ κύτταρα/ mm^3 ή <4000 κύτταρα/ mm^3 (4). Το SIRS μπορεί να προκύψει από λοιμώξεις αλλά και μη-λοιμώδεις αιτίες ιστικής βλάβης όπως τραύμα, θερμικός τραυματισμός, παγκρεατίτιδα, αυτοάνοσες διαταραχές και χειρουργική επέμβαση(1).

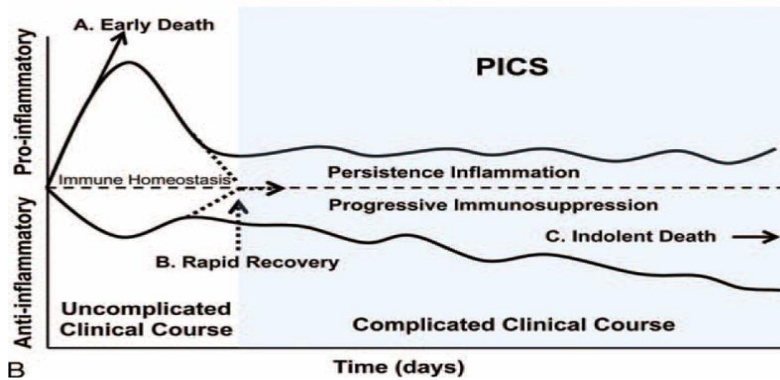
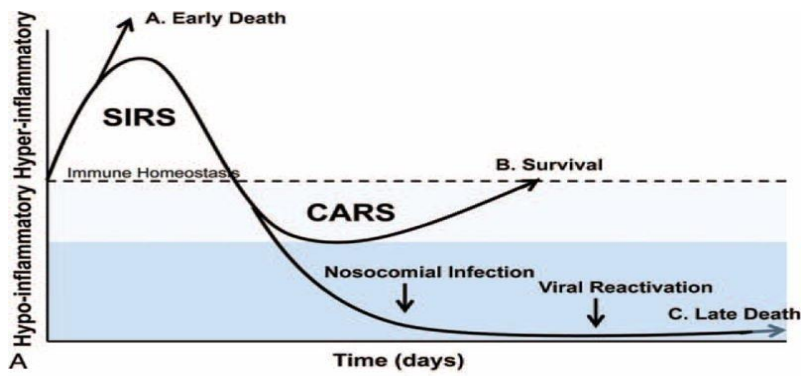


Πηγή : Bauman KA, Han MK. Chapter 27 - Gender Differences in Susceptibility, Outcomes, and Pathophysiology of Sepsis.)

Η σύμφυτη ανοσοαντίδραση παίζει μεγάλο ρόλο στην κλινική και βιοχημική εκδήλωση του SIRS. Η παρουσία ουσιών προερχόμενων από μικροοργανισμούς, γνωστό και ως pathogen-associated molecular pattern (PAMP), όπως είναι οι ενδοτοξίνες, τα αντιγόνα επιφανείας, προϊόντα από το κυτταρικό τοίχωμα, μαστίγια βακτηρίων καθώς και άλλες ουσίες που προέρχονται από την λύση των βακτηρίων καθορίζουν την άμεση ενεργοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν διαμεσολαβητές ικανούς για μια ισχυρή ανοσολογική απάντηση όπως ο tumor necrosis factor- α (TNF), ένας αριθμός ιντερλευκίνων (IL), platelet-activating factor (PAF), κ.α. (1)

Σύνδρομο Αντιφλεγμονώδους Απόκρισης Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome (CARS)

Σε σύντομο χρονικό διάστημα (πιθανότατα < 24 ώρες αργότερα) από την εμφάνιση του SIRS ενεργοποιούνται αντισταθμιστικοί μηχανισμοί με στόχο να ελέγξουν τη φλεγμονώδη απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος, συχνά μέσω της επαγωγής αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών(1). Αυτό το φαινόμενο αναφέρεται ως Σύνδρομο Αντιφλεγμονώδους Απόκρισης (CARS). Ενώ μια παροδική κατάσταση CARS είναι ένα απαραίτητο αντίμετρο για τη ρύθμιση και την προστασία από φλεγμονώδη τραυματισμό, πρέπει επίσης να ρυθμιστεί, όπως το SIRS. Η ανοσοπαράλυση αντιπροσωπεύει μια επίμονη, σοβαρή μορφή κατάστασης CARS που έχει γίνει παθολογική(1).



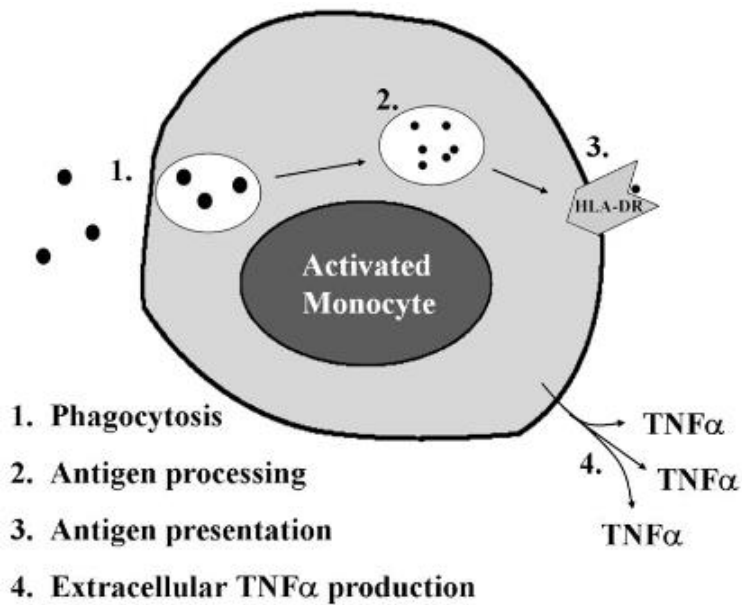
Πηγή: A review of GM-CSF therapy in sepsis, Medicine, December 2015

Ανοσοπαράλυση

Τα τελευταία χρόνια έγινε γνωστό ότι το CARS δεν παίζει σημαντικό ρόλο μόνο στην ομοίωση της φλεγμονώδους αντίδρασης αλλά μπορεί να καθορίσει από μόνο του μια κρίσιμη για τον ασθενή κατάσταση. Διάφορες πειραματικές και κλινικές μελέτες δείχνουν ότι τόσο η σήψη όσο και άλλες απειλητικές για τη ζωή καταστάσεις που συνοδεύονται από συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση, εμφανίζουν στη συνέχεια διαταραχές και της εγγενούς και της επίκτητης ανοσολογικής απάντησης του οργανισμού(2). Πρώτα , τα μονοκύτταρα παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση του HLA-DR στην μεμβράνη τους , το οποίο σχετίζεται με την μειωμένη έκκριση διαμεσολαβητών της φλεγμονής όταν ενεργοποιηθούν ή μειωμένη παρουσία αντιγόνου(5). Δεύτερον , η ικανότητα των μονοκυττάρων να απαντούν με παραγωγή κυτταροκινών μετά από διέγερση με PAMPs, όπως ο LPS μειώνεται. Τρίτον, η φαγοκυττάρωση των αποτοκικών κυττάρων από εγκατεστημένα ή κυκλοφορόντα μακροφάγα οδηγεί στην αλλαγή των τελευταίων σε M2 φαινότυπο , του οποίου το χαρακτηριστικό είναι η παραγωγή αντιφλεγμονωδών ουσιών IL-10 και IL-1ra(6). Τέταρτον, η παραγωγή ανοσοκατασταλτικών ουσιών , όπως PD1 , PD-L1 , αυξάνεται σε στα κύτταρα που έχουν έρθει σε επαφή με αντιγόνο , επομένως μειώνεται η ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων, και παράλληλα αυξάνεται η παρουσία υπο-πλυθισμών των T κυττάρων, όπως CD4+ και CD25+ , που καταστέλλουν την επίκτητη ανοσία(7). Όλες αυτές οι αντιδράσεις που προέρχονται από επιγενετικές αλλαγές οδηγούν , σε διαφορετικό χρόνο ,στην ενεργοποίηση και απενεργοποίηση γονιδίων που εμπλέκονται στην ανοσολογική αντίδραση και οι φαινότυποι που εκφράζονται να παίρνουν μέρος σε φλεγμονώδη αντίδραση ή ανοσοπαράλυση(7).

