

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona

TESI DOCTORAL

**Les infeccions en la cirrosi hepàtica: impacte clínic de la pandèmia per
COVID-19 en les infeccions i caracterització de la resposta immunitària *in*
vitro davant d'*Escherichia coli* multiresistents**

Autora

Berta Cuyàs i Espí

Directors

Dr. German Soriano Pastor

Dra. Silvia Vidal Alcorisa

Tutor

Dr. German Soriano Pastor

Programa de Doctorat en Medicina

Departament de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona, 2025

Als meus pares

AGRAÏMENTS

Els projectes que enfrontem no tindrien el mateix valor si no és per les persones amb qui els compartim. Pensant en aquests anys, puc dir que em considero molt afortunada.

En primer lloc, moltes gràcies German. Has estat el meu mentor des de resident i he après de tu no només des de la teva excel·lència com a metge sinó també des de la teva humilitat i generositat. M'has cuidat professionalment i, sobretot, a nivell personal amb la teva empatia, capacitat d'escolta i l'interès perquè tots els altres aspectes de la meua vida estiguessin ben equilibrats. Créixer al teu costat ha estat per mi un regal.

Gràcies Silvia, per acollir-me al teu laboratori i descobrir-me un món totalment nou, endinsant-me en el dia a dia de la investigació bàsica. Admiro la teva iniciativa i el teu lideratge. També el teu coneixement gastronòmic, engrescant el nostre grup de recerca a gaudir en bona companyia.

A tu Eva, ets llum per tots els que t'envoltem. Gràcies per la teva generositat, el teu suport incondicional i posar alegria a cada moment. La teva professionalitat i humanitat et fan tot un exemple a seguir. Maria, gràcies per tot el que m'has ensenyat, amb la teva constància, rigor i cura, és una sort fer equip amb tu. Edi, sempre he trobat en tu una bona consellera, gràcies per animar-me amb la teva passió a entrar en el món de l'hepatologia i la investigació, i per fer-ho tot més divertit.

Moltes gràcies Bet per la teva paciència ensenyant-me cada pas de cada experiment o protocol, i a tot l'equip del laboratori d'Immuno amb qui he coincidit abans o després, moltes gràcies per la vostra generositat, ajuda i bon ambient. Sou un exemple d'equip. Gràcies Ferran, Eli M. i Eli S., per les vostres contribucions.

Gràcies a la meua R gran, Mane, has estat sempre un recolzament indispensable, gràcies per la teva amistat. Als meus CoR, Sergi i Guillem, va ser un plaer créixer durant 4 anys al vostre costat, ho va fer tot tan fàcil... Gràcies als meus R petits: Beatriz, Carlos, Anna, Mireia, Laura, Raimon i Clàudia, he après molt de tots vosaltres. Gràcies Anna H.

A tots els companys i amics del servei de Digestiu, als de sempre, els que ja no hi són i als nous, que heu arribat per sumar. Grazie Raffa per la teva amistat i autenticitat. Charly, Cris Romero, Javi, Cris Roig, Laia, Patri, Marta G,... gràcies per fer el camí més

divertit. Oliva, gràcies per tot. Al Càndid, al Carlos Guarner, a l'Àngels, a l'Adolfo i al Xavi, gràcies. A la família de l'H. de Berga, que em fèieu sentir com a casa; Carme, gràcies per les estones de natura i la teva energia positiva.

Gràcies als meus amics que m'han animat durant tots aquests anys. A les de Bellaterra i als de Valle; Ana, a tu per estar al meu costat sempre tot i la distància. Gràcies Lúdia per aconseguir fer les coses profundes més lleugeres i regalar-me tants riures juntes. Gràcies Sandra pels anys de convivència i recolzar-me en tots els aspectes de la vida. Gràcies Uri per ser-hi sempre i animar-me a aconseguir els meus objectius. Gràcies a les meves amigues terrassenques per celebrar des del cor els èxits de cadascuna. Gràcies a les noves amistats de teatre per posar art i diversió a aquests anys de tesi; grazie Elena. Gràcies també a les meves nefròlogues de confiança.

Un enorme gràcies a la meva família. Als meus pares, Carme i Pere, tot i uns darrers anys convulsos, sempre enfronteu la vida amb coratge. Sou un gran exemple d'esforç, perseverança i positivisme. Us admiro. Als meus germans i cunyades, que m'heu animat sempre a ser "doctora doctora" i que feu la vida més desenfadada. A les tietes i tiets i a les cosines i cosins per ser les meves arrels; Maria i Pasqualet gràcies. A la meva família de Beni pel vostre recolzament i ànims. Als meus nebodets, Jan, Bruna, Tanit, Blau, Gabi i Claudia, que em fa tan feliç veure-us créixer. Als meus avis, que sé que avui celebrarien amb mi l'alegria d'aquest moment.

A tu Ale, mil gràcies per cuidar-me tant i ser la meva xarxa tots aquests anys. Creus tant en mi que m'has donat tot l'alè necessari perquè aconseguim juntes aquesta tesi. Que vinguin nous reptes!

LLISTAT D'ABREVIATURES I ACRÒNIMS

ACLF	Insuficiència hepàtica aguda sobre crònica	MDR	Multiresistents a antibiòtics
ADN	Àcid desoxiribonucleic	MDRO	Organismes multiresistents a antibiòtics
AGCC	Àcids grassos de cadena curta	MERTK	Receptor tirosina quinasa MER
AKI	Insuficiència renal aguda	MIP	Proteïna inflamatòria de macròfags
BLEE	Beta-lactamases d'espectre estès	NLR	<i>Nod-like receptors</i>
CAID	Disfunció immunitària associada a la cirrosi	NOD2	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2</i>
COVID-19	Malaltia causada pel virus SARS-CoV-2	OMS	Organització Mundial de la Salut
DAMPs	Patrons moleculars associats a dany cel·lular	PAMPs	Patrons moleculars associats a patògens
EH	Encefalopatia hepàtica	PBE	Peritonitis bacteriana espontània
GALT	Teixit limfoide associat a l'intestí	PBMC	Cèl·lules mononuclears de sang perifèrica
HCC	Hepatocarcinoma	PRR	Receptors de reconeixement de patrons
HSC	Cèl·lules estrellades hepàtiques	SARS-CoV-2	Coronavirus de tipus 2 causant de la síndrome respiratòria aguda greu
HTPCS	Hipertensió portal clínicament significativa	SEC	Cèl·lules endotelials sinusoidals
IBP	Inhibidors de bomba de protons	SIRS	Síndrome de resposta inflamatòria sistèmica
IFN	Interferó	TLR	<i>Toll-like receptors</i>
IL	Interleucina	TNF	Factor de necrosi tumoral
KC	Cèl·lules de Kupffer	UCI	Unitat de cures intensives
LPS	Lipopolisacàrid		
MCP-1	Proteïna quimiotàctica específica per als monòcits		

ÍNDEX

RESUM	13
SUMMARY	17
1. INTRODUCCIÓ.....	21
1.1. La cirrosi hepàtica: concepte, etiologia i epidemiologia.....	21
1.2. Història natural de la cirrosi hepàtica	22
1.3. Fisiopatologia de la cirrosi hepàtica	24
1.4. Infeccions en la cirrosi hepàtica	27
1.4.1. Epidemiologia de les infeccions	27
1.4.2. Patogènesi de les infeccions.....	29
1.4.2.1 Factors intrínsecs.....	30
1.4.2.2 Factors extrínsecs.....	37
1.4.3. Estratègies terapèutiques de les infeccions en la cirrosi	39
1.5. <i>Escherichia coli</i>	40
1.6. Resistències bacterianes a antibiòtics.....	42
1.7. Resposta inflammatòria a les infeccions	45
1.8. La pandèmia COVID-19	46
2. JUSTIFICACIÓ I HIPÒTESIS	51
3. OBJECTIUS	55
4. COMPENDI DE PUBLICACIONS.....	59
4.1. Publicació 1	61
4.1.1 Material suplementari	71
4.2. Publicació 2	73
4.2.1 Material suplementari.....	91
5. RESUM GLOBAL DELS RESULTATS	97
6. RESUM GLOBAL DE LA DISCUSSIÓ	103
6.1. Estudi 1.....	103

6.2. Estudi 2.....	107
7. CONCLUSIONS.....	115
8. FUTURES LÍNIES D'INVESTIGACIÓ.....	119
9. BIBLIOGRAFIA.....	123
10. ANNEXES.....	137
10.1. <i>Annex I</i> : Resolució del Comitè d'Ètica	137
10.2. <i>Annex II</i> : Comunicacions en congressos relacionades amb la tesi.....	139
10.2.1. Comunicació 1	139
10.2.2. Comunicació 2	140
10.3. <i>Annex III</i> : Beca obtinguda per a la realització d'aquesta tesi doctoral	141

RESUM

RESUM

La present tesi doctoral exposa el treball i les conclusions de la investigació realitzada sobre les infeccions en pacients amb cirrosi a través d'una perspectiva dual: a nivell epidemiològic clínic i a nivell de possibles mecanismes immunològics subjacents; posant èmfasi en les infeccions per bacteris multiresistents a antibiòtics (MDR).

Els pacients amb cirrosi hepàtica presenten una disfunció immunitària que els fa especialment vulnerables a les infeccions. Aquestes infeccions, especialment les causades per bacteris multiresistents, són la principal causa de descompensació, fallida multiorgànica i mort en aquests pacients. Tot i que la mortalitat per altres complicacions de la cirrosi ha disminuït, la relacionada amb infeccions ha augmentat els darrers anys. Per aquests motius, la prevenció, detecció precoç i tractament de les infeccions en la cirrosi hepàtica suposa un gran repte en l'actualitat.

El primer estudi que compon la present tesi doctoral avalua de manera retrospectiva la incidència i el tipus d'infeccions en pacients amb cirrosi en un moment de pandèmia mundial, comparant amb un període de temps previ a la pandèmia. Va ser publicat a la revista *Scientific Reports* (JCR 2024: IF 3,9, Q1). Es tracta d'un estudi novedós ja que no s'havia avaluat mai prèviament en el nostre medi com afectava una pandèmia i les mesures restrictives associades a la mateixa, al tipus d'infeccions que presenten els pacients amb cirrosi ingressats a les plantes d'hospitalització convencionals. Tot i que la incidència d'infeccions fou similar en ambdós períodes, durant la pandèmia es va observar una tendència a una menor incidència d'infeccions nosocomials, amb una major incidència d'infeccions per bacteris multiresistents. Això ens indica que les mesures estàndards de prevenció d'infeccions són necessàries per evitar l'augment d'infeccions nosocomials i de bacteris multiresistents.

En el segon estudi vam analitzar la resposta immunitària *in vitro* d'individus sans davant d'*Escherichia coli* obtinguts de pacients amb cirrosi hepàtica. L'objectiu fou donar resposta a la pregunta clínica de si el pitjor pronòstic sovint associat a les infeccions per bacteris multiresistents podia estar relacionat amb una resposta immunitària diferent a la produïda per les soques sensibles. En aquest estudi publicat a la revista

Microorganisms (IF JCR 2024: 4,2; Q2) vàrem comparar la resposta immunitària *in vitro* de cèl·lules mononuclears en base a la producció de citocines davant de dos components (les proteïnes de superfície i l'ADN) d'*E. coli* MDR i d'*E. coli* sensibles a antibiòtics. No vàrem observar diferents patrons de resposta, suggerint que aquest pitjor pronòstic no sembla relacionat amb una resposta immunitària diferent respecte als bacteris sensibles a antibiòtics, sinó per altres factors. A més, destacà que la resposta immunitària estava fortament influenciada per la variabilitat interindividual entre els diferents donants. Aquests resultats obren la porta a seguir avançant en l'estudi dels mecanismes implicats en la variabilitat interindividual davant de les infeccions i les seves implicacions clíniques.

En conclusió, aquesta tesi pretén aportar coneixement sobre les infeccions en la cirrosi, posant èmfasi en aquelles per gèrmens MDR, des d'un punt de vista clínic i experimental, subratllant la importància de les mesures higièniques per prevenir les infeccions nosocomials i que el pitjor pronòstic de les infeccions per bacteris MDR estaria relacionat amb el retard en un tractament antibiòtic efectiu o amb altres factors més que amb una resposta immunitària diferent.

SUMMARY

SUMMARY

This doctoral thesis presents the work and conclusions of the research carried out on infections in patients with cirrhosis from a dual perspective: clinical epidemiology and potential underlying immunological mechanisms, with a focus on infections caused by multidrug-resistant (MDR) bacteria.

Patients with liver cirrhosis exhibit immune dysfunction that makes them particularly vulnerable to infections. These infections, especially those caused by MDR bacteria, are the leading cause of decompensation, multi-organ failure, and death in these patients. Although mortality from other cirrhosis-related complications has decreased, infection-related mortality has increased in recent years. For these reasons, prevention, early detection, and treatment of infections in liver cirrhosis represent a significant current challenge.

The first study that comprise this doctoral thesis, retrospectively evaluates the incidence and types of infections in patients with cirrhosis during a period of global pandemic, comparing it with a pre-pandemic period. It was published in *Scientific Reports* (JCR 2024: IF 3.9, Q1). This is a novel study, as the impact of a pandemic and its associated restrictive measures on the types of infections experienced by patients with cirrhosis had never been evaluated in our setting before. Although the overall incidence of infections was similar in both periods, during the pandemic a trend towards a lower incidence of nosocomial infections was observed, along with a higher incidence of infections caused by MDR bacteria. This indicates that standard infection prevention measures are essential to avoid increases in nosocomial infections and multidrug-resistant bacteria.

In the second study, we analyzed the *in vitro* immune response of healthy individuals to *Escherichia coli* strains obtained from patients with liver cirrhosis. The objective was to address the clinical question of whether the poorer prognosis often associated with infections by MDR bacteria is due to an immune response different from that elicited by sensitive strains, or to other factors. This article was published in the journal *Microorganisms* (JCR 2024 IF: 4.2; Q2). In this study, we compared the *in vitro* immune

response of mononuclear cells based on cytokine production in response to two components (surface proteins and DNA) of several MDR *E. coli* and antibiotic-sensitive *E. coli*. We did not observe different response patterns, suggesting that the poorer prognosis does not appear to be related to a distinct immune response compared to antibiotic-sensitive bacteria, but rather to other factors. Moreover, the immune response was found to be strongly influenced by interindividual variability among the different healthy donors. These results pave the way for further investigation into the mechanisms underlying interindividual variability in response to infections and their clinical implications.

In conclusion, this thesis aims to provide new information on infections in cirrhosis, with a particular focus on those caused by MDR organisms, from both clinical and experimental perspectives. Our results highlight the importance of hygienic measures to prevent nosocomial infections and the widespread of MDR organisms, and suggest that the poorer prognosis of infections caused by MDR bacteria is more likely related to delays in effective antibiotic treatment or other factors, rather than to a different immune response.

INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1. La cirrosi hepàtica: concepte, etiologia i epidemiologia

La cirrosi hepàtica és l'estadi final de la malaltia hepàtica crònica, caracteritzada per una inflamació hepàtica persistent que provoca la substitució del teixit hepàtic sa per septes fibrosos i nòduls de regeneració (1). Aquesta alteració del parènquima hepàtic i la distorsió de l'arquitectura vascular, afavoreixen l'aparició de la hipertensió portal i la insuficiència hepàtica, i finalment les descompensacions de la cirrosi, que comporten freqüents ingressos hospitalaris, pèrdua de la qualitat de vida i una alta morbiditat i mortalitat.

En relació a l'etiologia de la cirrosi, a Europa estem observant un canvi de paradigma. El consum abusiu d'alcohol representa la principal etiologia de la cirrosi coincidint amb l'important descens de les hepatitis virals gràcies a la seva prevenció i tractament amb antivirals (2). Tanmateix, ha augmentat de manera notable la cirrosi per malaltia hepàtica associada a disfunció metabòlica en paral·lel a la major prevalença de síndrome metabòlica (3), destacant que els factors de risc metabòlic estan augmentant de manera preocupant també en infants i adolescents, constituint una amenaça important per a la salut global en les pròximes dècades (4). A Àsia, en canvi, la prevalença d'hepatitis B és molt alta i continua essent la principal etiologia (5).

La prevalença estimada de cirrosi hepàtica compensada fou de 112 milions a nivell mundial al 2019, el que correspon a una prevalença ajustada per edat de 1.395 casos per 100.000 habitants (6), si bé probablement estigui infraestimada donat que en aquesta fase la malaltia és asintomàtica (7). A Europa, la prevalença mitjana de cirrosi va ser de 833 casos per 100.000 habitants (amb un rang entre 447 i 1.100) (8).

La cirrosi hepàtica és l'onzena causa principal de defunció a nivell mundial i la tercera entre les persones de 45 i 64 anys (4,9). És responsable d'un milió de morts anuals al món i, juntament amb el càncer de fetge, representa el 3,5% de les morts mundials (6,10). A més de l'elevada mortalitat, la cirrosi té un gran impacte en la salut global ja que comporta una disminució de la qualitat de vida relacionada amb la salut, important utilització de recursos sanitaris, incapacitat laboral i una significativa càrrega familiar,

social i econòmica (11). De fet, és una de les 15 primeres causes de pèrdua d'anys de vida ajustats per discapacitat, amb major impacte en les persones joves (6).

1.2. Història natural de la cirrosi hepàtica

La fase inicial de la cirrosi és en la seva forma asimptomàtica o “compensada”, però l'augment de la pressió portal i l'empitjorament de la funció hepàtica poden comportar l'evolució a una cirrosi simptomàtica o “descompensada”. La descompensació es caracteritza per l'aparició de complicacions de la cirrosi com l'ascites, l'hemorràgia varicosa i l'encefalopatia hepàtica (EH) (1,12). La probabilitat de passar d'una cirrosi compensada a una descompensada és del 5-8% per any, essent major el risc si l'etiologia de la cirrosi es troba activa com, per exemple, la relacionada amb el consum d'alcohol persistent. El pronòstic d'aquests dos estadis és molt diferent. En una revisió sistemàtica amb una gran cohort de pacients, la supervivència mitjana passava de més de 12 anys en cirrosi compensada a uns 2 anys en la descompensada (12). Segons dades més recents, la supervivència en la cirrosi descompensada pot oscil·lar entre 2 i 4 anys, essent menor en cas de descompensacions recurrents (13).

Dins de cadascun d'aquests dos estadis, hi ha pacients amb pronòstics diferents. En la fase compensada, els pacients es poden classificar segons la presència o no d'hipertensió portal clínicament significativa (HTPCS). En absència d'HTPCS, el risc de descompensació és molt baix. En presència d'HTPCS (definida per un gradient de pressió venosa hepàtica superior a 10 mmHg o, de manera indirecta, per elastografia hepàtica combinada amb el recompte de plaquetes), el risc augmenta notablement. Dins del grup amb HTPCS, la presència de varices esofàgiques s'associa amb un risc encara més alt de descompensació i una mortalitat anual d'aproximadament el 10%, en comparació amb menys de l'1% en pacients sense varices (14).

Dins de la fase descompensada, caracteritzada per un augment de la hipertensió portal i la circulació hiperdinàmica, el tipus i nombre de descompensacions també tenen diferents implicacions pronòstiques. L'hemorràgia per varices s'associa a un risc de mortalitat als 5 anys del 18-20% mentre que aquest risc augmenta fins al 25% en cas de qualsevol altra descompensació diferent de l'hemorràgia, principalment l'ascites, seguida de l'EH(15,16). Si es produeix una segona descompensació sobreafegida, el risc

de mortalitat als 5 anys augmenta fins al 55-80% (16). La combinació més freqüent és l'ascites i l'hemorràgia per varices. Finalment, tant la infecció com la insuficiència renal aguda (AKI) en la cirrosi descompensada es relacionen amb un risc de mortalitat de quatre o cinc vegades superior respecte aquells que no les presenten (17–19). Així, s'ha descrit un últim estadi de descompensació avançada que resulta d'una progressiva vasodilatació esplàncnica i de la circulació hiperdinàmica, translocació bacteriana i inflamació sistèmica. Aquest últim estadi es defineix per l'ascites refractària, les infeccions, l'AKI, l'EH persistent i/o la disfunció multiorgànica; tot i ser un grup heterogeni, aquests pacients presenten un risc de mort a l'any molt elevat, d'entre el 60% i el 80% (14,17,20).

Tenint en compte aquestes dades, la classificació actual de la història natural de la cirrosi hepàtica es presenta a la **Figura 1**. L'estadi 1 (sense varices esofàgiques ni ascites) i l'estadi 2 (varices esofàgiques, sense ascites) abarquen la cirrosi compensada, mentre que la cirrosi descompensada abarca l'estadi 3 (hemorràgia per varices), 4 (descompensació diferent de l'hemorràgia), 5 (segona descompensació sobreafegida) i 6 (descompensació avançada persistent) (12,14,21–23).

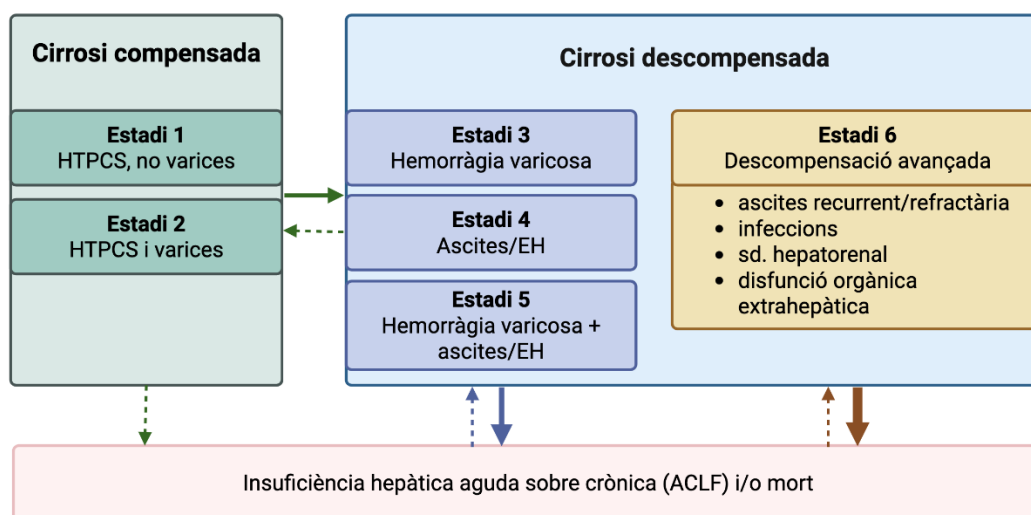


Figura 1. Estadis clínics de la cirrosi hepàtica. HTPCS: hipertensió portal clínicament significativa; EH: encefalopatia hepàtica. Adaptat de D'Amico G *et al.* Aliment Pharmacol Ther (2014), D'Amico G *et al.* J Hepatol (2018), Jalan R *et al.* J Hepatol (2021), D'Amico G *et al.* Hepatology (2024), Artru F *et al.* J Hepatol (2024).

La insuficiència hepàtica aguda sobre crònica (*acute-on-chronic liver failure*, ACLF) és una forma greu de descompensació de la cirrosi que pot aparèixer en qualsevol estadi, amb una alta mortalitat a curt termini: 20% als 28 dies i 38-96% als 6 mesos. Aquesta síndrome es caracteritza per la disfunció d'un o més dels sis principals sistemes orgànics (fetge, ronyó, cervell, pulmons, coagulació i circulació) i per una inflamació sistèmica (24). Els factors precipitants d'ACLF poden ser intrahepàtics, extrahepàtics o ambdós; els més freqüents són les infeccions bacterianes i l'hepatitis alcohòlica greu (25). Segons el número d'òrgans afectats es divideix en tres graus, amb major mortalitat a major grau:

- ACLF grau 1, inclou 3 subgrups:
 - únicament fallada renal (creatinina $\geq 2,0$ mg/dL)
 - fallada d'un òrgan (fetge, coagulació, circulació o pulmons) associada a una o ambdues de les següents: disfunció renal (creatinina 1,5mg/dL-1,9mg/dL) o EH grau I-II
 - EH grau III-IV amb disfunció renal (creatinina 1.5mg/dL-1.9mg/dL)
- ACLF grau 2: fallada de dos òrgans
- ACLF grau 3: fallada de tres o més òrgans.

L'hepatocarcinoma (HCC) és la tercera causa de mortalitat associada a càncer a nivell global i la principal causa de mort en els pacients amb cirrosi hepàtica (26). Pot desenvolupar-se en qualsevol dels estadis de la cirrosi i la seva incidència anual és del 1% - 6%. L'aparició d'HCC s'associa a un alt risc de descompensació i de descompensació avançada en pacients amb cirrosi (27).

1.3. Fisiopatologia de la cirrosi hepàtica

La cirrosi hepàtica és una malaltia crònica caracteritzada per una remodelació de l'arquitectura del fetge a conseqüència d'un procés inflamatori i fibrogènic sostingut. Diverses cèl·lules hepàtiques intervenen en aquest procés, principalment els hepatòcits, les cèl·lules estrellades hepàtiques (HSC), les cèl·lules endotelials sinusoidals (SEC) i les cèl·lules de Kupffer (KC). Les HSC, normalment encarregades d'emmagatzemar vitamina A, s'activen en resposta a citocines inflamatòries, es transformen en miofibroblasts i

comencen a sintetitzar col·lagen i matriu extracel·lular, contribuint a la fibrosi (28). Les SECs, que recobreixen els sinusoides amb estructures fenestrades per facilitar l'intercanvi entre la sang i els hepatòcits, perden aquestes fenestracions en la cirrosi (capil·larització sinusoidal), afavorint la resistència al flux sanguini (29). Alhora, els hepatòcits danyats alliberen espècies reactives d'oxigen i mediadors proinflamatoris, i les KCs, activades, secreten citocines i actuen com a cèl·lules presentadores d'antigen (30). Aquest conjunt de canvis cel·lulars provoca alteracions estructurals que distorsionen l'angioarquitectura hepàtica i incrementen la resistència vascular intrahepàtica, conduint al desenvolupament progressiu de la hipertensió portal (30). A l'augment de la resistència intrahepàtica s'hi afegeixen alteracions funcionals, com la vasoconstricció sinusoidal, causada per un desequilibri entre agents vasodilatadors i vasoconstrictors. En destaca la reducció de la producció d'òxid nítric per part de SEC, especialment en situacions d'estrès, com les infeccions. Aquests factors contribueixen a intensificar encara més la hipertensió portal (29,30).

L'augment de la pressió portal desencadena un conjunt d'alteracions hemodinàmiques sistèmiques, entre les quals destaca la vasodilatació arterial esplàncnica. En aquest territori, a diferència del fetge, la producció d'òxid nítric està augmentada —inicialment com a resposta adaptativa i, posteriorment, com a conseqüència de la translocació bacteriana i de la inflamació sistèmica crònica. Aquesta vasodilatació incrementa el flux sanguini portal, el qual, en combinació amb l'augment de resistència intrahepàtica, agreuja la hipertensió portal (31). La disminució del volum arterial efectiu que en resulta activa sistemes neurohumorals compensatoris, com el sistema nerviós simpàtic, el sistema renina-angiotensina-aldosterona i la vasopressina, que busquen restaurar la perfusió però acaben afavorint la retenció de sodi i aigua, contribuint a la formació d'ascites i edemes (1).

En fases avançades, aquesta hiperactivació neurohumoral pot deteriorar la funció renal i provocar síndrome hepatorenal, una forma greu d'insuficiència renal funcional, mentre que la circulació hiperdinàmica – amb augment del dèbit cardíac – pot veure's limitada per una miocardiopatia cirròtica, que agreuja la hipovolèmia efectiva (32,33).

L'increment sostingut de la pressió portal afavoreix també la formació de circulació col·lateral portosistèmica, com ara les varices esofàgiques, que poden trencar-se i causar hemorràgies digestives greus (34). A més, els shunts portosistèmics i la disfunció hepatocel·lular redueixen la capacitat del fetge per eliminar toxines com l'amoní, afavorint l'aparició d'EH (35).

Un altre component clau en la fisiopatologia de la cirrosi és la inflamació sistèmica crònica, afavorida per la translocació bacteriana patològica, que consisteix en el pas de bacteris intestinals o dels seus productes a la circulació sistèmica a través d'una mucosa intestinal alterada (36). Aquesta translocació s'associa a hipertensió portal, permeabilitat intestinal augmentada, alteracions de la microbiota i retard del trànsit intestinal. Tant els patrons moleculars associats a patògens (PAMPs) com els patrons moleculars associats a dany cel·lular (DAMPs) contribueixen a l'activació del sistema immunitari innat i a una resposta proinflamatòria sostinguda, amb elevació de citocines i quimioquines. Aquesta inflamació contribueix a la disfunció multiorgànica, augmenta el risc d'infeccions greus i afavoreix l'aparició de síndrome de resposta inflamatòria sistèmica (SIRS) i insuficiència orgànica aguda, com l'EH, on la hiperamonèmia i la neuroinflamació tenen un paper sinèrgic.

En conjunt, la fisiopatologia de la cirrosi resulta de la interacció entre hipertensió portal, disfunció circulatòria sistèmica, activació neurohumoral, inflamació sistèmica i alteracions de la barrera intestinal i del microbioma, factors que, de manera interrelacionada, condueixen a la descompensació hepàtica i a les seves complicacions més greus. A la **figura 2** es resumeixen aquests factors.

1.4. Infeccions en la cirrosi hepàtica

1.4.1. Epidemiologia de les infeccions

En els pacients amb cirrosi ingressats per descompensació aguda, les infeccions bacterianes són freqüents (24–29 %) i encara més en el context d'hemorràgia digestiva (fins al 50 %) (38). La majoria d'aquestes infeccions bacterianes són adquirides a la comunitat (entre el 32 i el 50%), seguides de les associades a l'atenció sanitària (25-41%) i les nosocomials (25-37%) (37). En pacients amb cirrosi, les infeccions progressen a sèpsia més freqüentment que en la població general (2,6 vegades) (40). En un estudi derivat del projecte PREDICT, Trebicka *et al.* descrigueren que les infeccions bacterianes són el desencadenant més freqüent de descompensació aguda de la cirrosi (29.3%) i d'ACLF (50%) (25). Els pacients amb ACLF associat a infeccions presenten una mortalitat als 90 dies superior a aquells amb ACLF no associat a infecció (41) i aquesta mortalitat encara es veu més augmentada en cas de retard diagnòstic i tractament empíric inadequat, sent aquest freqüent degut al progressiu increment de les infeccions per organismes multiresistents (MDRO). A més, les infeccions són una causa freqüent de segona descompensació com AKI o recidiva d'hemorràgia varicosa (37).

La infecció més freqüent en pacients amb cirrosi és la peritonitis bacteriana espontània (PBE), representant el 20-30% dels casos (37). La PBE es defineix com la infecció del líquid ascític que cursa amb un augment de leucòcits polimorfonuclears en el líquid ascític superior o igual a 250/mm³ amb cultiu positiu o negatiu, en absència d'una causa intraabdominal que ho justifiqui (42,43). La translocació bacteriana amb l'arribada de bacteris intestinals al líquid ascític és el principal mecanisme patogènic implicat (44).

Les altres infeccions freqüents en la cirrosi són: infeccions del tracte urinari (20-25%), pneumònia (10-20%), bacterièmia espontània (8-15%) i infeccions de pell i teixits tous (5-10%) (45). Altres infeccions menys freqüents són: colangitis, endocarditis, infeccions relacionades amb catèter, enterocolitis per *Clostridioides difficile*, peritonitis secundària, empiema espontani, meningitis i infeccions osteoarticulars. Aproximadament el 20% dels pacients infectats desenvolupen una segona infecció durant l'ingrés, la qual s'associa a major mortalitat (46).

Els principals patògens són els bacteris gramnegatius (principalment *Escherichia coli* i *Klebsiella spp.*), però les infeccions per grampositius (principalment *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.* i *Staphylococcus spp.*) han augmentat en els darrers anys i ja són igual

de prevalents (38,41). La infecció per *Clostridioides difficile* és més freqüent en la cirrosi que en la població general i s'associa a major mortalitat i despesa sanitària (47). Les infeccions per MDRO són un greu i creixent problema mundial i ja representen entre el 30 i el 50% de les infeccions bacterianes en la cirrosi (38,48). Desenvoluparem les infeccions per MDRO al punt 1.6.

Les infeccions fúngiques són menys freqüents que les bacterianes (3-7% de les infeccions amb cultiu positiu, tot i que sovint són infradiagnosticades) però tenen una elevada mortalitat, especialment en pacients immunodeprimits o amb hepatitis alcohòlica greu (37,38). Les més freqüents són la candidiasi invasiva i l'aspergil·losi pulmonar i habitualment són nosocomials (38).

Les infeccions víriques agudes són poc freqüents però també contribueixen significativament a la morbmortalitat d'aquests pacients, particularment les infeccions per virus respiratoris com la grip o el coronavirus de tipus 2 causant de la síndrome respiratòria aguda greu (SARS-CoV-2).

El desenvolupament de mesures eficaces per a la prevenció, la detecció precoç i el tractament de les infeccions en pacients amb cirrosi és un repte, especialment tenint en compte l'increment progressiu de la incidència d'infeccions per MDRO (37,38).

1.4.2. Patogènesi de les infeccions

La cirrosi s'associa a varis factors intrínsecs i extrínsecs que predisposen a les infeccions (**Figura 3**). Respecte els factors intrínsecs, els més rellevants són: a) la disfunció immunitària associada a la cirrosi (CAID), b) les alteracions de l'eix intestí-fetge (inclou la disbiosi intestinal i l'alteració de la barrera intestinal, que resulten en una translocació bacteriana patològica) i c) la predisposició genètica. Entre els factors extrínsecs que augmenten la susceptibilitat a infeccions trobem l'ús crònic d'inhibidors de la bomba de protons (IBP), la malnutrició-sarcopènia i l'exposició a procediments invasius/hospitalització, entre d'altres.

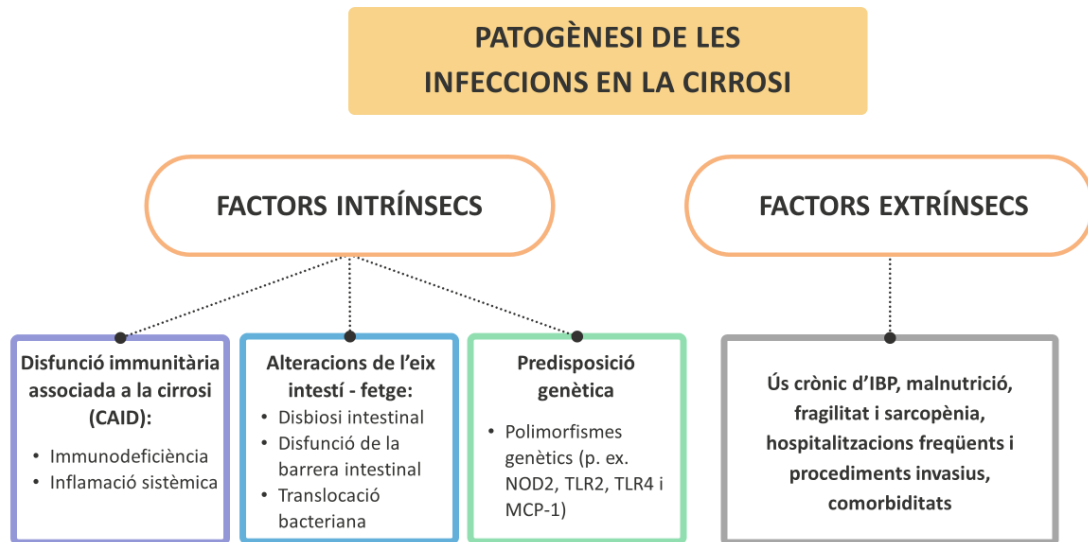


Figura 3. Factors que intervenen en la patogènesi de les infeccions en la cirrosi. IBP: inhibidors de bomba de protons

1.4.2.1 Factors intrínsecs

a) Disfunció immunitària associada a la cirrosi (CAID)

La cirrosi es considera una malaltia sistèmica ja que afecta a la majoria d'òrgans i sistemes del cos, entre ells el sistema immunitari. El concepte de CAID es refereix a l'ampli espectre d'alteracions immunitàries en la cirrosi i es caracteritza per dos components principals: una immunodeficiència per la incapacitat de respondre als patògens i una inflamació sistèmica per l'estimulació persistent del sistema immunitari (49). Segons la intensitat de la CAID, existeixen dos fenotips immunitaris diferents: el fenotip d'inflamació sistèmica de baix grau (present en pacients compensats i descompensats sense fallada orgànica) i el fenotip d'inflamació sistèmica d'alt grau caracteritzat per inflamació i immunodeficiència greus (present en pacients amb ACLF) (50). Aquests fenotips representen els extrems d'un espectre continu d'alteracions de la immunitat i són potencialment reversibles.

El fetge sa juga un paper essencial en l'homeòstasi del sistema immunitari mitjançant la vigilància contra patògens i la producció de molècules necessàries per a una resposta immunitària efectiva (51). Disposa de cèl·lules especialitzades, com les KC i les SECs, que

capten i eliminen patògens (29). A més, el fetge regula la resposta immunitària mitjançant la producció de proteïnes com el complement i altres receptors de reconeixement de patrons (PRR). La ubicació del fetge entre el sistema portal – que transporta bacteris i els seus productes des de l'intestí – i la circulació sistèmica, com s'explicarà més endavant, posa encara més de relleu la importància d'aquesta funció de vigilància immunològica.

Immunodeficiència

La immunodeficiència de la cirrosi es caracteritza per la presència d'anomalies en les cèl·lules del sistema immunitari que comprometen la seva funció efectora i provoquen una paràlisi immunitària. Aquestes alteracions inclouen defectes funcionals, expansió de determinades subpoblacions de cèl·lules immunitàries o una expressió reduïda de molècules coestimuladores. En la cirrosi, aquesta immunodeficiència s'explica principalment per la distorsió estructural del parènquima hepàtic, que compromet la funció de vigilància immunitària, i per l'alteració funcional de les cèl·lules immunitàries circulants (50). En fases inicials, es manifesta mitjançant alteracions en les cèl·lules mieloides (monòcits i neutròfils), com ara la reducció de la seva capacitat fagocítica. A mesura que la malaltia avança, la immunodeficiència augmenta, i en l'ACLF es caracteritza per disminució de l'expressió de HLA-DR, producció reduïda de TNF en resposta a lipopolisacàrid (LPS) per part dels monòcits, reducció de l'explosió oxidativa i alteració de la fagocitosi en monòcits i neutròfils. En l'ACLF també hi ha un augment dels nivells de monòcits que expressen el receptor tirosina quinasa MER (MERTK) – que actuen com a fre de la inflamació al suprimir les respostes immunitàries innates excessives – i de monòcits que produeixen citocines antiinflamatòries com la interleucina (IL) 10 (50,52). De fet, s'ha vist que una resposta immunosupressora excessiva (evidenciada per nivells elevats d'IL-10 o un nombre elevat de monòcits MERTK+) en el moment de l'ingrés hospitalari es correlaciona amb pitjor pronòstic en pacients amb ACLF (53). Un altre mecanisme clau és l'esgotament de les cèl·lules immunitàries de vigilància, causat per l'estimulació constant del sistema immunitari per productes bacterians provinents d'una barrera intestinal alterada, com els PAMPs, i per DAMPs, especialment en l'ACLF.

Paral·lelament, la disfunció immunitària també s'agreuja per la insuficiència hepàtica pròpiament dita. La disminució de la síntesi d'albumina i la seva disfunció afecten la resposta immunològica, a més de la funció hemodinàmica (54). Altres alteracions freqüents a la cirrosi com la hiperamonèmia i la hiponatrèmia també interfereixen amb la fagocitosi i poden afavorir un fenotip proinflamatori en els neutròfils.

Finalment, el dany en el teixit limfoide associat a l'intestí (GALT) contribueix a la perpetuació de la inflamació sistèmica crònica, afavorint la translocació bacteriana i tancant un cercle viciós d'activació immunitària i immunodeficiència (50).

En definitiva, la immunodeficiència augmenta el risc d'infeccions bacterianes en totes les fases de la malaltia hepàtica, fins i tot en la cirrosi compensada.

Inflamació sistèmica

En la cirrosi, la inflamació sistèmica coexisteix amb la immunodeficiència prèviament descrita i és el resultat de l'estimulació persistent de les cèl·lules immunitàries, amb sobreproducció de citocines proinflamatòries i expressió de marcadors d'activació cel·lular.

La inflamació sistèmica en la cirrosi es desencadena per diversos mecanismes interrelacionats. D'una banda, l'augment de la permeabilitat intestinal, associat a la disbiosi i al sobrecreixement bacterià, facilita la translocació de bacteris i de PAMPs cap al fetge i la circulació sistèmica. Alhora, la progressió de la malaltia hepàtica crònica comporta la necrosi d'hepatòcits, pel què s'alliberen DAMPs, que també contribueixen a l'activació immunitària. A més, la progressiva disregulació del sistema immunitari pròpia de la cirrosi, afavorida per l'estrès cel·lular i una resposta exagerada als PAMPs, dona lloc a una activació descontrolada del sistema immunitari (50).

Tant els PAMPs com els DAMPs activen els PRR de cèl·lules immunitàries, com els *toll-like receptors* (TLR) o els *nod-like receptors* (NLR), que indueixen la producció de citocines i quimiocines via les rutes de senyalització proinflamatòries NF- κ B (produint IL-6, TNF, IL-1 β) i IRF3 (produint interferons de tipus 1 i IP-10) (50). Aquesta activació s'inicia al GALT i als ganglis limfàtics mesentèrics, i s'estén a la sang perifèrica, on les

citocines alliberades estimulen la producció d'òxid nítric per l'endoteli, contribuint a la vasodilatació sistèmica, la hipertensió portal i la disfunció circulatoria. La intensitat de la inflamació sistèmica es correlaciona amb la severitat de la disfunció orgànica i la mortalitat, especialment en pacients amb ACLF (52).

És de destacar que les citocines i les cèl·lules immunitàries predominantment implicades en l'estat proinflamatori de la cirrosi són les relacionades amb la resposta innata, més que no pas l'adaptativa. Com ja s'ha comentat, actualment es descriuen dos fenotips d'inflamació (50). El primer és el fenotip d'inflamació sistèmica de baix grau, caracteritzat per una activació immunitària exagerada però amb resposta efectora parcialment preservada. El segon és el fenotip d'inflamació sistèmica d'alt grau, vinculat a l'ACLF, amb fracàs multiorgànic per l'alliberament massiu de citocines, l'activació de mecanismes de mort cel·lular, l'estrès oxidatiu i el reclutament de cèl·lules immunitàries efectores.

En conjunt, la inflamació crònica i la disfunció immunitària fan els pacients amb cirrosi més vulnerables a infeccions i contribueixen a la progressió de la malaltia i les seves complicacions. A la **figura 4** es descriuen els components del CAID.

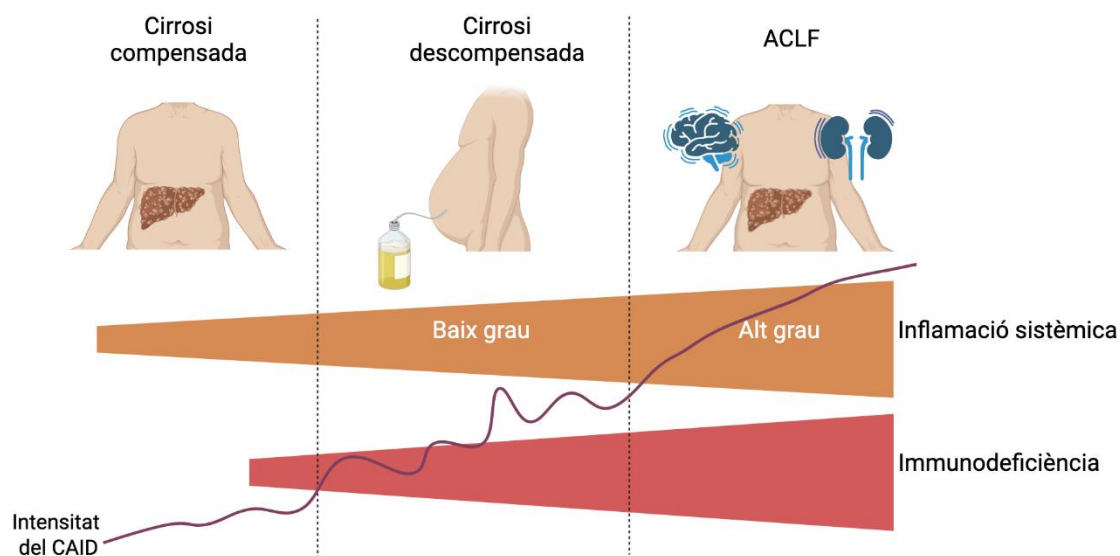


Figura 4. Disfunció immunitària associada a la cirrosi (CAID). ACLF: insuficiència hepàtica aguda sobre crònica. Adaptada de Albillos A *et al.* Nat Rev Gastroenterol Hepatol (2020).

Creada amb Biorender.com.

b) Alteracions en l'eix intestí-fetge

L'eix intestí-fetge fa referència a la relació bidireccional entre l'intestí —inclosa la seva microbiota— i el fetge, una connexió que resulta de les interaccions entre factors dietètics, genètics i ambientals. Aquesta comunicació mútua es produeix principalment a través de la circulació portal, que transporta cap al fetge productes derivats de l'intestí, inclosos bacteris i les seves molècules. Alhora, el fetge respon mitjançant la secreció de bilis i anticossos cap a l'intestí, modulant la composició de la microbiota i la funció de la barrera intestinal. Quan aquesta barrera es veu alterada, s'incrementa el pas de microorganismes i dels seus productes cap al fetge, contribuint així a l'aparició o empitjorament de diverses malalties hepàtiques (55).

La microbiota intestinal

La microbiota intestinal és el conjunt de microorganismes que habiten de manera natural el tracte digestiu. La formen trilions de microorganismes entre bacteris, virus, fongs, arqueus i protozous, essent però els bacteris el grup més nombrós i rellevant (56). La microbiota intestinal exerceix funcions essencials per a l'hoste: regula el sistema immunitari, impedeix la proliferació excessiva de patògens, modula la proliferació cel·lular i la vascularització, i regula rutes neuro-endocrines (57). A més, participa en la generació d'energia proporcionant entre un 5 i un 10% dels requeriments energètics diaris de l'hoste, biosintetitza vitamines i neurotransmissors, metabolitza sals biliars, carbohidrats i oligosacàrids complexos resultant en la síntesi d'àcids grassos de cadena curta (AGCC). També participa en el metabolisme de determinats fàrmacs, i contribueix a l'eliminació de toxines exògenes (57).

Els canvis en la seva composició en forma de sobrecreixement bacterià (augment del número de bacteris) o la disbiosi (alteració en la composició bacteriana) s'associen a diverses patologies cròniques i inflamatòries, entre elles, la cirrosi. Aquesta disbiosi s'agreuja amb la descompensació i es relaciona amb un pitjor pronòstic. A través de tècniques metagenòmiques sabem que la microbiota intestinal dels pacients amb cirrosi es caracteritza per una reducció de la diversitat microbiana (58) especialment en l'ACLF (59), disminució de bacteris beneficiosos (com *Lachnospiraceae* i *Ruminococcaceae*) i augment de bacteris potencialment patògens, com bacils gramnegatius de la família

Enterobacteriaceae (per exemple, *Escherichia* spp i *Klebsiella* spp) i cocs grampositius de les famílies *Streptococcaceae* i *Enterococcaceae*. Els principals factors que alteren la microbiota en la cirrosi són la reducció de la motilitat intestinal, la baixa secreció d'àcid gàstric i àcids biliars, els dèficits immunitaris a nivell intestinal i la invasió de bacteris d'origen oral a l'intestí (55).

Disfunció de la barrera intestinal

Donat que el tracte gastrointestinal està constantment en contacte amb microorganismes comensals i patògens, és imprescindible que desenvolupi un sistema de defensa i control que impedeixi que aquests microorganismes estableixin una infecció, però que alhora mantingui la interfície amb els nutrients necessaris per a l'organisme. Aquest sistema s'organitza en capes. La primera defensa és la microbiota resident, que competeix amb els patògens. A continuació, de manera fisiològica, hi ha la capa de muc que actua com a barrera física i conté productes antimicrobians i IgA secretora (60). Sota aquesta capa hi ha una monocapa de cèl·lules epitelials intestinals (enteròcits, cèl·lules caliciformes, tuft i enterocromafines) que actuen de barrera. Aquesta barrera és alhora física (les cèl·lules epitelials estan unides per unions estretes), elèctrica (amb càrrega negativa que rebutja bacteris) i química (mitjançant pèptids antimicrobians) (55). A més, la barrera intestinal està reforçada per diverses cèl·lules immunitàries que patrullen l'epiteli i la làmina pròpia, on es troben les cèl·lules plasmàtiques que alliberen IgA. Si els bacteris traspassen l'epiteli, poden arribar a la làmina pròpia, però només una petita part dels patògens es disseminaran a nivell sistèmic gràcies a la barrera intestinal vascular. Aquesta barrera, formada principalment per cèl·lules endotelials especialitzades dels capil·lars sanguinis intestinals, actua com un filtre immunològic al restringir el pas dels microorganismes i els PAMPs cap al torrent sanguini, evitant que puguin arribar al fetge (55). Paral·lelament, alguns productes bacterians solubles com els AGCC (per exemple l'acetat, el propionat i el butirat; derivats de la fermentació de fibres dietètiques), reforcen la barrera intestinal al modular-ne la resposta immunitària.

En els pacients amb cirrosi es produeix una alteració de la barrera intestinal que afavoreix la permeabilitat intestinal. Tant en humans com en models experimentals s'ha

observat que les unions estretes entre enteròcits es troben alterades i que coexisteixen amb edema submucós i desregulació de cèl·lules immunitàries intestinals. Totes aquestes anomalies alteren la barrera intestinal i faciliten no només el pas de macromolècules cap al fetge com per exemple PAMPs com el LPS o l'àcid desoxiribonucleic (ADN) bacterià, sinó també de bacteris vius (translocació bacteriana patològica) via limfàtica o bé via portal des de la llum intestinal (55,61). La hipertensió portal hi contribueix alterant la barrera vascular intestinal per la congestió dels capil·lars i i venes, i per la presència de shunts portosistèmics. Veure la **figura 5**.

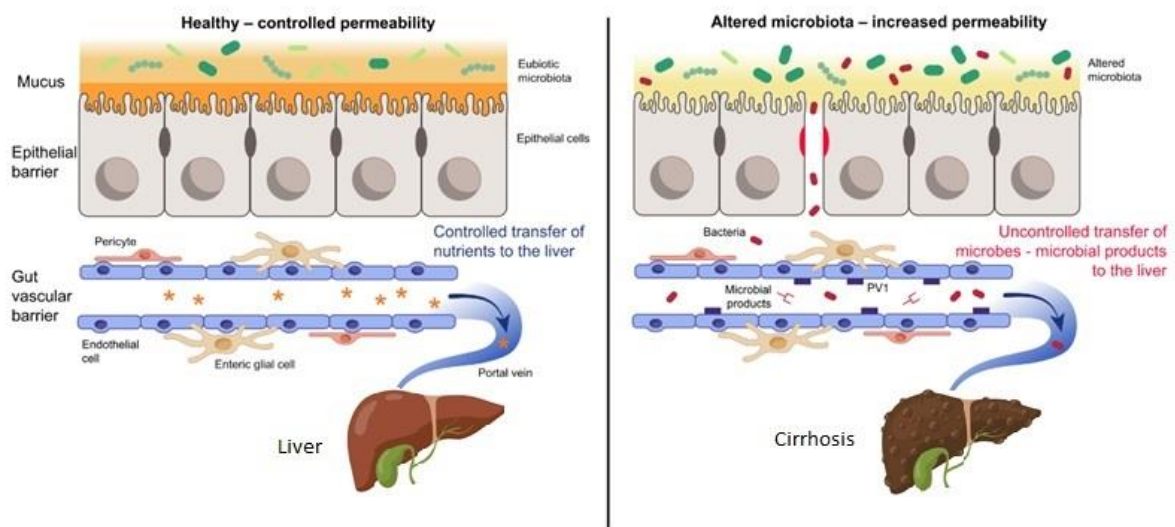


Figura 5. La barrera intestinal en condicions normals i disfuncionant. Adaptada de Albillos A *et al.* J Hepatol (2020)

Finalment, en la cirrosi es redueix la producció d'AGCC, àcids biliars secundaris i metabòlits del triptòfan, que tenen un paper clau en el manteniment de la barrera intestinal i la resposta immunitària local. Això es deu a la insuficiència hepàtica i a la pèrdua de certs bacteris que transformen els àcids biliars. La disminució dels àcids biliars intestinals deteriora la senyalització del receptor farnesoide X, alterant la funció de la barrera intestinal i augmentant la seva permeabilitat i la translocació bacteriana (55).

c) Predisposició genètica

Els factors genètics poden influir en la predisposició a les infeccions en els pacients amb cirrosi. Els receptors de la immunitat innata com els TLR i els NLR, així com les citocines inflammatòries, tenen un paper clau en els mecanismes d'activació immunitària. La seva

expressió i funció es pot veure afectada per la presència de polimorfismes en els seus gens, com els que codifiquen per *nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2* (NOD2), el TLR2 i la proteïna quimiotàctica específica per als monòcits (MCP-1), els quals confereixen major risc de desenvolupar PBE.

Les variants del gen NOD2 són especialment rellevants perquè alteren la immunitat intestinal mitjançant l'expressió desregulada de pèptids antimicrobians i la destrucció intracel·lular reduïda de bacteris, establint així una connexió entre la funció de les cèl·lules de Paneth i la translocació bacteriana patològica en la cirrosi. Al 2010 es descrigué que determinades variants del NOD2 (p.R702W, p.G908R, i c.3020insC) augmenten 3 vegades el risc de desenvolupar una PBE i disminueixen la supervivència en comparació amb els pacients amb cirrosi i ascites portadors dels genotips wild-type (62). També s'ha observat que determinades variants del TLR2 (genotip 16934 TT i portadors de dos tàndems GT d'al·lels repetits) augmenten el risc per presentar una PBE (63). A més, la presència simultània dels polimorfismes desfavorables de TLR2 i NOD2 augmenta 11 vegades el risc de PBE (63). Posteriorment, es va observar que determinades variants de NOD2 i TLR2 es van associar amb marcadors d'alteració de la permeabilitat intestinal i inflamació sistèmica més elevada (64). En pacients amb hepatitis alcohòlica els polimorfismes de MCP-1 també s'han associat a PBE (65). Per altra banda, s'ha descrit que els pacients amb cirrosi i ascites portadors de la variant rs56163822 GT del receptor del farnesoide X, tenen 7 vegades més risc de desenvolupar PBE (66). Finalment, els polimorfismes D299G i T399I del TLR4 s'han associat a la producció d'un patró alterat de citocines en pacients amb cirrosi, si bé no s'ha demostrat que augmentin directament la susceptibilitat a infeccions (67,68).

1.4.2.2 Factors extrínsecs

Factors externs a la cirrosi també poden afavorir la infecció. Entre ells trobem:

- Ús crònic d'IBP: s'associa a supressió d'àcid gàstric, proliferació bacteriana a l'intestí prim, disbiosi intestinal i disminució de la motilitat gastrointestinal. Aquests efectes poden per tant agreujar la translocació de bacteris patògens (69). Múltiples estudis observacionals han descrit l'associació d'aquests fàrmacs

amb un augment d'infeccions bacterianes incloent *Clostridioides difficile* (70), i amb descompensació de la cirrosi (69).

- Malnutrició, fragilitat i sarcopènia: són molt prevalents en els pacients amb cirrosi i impacten en la funció immunitària, resultant en un augment de susceptibilitat a les infeccions (71,72).
- Hospitalitzacions freqüents amb la necessitat d'inserció de vies venoses o arterials i sondes urinàries per controlar la diüresi, i procediments invasius com les paracentesis, les endoscòpies digestives, la col·locació de derivacions portosistèmiques intrahepàtiques transjugulars, entre d'altres, afavoreixen les infeccions relacionades (73).
- Comorbiditats com la diabetis o el consum d'alcohol (38).

A la **figura 6** es resumeixen els diferents components de la patogènesi de les infeccions bacterianes.