Τα μονοκύτταρα και ο ρόλος τους στην ανοσολογική αντίδραση και στην ανοσοπαράλυση

Η ανοσολογική απάντηση περιλαμβάνει την σύμφυτη και την επίκτητη ανοσία . Η σύμφυτη ανοσία χαρακτηρίζεται σαν η πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού. Τα μονοκύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στη σύμφυτη ανοσία. Οι λειτουργίες τους περιλαμβάνουν την αναγνώριση και την φαγοκυττάρωση των παθογόνων οργανισμών καθώς και στη συνέχεια στην παρουσίαση πεπτιδίων αυτών των οργανισμών στην κυτταρική τους μεμβράνη για την ενεργοποίηση της επίκτητης ανοσίας(8) . Οι υποδοχείς των μονοκυττάρων αναγνωρίζουν ένα ευρέως φάσματος παθογόνων οργανισμών . Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι ο βακτηριακός λιποπολυσακχαρίτης (LPS) ο οποίος αναγνωρίζεται μέσω των toll-like receptor (TLR)-4 στην επιφάνεια των μονοκυττάρων(8).



Πηγή: Frazier WJ, Hall MW. Immunoparalysis and Adverse Outcomes from Critical Illness. *Pediatr Clin North Am.* 2008

Μόλις διεγερθούν, τα μονοκύτταρα καταβροχθίζουν και καταστρέφουν μικρόβια τα οποία στη συνέχεια επεξεργάζονται σε συγκεκριμένα αντιγονικά πεπτίδια. Αυτά στη συνέχεια παρουσιάζονται στις εξωτερικές επιφάνειες των ανοσοκυττάρων σε συνδυασμό με μόρια Κύριου Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας κατηγορίας II (MHC) όπως το Ανθρώπινο Λευκοκυτταρικό Αντιγόνο (HLA)-DR (6,7). Τα αντιγόνα που παρουσιάζονται με αυτόν τον τρόπο, μαζί με τη συν-διεγερτική εισροή από τα έμφυτα ανοσοκύτταρα, ενεργοποιούν τον προσαρμοστικό βραχίονα της ανοσολογικής απόκρισης. Επιπλέον, τα μονοκύτταρα εκκρίνουν κυτοκίνες και χημειοκίνες που ρυθμίζουν τη φλεγμονώδη απόκριση στρατολογώντας και ενεργοποιώντας άλλα ανοσοενεργά κύτταρα και ενεργοποιώντας μη κυτταρικές πτυχές της ανοσοαπόκρισης όπως οι καταρράκτες του συμπληρώματος και της πήξης. (2,6)

Όπως προαναφέρθηκε, η δυσλειτουργία των μονοκυττάρων συμβάλει σημαντικά στην εμφάνιση ανοσοπαράλυσης, καθώς μειωμένη έκφραση του HLA-DR στην μεμβράνη των μονοκυττάρων οδηγεί σε μειωμένη έκκριση διαμεσολαβητών της φλεγμονής όταν ενεργοποιηθούν ή μειωμένη παρουσία αντιγόνου, μειώνεται η ικανότητα τους να απαντούν με παραγωγή κυτταροκινών μετά από διέγερση (πχ. με LPS) και τέλος τροποποιούνται λαμβάνοντας M2 φαινότυπο, με παραγωγή κυρίως αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως η IL-10 (7).

Ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις στους βαρέως πάσχοντες ασθενείς

Οι νοσοκομειακές λοιμώξεις (ΝΛ), γνωστές και ως λοιμώξεις που σχετίζονται με την υγειονομική περίθαλψη (hospital-acquired infections, HAI) περιπλέκουν το 30% των εισαγωγών στη μονάδα εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ) και σχετίζονται με αυξημένη θνησιμότητα και νοσηρότητα, συμπεριλαμβανομένων τόσο της μεγαλύτερης διάρκειας στη ΜΕΘ όσο και της νοσηλείας (8). Στη ΜΕΘ, οι ασθενείς με μηχανικό αερισμό διατρέχουν τον υψηλότερο κίνδυνο για HAI, πιθανότατα λόγω της παρουσίας πολλαπλών παραγόντων κινδύνου. Οι κυριότερες λοιμώξεις είναι η πνευμονία που σχετίζεται με το μηχανικό αερισμό, και η μικροβιαμία, σχετιζόμενη με άλλη λοίμωξη ή με τον ενδαγγειακό καθετήρα(8).

Πνευμονία που σχετίζεται με τον Μηχανικό αερισμό (ventilator-associated pneumonia, VAP)

Η πνευμονία που σχετίζεται με τον αναπνευστήρα (VAP) ορίζεται ως λοίμωξη του πνευμονικού παρεγχύματος σε ασθενείς που εκτίθενται σε επεμβατικό μηχανικό αερισμό για τουλάχιστον 48 ώρες, και αποτελεί μια από τις πιο συχνές λοιμώξεις σε ασθενείς που χρειάζονται επεμβατικό μηχανικό αερισμό(9). Παρά τις πρόσφατες εξελίξεις στα μικροβιολογικά εργαλεία, τα επιδημιολογικά και διαγνωστικά κριτήρια για το VAP εξακολουθούν να είναι αμφιλεγόμενα, περιπλέκοντας την ερμηνεία της θεραπείας, της πρόληψης και των μελετών αποτελεσμάτων. Η VAP αναφέρεται ότι επηρεάζει το 5-40% των ασθενών που λαμβάνουν επεμβατικό μηχανικό αερισμό για περισσότερες από 2 ημέρες, με μεγάλες διακυμάνσεις ανάλογα με τη χώρα, τον τύπο της ΜΕΘ και τα κριτήρια που χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση της VAP (9,10). Η μελέτη EU-VAP/CAP, για παράδειγμα, ανέφερε πυκνότητα επίπτωσης 18,3 επεισοδίων VAP ανά 1000 ημέρες αναπνευστήρα . Ο ημερήσιος κίνδυνος VAP κορυφώνεται μεταξύ 5-9 ημερών του μηχανικού αερισμού, ενώ η σωρευτική επίπτωση σχετίζεται στενά με τη συνολική διάρκεια του μηχανικού αερισμού . Η διάγνωση της VAP ορίζεται από την ταυτόχρονη παρουσία των τριών ακόλουθων κριτηρίων: κλινική υποψία, νέες ή προοδευτικές και επίμονες ακτινογραφικές διηθήσεις και θετικές μικροβιολογικές καλλιέργειες από δείγματα κατώτερης αναπνευστικής οδού (9–11).

Λοιμώξεις της κυκλοφορίας του αίματος που σχετίζονται με ενδοαγγειακούς καθετήρες Catheter Related Bloodstream Infection (CRBSI)

Οι νοσοκομειακές λοιμώξεις της κυκλοφορίας του αίματος που σχετίζονται με ενδοαγγειακούς καθετήρες (CRBSIs) είναι μια ειδική κατηγορία των ΗΑΙ που έχουν σημαντική σχετιζόμενη νοσηρότητα, επιφέρουν αυξημένο κόστος νοσηλείας και παρατείνουν τη διάρκεια παραμονής (12). Η αποδιδόμενη θνησιμότητα κυμαίνεται μεταξύ 12% και 25%(13). Κλινική υποψία για CRBSI τίθεται σε ασθενείς με ενδοφλέβιο καθετήρα και εμφάνιση ενδείξεων σήψης, ειδικά εάν δεν αναγνωρίζεται εναλλακτική εστία αυτής . Η διάγνωση επιβεβαιώνεται με καλλιέργειες αίματος και εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου από δείγματα προερχόμενα ή όχι από τους ενδοαγγειακούς καθετήρες(13).