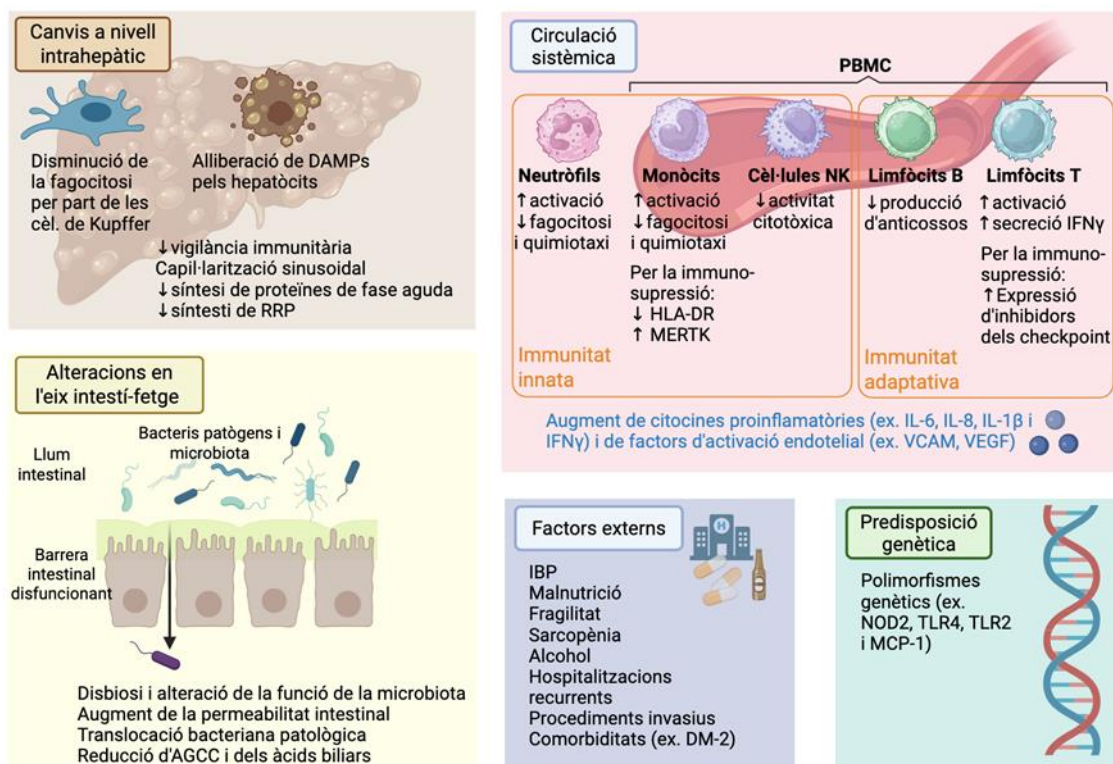


Figura 6. Patogènesi de les infeccions bacterianes en la cirrosi: paper de la disfunció immunitària associada a la cirrosi. Cada requadre representa un dels diferents aspectes implicats: 1) canvis a nivell intrahepàtic, 2) alteracions en l'eix intestí-fetge, 3) circulació

sistèmica, 4) factors externs i 5) predisposició genètica. AGCC: àcids grassos de cadena curta; DAMPs: patrons moleculars associats a dany cel·lular; DM-2: diabetis mellitus de tipus 2; IBP: inhibidors de bomba de protons; MERTK: Receptor tirosina quinasa MER; PMBC: cèl·lules mononuclears de sang perifèrica; PRR: receptors de reconeixement de patrons; Adaptada de Ferguson *et al.* Hepatol Commun. (2024). Creada amb *Biorender.com*.

1.4.3. Estratègies terapèutiques de les infeccions en la cirrosi

El maneig de les infeccions en la cirrosi es basa en tres pilars fonamentals: el tractament antibiòtic de les infeccions actives, la profilaxi per reduir el risc d'infeccions i el control de factors predisposants. A més, s'estan desenvolupant teràpies emergents dirigides a modular la resposta immunitària per millorar el pronòstic d'aquests pacients.

Les guies clíniques actuals recomanen l'ús d'antibiòtics per tractar les infeccions bacterianes, adaptant el tractament empíric segons: el lloc de l'adquisició de la infecció (nosocomial vs. adquirida a la comunitat), els perfils de resistències bacterianes locals i la gravetat de la infecció (74). A més del tractament de les infeccions establertes, els antibiòtics s'utilitzen en la profilaxi d'infeccions en situacions com: l'hemorràgia digestiva (norfloxací o ceftriaxona segons la funció hepàtica) (75) i la prevenció de PBE en pacients amb ascites de risc o antecedents de PBE (norfloxací) (74). La rifaximina està indicada per prevenir l'EH recurrent (74) i també podria contribuir a la prevenció d'infeccions, sola o associada a norfloxací (76). Finalment, l'albumina es recomana per prevenció d'insuficiència renal en la PBE (74) i també s'ha associat a efectes immunomoduladors que poden contribuir a prevenir i tractar les infeccions.

Les estratègies per reduir la incidència d'infeccions en pacients amb cirrosi van més enllà de l'ús d'antibiòtics i inclouen l'estricta compliment de les mesures de control de les infeccions nosocomials (37,77), com el rentat de mans i el correcte seguiment dels protocols d'aïllament per bacteris multiresistents, la reducció de l'ús indiscriminat d'antibiòtics per evitar les multiresistències, evitar les instrumentalitzacions innecessàries (incloent retirar vies i sondes urinàries no imprescindibles), el control de la disbiosi intestinal incloent l'ús de probiòtics i la retirada dels IBP crònics quan sigui possible, l'optimització de l'estat nutricional per millorar la resposta immunitària, i la

vacunació per reduir el risc d'infeccions virals i bacterianes greus com la malaltia causada pel virus SARS-CoV-2 (COVID-19), el pneumococ, l'hepatitis B o la grip.

Atesa la disfunció immunitària que s'associa a la cirrosi, s'estan investigant possibles dianes terapèutiques per modular la resposta immunitària. Això permetria millorar les defenses davant les infeccions, tant per prevenir-les com per millorar-ne el pronòstic un cop establertes. Algunes de les línies d'investigació són: tractaments immunomoduladors (ex. factor estimulador de colònies de granulòcits i agonistes del TLR 7/8) (78), bloqueig de citocines proinflamatòries (ex. bloqueig de TNF- α o del receptor de IL-1) (79) i inhibidors dels checkpoint (ex. antiPD-1 o antiPD-L1) (80). Tot i que aquestes teràpies són prometedores, actualment cap d'aquests tractaments està aprovat per a la seva utilització en infeccions en cirrosi i es requereixen més estudis clínics. A mesura que es compregui millor la fisiopatologia de la resposta immunitària en la cirrosi, es podran implementar tractaments més efectius per reduir la morbiditat i mortalitat associades a les infeccions en aquests pacients.

1.5. *Escherichia coli*

Escherichia coli destaca com el bacteri més freqüentment responsable de les infeccions en els pacient amb cirrosi (41). *E. coli* fou descrit per primer cop el 1885 pel pediatre alemany Theodor Escherich en microbiota fecal neonatal. És un bacil gramnegatiu, no esporulat, anaerobi facultatiu, que mesura 1-2 μm de llarg i que pertany a la família *Enterobacteriaceae* (81). La majoria de les soques són mòbils, depenent de si són o no flagel·lades. Veure la **figura 7** on es descriu l'estructura d'*E. coli*. Forma part de la microbiota intestinal dels animals de sang calenta inclosos els humans, establint-hi una relació de mutualisme ja que *E. coli* sintetitza vitamina K i B12, consumeix l'oxigen que pugui trobar-se a l'intestí i competeix amb potencials microorganismes patògens (81).

Tot i que la majoria de soques d'*E. coli* presents a l'intestí no són perjudicials sinó comensals, algunes han desenvolupat mecanismes patogènics capaços de causar diverses patologies. Les soques d'*E. coli* patògenes es divideixen en dos grups en base a la seva capacitat d'infectar el tracte intestinal -*E. coli* patògena intestinal (IPEC)- o de causar infeccions fora de l'intestí -*E. coli* patògena extraintestinal (ExPEC)-. Entre les IPEC, diferents patotips produeixen síndrome diarreica, com l'*E. coli* enterotoxigènica,

l'*E.coli* enteropatògena, l'*E. coli* enteroinvasiva, l'*E. coli* enterohemorràgica, l'*E. coli* enteroagregativa i l'*E. coli* d'adhesió difusa (81,82). Les ExPEC solen formar part de la microbiota intestinal i des d'allà poden propagar-se per produir infeccions extraintestinals, com infecció urinària, bacterièmia, pneumònia, cel·lulitis, prostatitis, peritonitis, colangitis i meningitis, entre d'altres (83). Els pacients amb cirrosi, pels mecanismes comentats en apartats anteriors, estarien especialment predisposats a les infeccions per les soques ExPEC.

Factors de virulència

Els *E. coli* patògens, a diferència dels no patògens, presenten factors de virulència que permeten colonitzar l'hoste, evadir defenses, obtenir nutrients i causar malaltia. Aquests factors de virulència són molècules específiques, principalment proteïnes, codificades per gens específics situats als cromosomes o en elements genètics mòbils (com els plàsmids i els fags) dels bacteris (84,85). Cada patotip d'*E. coli* té el seu perfil específic de factors de virulència, entre els quals destaquen els relacionats amb la colonització (adherència, formació de biofilms), l'adaptació (càpsula), l'activitat tòxica (toxina Shiga, toxines enteroagregatives), l'evasió del sistema immunitari (modificant el LPS o inhibint vies de senyalització immunitàries), i la captació del ferro (secretant sideròfors per tal de sobreviure a l'hoste) (85,86).

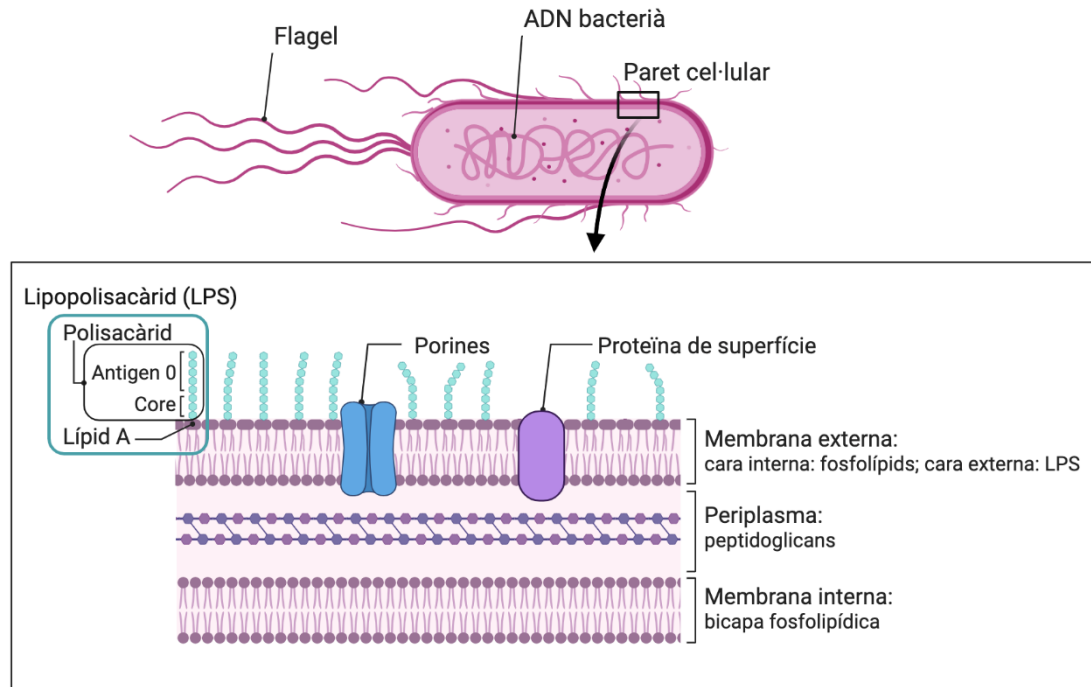


Figura 7. Estructura i PAMPs d'*Escherichia coli*. L'ADN bacterià és reconegut per TLR9, el flagel per TLR5, i el lípid A del lipopolisacàrid per TLR4. Adaptat de Matsuura *et al.* Front Immunol (2013). Creada amb Biorender.com.

1.6. Resistències bacterianes a antibiòtics

La resistència als antibiòtics constitueix una de les principals amenaces a la salut pública a nivell mundial, relacionada amb 4,95 milions de morts al 2019 i directament responsable de 1.27 milions d'aquestes (87). Els bacteris multiresistents són aquells que presenten resistència a almenys un agent de tres o més famílies d'antibiòtics i, per tant, representen un problema pel tractament de les infeccions que produeixen. Els 6 principals bacteris MDR causants de mortalitat a nivell mundial al 2019 foren *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* i *P. aeruginosa* (87) i formen part de la llista de patògens bacterians prioritaris de l'Organització Mundial de la Salut (OMS) de 2024 (88).

En els darrers anys, les infeccions per MDRO han augmentat especialment en poblacions vulnerables, com els pacients amb cirrosi, en els que ja representen un 30-50% de les infeccions bacterianes, amb resistències notables a β -lactàmics, carbapenems, meticil·lina i vancomicina (38). Els factors que contribueixen a aquesta resistència

inclouen l'exposició creixent als sistemes de salut (ingressos recurrents i procediments invasius), l'ús indiscriminat d'antibiòtics i la manca d'estratègies efectives de prevenció. Això té greus conseqüències, com una major mortalitat (un de cada cinc pacients amb cirrosi i infecció bacteriana mor a l'hospital, amb un risc augmentat del 50% en infeccions per MDRO), major incidència de shock sèptic i ACLF, major necessitat de trasllat a les Unitats de cures intensives (UCI), major estada hospitalària, més complicacions en pacients en llista d'espera per trasplantament hepàtic i costos sanitaris elevats (38,41,48,73).

Aquest pitjor pronòstic de les infeccions per MDRO en comparació amb les causades per bacteris sensibles als antibiòtics s'explicaria per diversos motius. El motiu principal és el retard en el tractament antibiòtic adequat. Aquest retard és crític, ja que l'eficàcia microbiològica del tractament empíric ha demostrat ser un dels principals predictors independents de mortalitat, tant intrahospitalària com a 28 dies (48,73). L'eficàcia microbiològica del tractament és un factor potencialment modificable, que posa de manifest la importància de disposar d'eines de diagnòstic ràpid i protocols adaptats a l'epidemiologia local per optimitzar el tractament empíric en pacients amb risc d'infecció per MDR. A part del tractament antibiòtic inadequat, factors del mateix hoste com les alteracions en la microbiota, el grau de fragilitat i les comorbiditats també podrien tenir-hi un paper. Finalment, altres motius que explicarien el pitjor pronòstic podrien estar relacionats amb una resposta immunitària diferent: per hiperinflamació (alguns estudis observaren major resposta inflamatòria en bacterièmia per MDRO a expenses de TNF- α (89)), esgotament immunitari (pacients amb sepsis evolucionada per bacteris MDR podrien presentar signes d'immunoparàlisi (90)) i evasió de la immunitat innata (alguns bacteris MDR podrien presentar factors de virulència que permetrien esquivar-la (91)). Per tant, el pitjor pronòstic en infeccions per MDRO podria dependre tant de la capacitat de l'hoste per modular una resposta immunitària efectiva com de que alguns MDRO poguessin provocar per si mateixos una resposta diferent que les soques sensibles, si bé no hi ha una evidència clara en aquest aspecte i les dades dels estudis *in vitro* son contradictòries pel que fa a *E. coli* (92,93). En altres bacteris, com *P. aeruginosa* i *S. aureus*, s'ha avaluat la resposta immunitària en models *in vitro*

d'infeccions oculars observant major resposta inflammatòria en els bacteris MDR respecte els sensibles a antibiòtics (94,95).

Mecanismes de resistència

En els darrers anys s'ha avançat molt en la comprensió dels mecanismes de resistència a antibiòtics, que poden ser intrínsecs, adaptatius i adquirits. Aquests mecanismes permeten als bacteris sobreviure a l'acció d'antibiòtics que, en condicions normals, haurien de ser efectius.

La resistència intrínseca fa referència a les propietats naturals dels bacteris que permeten la seva supervivència, com l'ús de bombes d'eflux (que expulsen els antibiòtics fora de la cèl·lula bacteriana), una permeabilitat reduïda (per exemple per la membrana externa dels bacteris gramnegatius), enzims codificats cromosòmicament (com les β -lactamases) i modificacions de les dianes dels antibiòtics (91).

Els mecanismes adaptatius inclouen també bombes d'eflux, reducció del nombre de porines (disminuint per tant la possibilitat de l'entrada passiva dels antibiòtics dins del bacteri), canvis epigenètics (que contribueixen a augmentar les bombes d'eflux, a reduir la permeabilitat de membrana i a inhibir les dianes d'unió als antibiòtics), cèl·lules persistents i formació de biofilms bacterians (91). Les cèl·lules persistents són un subtipus de bacteris que poden sobreviure als antibiòtics sense tenir cap mutació genètica de resistència (96). Els biofilms bacterians són comunitats de bacteris adherits a superfícies i envoltats per una matriu autogenerada de substàncies polimèriques, que actua com una barrera protectora davant dels antibiòtics i del sistema immunitari. Tot i que alguns antibiòtics poden penetrar el biofilm, la presència de cèl·lules persistents en el seu interior en dificulta un efecte bactericida eficaç (96).

Per últim, els mecanismes adquirits inclouen la transferència genètica horitzontal i mutacions genètiques. Aquests poden modificar la membrana externa dels gramnegatius (afectant per exemple les porines o els LPS i per tant disminuint la penetració d'antibiòtics) i les bombes d'eflux, poden també afavorir la producció d'enzims que modifiquin o destrueixin antibiòtics (com les β -lactamases) i modificar les dianes dels antibiòtics, evitant-ne la unió o facilitant vies alternatives (91).

1.7. Resposta inflammatòria a les infeccions

La resposta inflammatòria a les infeccions és un mecanisme essencial de defensa de l'organisme davant d'agents patògens. A la població general, la detecció de patògens mitjançant els receptors cel·lulars com TLR activa el sistema immunitari innat (macròfags, neutròfils, cèl·lules dendrítiques), que alliberen citocines proinflamatòries com TNF- α , IL-6 i IL-1 β entre d'altres. Aquestes molècules promouen la vasodilatació, el reclutament cel·lular i l'activació de l'endoteli, amb l'objectiu de controlar i eliminar la infecció.

E. coli, com ja s'ha comentat, és el bacteri més freqüentment responsable d'infeccions en la cirrosi, sovint per soques MDR. Per tant, és interessant considerar els mecanismes pels que aquest bacteri interactua amb l'hoste desencadenant la resposta immunitària. Diversos components d'*E. coli* actuen com a PAMPs activant diferents vies de senyalització (veure la **figura 7**). Els components de la superfície d'*E. coli* juguen un paper fonamental en aquest procés. El LPS, principal immunoestimulant de la paret cel·lular dels bacteris gramnegatius, s'uneix al complex TLR4/MD2 a través del seu component lipídic, el lípid A, i activa la resposta immunitària innata (97). D'altra banda, els bacteris poden alliberar ADN mitjançant lisi bacteriana o bé a través de vesícules de membrana externa (98). Aquest ADN bacterià, en particular l'ADN que conté dinucleòtids CpG no metilats, pot actuar com a PAMP i activar receptors com els TLR9 (99). Aquesta activació, desencadena la resposta immunitària innata a través de les vies de senyalització MyD88 i NF- κ B afavorint la producció de citocines proinflamatòries i altres mediadors com interferó (IFN), IL-6 i IgM (97,98). De fet, en els pacients amb cirrosi, la presència d'ADN bacterià circulat s'associa a un estat proinflamatori (100) i a pitjor pronòstic (101).

Els pacients amb cirrosi hepàtica presenten una resposta alterada a les infeccions com a part de la CAID, ja explicada prèviament, amb importants conseqüències clíniques (55,102). En alguns casos, la resposta immunitària és hiporeactiva, fet que impedeix una eliminació eficaç del patogen. En altres, es produeix una hiperactivació sistèmica, amb un alliberament massiu i excessiu de citocines que condueix a una SIRS i, eventualment, a disfunció multiorgànica (52,103). A més, en contextos d'infeccions greus, es produeix un augment dels DAMPs, que també poden activar el sistema immunitari de forma no

específica i amplificar la inflamació, tot contribuint a la progressió cap a ACLF. De fet, l'ACLF s'associa a una intensa inflamació sistèmica, que es correlaciona amb un pronòstic desfavorable (52,103).

Aquest desequilibri en la resposta inflamatòria té un impacte pronòstic important, ja que els pacients amb respostes exacerbades o ineficaces presenten una mortalitat més elevada (103). Per aquest motiu, és interessant l'estudi de la resposta inflamatòria en diferents situacions per tal d'estratificar el risc i individualitzar el tractament de pacients amb cirrosi i infecció. Concretament en el cas de les infeccions per MDRO, conèixer si aquests, especialment els *E. coli* MDR, provoquen una resposta inflamatòria diferent respecte les soques sensibles pot ser útil en aquesta estratificació i contribuir a dissenyar potencials noves estratègies de tractament més personalitzades.

1.8. La pandèmia COVID-19

Al desembre de 2019 es va detectar el primer cas d'una nova malaltia respiratòria causada pel coronavirus SARS-CoV-2 a Wuhan, Xina (104). Aquesta malaltia, altament contagiosa i amb una elevada mortalitat, es va estendre ràpidament a escala global. El 30 de gener de 2020, l'OMS va declarar l'emergència de salut pública d'abast internacional, i l'11 de març de 2020 la va qualificar com a pandèmia mundial (105).

A Espanya, el Govern va decretar l'estat d'alarma el 14 de març de 2020 per fer front a la situació d'emergència sanitària provocada per la COVID-19 (106). Aquesta mesura es va mantenir fins al 21 de juny de 2020, moment en què es va iniciar l'anomenada "nova normalitat", amb l'adopció de mesures de prevenció i contenció per controlar la pandèmia. Posteriorment, davant l'empitjorament de la situació epidemiològica, es va declarar un segon estat d'alarma el 25 d'octubre de 2020, amb mesures menys estrictes que el primer, que es va estendre fins al 9 de maig de 2021. No va ser fins el 5 de juliol de 2023 que es va declarar oficialment la fi de la crisi sanitària derivada de la COVID-19, després d'haver causat la mort de quasi 7 milions de persones a tot el món (107), més de 120,000 a tot Espanya i més de 20,000 a Catalunya (108).

Durant la pandèmia, es van implementar diverses mesures per reduir la transmissió del SARS-CoV-2, com el confinament domiciliari, l'ús obligatori de mascaretes, la higiene

freqüent de mans i la distància física i social. Aquestes accions van tenir un impacte més enllà de la COVID-19, afectant també el patró de transmissió d'altres infeccions comunes, tant comunitàries com nosocomials.

A nivell comunitari, durant els primers mesos de la pandèmia, es va observar una disminució significativa d'infeccions respiratòries i digestives, com la grip, els refredats comuns, la tos ferina i les gastroenteritis víriques (109,110). Aquest fenomen s'atribueix al mínim contacte social, el tancament d'escoles i espais públics, i la millora de la higiene individual (110).

En canvi, en l'àmbit hospitalari, els efectes foren més complexos. Si bé l'ajornament de l'activitat no urgent i la millora de les mesures d'higiene (rentat de mans, ús de bates i mascaretes) van poder contribuir inicialment a reduir certes infeccions nosocomials, altres factors com el col·lapse hospitalari, la sobrecàrrega assistencial i les dificultats per aplicar els protocols habituals de prevenció van afavorir un augment d'aquestes infeccions. A més, durant la pandèmia es va generalitzar l'ús d'antibiòtics en pacients amb COVID-19 sospitosos de presentar coinfeccions bacterianes (111), fet que probablement va contribuir a un increment en la selecció i disseminació de MDRO.

En relació amb l'impacte de la pandèmia COVID-19 en els pacients amb cirrosi — una població especialment vulnerable a les infeccions — es va observar que la mortalitat quan s'infectaven pel SARS-CoV-2 era més alta que en la població general, especialment en els pacients amb malaltia hepàtica més avançada i en aquells amb cirrosi relacionada amb l'alcohol, sent a més causa freqüent de ACLF (112). Pel que fa a l'impacte de les condicions sanitàries i les mesures adoptades durant la pandèmia sobre les infeccions no COVID-19 en pacients amb cirrosi, Park *et al.* van observar una reducció de les infeccions nosocomials en les hospitalitzacions a les UCI (113). Tanmateix, el perfil de les infeccions nosocomials pot ser molt diferent entre centres trasplantadors i no trasplantadors (114), i entre les UCI i les sales d'hospitalització convencional i no disposem de dades específiques sobre els efectes de la pandèmia COVID-19 en les infeccions bacterianes que van afectar els pacients amb cirrosi hospitalitzats a les unitats d'hepatology convencionals, fora de les unitats de crítics. Aquesta anàlisi podria contribuir a aprofundir en el coneixement de les infeccions a la cirrosi, especialment de

les causades per MDRO, els factors predisposants i, en definitiva, com prevenir-les per tal de millorar el pronòstic d'aquestes complicacions tan freqüents i greus.

JUSTIFICACIÓ I HIPÒTESIS

2. JUSTIFICACIÓ I HIPÒTESIS

Els pacients amb cirrosi es troben particularment predisposats a les infeccions bacterianes a causa de la disfunció immunitària, la translocació bacteriana patològica i l'exposició a procediments invasius, entre d'altres factors. Les infeccions són el principal desencadenant de les complicacions de la cirrosi i l'ACLF, i comporten una alta mortalitat a curt termini. A més, aquests pacients estan freqüentment exposats a ambients sanitaris i a antibiòtics, factors que afavoreixen les infeccions causades per MDRO. Les infeccions per MDRO representen una amenaça creixent per a la salut pública a nivell mundial i molt especialment pels pacients amb cirrosi.

Amb l'arribada de la pandèmia per COVID-19, es van implementar canvis substancials en l'organització sanitària, l'ús d'equips de protecció individual i reforç de la higiene de mans, entre d'altres. Aquestes mesures podrien haver influït tant en la incidència com en el tipus d'infeccions adquirides pels pacients amb cirrosi hospitalitzats per descompensació. Alhora, la relaxació d'alguns protocols de prevenció de les infeccions nosocomials per la sobrecàrrega assistencial i l'ús més extensiu i, en ocasions, empíric d'antibiòtics durant la pandèmia pot haver contribuït a un augment de les resistències antimicrobianes. En aquest sentit, és important avaluar si la pandèmia ha tingut un impacte mesurable en la incidència i característiques de les infeccions amb especial èmfasi en els MDRO, en aquest grup especialment vulnerable, per tal d'orientar millor les estratègies de prevenció, diagnòstic i tractament antibiòtic en el futur.

En paral·lel, diversos estudis han demostrat que les infeccions per soques multiresistents en pacients amb cirrosi s'associen a un pitjor pronòstic. Si bé aquest fet s'atribueix principalment al retard en l'inici del tractament antibiòtic adequat, no està clar si altres factors, com ara una resposta inflamatòria diferent davant les soques multiresistents a antibiòtics (MDR), també hi contribueixen. A més, estudis previs sobre la resposta immunitària *in vitro* davant bacteris MDR en altres poblacions han estat escasses i contradictòries. Identificar trets diferencials de resposta immunitària en bacteris MDR respecte a les soques sensibles a antibiòtics podria tenir importants implicacions terapèutiques tant en el maneig actual dels pacients com en el futur disseny de noves estratègies per abordar les infeccions per MDRO.

Hipòtesis

En base a l'exposat a la introducció i la justificació de la present tesi doctoral, les hipòtesis de treball van ser:

- Durant la pandèmia per COVID-19 el patró d'infeccions en pacients amb cirrosi hospitalitzats per descompensació aguda es pot haver vist modificat, disminuint o augmentant la incidència d'infeccions per bacteris multiresistents i la incidència d'infeccions nosocomials, amb un impacte sobre la gravetat clínica i la mortalitat a curt termini.
- La resposta immunitària *in vitro* de cèl·lules mononuclears induïda per soques d'*E. coli* multiresistents obtingudes de pacients amb cirrosi podria ser diferent de la que provoquen les soques sensibles als antibiòtics.

OBJECTIUS

3. OBJECTIUS

Aquesta tesi doctoral comprèn dos treballs amb els següents objectius:

Objectiu principal:

Aprofundir en el coneixement de les infeccions, particularment per bacteris MDR, en els pacients amb cirrosi hepàtica hospitalitzats, avaluant l'impacte de la pandèmia per COVID-19 en la incidència, tipus i lloc d'adquisició, alhora que determinar si la resposta immunitària *in vitro* davant d'*E. coli* multiresistents és diferent de la resposta davant d'*E. coli* sensibles a antibiòtics.

Objectius secundaris:

1. Comparar la incidència d'infeccions per bacteris multiresistents abans i durant la pandèmia per COVID-19.
2. Analitzar les complicacions associades a les infeccions en ambdós períodes.
3. Determinar si la producció *in vitro* de citocines per part de les cèl·lules mononuclears de donants sans és diferent en resposta als extractes de proteïna de superfície i d'ADN d'*E. coli* multiresistents i d'*E. coli* sensibles obtinguts de pacients amb cirrosi.
4. Avaluat la variabilitat interindividual en la producció *in vitro* de citocines davant d'*E. coli* i si el lloc d'origen de l'*E. coli* patògen (ascites vs. sang) determina una resposta immunitària *in vitro* diferent.

COMPENDI DE PUBLICACIONS

4. COMPENDI DE PUBLICACIONS

La present tesi doctoral inclou dos articles originals publicats en revistes científiques indexades:

Publicació 1. *Cuyàs B, Huerta A, Poca M, Alvarado-Tapias E, Brujats A, Román E, Guarner C, Escorsell À, Soriano G. Impact of the COVID-19 pandemic on the incidence and type of infections in hospitalized patients with cirrhosis: a retrospective study. Sci Rep. 2024 Feb 1;14(1):2718. doi: 10.1038/s41598-024-52452-2.*

IF (JCR 2024): 3,9

Quartil (categoria "Multidisciplinary Sciences"): Q1

Publicació 2. *Cuyàs B, Cantó E, Sanchez-Ardid E, Miró E, Alvarado-Tapias E, Román E, Poca M, Navarro F, Ferrero-Gregori A, Escorsell MÀ, Vidal S, Soriano G. In vitro Immune Response of Mononuclear Cells to Multidrug-Resistant Escherichia coli. Microorganisms. 2025; 13(5):1164. doi: 10.3390/microorganisms13051164*

IF (JCR 2024): 4,2

Quartil (categoria "Microbiology"): Q2

4.1. Publicació 1.

Cuyàs B, Huerta A, Poca M, Alvarado-Tapias E, Brujats A, Román E, Guarner C, Escorsell À, Soriano G. *Impact of the COVID-19 pandemic on the incidence and type of infections in hospitalized patients with cirrhosis: a retrospective study. Sci Rep. 2024 Feb 1;14(1):2718. doi: 10.1038/s41598-024-52452-2.*



OPEN Impact of the COVID-19 pandemic on the incidence and type of infections in hospitalized patients with cirrhosis: a retrospective study

Berta Cuyàs^{1,2✉}, Anna Huerta¹, Maria Poca^{1,2,3}, Edilmar Alvarado-Tapias^{1,2,3}, Anna Brujats^{1,2}, Eva Román^{1,3,4}, Carlos Guarner^{1,2,3}, Àngels Escorsell^{1,2,3} & German Soriano^{1,2,3}

Infections are a major cause of morbidity and mortality in cirrhosis, especially those caused by multi-drug resistant bacteria. During the COVID-19 pandemic, the incidence and type of infection in these patients may have been influenced by the restrictive measures implemented. We aimed to compare the infections in patients with cirrhosis hospitalized before the COVID-19 pandemic versus those hospitalized during the pandemic. We retrospectively compared infections in patients with cirrhosis hospitalized in the hepatology unit during the pre-pandemic period (3/2019–2/2020) with infections in patients hospitalized during the pandemic (3/2020–2/2021). Baseline characteristics, type of infections, type of bacteria, antimicrobial resistance and mortality were evaluated. There were 251 hospitalizations in 170 patients during the pre-pandemic period and 169 hospitalizations in 114 patients during the pandemic period. One or more infections were identified in 40.6% of hospitalizations during the pre-pandemic period and 43.8% of hospitalizations during the pandemic, $P = 0.52$. We found 131 infections in the pre-pandemic period and 75 infections during the pandemic. The percentage of nosocomial infections decreased in the pandemic period (25.3% vs. 37.4% in the pre-pandemic period, $P = 0.06$). We found a non-significant trend to a higher incidence of infections by multi-drug resistant organisms (MDRO) in the pandemic period than in the pre-pandemic period (6.5% vs. 4%). The incidence of infections was similar in both periods. However, during the pandemic, we observed a trend to a lower incidence of nosocomial infections with a higher incidence of MDRO infections.

Abbreviations

ACLF	Acute-on-chronic liver failure
MDRO	Multi-drug resistant organisms
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
MELD	Model of end-stage liver disease
HCA	Healthcare-associated
GI	Gastrointestinal
HE	Hepatic encephalopathy
AKI	Acute kidney injury
SBP	Spontaneous bacterial peritonitis

Due to the widespread use of antibiotics in recent years, antimicrobial resistance has become a major public health threat to populations all over the world. Patients with cirrhosis are particularly predisposed to bacterial

¹Department of Gastroenterology, Hospital Santa Creu i Sant Pau, Institut de Recerca Sant Pau, Barcelona, Spain. ²Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. ³Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. ⁴Escola Universitària d'Infermeria EUI-Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. ✉email: bcuyas@santpau.cat

infections because of alterations in the immune system and invasive procedures. Such infections are a major cause of complications, acute-on-chronic liver failure (ACLF), and high short-term mortality^{1–4}.

Patients with cirrhosis are highly susceptible to infections driven by multi-drug resistant organisms (MDRO) as they pose multiple risk factors for developing antibiotic resistance, such as repeated health care-exposure and need for frequent treatment with antibiotics and invasive procedures. Infections by MDRO have become a major challenge in the management of patients with cirrhosis as they are associated with poor outcomes^{5–7}.

In late 2019, the outbreak of coronavirus disease 2019 (COVID-19), caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), rapidly developed into a global health emergency. In order to control COVID-19, major changes -including reorganization of healthcare, physical distancing, use of personal protective equipment, emphasized hand hygiene, restricted mobility and telemedicine- were implemented worldwide. Some of these measures could have influenced the type and incidence of bacterial infections, especially those caused by MDRO⁸. Although a decrease in MDRO infections could be expected, reports addressing this issue show contradictory results^{9–11}.

The aim of this study was to assess the impact of the COVID-19 pandemic on the type of infections, the incidence of nosocomial infections, and the incidence of MDRO in hospitalized patients with cirrhosis during the pandemic.

Methods

Patients

We conducted a retrospective medical record review to study the infections occurring in patients ≥ 18 years old who were hospitalized for acute decompensation of cirrhosis in the hepatology department at a tertiary academic hospital between 11th March 2020 and 10th March 2021 (pandemic group). We compared these infections with those occurring in similar patients admitted to the centre in the previous year, from 11th March 2019 to 10th March 2020 (pre-pandemic group). Patients were excluded from the study if they: (1) had been electively admitted for a given procedure, (2) were liver transplant recipients, or (3) were positive for SARS-CoV-2 PCR at admission (as they were hospitalized in the specific COVID-19 hospitalization areas). Because infections were the target of the study, the analysis was based on episodes of infection, not on the admissions.

We recorded relevant baseline, demographic, clinical and analytical data.

Diagnosis of cirrhosis was established by histology or by clinical, analytical, and ultrasonographic findings. Acute decompensation of cirrhosis was defined as development of ascites, gastrointestinal (GI) bleeding, hepatic encephalopathy (HE), or bacterial infection according to previously defined criteria¹². We also included those admissions due to jaundice in the context of alcoholic hepatitis, and acute kidney injury (AKI). The severity of liver disease was assessed using the Child–Pugh score and the model for end-stage liver disease (MELD) score.

Assessment of infections

Episodes of infection were systematically searched and identified by reviewing all the electronic medical records of the admissions. Two data abstractors were trained to fill the data abstraction form once the study variables were defined.

Bacterial, viral and fungal infections were diagnosed according to conventional criteria. Spontaneous bacterial peritonitis and spontaneous bacteremia were defined according to EASL and AASLD guidelines, while for the rest of infections the CDC/NHSN surveillance definitions and criteria were used^{13–16}. Infections were classified as community-acquired, healthcare-associated (HCA), and nosocomial infections. Infections diagnosed at admission or within 48 h of hospitalization were classified as community-acquired, except for those in patients with a previous contact with a healthcare environment (hospitalization or short-term admission for at least 2 days in the previous 90 days, residence in a nursing home or a long-term care facility, or chronic haemodialysis) which were considered HCA infections. Infections developed after the first 48 h of hospitalization were considered nosocomial⁵.

Microbiological cultures and antibiotic susceptibility tests were performed according to standard international criteria. MDR bacteria were defined as non-susceptibility to at least 1 agent in at least 3 antimicrobial categories^{14,17}.

Follow-up and complications

Antibiotic treatment was implemented according to international guidelines and local policies¹⁴. Patients were followed throughout the hospitalization. During hospitalization we collected data concerning the development of ACLF (defined according to the EASL-CLIF Consortium criteria¹⁸), septic shock, the need for mechanical ventilation, and mortality.

Statistical analysis

We compared categorical data using the chi-square test and Fisher's exact test. Continuous variables were compared using the Student *t* test if a normal distribution could be assumed, and the Mann–Whitney U test if not. We assessed normality of the continuous variables using the Kolmogorov–Smirnov test. All *P*-values were two-tailed and were considered significant at *P* < 0.05. Calculations were performed using SPSS 25.0 (SPSS, Chicago, IL) statistical package.

Ethical approval

The present study, as an observational and retrospective study, was approved by the local clinical research ethics committee (Comitè d'Ètica d'Investigació amb Medicaments-CEIm) and was conducted according to the principles of the 1975 Declaration of Helsinki. Waiver of obtaining informed consent from the included patients

was provided by Comitè d'Ètica d'Investigació amb Medicaments-CEIm due to the retrospective nature of the study, in a pandemic situation. Moreover, a high number of patients died before the study was performed and patients' data were anonymised.

RESULTS

Patients, admissions and infections

During the pre-pandemic period, 170 patients were admitted for a total of 251 hospitalizations due to acute decompensation, and 114 patients for 169 hospitalizations during the pandemic period (Fig. 1). The admission rate was lower in the pandemic group [23.3 (6) vs. 15.8 (4.5) admissions per month, $P=0.002$].

One or more infections were present at admission and/or developed during hospitalization in 102/251 hospitalizations (40.6%) during the pre-pandemic period and 74/169 hospitalizations (43.8%) during the pandemic period ($P=0.52$). The main causes for admission in hospitalizations with one or more infections were (multiple causes of admission were identified in some cases): ascites (63.7% in the pre-pandemic period and 63.5% in the pandemic), HE (26.5% and 32.4%), portal hypertension related GI bleeding (3.9% and 6.8%), and infection (40.2% and 50%) (P NS). Other causes of admission were AKI (28.4% and 20.3%), jaundice (2% and 2.7%) and non-portal hypertension related GI bleeding (3.9% and 1.6%) (P NS).

Regarding the number of infections per admission, in the pre-pandemic group we detected one infection per admission in 78 admissions, two infections per admission in 21, and three or more infections in 3. In the pandemic group, we detected one infection per admission in 61 admissions, two infections per admission in 8, and three or more infections in 5. In the admissions with multiple infections, at least one infection was diagnosed at admission in 16/24 admissions during the pre-pandemic period and in 10/13 admissions during the pandemic.

Overall, we identified a total of 131 episodes of infection in 102 admissions in the pre-pandemic group and 95 episodes of infection in 74 admissions in the pandemic group. These infections were the target of the present study.

Characteristics of infected patients

Demographic and clinical characteristics of infected patients are summarized in Table 1. The mean age was similar in both groups and most patients were men although there was a significant increase in the percentage of women during the pandemic. There were no differences between groups regarding antibiotic prophylaxis or use of non-selective beta-blockers or proton-pump inhibitors. The most common etiology of cirrhosis was alcohol in both periods although there was a statistically significant increase in this etiology during the pandemic.

Prior to admission, pandemic patients had more impaired liver function according to MELD [12 (5) vs. 9 (3.7), $P<0.001$] but Child–Pugh score was similar. At diagnosis of the infection, we found no differences in MELD [17 (5.4) in the pandemic group vs. 17 (6.5), $P=0.55$] or in the Child–Pugh score [9 (2) vs. 9 (2), $P=0.29$].

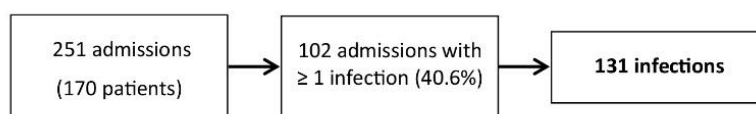
Type of infections

The main characteristics of infections are shown in Fig. 2a. The most common infections were spontaneous bacterial peritonitis (SBP), urinary tract infection, and pneumonia. During the pandemic period we observed a non-significant reduction in SBP and pneumonia (14.7% vs. 22.9% and 16.8% vs. 22.1% of all infections, respectively) and a non-significant increase in urinary tract infections (33.7% vs. 22.1%). We detected a non-significant decrease in *Clostridioides difficile* infections during the pandemic period (9.2% vs. 3.8%).

Site of acquisition

In the pandemic group, the percentage of community-acquired infections increased (48.4% vs. 35.1% in the pre-pandemic period, $P=0.04$) and the percentage of nosocomial infections decreased (25.3% vs. 37.4%, $P=0.06$) (Fig. 2b). Considering all admissions, the incidence of nosocomial infections was lower during the pandemic but did not reach statistical significance [18/169 admissions (10.7%) vs. 35/251 admissions (13.9%), $P=0.32$].

Pre-pandemic period:



Pandemic period:

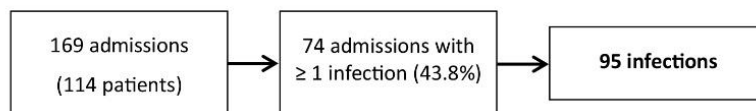


Figure 1. Flow chart of the study.

	Pre-pandemic n = 131	Pandemic n = 95	P value
Age (y)	64 ± 14	66 ± 10	0.52
Gender M/F	88 (67.2%)/43 (32.8%)	50 (52.6%)/45 (47.4%)	0.03
Etiology, n (%)			
Alcohol	58 (44.3%)	57 (60%)	0.01
Virus	20 (15.3%)	8 (8.4%)	0.18
Alcohol + virus	19 (14.5%)	14 (14.8%)	0.88
MAFLD	19 (14.5%)	8 (8.4%)	0.23
Others	15 (11.5%)	8 (8.4%)	0.60
Type 2 diabetes	56 (42.7%)	40 (42.1%)	0.92
Antibiotic prophylaxis	39 (29.8%)	19 (20%)	0.10
Beta-blockers prophylaxis	10 (53.4%)	45 (47.4%)	0.37
PPI treatment	72 (55%)	57 (60%)	0.45
Hepatocellular carcinoma	34 (26%)	16 (16.8%)	0.10
Child–Pugh pre-admission	7 ± 2	7 ± 2	0.65
MELD pre-admission	9 ± 4	12 ± 5	< 0.001
Child–Pugh at infection	9 ± 2	9 ± 2	0.30
MELD at infection	17 ± 7	17 ± 5	0.55
Sodium (mmol/L)	134 ± 6.1	136 ± 6.1	0.03
Creatinine (μmol/L)	120 ± 73.9	121 ± 95.2	0.28
Bilirubin (μmol/L)	74 ± 116	58 ± 55	0.93
Albumin (g/L)	27.7 ± 5.8	28.2 ± 5.5	0.42
INR	1.50 ± 0.5	1.6 ± 0.5	0.90
C-reactive protein (mg/L)	62.2 ± 53.4	54.4 ± 59.1	0.06
WBC (× 10 ⁹ /L)	9.67 ± 6.4	7.23 ± 4.2	0.01

Table 1. Clinical and analytical baseline characteristics of 131 infections in 102 admissions during the pre-pandemic period and 95 infections in 74 admissions during the pandemic period. Results are expressed as mean ± standard deviation or n (percentage). *MAFLD*: metabolic associated fatty liver disease; *PPI*: proton pump inhibitors; *MELD*: model for end-stage liver disease; *WBC*: white blood cells. Statistically significant values are in bold.

Microbiological cultures and MDRO

A positive microbiological culture was found in 71/131 infections (54.2%) in the pre-pandemic group and in 59/95 infections (62.1%) in the pandemic group ($P = 0.23$). The types of microorganisms are detailed in Supplementary Table 1. Gram-negative bacteria were the most commonly isolated bacteria in both groups (45.1% in the pre-pandemic group vs. 50.9% in the pandemic group). Gram-positive bacteria, anaerobic bacteria, and mixed cultures were also frequent in both periods (28.2% vs. 20.4%, 11.3% vs. 6.8%, and 11.3% vs. 10.1%, respectively) followed by viral and fungal infections (2.8% vs. 6.8% and 1.4% vs. 5.1%, respectively) without statistical differences. Only 3 patients in the pandemic group had SARS-CoV-2 acquired during hospitalization.

We found a non-significantly higher percentage of MDRO among the total infections in the pandemic period than in the pre-pandemic period [11/95 (11.5%) vs. 10/131 (7.6%), $P = 0.31$]. The types of MDRO-related infections are shown in Table 2. During the pandemic we observed an increase in MDRO-related infections among the nosocomial infections (Fig. 3). Considering all admissions, we found a trend to a higher incidence of MDRO-related infections during the pandemic (11/169 admissions, 6.5%) than in the pre-pandemic period (10/251 admissions, 4%), $P = 0.25$.

Complications during admission

There were no statistical differences between the two groups regarding the incidence of ACLF (15.3% during the pre-pandemic period vs. 12.6% during the pandemic period, $P = 0.57$), septic shock (13.7% vs. 9.5%, $P = 0.33$), need for mechanical ventilation related to the infection (2.3% vs. 5.3%, $P = 0.28$) and 30-day mortality (16% vs. 11.6%, $P = 0.34$).

Discussion

To our knowledge, this is the first comprehensive study analyzing the impact of the COVID-19 pandemic on the incidence and type of infections in patients with cirrhosis hospitalized in a non-intensive care unit setting. The main finding of this study was the similar incidence of infections in both periods (pre-pandemic vs pandemic) although we found a trend to a lower incidence of nosocomial infections and to a higher incidence of MDRO infections during the pandemic.

During the COVID-19 pandemic, strict measures were implemented to prevent the spread of SARS-CoV-2. These measures, such as greater awareness of hand hygiene, are also recommended to prevent infections in

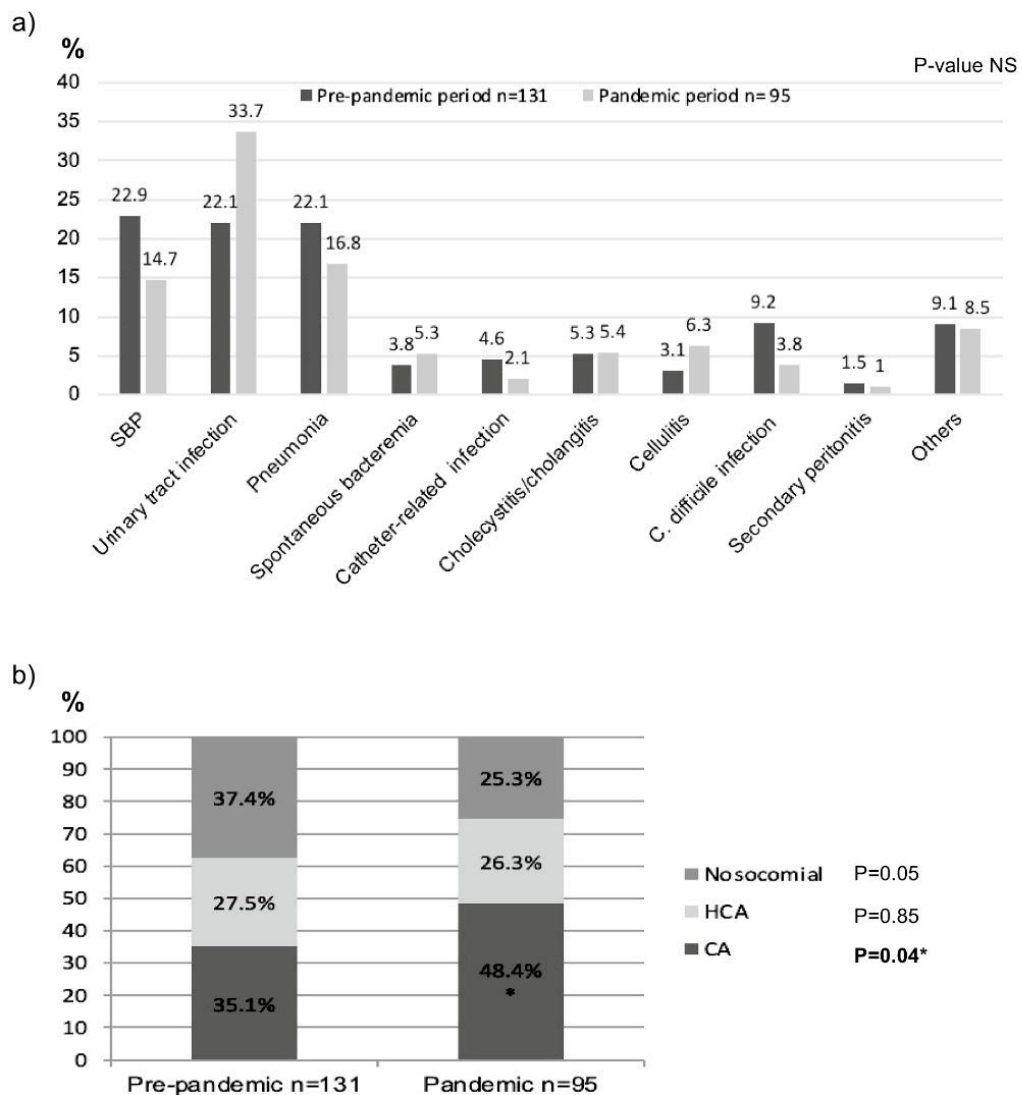


Figure 2. (a) Type of infections. (b) Site of acquisition of infections. SBP: spontaneous bacterial peritonitis; NS: not significant; HCA: healthcare-associated; CA: community-acquired.

general and MDRO infections specifically¹⁹. We could therefore have expected a decrease in the incidence of all types of non-COVID-19 infections during the pandemic, as has been reported in the general population in outpatient medical care in Germany²⁰ and in hospitalizations in the US²¹.

In the present study in hospitalized patients with cirrhosis, the incidence of all infections was similar in the pandemic to that in the pre-pandemic period, but there was a trend to a decreased incidence of nosocomial infections during the pandemic. This finding is in agreement with a report from the US that evaluated nosocomial infections in cirrhotic patients admitted to the intensive care unit²², as well as a report from China that evaluated nosocomial infections in a neurosurgery unit²³, and could be attributed to the measures implemented in hospitals to fight the pandemic. However, during the first and second year of the COVID-19 pandemic, the National Healthcare Safety Network in the US described an increase in HCA infections and a high incidence in device-related infections (bloodstream, urinary tract and ventilator-associated infections)^{24,25}. One possible explanation for these findings is that, in parallel to practices intended to prevent and control the spread of SARS-CoV-2, usual medical care was compromised due to the overall pressure on health systems: higher patient volumes and severity as well as shortages of staff and supplies. Focusing resources on SARS-CoV-2 may have

	Pre-pandemic n = 10	Pandemic n = 11
<i>E. coli</i> ESBL		
Urinary tract infection	3	7
SBP	2	–
Spontaneous bacteremia	1	–
<i>K. pneumoniae</i> ESBL		
Urinary tract infection	2	1
Spontaneous bacteremia	–	1
<i>P. aeruginosa</i>		
Urinary tract infection	–	–
Pneumonia	2	1
MRSA		
Urinary tract infection	–	1

Table 2. Multi-drug resistant bacteria isolated from 131 episodes of infection during the pre-pandemic period and 95 episodes of infection during the pandemic period. *SBP*: spontaneous bacterial peritonitis; *ESBL*: extended-spectrum beta-lactamase; *MRSA*: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

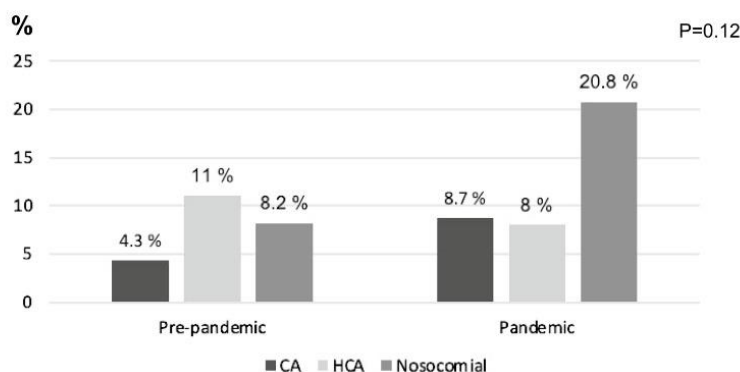


Figure 3. Site of acquisition of multi-drug resistant bacteria among the total of infections. *HCA*: healthcare-associated; *CA*: community-acquired.

reduced the attention given to traditional programs for prevention of nosocomial infections, such as venous and urinary catheter care, leading to an increase in nosocomial infections^{26,27}.

Interestingly, as other authors have observed, we too found a (non-significant) increase in urinary tract infections during the pandemic^{22,23}. This increase could be related to deficient urinary catheter care due to the pressure on health-care systems. We also found a non-significant decrease in SBP and lower respiratory tract infections. The latter might be explained by the measures taken to reduce contact transmission and aerosol spread²³. The low rate of COVID-19 infections in our study during the pandemic can be explained by the fact that all patients diagnosed with COVID-19 were admitted to specific COVID-19 hospitalization areas. The three patients with nosocomial-acquired COVID-19 identified during the pandemic period were diagnosed during hospitalization in the hepatology department.

Like in other studies, we also found infection rates of *Clostridioides difficile* decreased during the COVID-19 pandemic^{24,25,27,28}. This finding is most likely linked to the general preventive measures undertaken during the pandemic—measures beyond the use of alcohol-based hand sanitizer to which the *Clostridioides difficile* spores are resistant.

Regarding MDRO infections, it is of note that although their incidence remained low (4% in the pre-pandemic and 6.5% in the pandemic group), it increased both in the community-acquired infections and the nosocomial infections during the pandemic period, as reported by Jeon et al in hospitalized patients in Korea¹¹. In contrast, Park et al found that the rate of infections caused by MRSA and ESBL producers was significantly lower in patients with cirrhosis admitted to the intensive care unit during the pandemic. Bentivegna et al also describe a decrease in MDRO among the total numbers of infections in the general population in Rome during the pandemic¹⁰. Other authors in hospitals in Taiwan and the US have also described a reduction of MDRO among

nosocomial infections during this period^{18,9}. These contradictory findings between countries could be related to differences in antibiotic policies and/or in infection prevention measures.

We consider the low incidence of MDRO in our population in both periods is a relevant finding. Probably, the reason is that our study was performed in the hepatology unit at a hospital without liver transplant, while most of the previous studies evaluating infections by MDRO in cirrhosis were performed in an intensive-care setting and in hospitals with liver transplant program^{3,5,6}. Therefore, it is important to emphasize the need for monitoring antimicrobial resistance at each centre to adapt the empiric antibiotic therapy. This would contribute to a more rational use of antibiotics in order to prevent further progression of antibiotic resistance.

In our study, the admission rate was statistically lower in the pandemic group. One hypothesis might be that patients chose to stay at home rather than seek medical care due to fear of exposing themselves to SARS-CoV-2 and/or to reduce the pressure on health care system. This hypothesis is further supported by the finding that liver function was more severely impaired in hospitalized patients during the pandemic. A possible reason for this could be that in view of the pandemic only the most seriously ill sought hospital care.