SARS-CoV-2

Ο ιός coronavirus-2 (SARS-CoV-2) είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της πανδημίας που πλήττει τα τελευταία δύο χρόνια την ανθρωπότητα, έχοντας μέχρι στιγμής προκαλέσει 393 εκατομμύρια λοιμώξεις και 5.73 εκατομμύρια θανάτους(3).

Οι κοροναϊοί (CoVs) είναι μέλη του γένους Coronaviridae, μιας ομάδας πλειομορφικών ιών RNA που περιέχουν πεπλομερή σε σχήμα κορώνας. Ο SARS-CoV-2 έχει 80% φυλογενετική ταυτότητα με κοροναϊό με σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο (SARS-CoV) και 50% ομοιότητα με τον κορωνοϊό του αναπνευστικού συνδρόμου της Μέσης Ανατολής (MERS-CoV) που προκάλεσε παγκόσμιες εστίες το 2002-2003 και το 2011 αντίστοιχα.

Ο SARS-CoV-2 μεταδίδεται μεταξύ των ατόμων μέσω σταγονιδίων ή αερολύματος, εισχωρώντας στα επιθηλιακά κύτταρα μέσω της παθογνωμονικής πρωτεΐνης ακίδας («κορώνα») που αλληλοεπιδρά με τον υποδοχέα του μετατρεπτικού ενζύμου 2 (ACE2) της αγγειοτενσίνης(3). Κατά την είσοδο στο κύτταρο, ο χρόνος από τη μόλυνση έως τα συμπτώματα είναι 1–3 ημέρες για τυπικούς ιούς του αναπνευστικού συστήματος, στον SARS-CoV-2, η διάμεση επώαση είναι 5–7 ημέρες· η πλειονότητα των ασθενών γίνονται συμπτωματικοί εντός 13 ημερών από τη μόλυνση. Μετά την έναρξη των συμπτωμάτων, έως και 32% των ασθενών αναπτύσσουν σοβαρή ή κρίσιμη νόσο ~9 ημέρες αργότερα, η οποία οδηγεί σε υποξαιμική αναπνευστική ανεπάρκεια με τη μορφή του συνδρόμου αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS) λόγω φλεγμονής των πνευμόνων με βλάβη του αναπνευστικού επιθηλίου και ενδοθηλίου(4). Τα υψηλότερα ιικά φορτία και η παρατεταμένη λοίμωξη συσχετίζονται με αυξημένη σοβαρότητα· ωστόσο οι παράγοντες που οδηγούν σε σοβαρή νόσο COVID-19 δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί, όμως οι ανοσολογικοί μηχανισμοί θεωρείται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο(4).

Διαταραχές της Ανοσολογικής Αντίδρασης έναντι του ιού SARS-CoV-2 που σχετίζονται με σοβαρή νόσο

Οι μέχρι τώρα μελέτες υποδηλώνουν ότι η αυξημένη νοσηρότητα και θνητότητα που σχετίζεται με τη νόσο COVID19 είναι κυρίως αποτέλεσμα διαταραχής της ανοσολογικής απόκρισης στον ιό και όχι ιστικής βλάβης λόγω πολλαπλασιασμού του ιού στα κύτταρα. Υπάρχουν ενδείξεις για σημαντικό ρόλο των μονοκυττάρων, και της αλληλεπίδρασης τους με τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τον πηκτικό μηχανισμό(4).

Στις πιο σοβαρές περιπτώσεις COVID-19, ο ιός προκαλεί την απελευθέρωση πληθώρας κυτταροκινών που αναγνωρίζονται από ενεργοποιημένα κύτταρα T-helper (Th1) με αυξημένα επίπεδα ιντερλευκινών-1b, 2, 6, 7, 8 και 10 (IL1b, IL-2, IL-6, IL-7, IL- 8, και IL-10), του παράγοντα διέγερσης αποικιών των κοκκιοκυττάρων (GSF), του παράγοντα νέκρωσης όγκου-α (TNF-α) και ιντερφερόνης γ (4,7) . Τέτοια αυξημένα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτταροκινών μπορεί να οδηγήσουν σε φλεγμονή των πνευμόνων και επιβλαβής βλάβες στους ιστούς της καρδιάς, του ήπατος και των νεφρών , προκαλώντας πολυοργανική ανεπάρκεια (7). Η απελευθέρωση των κυτταροκινών αυτών μπορεί να συνδέεται στενά και με την ανάπτυξη και την εξέλιξη του ARDS σε ασθενείς που έχουν μολυνθεί από SARS-CoV, μόλυνση MERS-CoV και SARS-CoV-2(7) .

Μετά την είσοδο τους στα κύτταρα-στόχους τα ιικά σωματίδια αναγνωρίζονται από Toll-like receptors και viral-infection sensors (RIG-I) με αποτέλεσμα την επαγωγή ανοσοαπάντησης με τύπου-I ιντερφερόνη και ενεργοποίηση ινφλαμασώματων (inflammasome complexes) μέσω NLRP3 από τα μονοκύτταρα(14,15). Η έκταση της ενεργοποίηση των inflammasomes σχετίζεται με τη βαρύτητα της νόσου Covid-19. Η ενεργοποίηση των inflammasomes οδηγεί επίσης σε ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξης που επίσης συμβάλει στη βαρύτητα της νόσου COVID-19. Μια μελέτη με single-cell RNA-sequencing and single-cell proteomics σε μονοκύτταρα περιφερικού αίματος από ασθενείς με COVID-19 ανέδειξε υψηλά ποσοστά μονοκυττάρων με M1 φαινότυπο, αυξημένη έκφραση HLA-DR και ισχυρή αντιϊκή IFN απάντηση στους ασθενείς με ήπια νόσο. Αντίθετα στους ασθενείς με σοβαρή νόσο διαπιστώθηκε δυσλειτουργία των μονοκυττάρων με επικράτηση M2 φαινότυπου και χαμηλή έκφραση HLA-DR, ενισχύοντας την υπόθεση της συμβολής της δυσλειτουργίας των μονοκυττάρων στην παθογένεια της σοβαρής νόσου COVID-19(14,15).

Η παρούσα μελέτη θα εξετάσει την υπόθεση ότι η δυσλειτουργία των μονοκυττάρων μπορεί να επιβαρύνει την πρόγνωση των ασθενών με Covid-19 με επιπλέον τρόπους, και συγκεκριμένα καθιστώντας τους πιο επιρρεπείς σε ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή

Σκοπός

Η μελέτη αυτή εξέτασε δύο ερωτήματα: (1) την διάρκεια παραμονής των ασθενών με νόσο Covid-19 στη ΜΕΘ για να διαπιστώσει τον κίνδυνο εμφάνισης ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων, και (2) την παρουσία ανοσοπάρλυσης σε ασθενείς που νοσηλεύονται με νόσο Covid-19 στη ΜΕΘ μετά την 5 η μέρα νοσηλείας, όπως αυτή εκδηλώνεται με μειωμένη παραγωγή TNFα μετά από διέγερση με λιποπολυσακχαρίτη και αυξημένη συγκέντρωση ιντερλευκίνης 10(16).