While some studies also report a decrease in the overall hospital admission rate for non-covid-19 conditions during the pandemic²⁹, still others found the admission rate for alcohol-related liver events increased^{30,31}. In our study, we observed a significant increase in the alcoholic etiology of cirrhosis during the pandemic. These data are in agreement with the increase in alcohol abuse during this period³². We observed an increase in the number of women hospitalized during the pandemic, likely related to the increase in the rate of alcohol consumption reported among women at this time and higher susceptibility to the effects of alcohol³².

The main limitation of this study is its retrospective design. Data reliability is not the same as in a prospective design in a non-pandemic situation. Second, we focused only on the two periods we considered could best show the impact of the pandemic on infections: the first year of the pandemic and the previous year. This provided a relatively low sample size that could have contributed to the lack of a statistical significance in some differences observed between the two periods. Finally, we did not include patients with cirrhosis admitted for COVID-19, so we do not have data about their eventual episodes of infection.

To conclude, we observed a trend towards a lower incidence of nosocomial infections and a higher incidence of MDRO infections during the pandemic as compared to the pre-pandemic period. Such findings indicate that even in a crisis like a pandemic, standard infection prevention practices must be maintained in order to avoid the increase of nosocomial infections and the spread of MDRO infections.

Data availability

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 11 April 2023; Accepted: 18 January 2024

Published online: 01 February 2024

References

- Piano, S. *et al.* Epidemiology and effects of bacterial infections in patients with cirrhosis worldwide. *Gastroenterology* **156**, 1368–1380.e10 (2019).
- Dionigi, E. *et al.* Bacterial infections change natural history of cirrhosis irrespective of liver disease severity. *Am. J. Gastroenterol.* **112**, 588–596 (2017).
- Fernández, J. *et al.* Bacterial and fungal infections in acute-on-chronic liver failure: Prevalence, characteristics and impact on prognosis. *Gut* **67**, 1870–1880 (2018).
- Bajaj, J. S., Kamath, P. S. & Reddy, K. R. The evolving challenge of infections in cirrhosis. *N. Engl. J. Med.* **384**, 2317–2330 (2021).
- Fernandez, J. *et al.* Prevalence and risk factors of infections by multiresistant bacteria in cirrhosis: A prospective study. *Hepatology* **55**, 1551–1561 (2012).
- Fernandez, J. *et al.* Multidrug-resistant bacterial infections in patients with decompensated cirrhosis and with acute-on-chronic liver failure in Europe. *J. Hepatol.* **70**, 398–411 (2019).
- Fernandez, J., Piano, S., Bartoletti, M. & Wey, E. Q. Management of bacterial and fungal infections in cirrhosis: The MDRO challenge. *J. Hepatol.* **75**, S101–S117 (2021).
- Lo, S. H. *et al.* The impact of universal face masking and enhanced hand hygiene for COVID-19 disease prevention on the incidence of hospital-acquired infections in a Taiwanese hospital. *Int. J. Infect. Dis.* **104**, 15–18 (2021).
- Cole, J. & Barnard, E. The impact of the COVID-19 pandemic on healthcare acquired infections with multidrug resistant organisms. *Am. J. Infect. Control.* **49**, 653–654 (2021).
- Bentivegna, E. *et al.* Reduction of multidrug-resistant (MDR) bacterial infections during the COVID-19 pandemic: A retrospective study. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **18**, 1003 (2021).
- Jeon, K. *et al.* Impact of COVID-19 on antimicrobial consumption and spread of multidrug-resistance in bacterial infections. *Antibiotics (Basel)* **11**, 535 (2022).
- D'Amico, G. *et al.* Towards a new definition of decompensated cirrhosis. *J. Hepatol.* **76**, 202–207 (2022).
- Rimola, A. *et al.* Diagnosis, treatment and prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: A consensus document. *Int. Asc. Club. J. Hepatol.* **32**, 142–153 (2000).
- Angeli, P. *et al.* EASL Clinical Practice Guidelines for the management of patients with decompensated cirrhosis. *J. Hepatol.* **69**, 406–460 (2018).
- Biggins, S. W. *et al.* Diagnosis, evaluation, and management of ascites, spontaneous bacterial peritonitis and hepatorenal syndrome: 2021 practice guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* **74**, 1014–1048 (2021).
- Horan, T. C., Andrus, M. & Dudeck, M. A. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am. J. Infect. Control.* **36**, 309–332 (2008).
- Magiorakos, A. P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**, 268–281 (2012).
- Moreau, R. *et al.* Acute-on-chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis. *Gastroenterology* **144**, 1426–1437.e9 (2013).
- World Health Organization. *Global action plan on antimicrobial resistance* (World Health Organization, Geneva, 2015).

20. Tanislav, C. & Kostev, K. Investigation of the prevalence of non-COVID-19 infectious diseases during the COVID-19 pandemic. *Public Health*. **203**, 53–57 (2022).
21. Cassell, K., Zipfel, C. M., Bansal, S. & Weinberger, D. M. Trends in non-COVID-19 hospitalizations prior to and during the COVID-19 pandemic period, United States, 2017–2021. *Nat. Commun.* **13**, 5930 (2022).
22. Park, D. *et al.* Reduction in nosocomial infections in patients with cirrhosis during the COVID-19 era compared with pre-COVID-19: Impact of masking and restricting visitation. *Am. J. Gastroenterol.* **117**, 1874–1876 (2022).
23. Pan, S. J. *et al.* Relationship between nosocomial infections and coronavirus disease 2019 in the neurosurgery unit: Clinical characteristics and outcomes from a Chinese Tertiary-Care Hospital. *BMC Infect. Dis.* **22**, 836 (2022).
24. Lastinger, L. M. *et al.* Continued increases in the incidence of healthcare-associated infection (HAI) during the second year of the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **20**, 1–5 (2022).
25. Weiner-Lastinger, L. M. *et al.* The impact of coronavirus disease 2019 (COVID-19) on healthcare-associated infections in 2020: A summary of data reported to the National Healthcare Safety Network. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **43**, 12–25 (2022).
26. Rawson, T. M. *et al.* COVID-19 and the potential long-term impact on antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **75**, 1681–1684 (2020).
27. Baker, M. A. *et al.* The impact of coronavirus disease 2019 (COVID-19) on healthcare-associated infections. *Clin. Infect. Dis.* **74**, 1748–1754 (2022).
28. Bentivegna, E. *et al.* Impact of COVID-19 prevention measures on risk of health care-associated *Clostridium difficile* infection. *Am. J. Infect. Control*. **49**, 640–642 (2021).
29. Bodilsen, J. *et al.* Hospital admission and mortality rates for non-covid diseases in Denmark during covid-19 pandemic: Nationwide population based cohort study. *BMJ* **373**, n1135 (2021).
30. Shaheen, A. A. *et al.* Impact of the COVID-19 pandemic on hospitalizations for alcoholic hepatitis or cirrhosis in Alberta, Canada. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **20**, e1170–e1179 (2022).
31. Gonzalez, H. C. *et al.* Alcohol-related hepatitis admissions increased 50% in the first months of the COVID-19 pandemic in the USA. *Liver Int.* **42**, 762–764 (2022).
32. Barbosa, C., Cowell, A. J. & Dowd, W. N. Alcohol consumption in response to the COVID-19 pandemic in the United States. *J. Addict. Med.* **15**, 341–344 (2021).

Author contributions

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation and data collection were performed by B.C., A.H. and M.P. Data analysis was performed by B.C., A.H. and G.S. The first draft of the manuscript was written by B.C. and supervised by G.S. All authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

Berta Cuyàs received a grant from the Catalan Society of Digestive Diseases (Societat Catalana de Digestologia) to support this research. Alvarado-Tapias is recipient of a Joan Rodes award ISCIII (JR20/00047).

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-024-52452-2>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to B.C.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2024

4.1.1 Material suplementari

Impact of the COVID-19 pandemic on the incidence and type of infections in hospitalized patients with cirrhosis: a retrospective study

Authors: Berta Cuyàs¹; Anna Huerta¹; Maria Poca^{1,2}; Edilmar Alvarado-Tapias^{1,2}; Anna Brujats¹; Eva Román^{1,2,3}; Carlos Guarner^{1,2}; Àngels Escorsell^{1,2}; German Soriano^{1,2}

SUPPLEMENTARY TABLE

Supplementary table 1. Microorganisms isolated in positive culture-infections.

	Pre-pandemic n=71	Pandemic n=59	P
Gram-negative bacteria	32 (45.1%)	30 (50.9%)	0.51
- <i>E. coli</i>	22 (31%)	23 (39%)	
- <i>K. pneumoniae</i>	6 (8.5%)	4 (6.8%)	
- <i>P. aeruginosa</i>	3 (4.2%)	1 (1.7%)	
- <i>S. marcescens</i>	1 (1.4%)	-	
- <i>R. ornithinolytica</i>	-	1 (1.7%)	
- <i>Acinetobacter</i>	-	1 (1.7%)	
Gram-positive bacteria	20 (28.2%)	12 (20.4%)	0.30
- <i>S. epidermidis</i>	5 (7.1%)	2 (3.4%)	
- <i>S. aureus</i>	4 (5.6%)	2 (3.4%)	
- <i>E. faecium</i>	4 (5.6%)	3 (5.1%)	
- <i>E. faecalis</i>	2 (2.8%)	3 (5.1%)	
- <i>S. capitis</i>	1 (1.4%)	-	
- <i>S. gordonii</i>	1 (1.4%)	-	
- <i>S. hominis</i>	1 (1.4%)	-	
- <i>S. oralis</i>	1 (1.4%)	-	
- <i>S. salivarius</i>	1 (1.4%)	-	
- <i>S. gallyticus</i>	-	1 (1.7%)	
- <i>S. agalactiae</i>	-	1 (1.7%)	
Anaerobic bacteria	8 (11.3%)	4 (6.8%)	0.54
- <i>C. difficile</i>	7 (9.9%)	4 (6.8%)	
- <i>P. denticola</i>	1 (1.4%)	0	
Mixed	8 (11.3%)	6 (10.1%)	0.84
Virus	2 (2.8%)	4 (6.8%)	0.41
- Cytomegalovirus	1 (1.4%)	-	
- Influenza A	1 (1.4%)	-	
- SARS-CoV-2	-	3 (5.1%)	
- Herpes simplex virus type 1	-	1 (1.7%)	
Fungi	1 (1.4%)	3 (5.1%)	0.33
- <i>C. albicans</i>	1 (1.4%)	2 (3.4%)	
- <i>C. tropicalis</i>	-	1 (1.7%)	

4.2. Publicació 2

Cuyàs B, Cantó E, Sanchez-Ardid E, Miró E, Alvarado-Tapias E, Román E, Poca M, Navarro F, Ferrero-Gregori A, Escorsell MÀ, Vidal S, Soriano G. *In vitro Immune Response of Mononuclear Cells to Multidrug-Resistant Escherichia coli*. *Microorganisms*. 2025; 13(5):1164. doi: 10.3390/microorganisms13051164



Article

In Vitro Immune Response of Mononuclear Cells to Multidrug-Resistant *Escherichia coli*

Berta Cuyàs ^{1,2,3}, Elisabet Cantó ⁴, Elisabet Sanchez-Ardid ^{1,3}, Elisenda Miró ^{5,6}, Edilmar Alvarado-Tapias ^{1,2,3}, Eva Román ^{1,2,3}, Maria Poca ^{1,2,3}, Ferran Navarro ^{5,6}, Andreu Ferrero-Gregori ⁴, Maria Àngels Escorsell ^{1,2,3}, Silvia Vidal ⁴ and German Soriano ^{1,2,3,*}

¹ Department of Gastroenterology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, C/Mas Casanovas 90, 08041 Barcelona, Spain; bcuyas@santpau.cat (B.C.)

² Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, 08023 Barcelona, Spain

³ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain

⁴ Inflammatory Diseases Department, Institut de Recerca Sant Pau (IR Sant Pau), 08041 Barcelona, Spain

⁵ Department of Microbiology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, C/Mas Casanovas 90, 08041 Barcelona, Spain

⁶ Department of Genetics and Microbiology, Institut de Recerca Sant Pau (IR Sant Pau), Universitat Autònoma de Barcelona, 08041 Barcelona, Spain

* Correspondence: gsoriano@santpau.cat; Tel.: +34-609732644

Abstract: Infections caused by multidrug-resistant organisms (MDRO) are linked to poor outcomes, particularly in patients with cirrhosis. The underlying mechanisms are not fully understood and may involve a different immune response against MDRO. This study aimed to compare the in vitro immune response between multidrug-resistant (MDR) *Escherichia coli* and antibiotic-susceptible *E. coli* strains. Surface protein extract and DNA extract were obtained from MDR *E. coli* (n = 6) and antibiotic-susceptible *E. coli* (n = 6) strains isolated from infected patients with cirrhosis. The extracts were used to stimulate in vitro peripheral blood mononuclear cells from healthy donors. After 48 h, cytokine levels (IFN- γ , IL-1 β , IL-10, IL-12p70, MCP-1, IL-8, IL-6, MIP-1 α , and MIP-1 β) were measured. We observed no significant differences in cytokine production between MDR and susceptible strains. However, we identified notable interindividual variability in cytokine production for most of the cytokines studied. Only IFN- γ and IL-6 in surface extract and MCP-1 in DNA extract showed similar levels across all donors. We conclude that the cytokine profiles induced by MDR *E. coli* in vitro were similar to those in susceptible strains. These findings suggest that the poor prognosis associated with MDR *E. coli* infections is not due to a differential immune response but rather to other factors.

Keywords: resistance; cirrhosis; immune response; MDRO; *Escherichia coli*; cytokines



Academic Editor: Zhihui Cheng

Received: 14 April 2025

Revised: 16 May 2025

Accepted: 18 May 2025

Published: 20 May 2025

Citation: Cuyàs, B.; Cantó, E.; Sanchez-Ardid, E.; Miró, E.; Alvarado-Tapias, E.; Román, E.; Poca, M.; Navarro, F.; Ferrero-Gregori, A.; Escorsell, M.À.; et al. In Vitro Immune Response of Mononuclear Cells to Multidrug-Resistant *Escherichia coli*. *Microorganisms* **2025**, *13*, 1164. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13051164>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Antimicrobial resistance is one of the most critical threats to global public health. It is directly responsible for over one million deaths annually worldwide, with the total number expected to exceed 29 million over the next 25 years [1]. This problem is particularly relevant in vulnerable populations, such as patients with cirrhosis. These patients present a spectrum of immune alterations known as cirrhosis-associated immune dysfunction (CAID). CAID is characterized by immune deficiencies and a proinflammatory state. The immune deficiencies, together with microbiome dysbiosis, altered intestinal permeability, and gut bacterial translocation leads to an increase in the incidence of infections [2,3]. As

a consequence, infections are a major cause of morbidity and mortality in patients with cirrhosis [4]. In recent years, the prevalence of multidrug-resistant organisms (MDRO) has increased notably in patients with cirrhosis as the result of frequent antibiotic exposure, recurrent hospitalizations, and invasive procedures [5]. Infections caused by MDRO now occur in approximately one-third of culture-positive bacterial infections in patients with cirrhosis worldwide, with significant geographical variation [6]. Multidrug resistance is increasing particularly among Gram-negative bacteria, with *Escherichia coli*, the most prevalent infectious agent in cirrhosis, being a leading contributor [6]. *E. coli* resistance is frequently driven by the acquisition of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) [7].

Infections caused by MDRO in cirrhosis are associated with poorer clinical outcomes, including lower rates of infection resolution, increased mortality and a higher incidence of septic shock and organ failure [6,8,9]. This organ failure often manifests as acute-on-chronic liver failure (ACLF), a severe condition that is unique to cirrhosis [10]. A delay in adequate antibiotic treatment seems to be the main reason for the poorer outcomes in patients with infections caused by MDRO [6,9,11]. However, it remains unclear whether other factors, such as a different inflammatory response against MDRO, could also contribute to the poor prognosis. This question is especially relevant in patients with cirrhosis. These patients are not only predisposed to infections because of their immune deficiencies. CAID also encompasses high-grade and low-grade systemic inflammation, together with an increased production of proinflammatory cytokines [2]. Among these cytokines, IL-6 and IL-8 are of particular relevance because their excessive production has been related to a worse prognosis and ACLF development in patients with cirrhosis [12,13].

Data regarding the in vitro inflammatory response against MDRO are scarce and contradictory. While some authors have reported an increased production of proinflammatory cytokines induced by multidrug-resistant (MDR) *E. coli* in comparison with susceptible strains [14], other studies have found a lower production [15]. It is relevant to elucidate whether the immune response elicited by MDRO is different from that against susceptible strains. This difference could have significant therapeutic implications in the future, not only in high-risk groups such as patients with cirrhosis but also in the general population.

We aimed to determine whether the in vitro immune response differs between MDR *E. coli* and susceptible *E. coli* strains isolated from infected patients with cirrhosis.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial Isolates and Growth Conditions

Twelve *E. coli* isolates from infected patients with cirrhosis were randomly selected and used for the experiments: six from ascitic fluid in the context of a spontaneous bacterial peritonitis (SBP) and six from blood in the context of bacteremia. SBP was defined as a bacterial infection of ascitic fluid without any intra-abdominal surgically treatable source of infection, while bacteremia refers to a bloodstream infection according to current guidelines [16].

Identification of *E. coli* isolates was initially suspected based on colony morphology and growth on chromogenic agar (CPS agar; bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). Species confirmation was subsequently performed using MALDI-TOF mass spectrometry (Bruker Daltonics GmbH & Co., KG, Bremen, Germany).

Antimicrobial susceptibility testing was performed using the disk diffusion method in accordance with the guidelines established by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Mueller–Hinton agar was used for all assays, and incubation was carried out at 35 ± 1 °C for 16–20 h in aerobic conditions. The results were interpreted following EUCAST breakpoints applicable to the years of the study (EUCAST v8.1, 2018; EUCAST v9.0, 2019; and EUCAST v10.0, 2020) [17–19].

Isolates showing resistance or reduced susceptibility to third-generation cephalosporins (e.g., cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone) were simultaneously screened for potential ESBL production by observing synergy between cephalosporin disks and an amoxicillin-clavulanic acid (20/10) disk. Ceftazidime (30 µg), cefotaxime (30 µg) and cefepime (30 µg) disks were placed 20–30 mm from the central clavulanate disk on Mueller–Hinton agar plates inoculated with bacterial suspensions adjusted to 0.5 McFarland turbidity. Enhancement of the inhibition zone between the clavulanate disk and any of the cephalosporin disks was interpreted as indicative of ESBL activity [20]. Quality control was performed throughout using *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (ESBL-positive) and *Escherichia coli* ATCC 25922 (ESBL-negative).

Six of the twelve *E. coli* isolates were ESBL producers and the other six were susceptible to antibiotics.

2.2. Bacterial Extracts Isolations

Bacterial strains were fractionated into surface protein and DNA.

2.2.1. Surface Protein Isolation

Surface protein was isolated for each strain from 50 mL overnight liquid cultures (18 h) in duplicates, corresponding to the stationary growth phase. The method was adapted from previously published protocols, with slight modifications [21,22]. Cells were harvested by centrifugation (20 min, 10,000× g, 4 °C) and the resulting pellets were resuspended in 0.01 N NaOH solution. Protease inhibitors ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were added to all the solutions at final concentrations of 5 mM and 1 mM, respectively. Suspensions were gently agitated for 30 min at 37 °C in an orbital rotary agitator (Stuart SB3, Staffordshire, UK). After incubation and centrifugation, the supernatants containing the protein extracts were filtered (0.45 µm) and stored at −20 °C until further use. The protein concentration was measured using the Qubit™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) prior to their use.

2.2.2. Bacterial DNA Isolation

DNA extraction was performed for each strain from 1.5 mL broth cultures using the GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich, Dorset, UK) following the manufacturer's instructions. The DNA concentration was assessed using the Qubit™ DNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and stored at −80 °C.

2.3. Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) Isolation and Stimulation with Bacterial Extracts

PBMC were isolated from 10 mL of peripheral blood obtained from healthy donors using a Ficoll-Histopaque gradient and cryopreserved in liquid nitrogen. Cell concentrations were adjusted to 2×10^6 PBMC/mL in RPMI medium (Dominique Dutscher, Bernolsheim, France) supplemented with 5% fetal bovine serum (Biological Industries, Beit Haemek, Israel), 1% penicillin/streptomycin, and 1% glutamine (Biowest, Nuaillé, France). This medium is hereafter referred to as complete-RPMI.

In preliminary experiments, we stimulated PBMC with surface protein extracts at concentrations of 0.02, 0.2, and 2 µg/mL in complete-RPMI medium in a final volume of 200 µL in 96-well culture plates (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). For DNA extracts, we tested concentrations of 0.2 and 2 µg/mL. PBMC in complete-RPMI alone served as the negative control. PBMC stimulated with lipopolysaccharide (LPS-EB ultrapure 5×10^6 EU—InvivoGen, San Diego, CA, USA) at 1 µg/mL in complete-RPMI medium was used as the positive control. PBMC were incubated for 2 and 5 days at 37 °C.

For the final experiments we used surface protein extracts at 0.2 µg/mL and DNA extracts at 2 µg/mL because these concentrations performed best in preliminary tests. We incubated PBMC for two days because we aimed to assess the innate immune response rather than the adaptative response.

Because the yield of PBMC isolated from each healthy donor was insufficient to culture all 12 *E. coli* extracts we used extracts from *Escherichia coli* ATCC® 25922, a non-pathogenic clinical isolate from the American Type Culture Collection to standardize the results for all cultures.

2.4. Determination of Cytokine Concentration and Ratio

Preliminary analysis of supernatants was conducted using a bead-based multiplex immunoassay ProcartaPlex™ Human Inflammation Panel, 20 plex (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). From among the 20 cytokines analyzed for the final experiments, we selected a battery of nine cytokines on the basis of their clinical relevance in patients with cirrhosis [2,12,13] and/or their role in innate immune response. This battery of cytokines captures key aspects of the immune response to microorganisms, encompassing pro-inflammatory, regulatory, and chemotactic functions, while limiting the number of analytes to ensure analytical robustness and comparability across samples. Specifically, we analyzed interferon-gamma (IFN-γ), IL-1β, IL-10, IL-12p70, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), IL-8/CXCL8, IL-6, macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1α), and MIP-1β.

A ProcartaPlex™ Human MMP Panel, 5 plex (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used to measure interferon-gamma (IFN-γ), IL-1β, IL-10, IL-12p70, and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). We used specific ELISA kits for IL-8/CXCL8 (Mabtech, Nacka Strand, Sweden), IL-6 (ImmunoTools, Friesoythe, Germany), macrophage inflammatory protein (MIP)-1α and MIP-1β (PeproTech, Thermo Fisher Scientific, USA), because these cytokines were saturated in the ProcartaPlex™.

The lower limits of quantification were as follows: 11 pg/mL for IFN-γ, 2.76 pg/mL for IL-1β, 1.56 pg/mL for IL-10, 7.32 pg/mL for IL-12p70, 3.08 pg/mL for MCP-1, 4 pg/mL for IL-8, 6.1 pg/mL for IL-6 and 8 pg/mL for MIP-1α and MIP-1β. Supernatants were diluted 1/50 for IFN-γ, IL-1β, IL-10, IL-12p70 and MCP-1, 1/200 for IL-8 and IL-6, and 1/30 for MIP-1α and MIP-1β.

We normalized cytokine concentrations (in pg/mL) by calculating the ratio of cytokine production from pathogenic *E. coli* to that from standard *E. coli* ATCC® 25922 using the formula:

$$ratio = \frac{\text{Pathogenic } E. coli \text{ cytokine concentration} - \text{negative control cytokine concentration}}{E. coli \text{ ATCC}^{\circledR} 25922 \text{ cytokine concentration} - \text{negative control cytokine concentration}}$$

We then compared the cytokine ratios between MDR and susceptible *E. coli*. We also compared the cytokine ratios between the different healthy donors and between the site of isolation of *E. coli* (ascitic fluid or blood).

2.5. Statistical Analyses

Statistical analyses were conducted using Graph Pad Prism 9 software (GraphPad, Boston, MA, USA) and 2023 IBM SPSS Statistics for Windows, version 29.0.1.1 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). The Shapiro–Wilk test was applied to test the normality of data distribution. Results are reported as percentages, median (IQR), and mean ± standard deviation. To test comparisons between groups we used the Fisher’s exact test, Mann–Whitney test, Student’s *t*-test, multivariable linear regression analysis, and the Bonferroni post-hoc test. Significance was established at a two-sided *p*-value lower than 0.05.

3. Results

Surface-associated protein extract and DNA extracts were obtained from multidrug-resistant *E. coli* (n = 6) and antibiotic-susceptible *E. coli* (n = 6) strains isolated from patients with cirrhosis, and from a reference *E. coli* strain (ATCC® 25922). *E. coli* extracts were used to stimulate in vitro PBMC from healthy donors (n = 8).

Table 1 shows the clinical characteristics of the patients from whom the *E. coli* were isolated. There were no statistically significant differences in clinical and analytical characteristics between the MDR *E. coli* group and the susceptible *E. coli* group. Both groups were predominantly men, with similar mean ages (69 ± 10 vs. 68 ± 13 years, respectively). The etiology of cirrhosis was mostly alcohol-related and metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD), with impaired liver function at the infection diagnosis: Child–Pugh scores of 9 and MELD 23 ± 5.1 vs. 20 ± 9.3 , respectively. There was a non-significant trend to higher C-reactive protein levels and white blood cell count in patients infected by MDR *E. coli*. The MDR *E. coli* group had a non-significant higher proportion of previous antibiotic prophylaxis (66.7% vs. 33.3%). Bacteremia was more common in the MDR *E. coli* group, while SBP was more common in the susceptible *E. coli* group. Nosocomial infections were exclusively associated with MDR *E. coli*. Both groups had similar rates of acute kidney injury, cirrhosis decompensation, ACLF, and 30-day mortality.

Table 1. Clinical and analytical characteristics of patients with cirrhosis infected by MDR *E. coli* and antibiotic-susceptible *E. coli* from whom bacterial isolates were obtained. Results are expressed as percentages or mean $\pm$ standard deviation. Normality was assessed with the Shapiro–Wilk test; Student’s *t*-test or Mann–Whitney test were applied accordingly. Fisher’s exact test was used for comparisons of categorical variables. MASLD: metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease; MetALD: metabolic and alcohol-related liver disease; MELD: model for end-stage liver disease; SBP: spontaneous bacterial peritonitis; HE: hepatic encephalopathy; ACLF: acute-on-chronic liver failure.

	Infection by MDR <i>E. coli</i> n = 6	Infection by Susceptible <i>E. coli</i> n = 6	p-Value
Sex, M/F, n (%)	6 (100%)/0	4 (66.7%)/2 (33.3%)	0.45
Age, (years)	69 ± 10	68 ± 13	0.48
Etiology of cirrhosis, n (%)			
Alcohol-related liver disease	2 (33.3%)	1 (16.7%)	0.46
MASLD	3 (50%)	2 (33.3%)	
MetALD	1 (16.7%)	1 (16.7%)	
Alcohol + Autoimmune	0	2 (33.3%)	
Child–Pugh score at infection diagnosis, (points)	9 ± 2.3	9 ± 1.7	0.50
MELD score at infection diagnosis, (points)	23 ± 5.1	20 ± 9.3	0.23
C-reactive protein (mg/dL)	103.0 ± 63.4	93.7 ± 50.0	0.78
White blood cell count ($\times 10^9/L$)	10.9 ± 5.5	8.2 ± 4.4	0.38
Antibiotic prophylaxis, n (%)	4 (66.7%)	2 (33.3%)	0.57
Type of infection, n (%)			
Bacteremia	4 (66.7%)	2 (33.3%)	0.56
SBP	2 (33.3%)	4 (66.7%)	

Table 1. Cont.

	Infection by MDR <i>E. coli</i> n = 6	Infection by Susceptible <i>E. coli</i> n = 6	p-Value
Site of acquisition, n (%)			
Community-acquired	2 (33.3%)	3 (50%)	0.07
Healthcare associated	2 (33.3%)	3 (50%)	
Nosocomial	2 (33.3%)	0	
Acute kidney injury at infection diagnosis, n (%)	2 (33.3%)	3 (50%)	1
Decompensation of cirrhosis, n (%)	6 (100%), of which:	5 (83.3%), of which:	1
Ascites	3 (50%)	5 (100%)	
Variceal bleeding	1 (16.7%)	0	
Ascites + HE	2 (33.3%)	0	1
ACLF, n (%)	1 (16.7%)	2 (33.3%)	
30-day mortality, n (%)	1 (16.7%)	0	1

We compared the cytokine production between MDR *E. coli* and antibiotic-susceptible *E. coli* (Figure 1 and Table S1 and Table S2 in the Supplementary Materials). No statistically significant differences were detected in the production of any cytokine between MDR and susceptible strains.

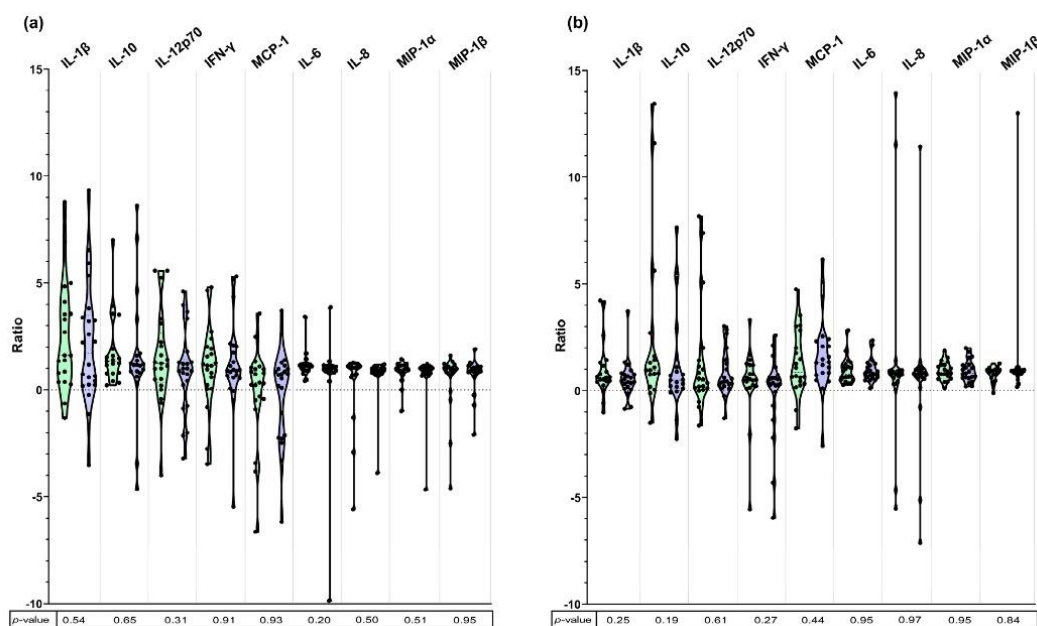


Figure 1. Violin plots showing standardized ratio of cytokine production in response to *E. coli* surface protein extract (a) and DNA extract (b), according to bacterial antibiotic susceptibility (antibiotic-susceptible in green, MDR in blue). Data are presented as individual results and median with IQR. Normality was assessed with the Shapiro–Wilk test; Student’s *t*-test or Mann–Whitney test were applied accordingly. No statistically significant differences between susceptible and MDR strains were detected in the production of any cytokine.

Multivariable linear regression analysis confirmed this finding and revealed that the individual healthy donor significantly influenced the production of several cytokines (Table 2). Specifically, IL-1 β , IL-10, IL-12p70, MCP-1, IL-8, MIP-1 α , and MIP-1 β levels in cultures stimulated with surface protein extracts showed statistically significant differences among healthy donors. Similarly, the individual healthy donor was associated with different production of IFN- γ , IL-1 β , IL-10, IL-12p70, IL-8, IL-6, MIP-1 α , and MIP-1 β in cultures stimulated with DNA extracts. No significant differences were observed among healthy donors for IFN- γ and IL-6 levels in response to surface extracts, nor for MCP-1 levels in response to DNA extracts.

Table 2. Multivariable linear regression analysis for each cytokine. Coefficients indicate the magnitude of the difference between antibiotic-susceptible vs. MDR *E. coli*; results are expressed as β coefficient and 95% confidence intervals. *p*-values for antibiotic-susceptible vs. MDR *E. coli* and among healthy donors are reported.

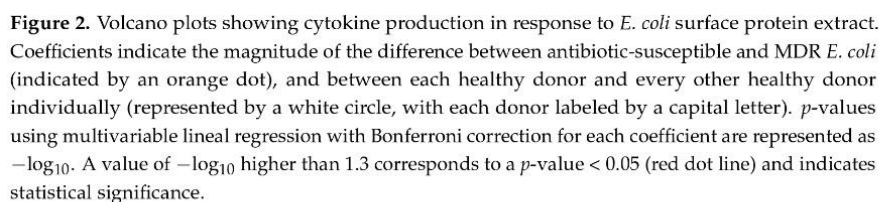
		Surface Protein Extract		DNA Extract	
		Antibiotic-Susceptible vs. MDR <i>E. coli</i>	Healthy Donors	Antibiotic-Susceptible vs. MDR <i>E. coli</i>	Healthy Donors
IL-1 β	coefficient (95% CI)	1.01 (−3.51–5.53)	–	0.03 (−1.15–1.21)	–
	<i>p</i> -value	0.65	<0.001 *	0.96	<0.001 *
IL-10	coefficient (95% CI)	−0.19 (−3.84–3.47)	–	−0.14 (−5.78–5.48)	–
	<i>p</i> -value	0.92	0.01 *	0.96	0.002 *
IL-12p70	coefficient (95% CI)	0.39 (−2.28–3.05)	–	0.71 (−3.07–4.49)	–
	<i>p</i> -value	0.77	<0.001 *	0.70	0.01 *
IFN- γ	coefficient (95% CI)	−0.07 (−4.61–4.47)	–	−0.04 (−3.6–3.53)	–
	<i>p</i> -value	0.97	0.18	0.98	0.008 *
MCP-1	coefficient (95% CI)	0.11 (−2.95–3.18)	–	−0.42 (−4.32–3.48)	–
	<i>p</i> -value	0.94	<0.001 *	0.83	0.40
IL-6	coefficient (95% CI)	0.11 (−4.81–5.02)	–	−0.18 (−1.40–1.05)	–
	<i>p</i> -value	0.96	0.93	0.77	0.045 *
IL-8	coefficient (95% CI)	0.11 (−2.08–2.31)	–	0.06 (−2.36–2.50)	–
	<i>p</i> -value	0.92	<0.001 *	0.96	<0.001 *
MIP-1 α	coefficient (95% CI)	0.13 (−0.36–0.62)	–	−0.13 (−1.10–0.84)	–
	<i>p</i> -value	0.58	<0.001 *	0.78	0.01 *
MIP-1 β	coefficient (95% CI)	−0.04 (−2.19–2.11)	–	0.03 (−0.59–0.64)	–
	<i>p</i> -value	0.97	0.004 *	0.93	0.01 *

(*): statistically significant *p*-values.

To further explore these findings, we generated volcano plots (Figures 2 and 3) to illustrate the coefficients and *p*-values with Bonferroni correction for cytokine production between susceptible and MDR strains and the variability among healthy donors. For example, in Figure 2, regarding IL-1 β , donor J exhibited a different cytokine production pattern to that of the other donors. For IL-10, donor G showed the greatest difference. In contrast, no significant differences were observed among donors for IFN- γ .

Among the cytokines analyzed, the production levels were highest for IL-1 β in surface protein extracts (ratio of 1.70 (0.24–3.49) for MDR strains vs. 1.61 (0.48–3.98) for susceptible strains, *p* = 0.54) and for IL-10 and MCP-1 in DNA extracts (ratios of 0.50 (0.13–1.39) vs. 0.96 (0.47–2.16), *p* = 0.19, and 1.34 (0.78–2.37) vs. 0.88 (0.36–2.63), *p* = 0.44, respectively) (Figure 1 and Tables S1 and S2 in the Supplementary Materials).

Lastly, we studied whether the type of infection, and consequently the site of bacterial isolation, influenced the immune response. We observed no significant differences in cytokine production based on the source of infection (ascites vs. blood) (Figure 4 and Tables S3 and S4 in the Supplementary Materials).



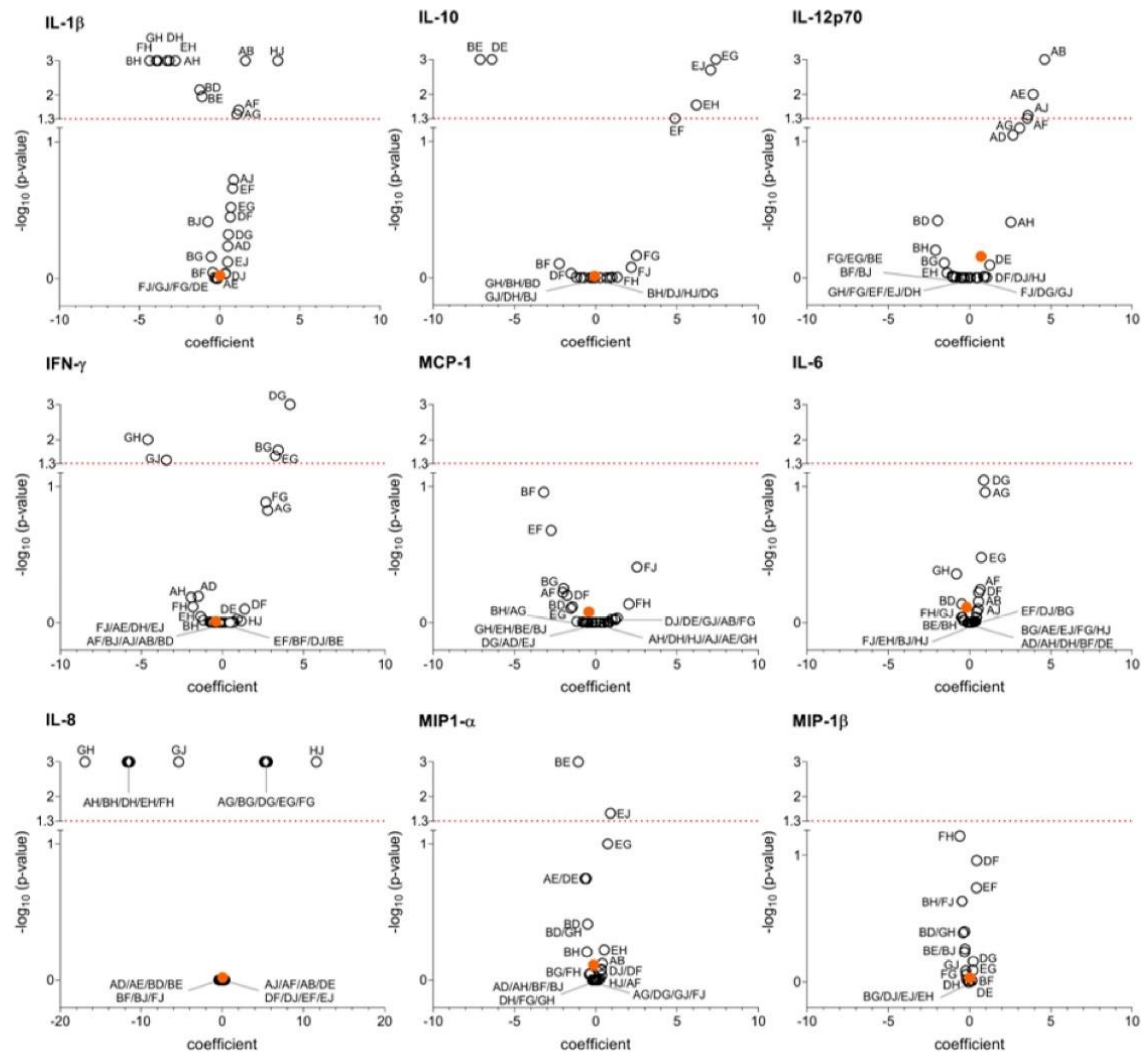


Figure 3. Volcano plots showing cytokine production in response to *E. coli* DNA extract. Coefficients indicate the magnitude of the difference between antibiotic-susceptible and MDR *E. coli* (indicated by an orange dot), and between each healthy donor and every other healthy donor individually (represented by a white circle, with each donor labeled by a capital letter). p -values using multivariable linear regression with Bonferroni correction for each coefficient are represented as $-\log_{10}$. A value of $-\log_{10}$ higher than 1.3 corresponds to a p -value < 0.05 (red dot line) and indicates statistical significance.

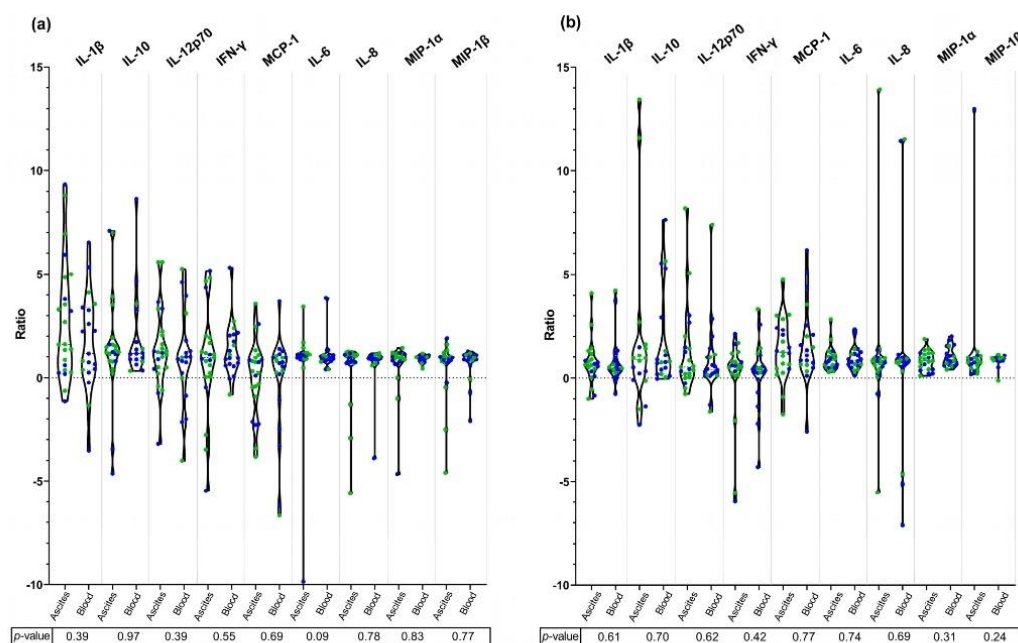


Figure 4. Violin plots showing the standardized ratio of cytokine production in response to *E. coli* surface protein extract (a) and DNA extract (b), according to the site of infection (ascites vs. blood). Antibiotic-susceptible strains are represented by green dots and MDR strains by blue dots. Data are presented as individual results and median with IQR. Normality was assessed with the Shapiro–Wilk test, Student’s *t*-test, or Mann–Whitney test were applied accordingly. No statistically significant differences were detected between ascites and blood in the production of any cytokine.

4. Discussion

The main finding in the present study was that the in vitro cytokine production by PBMC from healthy donors challenged with *E. coli* isolated from patients with cirrhosis was similar in MDR and susceptible strains. In addition, the production of most cytokines differed among individual healthy donors.

The rising prevalence of infections caused by MDRO worldwide is a serious threat to global public health, especially in patients with cirrhosis [6]. The link between MDR infections and higher mortality observed in previous reports [23,24] could have several non-exclusive explanations, such as delays in appropriate antibiotic treatment [6,9,11], intrinsic host factors [25], and bacterial virulence factors [26]. However, a different elicited immune response between MDR and susceptible bacteria could also contribute to the worse prognosis in the former. Few studies have evaluated in vitro how immunity responds to MDR *E. coli* through cytokine production. Bristianou et al. studied the early release of cytokines by human monocytes from healthy donors stimulated by *E. coli* obtained from the urine of women with acute pyelonephritis [14]. They observed a higher production of TNF, IL-6, and IL-8 by MDR *E. coli* than by susceptible strains, while the opposite occurred for IL-12. In contrast, Auger et al. found that beta-lactam-resistant *E. coli* strains isolated from urine or blood incubated with whole blood from healthy donors induced significantly lower levels of TNF- α and IL-1 β than susceptible strains [15]. This discrepancy with Bristianou et al.’s results was attributed to the use of whole blood instead of monocytes.

In our study the battery of cytokines was selected on the basis of their clinical relevance in patients with cirrhosis [2,12,13] and/or their role in innate immune response to

microorganisms, the target of our experimental approach. This battery included IFN- γ , IL-1 β , IL-10, IL-12p70, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, and IL-8 and allowed us to analyze essential components of the immune response, covering pro-inflammatory, regulatory, and chemotactic functions. We did not find statistically significant differences in the production of any of these cytokines between MDR *E. coli* and susceptible strains. It is of note that the production of IL-6 and IL-8, pro-inflammatory cytokines with a relevant prognostic value in cirrhosis [12,13], did not differ between the two groups of *E. coli* strains. These results suggest that the worse prognosis of MDR *E. coli* infections is more likely attributable to factors such as delayed appropriate antibiotic treatment [6,9] or a patient's poorer baseline status than to a different immune response elicited by the bacteria. Moreover, our data in vitro do not support the use of specific immune modulation as a therapeutic strategy for sepsis caused by MDR *E. coli*. However, we cannot exclude the potential role of therapeutic immune modulation in vivo or in other contexts [27].

The mechanisms of antibiotic resistance in *E. coli* are mainly located in the bacterial envelope. These mechanisms include antibiotic inactivating/modifying enzymes (such as carbapenemases and ESBLs), outer membrane porin remodeling, enhanced efflux pump action to actively transport antibiotics out of the cell, and alteration of antibiotic target sites (e.g., lipid A region of lipopolysaccharide) [28]. In the present study, all the MDR *E. coli* were ESBL-producing strains. Therefore, it seemed interesting to study the differences between MDR and susceptible *E. coli* in the immune response elicited specifically by the surface bacterial extract. However, although the surface components of bacteria play a key role in triggering the human immune response, other bacterial components such as CpG DNA also stimulate this response. In effect, circulating bacterial DNA is associated with the proinflammatory state [29] and a worse prognosis [30] in patients with cirrhosis. Notably, bacterial surface and DNA components stimulate the immune system through different pathways. Surface lipopolysaccharide binds to Toll-like receptor (TLR) 4 and lipoproteins to TLR 2/TLR 1 whereas bacterial CpG-containing DNA binds to TLR 9 [31–34]. The immune response to surface components could therefore differ from that elicited by DNA extracts. For this reason, in contrast to the studies by Bristianou and Auger who used the whole bacteria [14,15], we analyzed the surface extract and the DNA extract separately, and we did not find relevant differences in the immune response between MDR *E. coli* and susceptible *E. coli* in any. However, whole bacteria may simultaneously activate multiple pattern recognition receptors, resulting in a synergistic cytokine regulation [35]. This effect could lead to an immune response different from that elicited by surface and DNA extracts separately. Future studies comparing whole bacteria with their isolated components could provide further insight into these interactions.

In this study, we used PBMC from healthy donors rather than from patients with cirrhosis to minimize variability and potential confounding factors. Patients with cirrhosis exhibit high heterogeneity in baseline immune alterations, history of infections, liver failure severity, comorbidities and pharmacological treatments. All these factors could mask potential differences in cytokine production between MDR and susceptible *E. coli*, especially given the limited number of strains analyzed. Therefore, we decided to use PBMC from healthy donors, a theoretically more homogeneous population. Nevertheless, among the healthy donors, we observed high variability in the production of most cytokines, highlighting the role of genetic polymorphisms and environmental factors in modulating inflammatory pathways. For instance, a genome-wide association study revealed innate immunity was strongly influenced by several genetic loci, while factors such as smoking, age, and sex were shown to predominantly influence adaptive immunity [36]. Previous microbial exposure may also influence systemic immune responses, including cytokine production. It is important to consider that patients with cirrhosis exhibit a different

immune response compared to healthy subjects. In fact, an exaggerated in vitro response to bacterial products has been reported in patients with cirrhosis compared to healthy controls, particularly in the production of interferons, IL-6 and IL-8 [37]. Therefore, it remains unknown whether the similar cytokine profile found between MDR and susceptible *E. coli* strains in PBMC from healthy controls can be extrapolable to PBMC from patients with cirrhosis.

The cytokines with the highest production were IL-1 β in surface extracts and IL-10 and MCP-1 in DNA extracts. IL-1 β is a proinflammatory cytokine that has an important role in the immune response after the initial host recognizes bacterial infection and enhances phagocyte recruitment and function [38]. MCP-1 is a chemokine that plays a key role in recruiting monocytes and polymorphonuclear cells [39]. In contrast, IL-10 has been reported to act as an anti-inflammatory cytokine that protects the host from a harmful uncontrolled immune response [38]. Nevertheless, IL-10 can also exhibit immunostimulatory properties under certain conditions [40].

The site from which *E. coli* was isolated (ascitic fluid vs. blood) did not significantly influence the in vitro immune response. This observation aligns with the understanding that SBP and spontaneous bacteremia—the most characteristic infections in cirrhosis—share the common pathophysiological pathway of bacterial translocation, with bacteria originating from the intestinal lumen moving to various extraintestinal sites [41].

Our study has certain limitations. First, the number of bacteria is limited. However, our intention was to mimic an ex vivo clinical scenario using strains isolated from infected patients with cirrhosis and to evaluate a comprehensive battery of cytokines. Second, we used multiple healthy donors instead of relying on a single donor for all experiments. The variability generated between these different donors could therefore limit the comparison between MDR and susceptible strains. However, we tried to control this potential bias by multivariable linear regression analysis. This approach of using several healthy donors increased the generalizability of our results and allowed us to observe the role of donor variability in the immune response. Third, the PBMC were obtained from healthy donors rather than patients with cirrhosis. Nonetheless, this serves as a preliminary approach to understanding how the general population responds to MDR *E. coli* and provides a foundation for future studies with PBMC from patients with cirrhosis. It would also be valuable to extend this approach to other MDR bacteria. Fourth, we used different cytokine quantification techniques to evaluate the results because some cytokines were saturated in the multiplex immunoassay. While this introduced variability, it allowed us to assess a broader range of cytokine responses. Lastly, our study is based on in vitro experiments. While valuable to understand certain aspects of immune responses under well-defined conditions, such experiments cannot fully replicate the complexity and dynamic nature of the immune environment in vivo.

5. Conclusions

Within the limitations of the sample size, we conclude that there were no significant differences in in vitro cytokine production between MDR and antibiotic-susceptible *E. coli* strains isolated from infected patients with cirrhosis. This result suggests that the poor prognosis associated with MDR infections is likely driven by factors other than differences in immune response. Furthermore, our data in vitro do not support the use of specific immune modulation as a targeted therapeutic approach for MDR infections. Notably, we observed that immune response was strongly influenced by interindividual variability among healthy donors. This result underscores the importance of considering host variability in shaping immune response to infections. Future research should explore

the underlying mechanisms of this variability and its clinical implications, particularly in vulnerable populations such as patients with cirrhosis.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms13051164/s1>, Table S1: Standardized ratio of cytokine production in response to *E. coli* surface protein extract (a) and DNA extract (b), according to bacterial antibiotic susceptibility. Results are expressed as median (IQR). Normality was assessed with the Shapiro–Wilk test; Student’s *t*-test or Mann–Whitney test were applied accordingly; Table S2: Absolute concentrations (pg/mL) of cytokine production in response to *E. coli* surface protein extract (a) and DNA extract (b), according to bacterial antibiotic susceptibility. Results are expressed as median (IQR). Normality was assessed with the Shapiro–Wilk test; Student’s *t*-test or Mann–Whitney test were applied accordingly; Table S3: Standardized ratio of cytokine production in response to *E. coli* surface protein extract (a) and DNA extract (b), according to the site of infection (ascites vs. blood). Results are expressed as median (IQR). Normality was assessed with the Shapiro–Wilk test; Student’s *t*-test or Mann–Whitney test were applied accordingly; Table S4: Absolute concentrations (pg/mL) of cytokine production in response to *E. coli* surface protein extract (a) and DNA extract (b), according to the site of infection (ascites vs. blood). Results are expressed as median (IQR). Normality was assessed with the Shapiro–Wilk test; Student’s *t*-test or Mann–Whitney test were applied accordingly.

Author Contributions: Conceptualization, B.C., E.C., S.V., and G.S.; methodology, B.C., E.C., S.V., and G.S.; patient selection, B.C., E.A.-T., E.R., M.P., M.À.E., and G.S.; bacteria isolation, E.M. and F.N.; experiments, B.C., E.C., and E.S.-A.; data analysis, B.C., E.C., S.V., A.F.-G., and G.S.; writing—original draft preparation, B.C.; writing—review and editing, B.C., E.C., E.A.-T., E.R., F.N., S.V., and G.S.; supervision, S.V. and G.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: B.C. received a grant “Ajut per Iniciació a la Recerca” from the Societat Catalana de Digestologia to support this research. E.A.T. is a recipient of a Joan Rodes award from the ISCII (JR20/00047) and the PI21/01995 grant from the ISCIII-Fondos Feder.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Ethics Committee (Comitè d’Ètica d’Investigació amb Medicaments-CEIm) of Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona (protocol code IIBSP-RES-2018-91, approval date: 10 June 2020).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The original contributions presented in this study are included in the article/Supplementary Material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

Acknowledgments: The authors thank Carolyn Newey for the English language revision.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

ACLF	Acute-on-chronic liver failure;
CAID	Cirrhosis-associated immune dysfunction;
HE	Hepatic encephalopathy;
ESBL	Extended-spectrum—betalactamases;
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing;
IFN- γ	Interferon-gamma;
MASLD	Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease;
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1;

MDR	Multidrug-resistant;
MDRO	Multidrug-resistant organisms;
MetALD	Metabolic and alcohol-related liver disease;
MIP	Macrophage inflammatory protein;
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells;
SBP	Spontaneous bacterial peritonitis;
TLR	Toll-like receptor.