Θεωρητικό υπόβαθρο

Οι ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις, όπως αναφέρεται στο γενικό μέρος, αποτελούν σημαντική αιτία νοσηρότητας και θνητότητας στους βαρέως πάσχοντες ασθενείς στη ΜΕΘ(17). Οι ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις εμφανίζονται συνήθως μετά την 5^η μέρα νοσηλείας στη ΜΕΘ (κυρίως 5^η – 10^η μέρα) και είναι συνηθέστερα πνευμονία και βακτηριαμία(11). Μεταξύ των μηχανισμών που οδηγούν σε ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις είναι και η δυσλειτουργία των μονοκυττάρων(18). Αν και η αξιολόγηση της δυσλειτουργίας των μονοκυττάρων στους βαρέως πάσχοντες ασθενείς ακόμα δεν έχει περάσει στην κλινική ρουτίνα, η αξιολόγηση της παραγωγής TNFα μετά από ex-vivo διέγερση με ενδοτοξίνη έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης ανοσοανεπάρκειας και έχει συσχετιστεί με ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις σε ασθενείς με σήψη και τραύμα(19). Επιπλέον η ανοσοκατασταλτική κυτταροκίνη IL-10 έχει αναγνωρισμένο ρόλο στην ανοσοκαταστολή που συνοδεύει ιογενείς λοιμώξεις όπως η γρίπη(18). Επιπλέον η ανοσοκατασταλτική κυτταροκίνη IL-10 έχει αναγνωρισμένο ρόλο στην ανοσοκαταστολή που συνοδεύει ιογενείς λοιμώξεις. Στην παθογένειά της ενέχεται η καταστολή της αντιγονοπαρουσίασης, η στροφή των μονοκυττάρων/μακροφάγων προς M2 φαινότυπο, και η καταστολή της ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων(14).

Μέθοδος

Στη μελέτη συμπεριλάβαμε ενήλικες ασθενείς νοσηλευόμενους στη μονάδα εντατικής θεραπείας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου με λοίμωξη από Sars-CoV-19 και υγιείς εθελοντές. Η μελέτη έλαβε έγκριση από την Επιτροπή Βιοηθικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου (Αρ. Πρωτοκ. 10696/ 28-6-2021). Για τη συμμετοχή στη μελέτη ελήφθη έγκριση από τους νόμιμους εκπροσώπους των ασθενών.

Για να απαντηθεί το πρώτο ερώτημα έγινε καταγραφή και ανάλυση της διάρκειας νοσηλείας των διασωληνωμένων ασθενών με COVID-19 σε διάστημα ενός έτους (11/20-11/21).

Για να απαντηθεί το δεύτερο ερώτημα εξετάστηκε η παρουσία ανοσοπαράλυσης σε διασωληνωμένους ασθενείς με COVID-19.

Τα κριτήρια εισαγωγής και αποκλεισμού των ασθενών ήταν:

Κριτήρια εισαγωγής

Ενήλικες ασθενείς (≥ 18 ετών)

Επιβεβαιωμένη διάγνωση Covid-19 με θετικό PCR τεστ

Αναπνευστική ανεπάρκεια με ανάγκη για μηχανικό αερισμό

Νοσηλεύομενοι στη ΜΕΘ για > 96 ώρες

Κριτήρια αποκλεισμού

Γνωστή ανοσοκαταστολή όπως Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας (AIDS), ουδετεροπενία, ανοσοκατασταλτική φαρμακευτική αγωγή (π.χ. μεθοτρεξάτη και βιολογικούς παράγοντες),

Ασθενείς με ηπατική νόσο τελικού σταδίου ή κεραυνοβόλο ηπατική ανεπάρκεια ,

Έγκυοι ή θηλάζουσες ασθενείς.

Ασθενείς που αναμενόταν να παραμείνουν στη ΜΕΘ για < 72 ώρες

Τα δημογραφικά στοιχεία καθώς και τα στοιχεία της πορείας νόσου, της φαρμακευτικής αγωγής, της εμφάνισης λοιμώξεων και της έκβασης των ασθενών ελήφθησαν από τον ιατρικό φάκελο των ασθενών.

Συγκεκριμένα καταγράφηκαν:

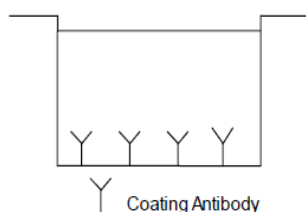
1. Δημογραφικά στοιχεία: φύλο, ηλικία, ύψος, βάρος, μέρα εισαγωγής
2. Αγωγή για τη νόσο COVID-19: dexamethasone, anti-IL6
3. Ημερομηνία δειγματοληψίας
4. Εμφάνιση ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων (η διάγνωση VAP και BSI βασίστηκε σε κλινικά και μικροβιολογικά κριτήρια σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες)
5. Διάρκεια παραμονής στη ΜΕΘ και έκβαση.

Συλλογή δειγμάτων και ανάλυση

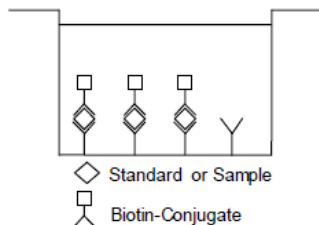
Τα δείγματα ελήφθησαν από τους ασθενείς κατά την 5η με 7η ημέρα νοσηλείας στη ΜΕΘ , αλλά και από τους υγιείς μάρτυρες της μελέτης, κατόπιν συγκατάθεσης των συγγενών τους. Συγκεκριμένα, μετά τη λήψη , δείγμα αίματος των ασθενών επώαστηκε για 4 ώρες με λιποπολυσακχαρίτη(20) στους 37 βαθμούς, και στη συνέχεια φυγοκεντρείθηκε και απομονώθηκε ο ορός ο οποίος φυλάχθηκε στους -80 βαθμούς κελσίου . Στη συνέχεια μετά την ολοκλήρωση της συλλογής των δειγμάτων τα δείγματα αναλύθηκαν για μέτρηση επιπέδων TNFa(19), και IL- 10(16) με μέθοδο ELISA.

Περιγραφή μεθόδου ELISA

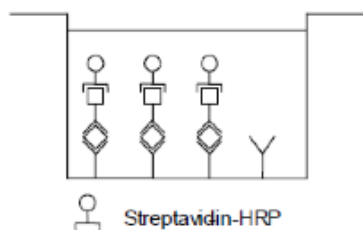
Με τη μέθοδο ELISA μπορούμε να ποσοτικοποιήσουμε τα επίπεδα έκφρασης του TNF α και της IL-10 στον ορό, αφού φωτομετρηθούν στο μήκος κύματος εκπομπής χρωμοφόρου στα 450nm. Αρχικά, ένα ειδικό αντίσωμα έναντι της εκάστοτε πρωτεΐνης-στόχου βρίσκεται προσκολλημένο σε πλάκα 96 θέσεων. Στη συνέχεια προστίθεται ο ορός ακολουθούμενος από ένα μείγμα αντισωμάτων(21). Το μείγμα αντισωμάτων αποτελείται από μια ετικέτα συγγένειας επισημασμένη με μονοκλωνικά αντίσωμα σύλληψης και ένα συνδεδεμένο με αντίσωμα πολυκλωνικής ανίχνευσης, ειδικά σχεδιασμένο για τον ανθρώπινο TNF α . Στη συνέχεια γίνεται πλύσιμο των μη δεσμευμένων ουσιών και προστίθεται ένα διάλυμα υποστρώματος στα φρεάτια και αναπτύσσεται χρώμα ανάλογο με την ποσότητα του δεσμευμένου TNF α (21). Τέλος χρωματική ανάπτυξη διακόπτεται και μετράτε η ένταση του χρώματος. Η οπτική πυκνότητα του κάθε δείγματος οδηγείται στην ποσοτικοποίηση του TNF α , με βάση την αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς (standard curve) του κατασκευαστή(21).



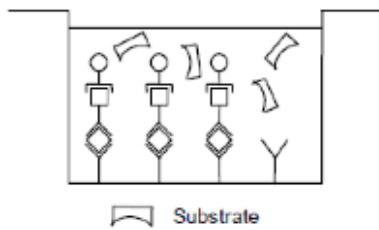
1. Ένα αντίσωμα επικάλυψης κατά του ανθρώπινου TNF α προσροφάτε σε μικροβυθίσματα.