References

1. Naghavi, M.; Vollset, S.E.; Ikuta, K.S.; Swetschinski, L.R.; Gray, A.P.; Wool, E.E.; Robles Aguilar, G.; Mestrovic, T.; Smith, G.; Han, C.; et al. Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance 1990–2021: A Systematic Analysis with Forecasts to 2050. *Lancet* **2024**, *404*, 1199–1226. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Albillos, A.; Martín-Mateos, R.; Van der Merwe, S.; Wiest, R.; Jalan, R.; Álvarez-Mon, M. Cirrhosis-Associated Immune Dysfunction. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2022**, *19*, 112–134. [\[CrossRef\]](#)
3. Jalan, R.; Fernandez, J.; Wiest, R.; Schnabl, B.; Moreau, R.; Angeli, P.; Stadlbauer, V.; Gustot, T.; Bernardi, M.; Canton, R.; et al. Bacterial Infections in Cirrhosis: A Position Statement Based on the EASL Special Conference 2013. *J. Hepatol.* **2014**, *60*, 1310–1324. [\[CrossRef\]](#)
4. Piano, S.; Bunchorntavakul, C.; Marciano, S.; Rajender Reddy, K. Infections in Cirrhosis. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2024**, *9*, 745–757. [\[CrossRef\]](#)
5. Gallaher, C.E.; Shawcross, D.L. Management of Multidrug-Resistant Infections in Cirrhosis. *Semin. Liver. Dis.* **2022**, *42*, 173–187. [\[CrossRef\]](#)
6. Piano, S.; Singh, V.; Caraceni, P.; Maiwall, R.; Alessandria, C.; Fernandez, J.; Soares, E.C.; Kim, D.J.; Kim, S.E.; Marino, M.; et al. Epidemiology and Effects of Bacterial Infections in Patients with Cirrhosis Worldwide. *Gastroenterology* **2019**, *156*, 1368–1380.e10. [\[CrossRef\]](#)
7. Diekema, D.J.; Hsueh, P.R.; Mendes, R.E.; Pfaller, M.A.; Rolston, K.V.; Sader, H.S.; Jones, R.N. The Microbiology of Bloodstream Infection: 20-Year Trends from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e00355-19. [\[CrossRef\]](#)
8. Fernández, J.; Acevedo, J.; Weist, R.; Gustot, T.; Amorós, A.; Deulofeu, C.; Reverter, E.; Martínez, J.; Saliba, F.; Jalan, R.; et al. Bacterial and Fungal Infections in Acute-on-Chronic Liver Failure: Prevalence, Characteristics and Impact on Prognosis. *Gut* **2018**, *67*, 1870–1880. [\[CrossRef\]](#)
9. Fernández, J.; Prado, V.; Trebicka, J.; Amorós, A.; Gustot, T.; Wiest, R.; Deulofeu, C.; García, E.; Acevedo, J.; Fuhrmann, V.; et al. Multidrug-Resistant Bacterial Infections in Patients with Decompensated Cirrhosis and with Acute-on-Chronic Liver Failure in Europe. *J. Hepatol.* **2019**, *70*, 398–411. [\[CrossRef\]](#)
10. Moreau, R.; Jalan, R.; Gines, P.; Pavesi, M.; Angeli, P.; Córdoba, J.; Durand, F.; Gustot, T.; Saliba, F.; Domenicali, M.; et al. Acute-on-Chronic Liver Failure Is a Distinct Syndrome That Develops in Patients with Acute Decompensation of Cirrhosis. *Gastroenterology* **2013**, *144*, 1426–1437.e9. [\[CrossRef\]](#)
11. Song, K.H.; Jeon, J.H.; Park, W.B.; Park, S.W.; Bin Kim, H.; Oh, M.D.; Lee, H.S.; Kim, N.J.; Choe, K.W. Clinical Outcomes of Spontaneous Bacterial Peritonitis Due to Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia Coli* and *Klebsiella* Species: A Retrospective Matched Case-Control Study. *BMC Infect. Dis.* **2009**, *9*, 41. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Clària, J.; Stauber, R.E.; Coenraad, M.J.; Moreau, R.; Jalan, R.; Pavesi, M.; Amor, A.; Titos, E.; Alcaraz-Quiles, J.; Oettl, K.; et al. Systemic Inflammation in Decompensated Cirrhosis: Characterization and Role in Acute-on-Chronic Liver Failure. *Hepatology* **2016**, *64*, 1249–1264. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Juanola, A.; Ma, A.T.; de Wit, K.; Gananandan, K.; Roux, O.; Zaccherini, G.; Jiménez, C.; Tonon, M.; Solé, C.; Villaseca, C.; et al. Novel Prognostic Biomarkers in Decompensated Cirrhosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Gut* **2024**, *73*, 156–165. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Bristianou, M.; Panagou, C.; Adamis, T.; Raftogiannis, M.; Antonopoulou, A.; Chrisofos, M.; Galani, I.; Kanellakopoulou, K.; Tsaganos, T.; Giamarellos-Bourboulis, E.J. The Impact of Multidrug Resistance on the Pathogenicity of *Escherichia Coli*: An Experimental Study. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2008**, *31*, 216–223. [\[CrossRef\]](#)
15. Auger, G.; Corvec, S.; Roquilly, A.; Segain, J.P.; Lepelletier, D.; Reynaud, A.; Asehnoune, K. *Escherichia Coli*-Induced Productions of pro-Inflammatory Cytokines Are Regulated by MAP Kinases and G-Protein but Not by Akt: Relationship with Phylogenetic Groups and Resistance Patterns. *Cytokine* **2011**, *56*, 290–297. [\[CrossRef\]](#)
16. Angeli, P.; Bernardi, M.; Villanueva, C.; Francoz, C.; Mookerjee, R.P.; Trebicka, J.; Krag, A.; Laleman, W.; Gines, P. EASL Clinical Practice Guidelines for the Management of Patients with Decompensated Cirrhosis. *J. Hepatol.* **2018**, *69*, 406–460. [\[CrossRef\]](#)

17. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters 8.1. Available online: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_8.1_Breakpoint_Tables.pdf (accessed on 20 December 2018).
18. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters 9.0. Available online: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_9.0_Breakpoint_Tables.pdf (accessed on 10 December 2019).
19. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters 10.0. Available online: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf (accessed on 12 December 2020).
20. EUCAST Guidelines for Detection of Resistance Mechanisms and Specific Resistances of Clinical and/or Epidemiological Importance. Available online: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf (accessed on 12 December 2020).
21. Sánchez, B.; Arias, S.; Chaignepain, S.; Denayrolles, M.; Schmitter, J.M.; Bressollier, P.; Urdaci, M.C. Identification of Surface Proteins Involved in the Adhesion of a Probiotic *Bacillus Cereus* Strain to Mucin and Fibronectin. *Microbiology* **2009**, *155*, 1708–1716. [CrossRef]
22. Hidalgo-Cantabrana, C.; Lucena-Prieto, M.R.; Moro-García, M.A.; Alonso-Arias, R.; Sánchez, B. Whole Fractions from Probiotic Bacteria Induce In Vitro Th17 Responses in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *J. Funct. Foods* **2018**, *48*, 367–373. [CrossRef]
23. Tabah, A.; Koulenti, D.; Laupland, K.; Misset, B.; Valles, J.; Bruzzi de Carvalho, F.; Paiva, J.A.; Çakar, N.; Ma, X.; Eggimann, P.; et al. Characteristics and Determinants of Outcome of Hospital-Acquired Bloodstream Infections in Intensive Care Units: The EURO-BACT International Cohort Study. *Intensive Care Med.* **2012**, *38*, 1930–1945. [CrossRef]
24. Martin-Loeches, I.; Torres, A.; Rinaudo, M.; Terraneo, S.; de Rosa, F.; Ramirez, P.; Diaz, E.; Fernández-Barat, L.; Li Bassi, G.L.; Ferrer, M. Resistance Patterns and Outcomes in Intensive Care Unit (ICU)-Acquired Pneumonia. Validation of European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) and the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Classification of Multidrug Resistant Organisms. *J. Infect.* **2015**, *70*, 213–222. [CrossRef]
25. Vardakas, K.Z.; Rafailidis, P.I.; Konstantelias, A.A.; Falagas, M.E. Predictors of Mortality in Patients with Infections Due to Multi-Drug Resistant Gram Negative Bacteria: The Study, the Patient, the Bug or the Drug? *J. Infect.* **2013**, *66*, 401–414. [CrossRef] [PubMed]
26. Recker, M.; Laabei, M.; Toleman, M.S.; Reuter, S.; Saunderson, R.B.; Blane, B.; Török, M.E.; Ouadi, K.; Stevens, E.; Yokoyama, M.; et al. Clonal Differences in *Staphylococcus Aureus* Bacteraemia-Associated Mortality. *Nat. Microbiol.* **2017**, *2*, 1381–1388. [CrossRef] [PubMed]
27. Jacob, S.; Jacob, S.A.; Thoppil, J. Targeting Sepsis through Inflammation and Oxidative Metabolism. *World J. Crit. Care Med.* **2025**, *14*, 101499. [CrossRef]
28. Gauba, A.; Rahman, K.M. Evaluation of Antibiotic Resistance Mechanisms in Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics* **2023**, *12*, 1590. [CrossRef]
29. Francés, R.; Zapater, P.; González-Navajas, J.M.; Muñoz, C.; Caño, R.; Moreu, R.; Pascual, S.; Bellot, P.; Pérez-Mateo, M.; Such, J. Bacterial DNA in Patients with Cirrhosis and Noninfected Ascites Mimics the Soluble Immune Response Established in Patients with Spontaneous Bacterial Peritonitis. *Hepatology* **2008**, *47*, 978–985. [CrossRef]
30. Zapater, P.; Francés, R.; González-Navajas, J.M.; de la Hoz, M.A.; Moreu, R.; Pascual, S.; Monfort, D.; Montoliu, S.; Vila, C.; Escudero, A.; et al. Serum and Ascitic Fluid Bacterial DNA: A New Independent Prognostic Factor in Noninfected Patients with Cirrhosis. *Hepatology* **2008**, *48*, 1924–1931. [CrossRef]
31. Frasinariu, O.E.; Ceccarelli, S.; Alisi, A.; Moraru, E.; Nobili, V. Gut-Liver Axis and Fibrosis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: An Input for Novel Therapies. *Dig. Liver Dis.* **2013**, *45*, 543–551. [CrossRef]
32. Hemmi, H.; Takeuchi, O.; Kawai, T.; Kaisho, T.; Sato, S.; Sanjo, H.; Matsumoto, M.; Hoshino, K.; Wagner, H.; Takeda, K.; et al. A Toll-like Receptor Recognizes Bacterial DNA. *Nature* **2000**, *408*, 740–745. [CrossRef]
33. Spohn, R.; Buwitt-Beckmann, U.; Brock, R.; Jung, G.; Ulmer, A.J.; Wiesmüller, K.-H. Synthetic Lipopeptide Adjuvants and Toll-like Receptor 2—Structure–Activity Relationships. *Vaccine* **2004**, *22*, 2494–2499. [CrossRef]
34. Matsuura, M. Structural Modifications of Bacterial Lipopolysaccharide That Facilitate Gram-Negative Bacteria Evasion of Host Innate Immunity. *Front. Immunol.* **2013**, *4*, 109. [CrossRef]
35. Oviedo-Boyso, J.; Bravo-Patiño, A.; Baizabal-Aguirre, V.M. Collaborative Action of Toll-Like and Nod-Like Receptors as Modulators of the Inflammatory Response to Pathogenic Bacteria. *Mediators Inflamm.* **2014**, *2014*, 432785. [CrossRef] [PubMed]
36. Patin, E.; Hasan, M.; Bergstedt, J.; Rouilly, V.; Libri, V.; Urrutia, A.; Alanio, C.; Scepanovic, P.; Hammer, C.; Jönsson, F.; et al. Natural Variation in the Parameters of Innate Immune Cells Is Preferentially Driven by Genetic Factors. *Nat. Immunol.* **2018**, *19*, 302–314. [CrossRef] [PubMed]

37. Kronsten, V.T.; Woodhouse, C.A.; Zamalloa, A.; Lim, T.Y.; Edwards, L.A.; Martinez-Llordella, M.; Sanchez-Fueyo, A.; Shawcross, D.L. Exaggerated Inflammatory Response to Bacterial Products in Decompensated Cirrhotic Patients Is Orchestrated by Interferons IL-6 and IL-8. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2022**, *322*, G489–G499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Arango Duque, G.; Descoteaux, A. Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 491. [[CrossRef](#)]
39. Deshmane, S.L.; Kremlev, S.; Amini, S.; Sawaya, B.E. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J. Interferon. Cytokine Res.* **2009**, *29*, 313–326. [[CrossRef](#)]
40. Carlini, V.; Noonan, D.M.; Abdalalem, E.; Goletti, D.; Sansone, C.; Calabrone, L.; Albin, A. The Multifaceted Nature of IL-10: Regulation, Role in Immunological Homeostasis and Its Relevance to Cancer, COVID-19 and Post-COVID Conditions. *Front. Immunol.* **2023**, *14*, 1161067. [[CrossRef](#)]
41. Guarner, C.; Soriano, G. Bacterial Translocation and Its Consequences in Patients with Cirrhosis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2005**, *17*, 27–31. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

4.2.1 Material suplementari

SUPPLEMENTARY MATERIAL

In Vitro Immune Response of Mononuclear Cells to Multidrug-Resistant *Escherichia coli*

Berta Cuyàs ^{1,2,3}, Elisabet Cantó ⁴, Elisabet Sanchez-Ardid ^{1,3}, Elisenda Miró ^{5,6}, Edilmar Alvarado-Tapias ^{1,2,3}, Eva Román ^{1,2,3}, Maria Poca ^{1,2,3}, Ferran Navarro ^{5,6}, Andreu Ferrero-Gregori ⁴, Maria Àngels Escorsell ^{1,2,3}, Silvia Vidal ⁴, German Soriano ^{1,2,3*}

Table S1. Standardized ratio of cytokine production in response to *E. coli* surface protein extract (a) and DNA extract (b), according to bacterial antibiotic susceptibility. Results are expressed as median (IQR). Normality was assessed with the Shapiro–Wilk test; Student’s t-test or Mann–Whitney test were applied accordingly. *MDR*: multidrug-resistant.

a) Surface protein extract

	IL-1 β	IL-10	IL-12p70	IFN- γ	MCP-1	IL-6	IL-8	MIP-1 α	MIP-1 β
Antibiotic-susceptible <i>E. coli</i>	1.61 (0.48-3.98)	1.33 (0.77-1.92)	1.24 (0.34-2.67)	1.14 (0.14-1.97)	0.34 (-0.45-1.00)	1.09 (0.90-1.19)	1.03 (0.67-1.12)	0.98 (0.79-1.15)	0.96 (0.68-1.10)
MDR <i>E. coli</i>	1.70 (0.24-3.49)	1.16 (0.81-1.69)	0.94 (-0.02-1.42)	0.92 (0.57-2.04)	0.72 (-2.16-1.02)	0.96 (0.87-1.10)	0.90 (0.74-1.05)	0.94 (0.77-1.06)	0.87 (0.71-1.08)
p-value	0.54	0.65	0.31	0.91	0.93	0.20	0.50	0.51	0.95

b) DNA extract

	IL-1 β	IL-10	IL-12p70	IFN- γ	MCP-1	IL-6	IL-8	MIP-1 α	MIP-1 β
Antibiotic-susceptible <i>E. coli</i>	0.63 (0.42-1.28)	0.96 (0.47-2.16)	0.45 (0.06-1.35)	0.52 (0.23-1.19)	0.88 (0.36-2.63)	0.78 (0.50-1.21)	0.78 (0.36-0.95)	0.86 (0.59-1.21)	0.88 (0.54-0.98)
MDR <i>E. coli</i>	0.46 (0.13-0.79)	0.50 (0.13-1.39)	0.44 (0.24-1.45)	-0.37 (-0.37-0.68)	1.34 (0.78-2.37)	0.82 (0.62-1.22)	0.79 (0.55-0.99)	0.82 (0.59-1.20)	0.90 (0.76-0.97)
p-value	0.25	0.19	0.61	0.27	0.44	0.95	0.97	0.95	0.84

Table S2. Absolute concentrations (pg/mL) of cytokine production in response to *E. coli* surface protein extract (a) and DNA extract (b), according to bacterial antibiotic susceptibility. Results are expressed as median (IQR). Normality was assessed with the Shapiro–Wilk test; Student’s t-test or Mann–Whitney test were applied accordingly. *MDR*: multidrug-resistant.

a) Surface protein extract

	IL-1 β	IL-10	IL-12p70	IFN- γ	MCP-1	IL-6	IL-8	MIP-1 α	MIP-1 β
Antibiotic-susceptible <i>E. coli</i>	1756.00 (921.84-3306.32)	372.75 (219.19-520.82)	7.72 (5.99-9.59)	93.89 (45.74-384.82)	1049.16 (868.65-1200.25)	10942.86 (7609.52-14323.81)	108278.90 (78342.86-148628.60)	13950.00 (12200.00-16550.00)	6866.25 (5778.75-8553.75)
MDR <i>E. coli</i>	1549.85 (862.32-2881.91)	385.07 (175.90-519.66)	7.14 (5.93-8.82)	114.13 (51.26-243.72)	964.98 (857.88-1160.71)	14228.57 (8323.81-18323.81)	133485.70 (88914.29-148914.30)	14000.00 (12825.00-15925.00)	7278.75 (5253.75-11066.25)
p-value	0.65	0.98	0.58	1	0.83	0.21	0.28	0.80	0.34

b) DNA extract

	IL-1 β	IL-10	IL-12p70	IFN- γ	MCP-1	IL-6	IL-8	MIP-1 α	MIP-1 β
Antibiotic-susceptible <i>E. coli</i>	1147.02 (892.79-1504.24)	361.26 (94.46-489.94)	7.38 (6.24-8.35)	53.97 (29.50-174.92)	913.74 (819.33-1158.62)	7085.71 (3966.67-13014.29)	100485.72 (71778.41-148200.03)	12200.00 (8300.00-13636.58)	6898.75 (5628.75-7785.00)
MDR <i>E. coli</i>	1267.37 (929.55-1927.82)	253.99 (134.02-403.92)	7.38 (6.56-8.39)	64.73 (33.50-160.46)	938.16 (812.72-1170.84)	13085.71 (5990.48-21514.29)	147843.80 (90771.43-184342.85)	14200.00 (10600.00-16650.00)	7635.00 (6082.16-10241.25)
p-value	0.55	0.98	0.99	0.93	0.55	0.07	0.09	0.14	0.08

Table S3. Standardized ratio of cytokine production in response to *E. coli* surface protein extract (a) and DNA extract (b), according to the site of infection (ascites vs. blood). Results are expressed as median (IQR). Normality was assessed with the Shapiro–Wilk test; Student’s t-test or Mann–Whitney test were applied accordingly.

a) Surface protein extract

	IL-1 β	IL-10	IL-12p70	IFN- γ	MCP-1	IL-6	IL-8	MIP-1 α	MIP-1 β
Ascites	1.61 (0.36–4.85)	1.24 (0.78–1.68)	1.22 (0.44–2.18)	0.96 (0.05–1.93)	0.31 (–0.91–0.97)	1.09 (0.91–1.18)	1.03 (0.71–1.11)	0.95 (0.69–1.14)	0.95 (0.70–1.02)
Blood	1.17 (0.37–3.39)	1.17 (0.82–2.51)	0.98 (0.00–1.79)	1.03 (0.60–2.07)	0.72 (–0.77–1.03)	0.94 (0.79–1.09)	0.92 (0.79–1.08)	0.97 (0.79–1.04)	0.96 (0.72–1.09)
p-value	0.39	0.97	0.39	0.55	0.69	0.09	0.78	0.83	0.77

b) DNA extract

	IL-1 β	IL-10	IL-12p70	IFN- γ	MCP-1	IL-6	IL-8	MIP-1 α	MIP-1 β
Ascites	0.64 (0.20–1.03)	0.89 (–0.09–1.52)	0.53 (0.12–1.75)	0.58 (0.18–0.99)	1.25 (0.44–2.37)	0.82 (0.50–1.18)	0.76 (0.38–0.96)	0.82 (0.41–1.21)	0.75 (0.45–1.00)
Blood	0.46 (0.28–0.91)	0.76 (0.19–2.93)	0.41 (0.13–1.10)	0.39 (0.03–0.96)	1.22 (0.63–2.43)	0.85 (0.61–1.24)	0.81 (0.57–0.98)	0.86 (0.64–1.45)	0.93 (0.84–0.98)
p-value	0.61	0.70	0.62	0.42	0.77	0.74	0.69	0.31	0.24

Table S4. Absolute concentrations (pg/mL) of cytokine production in response to *E. coli* surface protein extract (a) and DNA extract (b), according to the site of infection (ascites vs. blood). Results are expressed as median (IQR). Normality was assessed with the Shapiro–Wilk test; Student’s t-test or Mann–Whitney test were applied accordingly.

a) Surface protein extract

	IL-1 β	IL-10	IL-12p70	IFN- γ	MCP-1	IL-6	IL-8	MIP-1 α	MIP-1 β
Ascites	1195.07 (905.54-1539.05)	307.60 (96.05-496.04)	7.38 (6.72-8.31)	74.19 (29.10-200.45)	897.57 (809.94-1103.92)	6419.05 (3847.62-14276.20)	103200.00 (68057.14-149093.35)	11300.00 (6600.00-15100.00)	6472.50 (5628.75-7822.50)
Blood	1489.94 (912.36-2939.02)	322.11 (202.34-562.47)	7.38 (6.27-8.73)	102.27 (36.58-234.94)	922.07 (795.77-1074.56)	14228.57 (8085.71-18466.67)	124057.10 (86914.29-152628.60)	14300.00 (12325.00-16175.00)	7128.75 (5516.25-10110.00)
p-value	0.87	0.96	0.83	0.54	0.178	0.65	0.53	0.50	0.42

b) DNA extract

	IL-1 β	IL-10	IL-12p70	IFN- γ	MCP-1	IL-6	IL-8	MIP-1 α	MIP-1 β
Ascites	1861.07 (792.28-3032.74)	413.20 (207.01-476.47)	7.38 (5.80-9.07)	93.89 (56.72-322.58)	1077.53 (920.49-1400.00)	11276.19 (7966.67-14728.57)	109771.40 (82914.29-147485.75)	13850.00 (12575.00-16550.00)	7241.25 (5778.75-8478.75)
Blood	1261.04 (904.79-2022.48)	240.11 (175.98-403.98)	7.05 (6.16-8.39)	47.70 (35.57-145.10)	961.39 (831.28-1193.16)	11514.28 (6728.57-17823.81)	148628.55 (91146.17-177128.60)	13550.00 (12225.00-15800.00)	7766.25 (6603.75-10728.75)
p-value	0.38	0.86	0.49	0.59	0.31	0.15	0.23	0.06	0.05

RESUM GLOBAL DELS RESULTATS

5. RESUM GLOBAL DELS RESULTATS

En el primer estudi es va avaluar l'impacte de la pandèmia COVID-19 en el tipus d'infeccions, la incidència d'infeccions nosocomials i la incidència de MDRO en pacients amb cirrosi hospitalitzats entre l'11 de març de 2020 i el 10 de març de 2021, comparant els resultats amb un període de temps pre pandèmia (11 de març de 2019 a 10 de març de 2020).

Durant el període pre pandèmia, 170 pacients van precisar un total de 251 ingressos a causa de descompensacions agudes de la cirrosi (Figura 1 de l'estudi 1). D'entre aquests ingressos, es va detectar una o més infeccions en el moment de l'ingrés i/o es van desenvolupar durant l'hospitalització en 102 de 251 hospitalitzacions (40,6%). Durant el període pandèmia, foren 114 pacients que precisaren 169 ingressos, d'entre els quals es van detectar una o més infeccions en el moment de l'ingrés i/o es van desenvolupar durant l'hospitalització en 74 de 169 hospitalitzacions (43,8%), sense diferències estadísticament significatives respecte al període pre pandèmia ($P=0,52$). Destacà una menor taxa d'ingressos durant el període pandèmia (23,3 (6) vs 15,8 (4,5) ingressos per mes, $P=0,002$].

Pel que fa al nombre d'infeccions per ingrés, es va detectar una infecció per ingrés en 78 ingressos en el grup pre pandèmia (76,5%) i en 61 ingressos en el grup pandèmia (82,4%), dues infeccions per ingrés en 21 ingressos (20,6%) i en 8 (10,8%), respectivament, i tres o més infeccions en 3 ingressos (2,9%) i en 5 (6,8%), respectivament. D'entre els ingressos amb més d'una infecció, almenys una infecció es va diagnosticar en el moment de l'ingrés en 16 de 24 ingressos (66,7%) durant el període pre pandèmia i en 10 de 13 ingressos (76,9%) durant la pandèmia.

En total per tant, es van identificar 131 episodis d'infecció en 102 ingressos en el grup pre pandèmia i 95 episodis d'infecció en 74 ingressos en el grup pandèmia. Aquestes infeccions van ser l'objectiu del primer estudi.

Les principals característiques de les infeccions es recullen a la figura 2a de l'estudi 1. En general, les infeccions més freqüents van ser la PBE, la infecció del tracte urinari i la pneumònia. Durant la pandèmia, en comparació amb el grup pre pandèmia, van

disminuir de manera no significativa la PBE i la pneumònia (22,9% pre pandèmia vs 14,7% en pandèmia i 22,1% vs. 16,8% de totes les infeccions, respectivament) i van augmentar no significativament les infeccions del tracte urinari (22,1% vs 33,7%, respectivament). A destacar que es va produir una disminució no estadísticament significativa de les infeccions per *Clostridioides difficile* durant el període pandèmia (9,2% vs 3,8%).

En referència al lloc d'adquisició de la infecció, en el grup pandèmia el percentatge d'infeccions adquirides a la comunitat va augmentar (35,1% en el període pre pandèmia vs. 48,4% en pandèmia, $P=0,04$) i el percentatge d'infeccions nosocomials va disminuir (37,4% pre pandèmia vs 25,3% en pandèmia, $P=0,06$) tal com es pot veure a la Figura 1b de l'estudi 1. El percentatge d'infeccions associades a l'atenció sanitària es va mantenir similar en ambdós períodes (27,5% pre pandèmia vs 26,3% en pandèmia) Tenint en compte tots els ingressos, la incidència d'infeccions nosocomials va ser inferior durant la pandèmia, però aquesta diferència no va assolir significació estadística [35/251 ingressos (13,9%) en pre pandèmia vs 18/169 ingressos (10,7%) en pandèmia].

Pel què fa als cultius, es va detectar un cultiu microbiològic positiu en 71/131 infeccions (54,2%) en el grup pre pandèmia i en 59/95 infeccions (62,1%) en el grup pandèmia ($P=0,23$). Els tipus de microorganismes es detallen a la Taula complementària 1 de l'estudi 1. Els principals aïllaments foren bacteris gramnegatius en ambdós grups (45,1% en el grup pre pandèmia vs 50,9% en el grup pandèmia). Es va observar un percentatge superior de forma no estadísticament significativa de MDRO entre el total d'infeccions en el període pandèmia [10/131 infeccions en pre pandèmia (7,6%) vs 11/95 infeccions en pandèmia (11,5%), $P=0,31$]. Els tipus d'infeccions relacionades amb MDRO es mostren a la Taula 2 de l'estudi 1, destacant que la majoria foren pels bacils gramnegatius *E. coli* productor de beta-lactamases d'espectre estès (BLEE) i *K. pneumoniae* BLEE, seguits de *P. aeruginosa* multiresistent i *Staphylococcus aureus* resistent a meticil·lina. Durant el període pandèmia es va observar un augment d'infeccions relacionades amb MDRO entre les infeccions nosocomials (Figura 3 de l'estudi 1): 8,2% de les infeccions nosocomials durant el període pre pandèmia foren per MDRO mentre que entre les infeccions nosocomials durant el període pandèmia, 20,8% van ser per MDRO. Tenint en compte tots els ingressos, es va detectar una tendència a una incidència més elevada d'infeccions relacionades amb MDRO durant la pandèmia

(11/169 ingressos, 6,5%) en comparació amb el període pre pandèmia (10/251 ingressos, 4%), $P=0,25$.

En relació a les complicacions durant l'ingrés, no es van observar diferències estadísticament significatives entre els dos grups pel que fa a la incidència de ACLF (15,3% durant el període pre pandèmia vs 12,6% durant la pandèmia, $P=0,57$), xoc sèptic (13,7% vs 9,5%, $P=0,33$), necessitat de ventilació mecànica relacionada amb la infecció (2,3% vs 5,3%, $P=0,28$) i mortalitat als 30 dies (16% vs 11,6%, $P=0,34$).

En el segon estudi, l'objectiu fou determinar si la resposta immunitària in vitro de cèl·lules mononuclears de donants sans davant d'*E. coli* MDR és diferent respecte la que desencadenarien els *E. coli* sensibles a antibiòtics. Aquests *E. coli* es van obtenir de la sang o bé del líquid ascític de pacients amb cirrosi hepàtica infectats i es van processar per tal d'aïllar dos extractes de cadascun dels *E. coli*: l'extracte de proteïnes de superfície i l'extracte d'ADN bacterià. La resposta immunitària es va avaluar mitjançant la determinació de 9 citocines en el sobrenadant, a les 48 hores d'incubació de les cèl·lules amb els *E. coli*: IFN- γ , IL-1 β , IL-10, IL-12p70, MCP-1, IL-4, IL-8, MIP-1 α i MIP-1 β . Aquestes citocines foren seleccionades en base a la seva rellevància clínica en pacients en cirrosi i/o el seu paper en la immunitat innata (50,52,115).

Es van utilitzar 6 *E. coli* MDR i 6 *E. coli* sensibles a antibiòtics de pacients amb cirrosi, així com un *E. coli* de referència (ATCC® 25922) del laboratori, i es van aïllar l'extracte de proteïnes de superfície i l'extracte d'ADN bacterià de tots ells. Amb aquests extractes, es van estimular in vitro les cèl·lules mononuclears de 8 donants sans diferents. A la taula 1 de l'estudi 2 es descriuen les característiques clíniques dels pacients amb cirrosi dels quals es van obtenir els *E. coli*. Dels 6 *E. coli* MDR, 4 foren causants de bacterièmia i 2 de PBE, mentre que d'entre els 6 *E. coli* sensibles, foren 2 i 4 respectivament, sense diferències estadístiques. Les infeccions nosocomials es van associar exclusivament als *E. coli* MDR.

Vam comparar la producció de les citocines davant d'*E. coli* MDR i d'*E. coli* sensibles als antibiòtics mitjançant el test de t de Student i el test de Mann-Whitney (Figura 1 i Taules S1 i S2 dels Materials Suplementaris). Hi va haver una gran variabilitat però no es van

detectar diferències estadísticament significatives en la producció de cap citocina entre les soques MDR i les sensibles.