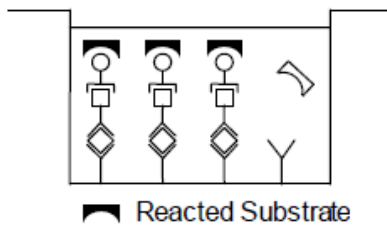
2. Ο ανθρώπινος TNF α που υπάρχει στο δείγμα ή στο πρότυπο συνδέεται με αντισώματα που έχουν προσροφήσει στα μικροπηγάδια. Ένα συζευγμένο με βιοτίνη αντίσωμα κατά του ανθρώπινου TNF α προστίθεται και συνδέεται με τον ανθρώπινο TNF α που συλλαμβάνεται από το πρώτο αντίσωμα.



3. Μετά την επώαση, το μη συζευγμένο με βιοτίνη αντίσωμα κατά του ανθρώπινου TNF α αφαιρείται κατά τη διάρκεια ενός σταδίου πλύσης. Η στρεπταβιδίνη-HRP προστίθεται και συνδέεται με το συζευγμένο με βιοτίνη αντίσωμα κατά του ανθρώπινου TNF α .



4. Μετά την επώαση, η μη δεσμευμένη στρεπταβιδίνη-HRP αφαιρείται κατά τη διάρκεια ενός σταδίου πλύσης, και διάλυμα υποστρώματος αντιδραστικό με HRP προστίθεται στα φρεάτια.



5. Ένα έγχρωμο προϊόν σχηματίζεται σε αναλογία με την ποσότητα του ανθρώπινου TNF α που υπάρχει στο δείγμα ή στο πρότυπο. Η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη οξέος και η απορρόφηση μετράτε στα 450 nm. Τέλος παρασκευάζεται μια τυπική καμπύλη από 7 τυπικές αραιώσεις ανθρώπινου TNF α και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση δείγματος ανθρώπινου TNF α.

ΔΕΟΝΤΟΛΟΓΙΑ-ΒΙΟΗΘΙΚΗ

Η διεξαγωγή της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε με την έγκριση του Διευθυντή της ΜΕΘ του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου καθώς και με την έγκριση του Επιστημονικού Συμβουλίου του νοσοκομείου με αριθμό πρωτοκόλλου 10696/07-07-2021.

Η καταγραφή των δεδομένων της μελέτης πραγματοποιήθηκε ανώνυμα, με εχεμύθεια και αυστηρά στους χώρους της ΜΕΘ. Κατά την υλοποίηση της παρούσας μελέτης δεν υπήρξε καμία παρέμβαση στο έργο του ιατρονοσηλευτικού προσωπικού της ΜΕΘ.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με χρήση των στατιστικών δεδομένων του προγράμματος EXCEL. Οι ποσοτικές μεταβλητές περιεγράφηκαν με τη μέση τιμή (mean \pm Standard Error) και οι μη κανονικής κατανομής με τη διάμεση τιμή (median, IQR 25-75%).

Οι απόλυτες (n) και σχετικές (%) συχνότητες χρησιμοποιήθηκαν για την περιγραφή των ποιοτικών μεταβλητών. Για τους πίνακες χρησιμοποιήθηκαν οι πίνακες του προγράμματος Word, και για τα διαγράμματα πίνακες και πίτες από το πρόγραμμα EXCEL.

Αποτελέσματα

1^ο ερώτημα

Στο χρονικό διάστημα από 11/2020 μέχρι και 11/2021 νοσηλεύθηκαν στη ΜΕΘ ΠΑΓΝΗ διασωληνωμένοι 115 ασθενείς με Covid-19. Οι άνδρες στη μελέτη αυτή απάρτιζαν το 62% ενώ οι γυναίκες το 38% , και η συνολική θνητότητα ανήλθε στο 53%. Από τα στοιχεία προκύπτουν ότι 1 ασθενής αποσωληνώθηκε και εξήλθε σε <7 ημέρες, ενώ 108 από τους 115 ασθενείς (94%) χρειάστηκε να νοσηλευθούν για πάνω από 7 ημέρες και τέλος ότι πάνω από το 90% των ασθενών εμφάνισαν ΗΑΙ.

Με βάση αυτά τα αποτελέσματα επισημαίνεται η μεγάλη σημασία των ΗΑΙ για τους ασθενείς που νοσηλεύονται στη ΜΕΘ λόγω COVID 19.

2^ο ερώτημα

Έχοντας τεκμηριώσει ότι οι ΗΑΙ παίζουν σημαντικό ρόλο στην νοσηλεία των βαρέως πασχόντων ασθενών με COVID 19, εξετάσαμε την πιθανή παρουσία ανοσοκαταστολής στους ασθενείς αυτούς.

Χαρακτηριστικά των ασθενών

Μελετήθηκαν 24 ασθενείς με COVID 19, διασωληνωμένοι σε μηχανικό αερισμό. Όλοι οι ασθενείς που μελετήθηκαν λάμβαναν θεραπεία με δεξαμεθαζόνη (6mg), και μόνο ένας είχε λοίμωξη πριν την ημέρα της εξέτασης.

Η ηλικιακή κατανομή των ασθενών ήταν 41-88 ετών με μέση τιμή τα 70 έτη και τυπική απόκλιση 12,5.

Οι 14 (58%) ήταν άνδρες. (ηλικία mean/sd or median/IQR). [Πίνακας I]

Η μέση παραμονή των ασθενών στη ΜΕΘ ήταν 27,5 ημέρες και η επιβίωση 50%.

Οι 20 από τους 24 (83%) ασθενείς εμφάνισαν λοίμωξη σχετιζόμενη με υγειονομική περίθαλψη (ΗΑΙ) και από αυτούς τους ασθενείς οι 17/20 (85%) εμφάνισαν VAP και οι 3/20 (15%) ανέπτυξαν CRBSI .

Πίνακας Ι . Δημογραφικά και κλινικά δεδομένα του πληθυσμού της μελέτης

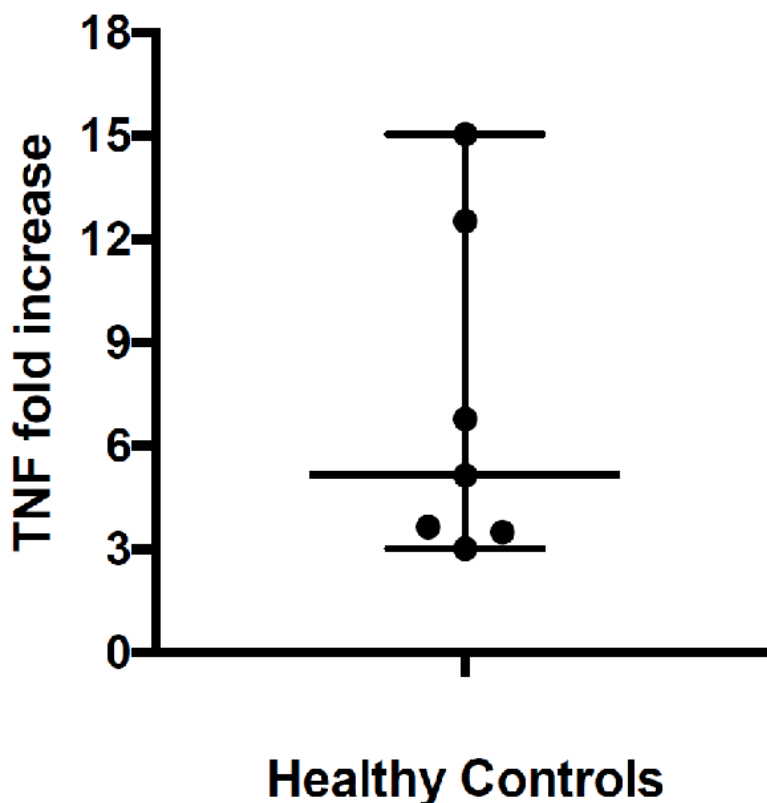
	COVID GROUP	HEALTHY GROUP
No. of Patients	24	7
Age , Median, SD	70 (12.5)	38
Gender	58 % Men	85 % Men
ICU Days , median	27.5	
Patient Discharge from ICU(%)	12 (50%)	
Day of secondary Infection (median)+ SD	9 (3,66)	

Δείκτες ανοσοκαταστολής

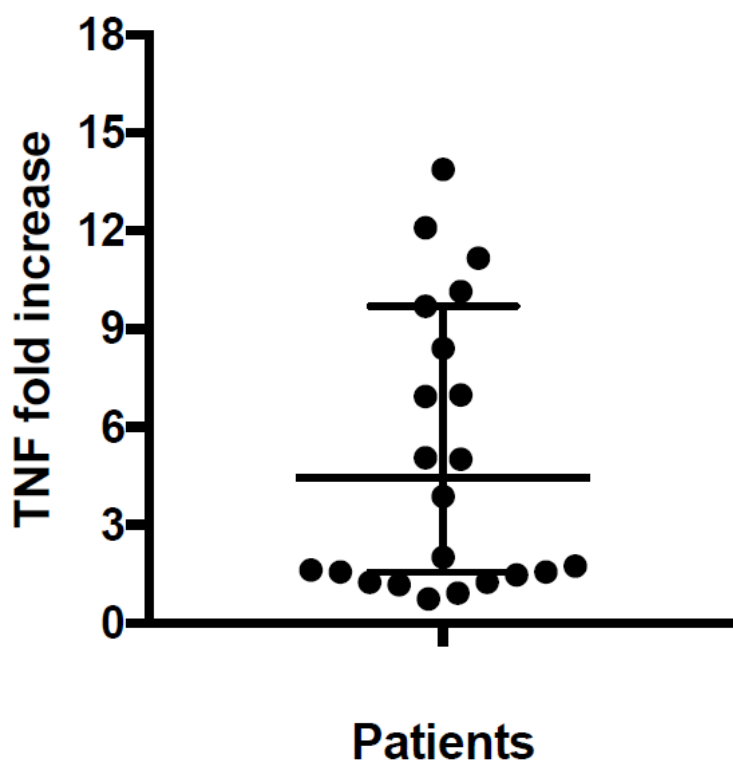
Ex-Vivo LPS-induced TNF production

Στους υγιείς εθελοντές η παρατηρούμενη αύξηση των επιπέδων TNFα στον ορό φαίνεται στο Διάγραμμα I . Με βάση αυτή την ανάλυση θεωρήσαμε ότι αύξηση κάτω του τριπλάσιου της τιμής είναι ενδεικτικό για μειωμένη επαγωγή TNFα μετά από τη διέγερση με LPS και δυσλειτουργία των μονοκυττάρων(22). Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα II , 13 από τους 20 ασθενείς (62%) που εμφάνισαν ΗΑΙ είχαν μειωμένη επαγωγή TNFα μετά από τη διέγερση με LPS. Το ποσοστό ήταν το ίδιο όταν εξετάσαμε ασθενείς με πρώιμη ή αψώτερη εμφάνιση της ΗΑΙ (μέσα στις επόμενες 5 μέρες από την εξέταση ή αργότερα). Επιπλέον 2 ασθενείς από τους 4 που δεν εμφάνισαν λοίμωξη είχαν μειωμένη επαγωγή TNFα μετά από τη διέγερση με LPS.

Διάγραμμα I . Κατανομή αύξησης του TNFα στους υγιείς ασθενείς.



Διάγραμμα II . Κατανομή αύξησης του TNFα στο σύνολο των ασθενών.

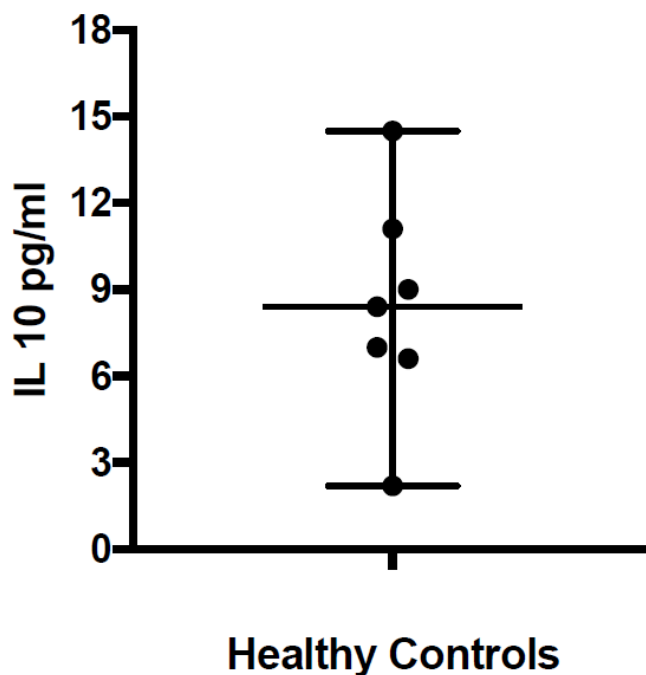


Δείκτες ανοσοκαταστολής – επίπεδα IL-10 ορού

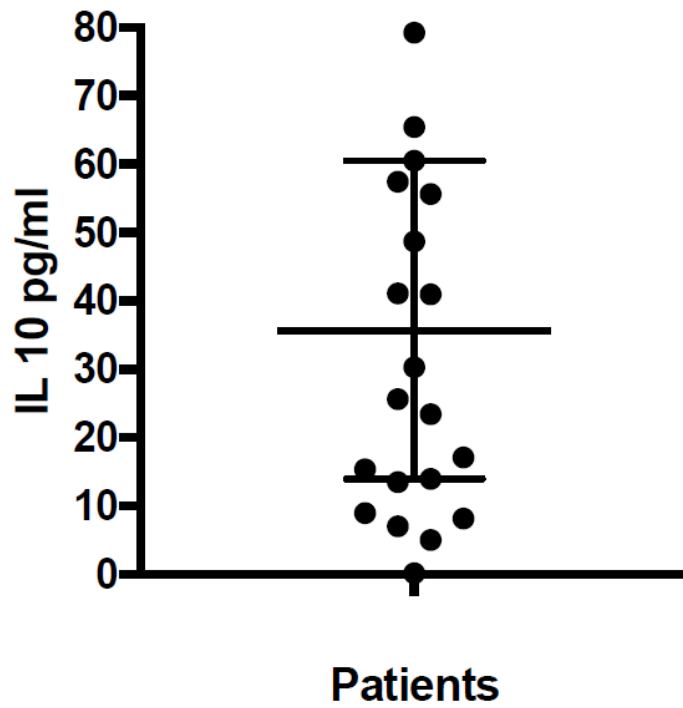
Με βάση αυτή την ανάλυση θεωρήσαμε αυξημένα επίπεδα IL-10 στον ορό >15 pg/ml. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα IV, 13 από τους 20 ασθενείς (62%) που εμφάνισαν ΗΑΙ είχαν αυξημένα επίπεδα IL-10 στον ορό. Το ποσοστό ήταν το ίδιο όταν εξετάσαμε ασθενείς με πρώιμη ή αψώτερη εμφάνιση της ΗΑΙ (μέσα στις επόμενες 5 μέρες από την εξέταση ή αργότερα). Επιπλέον 2 ασθενείς από τους 4 που δεν εμφάνισαν λοίμωξη είχαν αυξημένα επίπεδα IL-10 στον ορό.

Συνολικά οι 18 από τους 20 ασθενείς που εμφάνισαν ΗΑΙ είχαν μια από τις ανοσολογικές διαταραχές που εξετάστηκαν, ενώ 8/20 ασθενείς είχαν και τις 2, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα V.

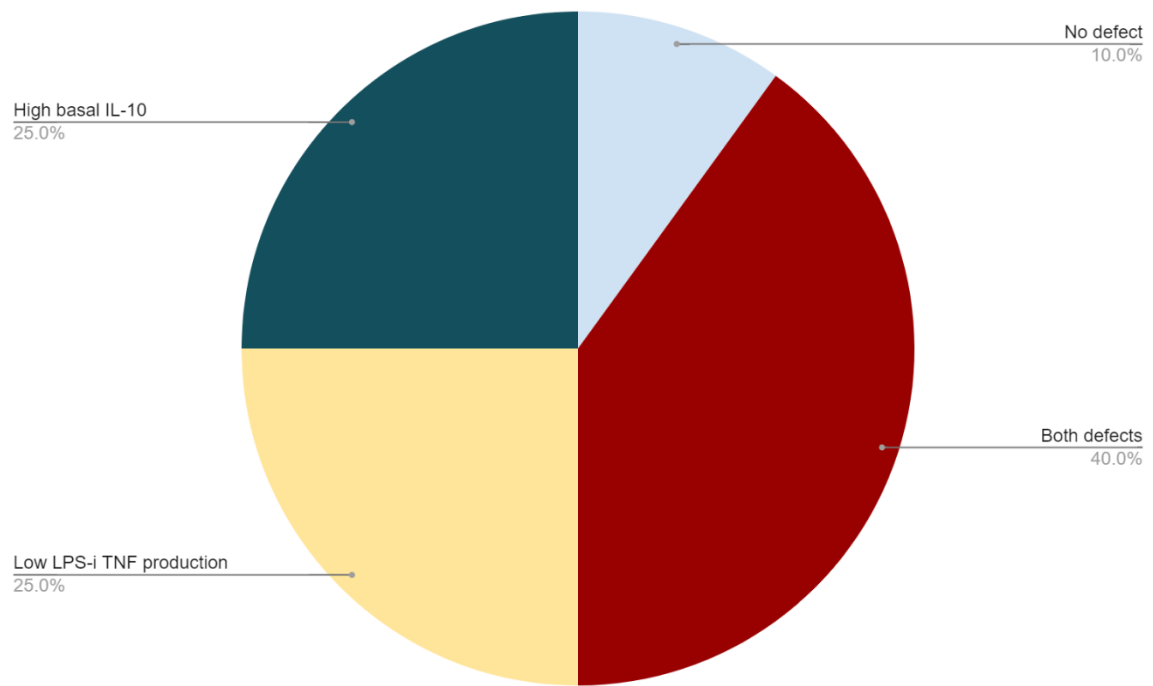
Διάγραμμα III . Κατανομή αύξησης της IL-10 στους υγιείς ασθενείς.



Διάγραμμα IV. Κατανομή αύξησης της IL-10 στους ασθενείς.



Διάγραμμα V .



Συζήτηση

Τα βασικά ευρήματα αυτής της μελέτης είναι 1^{ον} ότι οι ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις είναι πολύ συχνές στους βαρέως πάσχοντες ασθενείς με COVID-19, και ότι ανοσολογικές διαταραχές όπως μειωμένη επαγωγή παραγωγής TNFα μετά από πρόκληση με LPS και αυξημένα επίπεδα IL-10 είναι συχνές στους ασθενείς που εμφανίζουν ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις.

Η ανοσοπαράλυση αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο ως η κυρίαρχη δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος στη σήψη, με αποτέλεσμα υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα(6,8,18). Η αναγνώριση των ασθενών που πάσχουν από ανοσοπαράλυση είναι υψίστης σημασίας για την καθοδήγηση της θεραπείας(18). Ωστόσο, η μετάφραση της πολύπλοκης αλληλεπίδρασης προφλεγμονωδών και ανοσοπαραλυτικών μηχανισμών σε ένα πίνακα βιοδεικτών που αντανακλά επαρκώς την ανοσολογική κατάσταση του ασθενούς είναι αρκετά δύσκολη .

Η δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού είναι συχνή σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς, αλλά η καλύτερη μέθοδος αξιολόγηση του ανοσοποιητικού συστήματος σε αυτήν τη ρύθμιση είναι άγνωστη(18). Η μέτρηση των επιπέδων του TNF-α μετά τη διέγερση με μια δοκιμασία LPS έχει προταθεί ως τρόπος ποσοτικοποίησης της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος , αλλά έχουν αναφερθεί προηγουμένως συσχετίσεις μεταξύ των διεγερμένων επιπέδων TNF-α και τα αποτελέσματα των ασθενών ήταν ασυνεπή(19).

Τα χαμηλά επίπεδα TNF-α, υποδηλώνουν ότι το ανοσοποιητικό σύστημα δεν ανταποκρίθηκε κατάλληλα μετά από διέγερση με LPS(19). Προηγούμενες μελέτες εξέτασαν την ανοσοκαταστολή με την πάροδο του χρόνου σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς και πρότειναν ότι σχετίζεται με χειρότερα αποτελέσματα, αλλά δεν εξέτασαν συγκεκριμένα διεγερμένα επίπεδα TNF-α (2,6–8,18).

Η περιορισμένη επιτυχία της πρόσφατης δοκιμής δεξαμεθαζόνης υποδηλώνει ότι η υπερβολική φλεγμονή μπορεί να βελτιωθεί σε ασθενείς με σοβαρό COVID-19 για να μειωθεί η κλινικά κρίσιμη ανοσοπαθολογία τους[28]. Περαιτέρω κλινικές δοκιμές που στοχεύουν στην υπερφλεγμονή με ανταγωνιστές έναντι των IL-1β, IL-6, TNF και παράγοντα διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (GM-CSF) σε ασθενείς με COVID-19 βρίσκονται σε εξέλιξη(4). Η σημασία της ηλικίας, του φύλου και της συννοσηρότητας ως καθοριστικών παραγόντων του σοβαρού COVID-19 είναι γνωστή, αλλά η τρέχουσα κατανόησή μας για τις συσχετίσεις μεταξύ του COVID-19 και της ανοσολογικής απόκρισης είναι πολύ περιορισμένη(14). Δεν είναι επίσης σαφές πώς η φλεγμονή που παρατηρείται στον COVID-19 που προκαλεί μακροχρόνια εμμονή και υψηλή θνησιμότητα διαφέρει από τη φλεγμονή σε άλλες λοιμώξεις του αναπνευστικού. Έτσι, η διεύρυνση της κατανόησής μας για τη λεπτή ισορροπία μεταξύ των προφλεγμονωδών κυτοκινών και των IFNs θα επιτρέψει την ανάπτυξη αποτελεσματικών θεραπειών ειδικά για την υπερφλεγμονή του σοβαρού COVID-19 χωρίς να διαταραχθεί ένα ευρύ φάσμα αντιϊκής άμυνας του ασθενή(4). Ο χρόνος, η διάρκεια και η ποιοτική

ρύθμιση είναι σημαντικές παράμετροι σε διάφορες δραστηριότητες κυτοκινών και θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη πριν στοχεύσουμε την υπερβολική φλεγμονή στο COVID-19(18). Είναι σημαντικό ότι η μελέτη των αιτιολογικών παραγόντων που συνδέουν τους φλεγμονώδεις μεσολαβητές και την κλινική ετερογένεια είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάπτυξη πραγματικά προγνωστικών βιοδεικτών και θεραπευτικών για τον COVID-19(8,18).

Περιορισμοί της μελέτης

Ένας σημαντικός περιορισμός της μελέτης είναι ο μικρός αριθμός των δειγμάτων, και κυρίως των ασθενών που δεν εμφάνισαν ΗΑΙ, κάτι που οφείλεται στο περιορισμένο χρονικό πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος ώστε να εξασφαλισθεί η απαραίτητη συλλογή ενός επαρκούς δείγματος ασθενών για το είδος της μελέτης αλλά και στην πολύ απαιτητική και χρονοβόρο τεχνική των εργαστηριακών μετρήσεων. Η συχνότητα εμφάνισης ΗΑΙ στους ασθενείς που νοσηλεύθηκαν στη ΜΕΘ ΠΑΓΝΗ ήταν υψηλή, πιθανά και λόγω της αυξημένης αναλογίας ασθενών/νοσηλευτών, περιορίζοντας έτσι τη δυνατότητα αναγνώρισης του ρόλου των ανοσολογικών μηχανισμών. Επιπλέον η μελέτη αυτή δεν εξέτασε το είδος των παθογόνων, και δεν εστίασε σε περισσότερο ειδικά σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν την έκφραση του TNFα και της IL-10 καθώς και των γονιδίων που εκφράζουν μια πληθώρα κυτταροκινών σχετιζόμενων με την ανοσοπαράλυση. Μια τέτοια προσπάθεια θα απαιτήσει τον σχεδιασμό εκτεταμένης πολυκεντρικής μελέτης ώστε να συμπεριλάβει ικανό αριθμό ασθενών που στη συνέχεια θα ταξινομηθούν σε υπό-ομάδες μελέτης.

Προοπτική της μελέτης

Η κατανόησή μας για τον μηχανισμό του ανοσολογικού παραμένει η απόκριση και η καταγίδα κυτταροκινών που προκαλείται από τον SARS-CoV-2 ατελής. Υπάρχουν πολύ λίγες μελέτες που έχουν εξετάσει πώς εξελίσσονται τα κλινικά συμπτώματα και τα εργαστηριακά ευρήματα χρόνο, η οποία είναι ιδιαίτερα σημαντική δεδομένης της δυναμικής φύσης του την ανοσολογική απάντηση και τη σημασία της έγκαιρης, στοχευμένης παρεμβάσεις. Μικρά μεγέθη δείγματος και ετερογένεια στις μελέτες, ο φαινότυπος της νόσου και οι μεθοδολογίες αξιολόγησης του ανοσοποιητικού περιπλέκουν τις συγκρίσεις μεταξύ αναλύσεων. Αυτή τη στιγμή υπάρχουν μελέτες σε εξέλιξη για την καλύτερη κατανόηση της συμβολής γενετικών και επιγενετικών παραγόντων για ορισμένους πληθυσμούς και αύξηση του κινδύνου σε άλλους. Επιπλέον, η κατανόηση των μηχανισμών που παίρνουν μέρος στην ενεργοποίηση της υπερφλεγμονής στη λοίμωξη από Sars-CoV 2 μπορεί να παρέχει κρίσιμες πληροφορίες στην εξέλιξη φλεγμονωδών και αυτοάνοσων νοσημάτων και να βελτιώσουμε την ικανότητά μας να επαναπροσδιοριζόμαστε και να αναπτύσσουμε αποτελεσματικά θεραπείες.

Συμπεράσματα

Η μέτρηση της ανοσολογικής λειτουργίας σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς με λοίμωξη από Sars-CoV 2 και η συσχέτιση με τα αποτελέσματα με επίκεντρο τον ασθενή είναι μια ανάγκη. Εντός των περιορισμών αυτής της μελέτης, διαπιστώσαμε ότι , πρώτον , οι ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις είναι πολύ συχνές και σημαντικές για την έκβαση των βαρέως πασχόντων ασθενών με λοίμωξη από Sars-CoV 2 και δεύτερον , οι περισσότεροι (90%) από αυτούς τους ασθενείς εμφανίζουν δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού μηχανισμού , όπως αυτή εκτιμάται με την μέτρηση της ιντερλευκίνης 10 και της παραγωγής TNFα μετά από δοκιμασία πρόκλησης με LPS ex-vivo , που μπορεί να σχετίζεται με τις ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις(19). Απαιτείται παρόλα ταύτα περαιτέρω μελέτη για την αξιολόγηση της ικανότητας αυτής της ανάλυσης για ποσοτικοποίησή της λειτουργίας του ανοσοποιητικού κατά τη διάρκεια μιας κρίσιμης νόσου και τη χρησιμότητα άλλων βιοδεικτών για τον χαρακτηρισμό της δυσλειτουργίας του ανοσοποιητικού.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent J-L. Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primer*. 2016 Jun 30;2:16045.
2. Berlot G, Passero S. Immunoparalysis in Septic Shock Patients [Internet]. *Infectious Process and Sepsis*. IntechOpen; 2019 [cited 2021 Nov 11]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/68828>
3. Muralidar S, Ambi SV, Sekaran S, Krishnan UM. The emergence of COVID-19 as a global pandemic: Understanding the epidemiology, immune response and potential therapeutic targets of SARS-CoV-2. *Biochimie*. 2020 Dec;179:85–100.
4. Park SH. An Impaired Inflammatory and Innate Immune Response in COVID-19. *Mol Cells*. 2021 Jun 30;44(6):384–91.
5. Vergadi E, Vaporidi K, Tsatsanis C. Regulation of Endotoxin Tolerance and Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome by Non-coding RNAs. *Front Immunol* [Internet]. 2018 [cited 2021 May 27];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.02705/full>
6. Bruse N, Leijte G, Pickkers P, Kox M. New frontiers in precision medicine for sepsis-induced immunoparalysis. *Expert Rev Clin Immunol*. 2018 Dec 20;15.
7. Dupont T, Caillat-Zucman S, Fremeaux-Bacchi V, Morin F, Lengliné E, Darmon M, et al. Identification of Distinct Immunophenotypes in Critically Ill Coronavirus Disease 2019 Patients. *CHEST*. 2021 May 1;159(5):1884–93.
8. Frazier WJ, Hall MW. Immunoparalysis and Adverse Outcomes from Critical Illness. *Pediatr Clin North Am*. 2008 Jun;55(3):647–xi.
9. Kalanuria AA, Zai W, Mirski M. Ventilator-associated pneumonia in the ICU. *Crit Care*. 2014;18(2):208.
10. Papazian L, Klompas M, Luyt C-E. Ventilator-associated pneumonia in adults: a narrative review. *Intensive Care Med*. 2020 May 1;46(5):888–906.
11. American Thoracic Society, Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Feb 15;171(4):388–416.
12. Cantón-Bulnes ML, Garnacho-Montero J. Practical approach to the management of catheter-related bloodstream infection. *Rev Esp Quimioter*. 2019;32(Suppl 2):38–41.
13. Kouni S, Tsofia M, Roilides E, Dimitriou G, Tsiodras S, Skoutelis A, et al. Establishing nationally representative central line-associated bloodstream infection surveillance data for paediatric patients in Greece. *J Hosp Infect*. 2019 Jan;101(1):53–9.
14. Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment [Internet]. [cited 2022 Feb 17]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7405822/>

15. Chau AS, Weber AG, Maria NI, Narain S, Liu A, Hajizadeh N, et al. The Longitudinal Immune Response to Coronavirus Disease 2019: Chasing the Cytokine Storm. *Arthritis Rheumatol* Hoboken NJ. 2021 Jan;73(1):23–35.
16. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*. 2010 Mar;10(3):170–81.
17. Briassoulis P, Briassoulis G, Christakou E, Machaira M, Kassimis A, Barbaressou C, et al. Active Surveillance of Healthcare-associated Infections in Pediatric Intensive Care Units: Multicenter ECDC HAI-net ICU Protocol (v2.2) Implementation, Antimicrobial Resistance and Challenges. *Pediatr Infect Dis J*. 2021 Mar 1;40(3):231–7.
18. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2013 Dec;13(12):862–74.
19. Levin G, Boyd JG, Day A, Hunt M, Maslove DM, Norman P, et al. The relationship between immune status as measured by stimulated ex-vivo tumour necrosis factor alpha levels and the acquisition of nosocomial infections in critically ill mechanically ventilated patients. *Intensive Care Med Exp*. 2020 Sep 16;8(1):55.
20. Novakovic B, Habibi E, Wang S-Y, Arts RJW, Davar R, Megchelenbrink W, et al. β -Glucan Reverses the Epigenetic State of LPS-Induced Immunological Tolerance. *Cell*. 2016 Nov 17;167(5):1354-1368.e14.
21. TNF alpha Human ELISA Kit - Invitrogen [Internet]. [cited 2022 Jan 15]. Available from: <https://www.thermofisher.com/elisa/product/TNF-alpha-Human-ELISA-Kit/BMS223-4>
22. Volk HD, Reinke P, Krausch D, Zuckermann H, Asadullah K, Müller JM, et al. Monocyte deactivation--rationale for a new therapeutic strategy in sepsis. *Intensive Care Med*. 1996 Oct;22 Suppl 4:S474-481.