L'anàlisi de regressió lineal multivariable va confirmar aquest resultat i va revelar que la producció de citocines es veia significativament influenciada pels diferents donants sans, tal com s'observa a la Taula 2 de l'estudi 2. Concretament, els nivells d'IL-1 β , IL-10, IL-12p70, MCP-1, IL-8, MIP-1 α i MIP-1 β en cultius estimulats amb extractes de proteïnes de superfície van mostrar diferències estadísticament significatives entre els diferents donants sans. De la mateixa manera, hi van haver diferències estadísticament significatives entre els diferents donants sans en la producció d'IFN- γ , IL-1 β , IL-10, IL-12p70, IL-8, IL-6, MIP-1 α i MIP-1 β en cultius estimulats amb extractes d'ADN bacterià. No es van observar diferències significatives entre els donants sans pel que fa als nivells d'IFN- γ i IL-6 en resposta als extractes de superfície, ni tampoc en els nivells de MCP-1 en resposta als extractes d'ADN.

Per tal d'aprofundir en aquests resultats, es van generar diagrames de volcà per representar els resultats de l'anàlisi de regressió lineal multivariable amb la correcció de Bonferroni (Figures 2 i 3 de l'estudi 2). En aquests diagrames es representen els coeficients i els valors de P per a la producció de citocines entre les soques sensibles i MDR, així com entre els diferents donants sans. Els coeficients indiquen la magnitud de la diferència entre l'*E. coli* sensible i el MDR (punt taronja del gràfic) i entre un donant i un altre donant (cercles blancs). Els $-\log_{10}$ (valor P) majors de 1,3 corresponen a un valor de $P < 0.05$ (indicat a la figura amb la línia vermella discontinua), per tant, indiquen significació estadística. Per exemple, en la Figura 2 de l'estudi 2, pel que fa a IL-1 β , el donant J va mostrar un patró de producció de citocines diferent de la resta de donants. Per a IL-10, el donant G és el que es va comportar més diferent dels altres. En canvi, no es van observar diferències significatives entre cap dels donants pel que fa a IFN- γ .

Finalment, es va estudiar si el tipus d'infecció (bacterièmia vs PBE), i en conseqüència el lloc d'aïllament bacterià, influïa en la resposta immunitària. No es van observar diferències significatives en la producció de citocines segons la procedència de l'*E. coli* (ascites vs. sang) tal com es detalla a la Figura 4 i Taules S3 i S4 dels Materials Suplementaris de l'estudi 2.

RESUM GLOBAL DE LA DISCUSSIÓ

6. RESUM GLOBAL DE LA DISCUSSIÓ

La present tesi doctoral neix de la necessitat d'aprofundir en el coneixement de les infeccions en els pacients amb cirrosi hepàtica, un col·lectiu especialment vulnerable per la seva disfunció immunitària (50) i per l'elevada exposició al sistema sanitari i els procediments invasius. Les infeccions en aquests pacients s'associen a pitjor pronòstic i són causa d'ACLF i mortalitat (38). Paral·lelament, la resistència antimicrobiana s'ha convertit en una creixent amenaça per la salut pública a nivell mundial (116), amb especial impacte en poblacions amb malalties cròniques com la cirrosi. En aquest context, el primer estudi de la present tesi se centrà en avaluar com la pandèmia COVID-19 i les mesures de contenció implementades afectaren la incidència i el tipus d'infeccions en pacients amb cirrosi, amb especial èmfasi en les infeccions causades per MDRO.

Entre els pacients amb cirrosi, destaca *E. coli* BLEE com a principal agent causant d'infeccions per MDRO. Tenint en compte el pitjor pronòstic d'aquestes i la importància de la resposta immunitària en el pronòstic dels pacients amb cirrosi, ens vàrem plantejar si aquesta resposta era diferent en front els *E. coli* BLEE en comparació amb les soques sensibles als antibiòtics. Per aquest motiu, el segon estudi es va dissenyar per avaluar la resposta immunitària que produeixen *in vitro* les soques d'*E. coli* MDR comparant-la amb aquella que indueixen les soques d'*E. coli* sensibles a antimicrobians.

6.1. Estudi 1

Aquest és el primer estudi exhaustiu que analitza l'impacte de la pandèmia de la COVID-19 en la incidència i el tipus d'infeccions en pacients amb cirrosi hospitalitzats fora de les UCI. Els resultats d'aquest primer estudi evidencien que durant la pandèmia hi va haver una incidència similar d'infeccions respecte el període pre pandèmia, però amb una tendència a una menor incidència d'infeccions nosocomials i una major incidència d'infeccions per MDRO. El principal agent causant de MDRO fou *E. coli* BLEE, tal com també s'ha descrit en estudis previs en pacients amb cirrosi (41).

Durant la pandèmia de la COVID-19, per tal d'evitar la propagació del SARS-CoV-2 es van implementar i reforçar mesures estrictes que també es recomanen des de fa temps per

prevenir les infeccions en general i particularment aquelles per MDRO, com per exemple una millor higiene de mans, l'ús de bates de protecció o l'aïllament físic, entre d'altres (117). Tot i que es podia haver esperat que aquestes mesures dirigides a evitar l'expansió del SARS-CoV-2 repercutissin en una menor incidència de determinades infeccions bacterianes (118), com per exemple les nosocomials o les causades per MDRO, no es va observar una reducció significativa de la incidència global d'infeccions en pacients amb cirrosi hospitalitzats en comparació amb el període prepandèmia, si bé sí que es va identificar una tendència no significativa a menys infeccions nosocomials. Aquesta disminució d'infeccions nosocomials coincideix amb els resultats d'un estudi en pacients amb cirrosi ingressats a les UCIs dels Estats Units (113), així com amb un altre que avaluava les infeccions en una unitat de neurocirurgia de la Xina (119), i podria estar reflectint l'impacte positiu de les mesures preventives implementades als hospitals per combatre la pandèmia. En aquest sentit, un estudi italià va avaluar l'efecte d'un programa específic de prevenció d'infeccions en pacients amb cirrosi hospitalitzats abans de la pandèmia per COVID-19 (77). Aquest programa incloïa la reducció de pacients per habitació i major distància entre ells, la milloria de la higiene de mans i ús d'antisèptics, la retirada precoç de sondes urinàries, la limitació dels procediments invasius dins del possible, tècniques de cultiu microbià més ràpides, aïllament dels pacients amb infeccions per MDRO així com un ús racional d'antibiòtics. Van aconseguir reduir significativament la taxa d'infeccions nosocomials un 50% així com la incidència d'infeccions per MDRO. No obstant, durant la pandèmia per COVID-19 tot i mantenir les mesures ja implementades i afegir-ne d'altres més estrictes, van observar una tendència no estadísticament significativa a un augment d'infeccions nosocomials.

En aquesta mateixa línia, durant el primer i segon any de la pandèmia, la National Healthcare Safety Network dels Estats Units va descriure un augment de les infeccions associades a l'atenció sanitària, especialment aquelles relacionades amb dispositius mèdics com els catèters venosos i urinaris, i els respiradors (120,121). Una possible explicació és que, paral·lelament a les pràctiques destinades a prevenir i controlar la propagació del SARS-CoV-2, l'atenció mèdica i d'infermeria habitual es va veure compromesa per la sobrecàrrega dels sistemes sanitaris, que atenien major volum de pacients, més greus, i amb menys recursos materials i humans. En aquest sentit, la

priorització de la COVID-19 podria haver compromès els programes habituals de prevenció d'infeccions nosocomials, fet que hauria pogut provocar un augment d'aquest tipus d'infeccions com descriu l'estudi de la National Healthcare Safety Network i altres estudis (120–123). De fet, en el present estudi es va observar un augment estadísticament no significatiu d'infeccions del tracte urinari durant la pandèmia, en consonància amb altres autors (113,119). Aquest augment podria estar relacionat amb una cura deficitària dels catèters urinaris a causa de la pressió sobre els sistemes sanitaris. També vam observar una disminució no significativa de la PBE i de les infeccions de les vies respiratòries baixes. Això últim es podria explicar per les mesures implementades per reduir la transmissió per contacte i per aerosols (119). Respecte la PBE, tenint en compte el seu mecanisme fisiopatològic (translocació bacteriana patològica) estaria poc influïda per les mesures implementades (77).

La baixa taxa d'infeccions per COVID-19 en el nostre estudi durant la pandèmia pot explicar-se pel fet que tots els pacients diagnosticats amb COVID-19 van ser ingressats a àrees específiques de COVID-19 i no s'han inclòs en aquest estudi. Els tres pacients diagnosticats amb COVID-19 nosocomial durant la pandèmia ho van ser durant l'hospitalització a la Unitat d'Hepatologia.

En línia amb altres estudis, es va observar una disminució en les taxes d'infecció per *C. difficile* durant la pandèmia (120–122,124), probablement per l'adopció de les mesures preventives generals en context de la pandèmia, més enllà de l'ús de solucions hidroalcohòliques, a les quals les espores de *C. difficile* són resistents.

Pel que fa a les infeccions per MDRO, tot i mantenir una incidència global baixa (4% en el grup pre pandèmia i 6,5% en el grup pandèmia), es va observar un augment tant entre les infeccions comunitàries com entre les nosocomials durant la pandèmia, en concordança amb el que han reportat altres autors (125). Aquest patró contrasta amb altres estudis que van descriure una disminució de les infeccions per MDRO durant la pandèmia, com Park *et al.* (menor taxa de MRSA i BLEEs en pacients amb cirrosi ingressats a les UCI) (113), Bentivegna *et al.* (menor taxa de MDRO en població general a Roma) (126) i Lo *et al.* i Cole *et al.* a Taiwan i als Estats Units, respectivament (reducció dels MDRO entre les infeccions nosocomials) (127,128). Les diferències observades

entre centres i països podrien estar relacionades amb variacions en les polítiques d'ús d'antibiòtics, les polítiques de prevenció i control d'infeccions i les poblacions estudiades. De fet, la baixa incidència de MDRO en el present estudi en comparació amb estudis previs (41,48,129) és una troballa rellevant, tant en el període pre pandèmia com durant la pandèmia, que podria explicar-se pel fet que incloguéssim exclusivament pacients ingressats a la sala d'hospitalització convencional de la Unitat d'Hepatologia del nostre centre, que no disposa de programa de trasplantament hepàtic, i a que no es van incloure els pacients ingressats a la UCI. La majoria dels estudis publicats que descriuen taxes d'infeccions per MDRO més elevades en pacients amb cirrosi provenen de dades de centres trasplantadors i/o de sèries que inclouen pacients ingressats a les UCI (37,41,48). Aquestes diferències podrien explicar la major incidència d'infeccions per MDRO en comparació amb l'observada en aquest estudi. En aquest sentit, en el nostre estudi Torras *et al.* han observat recentment una major incidència d'infeccions per MDRO en pacients amb cirrosi ingressats en hospitals que disposen de trasplantament hepàtic que en centres no trasplantadors (114). La major pressió antibiòtica i la major instrumentalització en els centres trasplantadors explicarien aquestes diferències.

Durant la pandèmia, la taxa d'ingrés hospitalari va ser estadísticament inferior, però els pacients que van ingressar ho van fer amb una pitjor funció hepàtica basal, suggerint que els pacients van demorar la cerca d'atenció mèdica per por a exposar-se al SARS-CoV-2 i/o per reduir la pressió sobre el sistema sanitari. A destacar també que es va detectar un augment significatiu en l'etiologia alcohòlica de la cirrosi i en el nombre de dones hospitalitzades en la pandèmia, en consonància amb l'augment del consum d'alcohol descrit en la població general durant aquest període i a una major susceptibilitat als efectes de l'alcohol en les dones (130). En consonància amb aquestes dades, alguns estudis informen d'una disminució general en la taxa d'ingressos hospitalaris per patologies no relacionades amb la COVID-19 durant la pandèmia (131) i altres estudis destaquen que la taxa d'ingrés per esdeveniments hepàtics relacionats amb l'alcohol va augmentar (132,133).

Aquestes observacions posen de manifest la complexitat de l'impacte de la pandèmia sobre la salut de pacients crònics, com els pacients amb cirrosi hepàtica, i reforcen la necessitat de mantenir i individualitzar les estratègies de prevenció i vigilància,

especialment pel que fa a les infeccions nosocomials, sobre tot les relacionades amb procediments invasius com sondes vesicals i vies venoses, i les resistències antimicrobianes. És fonamental monitoritzar aquestes resistències a cada centre per tal d'adaptar la teràpia antibiòtica empírica a les resistències locals i personalitzar-la segons les característiques específiques de cada pacient. Això permet evitar l'ús innecessari de determinats antibiòtics d'ampli espectre, i per tant contribuir a reduir tant el desenvolupament de noves resistències bacterianes com els efectes secundaris i el cost sanitari (91).

La principal limitació d'aquest estudi és en primer lloc el seu disseny retrospectiu, que podria haver introduït biaixos. En segon lloc, només es van analitzar dos períodes de temps d'un any (l'any anterior a la pandèmia i el primer any de pandèmia), fet que per una banda va permetre mostrar millor l'impacte de la pandèmia sobre les infeccions però alhora va determinar que la mostra fos relativament petita, fet que podria haver contribuït a la manca de significació estadística en algunes diferències observades entre els dos períodes. Finalment, no es van incloure pacients amb cirrosi ingressats per COVID-19 ja que aleshores ingressaven a les unitats específiques de COVID-19 i no a la Unitat d'Hepatologia, de manera que no es disposa de dades sobre els seus possibles episodis d'infecció. Tampoc es van incloure els pacients ingressats a la UCI, en els que el perfil de resistències bacterianes segurament va ser diferent, però per altra banda això ens ha permès constatar la baixa incidència d'infeccions per MDRO en els pacients que no ingressen a la UCI.

6.2. Estudi 2

Per tal d'ampliar el coneixement en infeccions multiresistents i en línia amb el fet que *E. coli* BLEE va ser el principal bacteri multiresistent causant d'infeccions en el primer estudi, en el segon estudi vàrem estudiar si la resposta immunitària que desencadenen els *E. coli* BLEE és diferent de la que produeixen els *E. coli* sensibles a antibiòtics. Per fer-ho, es va avaluar la resposta immunitària a través d'un panell de citocines inflamatòries. Els resultats evidencien que la producció *in vitro* de citocines (IFN- γ , IL-1 β , IL-10, IL-12p70, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6 i IL-8) per cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMC) de donants sans estimulats amb *E. coli* de pacients amb cirrosi infectats és

similar entre els *E. coli* MDR i els *E. coli* sensibles. Destacà una important variabilitat interindividual en la resposta immunològica entre els diferents donants sans.

Com ja s'ha comentat, les infeccions per MDRO s'associen a pitjor pronòstic, incloent major mortalitat (134,135), especialment en pacients amb cirrosi hepàtica (38,73). Tradicionalment, aquesta pitjor evolució clínica s'ha atribuït al retard en l'inici del tractament antibiòtic adequat (48,73,136), factors intrínsecs de l'hoste (137) i als factors de virulència bacteriana (138). No obstant, també s'ha suggerit que un factor que també podria influir en el pronòstic fos una possible diferència en la resposta immunitària davant de bacteris MDR, tot i que els estudis publicats mostren resultats contradictoris (92,93). Bristianou *et al.* van estudiar la producció precoç de citocines per part de monòcits humans de donants sans estimulats per *E. coli* obtingut de l'orina de dones amb pielonefritis aguda (92). Van observar una major producció de TNF, IL-6 i IL-8 per *E. coli* MDR que per les soques sensibles. En canvi, Auger *et al.* van trobar que les soques d'*E. coli* BLEE aïllades d'orina o sang incubades amb sang completa de donants sans van induir nivells significativament més baixos de TNF- α i IL-1 β que les soques sensibles (93). Aquesta discrepància entre els dos estudis es va atribuir a l'ús de sang completa a l'estudi d'Auger *et al.* enlloc de només monòcits en l'estudi de Bristianou *et al.*

En l'estudi 2 vam seleccionar una bateria de citocines a causa de la seva rellevància clínica en pacients amb cirrosi (50,52,115) i/o el seu paper en la resposta immunitària innata, que era el nostre objectiu d'estudi. Aquesta bateria incloïa IFN- γ , IL-1 β , IL-10, IL-12p70, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6 i IL-8. El principal resultat de l'estudi 2 és que no vam trobar diferències estadísticament significatives en la producció de cap d'elles entre les soques MDR d'*E. coli* i les sensibles. Tampoc en la producció d'IL-6 i IL-8, citocines proinflamatòries amb rellevància pronòstica en la cirrosi (52,115). Aquests resultats suggereixen que una diferent resposta immunitària no seria el principal factor responsable del pitjor pronòstic associat a les infeccions per MDRO, sinó que és més probable que aquesta pitjor evolució es degui a factors com ara endarreriments en el tractament antibiòtic adequat (48,73) o un pitjor estat basal del pacient. Per altra banda, les nostres dades no recolzarien l'ús d'una modulació immunitària específica per *E. coli* MDR com a potencial estratègia terapèutica per a la sèpsia causada per aquests bacteris (139). Tanmateix, cal recordar que les nostres són dades *in vitro* i limitades a *E. coli* i per

tant no permeten descartar la possibilitat de la utilitat de la modulació immunitària terapèutica *in vivo* o en infeccions per altres bacteris MDRO diferents d'*E. coli*.

A diferència d'estudis previs que van utilitzar el bacteri complet (92,93), en el present estudi vam analitzar per separat dos components específics d'*E. coli* (les proteïnes de superfície i l'ADN bacterià). Aquesta decisió es fonamentà en que si bé els principals mecanismes de resistència als antibiòtics es localitzen en l'embolcall bacterià i poden activar les vies TLR 2 i TLR 4 (140), l'ADN bacterià també pot induir una resposta immunitària a través de la via TLR 9 (97,99,141,142). En l'embolcall bacterià trobem com a mecanismes de resistència antimicrobiana els enzims inactivadors com les carbapenemases i les BLEE (els *E. coli* MDR utilitzats a l'estudi 2 eren tots productors de BLEE), les modificacions de porines de la membrana externa, l'increment de l'activitat de les bombes d'eflux i alteracions dels llocs diana dels antibiòtics, com la regió lípid A del LPS (140). L'ADN bacterià, en particular el que conté seqüències CpG, pot induir també una resposta immunitària (100,101). Malgrat aquest enfocament de separar els dos components, no es van observar diferències en la resposta immunitària segons la resistència bacteriana davant cap dels dos components bacterians. Tanmateix, cal considerar que els bacteris sencers poden activar simultàniament múltiples PRR, generant una resposta sinèrgica més potent (143). Així doncs, futurs estudis que comparin bacteris complets amb els seus components aïllats podrien aportar nova informació sobre la complexa interacció entre els mecanismes de resistència i la immunoactivació.

Els pacients amb cirrosi presenten una gran heterogeneïtat pel que fa a les alteracions immunològiques, historial d'infeccions, gravetat de la insuficiència hepàtica, comorbiditats i tractaments farmacològics. En aquest estudi, per tal d'evitar la variabilitat clínica pròpia de la cirrosi i els possibles factors de confusió, es van utilitzar PBMC de donants sans, una població teòricament més homogènia. Tot i així, es va observar una elevada variabilitat interindividual en la producció de citocines, que estaria relacionada amb el paper dels polimorfismes genètics i els factors ambientals en la modulació de les vies inflammatòries (144). De fet, Patin *et al.* demostraren que la immunitat innata estava fortament influenciada per diversos loci genètics mentre que factors ambientals com el tabaquisme, l'edat, el sexe i la infecció latent per

citomegalovirus influencien principalment en la immunitat adaptativa (144). Aquesta variabilitat interindividual caldria tenir-la en compte a l'hora de dissenyar i interpretar estudis sobre la resposta immunitària en qualsevol població. D'altra banda, els resultats obtinguts en el present estudi en PBMC de donants sans potser no es podrien extrapolar a PBMC de pacients amb cirrosi. De fet, s'ha descrit una resposta exagerada *in vitro* als productes bacterians en pacients amb cirrosi comparats amb controls sans, particularment en la producció d'interferons, IL-6, IL-8, IL-1 β , TNF- α , IP-10 i IL-10 (102).

Les citocines amb la producció més elevada van ser IL-1 β davant d'extractes de proteïnes de superfície i IL-10 i MCP-1 davant d'extractes d'ADN. Mentre que IL-1 β és una citocina proinflamatòria que inicia i amplifica la resposta inflamatòria (145) i MCP-1 una quimiocina que promou el reclutament de monòcits i altres leucòcits (146), IL-10 és una citocina reguladora amb funció antiinflamatòria que protegeix l'hoste una resposta immunitària descontrolada i perjudicial (145) si bé en certes condicions també pot actuar com a immunoestimuladora (147).

Finalment, el lloc d'aïllament d'*E. coli* (líquid ascític vs sang) no es va relacionar significativament amb la resposta immunitària *in vitro*. Aquesta observació és coherent amb la fisiopatologia comuna de la PBE i la bacterièmia espontània en la cirrosi, caracteritzada per la translocació bacteriana patològica per part de bacteris intestinals (148).

Aquest estudi presenta limitacions. En primer lloc, el nombre de soques bacterianes estudiades és limitat, però la intenció va ser reproduir un complex escenari clínic *ex vivo* amb soques aïllades de pacients amb cirrosi infectats i permetre l'anàlisi d'una bateria completa de citocines. Segon, enlloc d'utilitzar la sang d'un únic donant per a tots els experiments es van utilitzar PBMC de múltiples donants. Això va introduir major variabilitat però alhora va permetre augmentar la generalització dels nostres resultats. L'anàlisi de regressió lineal multivariable va permetre controlar aquest possible biaix i posar de manifest la important variabilitat individual en la resposta immunitària. Tercer, les PBMC es van obtenir de donants sans enlloc de pacients amb cirrosi, proporcionant un enfocament preliminar i establint una base per a futurs estudis amb PBMC de pacients amb cirrosi, que poden presentar respostes diferents donada la disfunció immunitària que els caracteritza (102). Quart, les PBMC es van incubar durant 48 hores

per avaluar la resposta immunitària innata però no es van dur a terme estudis cinètics per veure l'evolució temporal des de les primeres hores. Per últim, es van utilitzar dues tècniques diferents de quantificació de citocines donada la saturació d'algunes d'elles al multiplex; si bé aquest fet va introduir variabilitat, va permetre avaluar un major nombre de citocines.

CONCLUSIONS

7. CONCLUSIONS

Tenint en compte els objectius ja descrits, les conclusions dels estudis d'aquesta tesi doctoral són les següents:

- La incidència d'infeccions en pacients amb cirrosi hospitalitzats i la seva taxa de complicacions fou similar entre el període pre pandèmia i la pandèmia COVID-19, amb una tendència a la disminució de les infeccions nosocomials durant la pandèmia, probablement per les mesures d'higiene i control de la transmissió adoptades per la COVID-19.
- La incidència d'infeccions per MDRO fou en general baixa al nostre estudi, probablement per no incloure pacients ingressats a la UCI i per no ser el nostre un centre amb trasplantament hepàtic, però va tendir a augmentar durant la pandèmia, destacant la necessitat de mantenir els protocols de vigilància i prevenció d'infeccions i un ús racional dels antibiòtics fins i tot en situacions de crisi sanitària. Cal adaptar els tractaments antibiòtics als perfils de resistències de cada centre i personalitzar-los segons les característiques específiques de cada pacient.
- Durant la pandèmia es va observar un augment no significatiu de les infeccions urinàries, possiblement per una atenció subòptima dels catèters urinaris a causa de la pressió sobre el sistema sanitari, mentre que es van reduir no significativament les PBE i també les infeccions respiratòries i la infecció per *C. difficile*, aquestes probablement per les mesures de control durant la pandèmia.
- La producció de citocines *in vitro* per part de PBMC de donants sans no difereix entre soques d'*E. coli* MDR i sensibles a antibiòtics aïllades de pacients amb cirrosi, suggerint que la pitjor evolució clínica associada a les infeccions per MDRO podria atribuir-se més a factors com el retard en el tractament antibiòtic adequat o l'estat basal del pacient, que a una resposta immunitària diferent. Tampoc s'observen diferències entre soques d'*E. coli* aïllades de sang o ascites.
- S'observa una gran variabilitat interindividual en la resposta immunitària entre els donants sans, evidenciant la influència dels factors genètics i ambientals en la modulació de la resposta inflamatòria. Aquesta variabilitat és un aspecte clau a considerar en el disseny i la interpretació de futurs estudis que avaluïn la resposta immunitària, no només en pacients amb cirrosi sinó també en altres poblacions.

FUTURES LÍNIES D'INVESTIGACIÓ

8. FUTURES LÍNIES D'INVESTIGACIÓ

A partir d'aquesta tesi doctoral, es plantegen diverses futures línies d'investigació orientades a aprofundir en el coneixement sobre les infeccions per bacteris MDRO, especialment en pacients amb cirrosi.

Per una banda, donats els canvis constants en les multiresistències al llarg del temps es proposa un nou estudi observacional prospectiu i multicèntric que permeti comparar infeccions nosocomials i infeccions adquirides a la comunitat en pacients amb cirrosi, avaluar la prevalença d'infeccions per bacteris MDRO, i analitzar factors predictors d'infecció i mortalitat, fora del context pandèmic per tal de conèixer millor la situació actual. També seria interessant comparar unitats de cures intensives i no intensives, per tal d'individualitzar i adequar les mesures de prevenció i el tractament empíric recomanat a l'entorn de cada pacient.

A més, caldria estudiar el canvi en el perfil demogràfic, clínic i social dels pacients amb cirrosi, arran de l'increment d'ingressos per causa alcohòlica i el major nombre de dones detectats en el present estudi.

D'altra banda, s'obre una línia per comparar la resposta immunitària de PBMC de persones sanes amb les de pacients amb cirrosi, incloent-hi l'anàlisi cinètica de la producció de citocines ja que es podrien observar diferències en fases més precoces de la resposta immunitària.

Seria interessant aprofundir en l'estudi de la variabilitat interindividual observada en la producció de citocines, explorant factors genètics, ambientals i la composició i funcions de la microbiota. Es planteja també comparar la resposta als diferents components bacterians amb la resposta a bacteris sencers, i fer la seqüenciació genòmica de les soques d'*E. coli* i identificar factors de virulència associats a la resposta immunitària o a la gravetat clínica. Altres línies serien estendre l'estudi a altres patògens multiresistents incloent bacteris grampositius, que es troben en augment en els darrers anys entre els pacients amb cirrosi.

Aquestes línies futures contribuirien a consolidar i ampliar els resultats de la tesi, afavorint una millor comprensió i gestió de les infeccions per bacteris MDRO en pacients amb cirrosi.

BIBLIOGRAFIA

9. BIBLIOGRAFIA

1. Ginès P, Krag A, Abraldes JG, Solà E, Fabrellas N, Kamath PS. Liver cirrhosis. *Lancet*. 2021 Oct;398(10308):1359–76.
2. Åberg F, Jiang ZG, Cortez-Pinto H, Männistö V. Alcohol-associated liver disease—Global epidemiology. *Hepatology*. 2024 Dec;80(6):1307–22.
3. Huang DQ, Terrault NA, Tacke F, Gluud LL, Arrese M, Bugianesi E, et al. Global epidemiology of cirrhosis — aetiology, trends and predictions. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2023;20(6):388–98.
4. Devarbhavi H, Asrani SK, Arab JP, Nartey YA, Pose E, Kamath PS. Global burden of liver disease: 2023 update. *J Hepatol*. 2023 Aug;79(2):516–37.
5. Wong MCS, Huang JLW, George J, Huang J, Leung C, Eslam M, et al. The changing epidemiology of liver diseases in the Asia-Pacific region. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019 Jan 29;16(1):57–73.
6. Sepanlou SG, Safiri S, Bisignano C, Ikuta KS, Merat S, Saberifiroozi M, et al. The global, regional, and national burden of cirrhosis by cause in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2020 Mar 1;5(3):245–66.
7. Griffin C, Agbim U, Ramani A, Shankar N, Kanwal F, Asrani SK. Underestimation of Cirrhosis-Related Mortality in the Medicare Eligible Population, 1999–2018. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2023 Jan;21(1):223–225.e3.
8. Pimpin L, Cortez-Pinto H, Negro F, Corbould E, Lazarus J V., Webber L, et al. Burden of liver disease in Europe: Epidemiology and analysis of risk factors to identify prevention policies. *J Hepatol*. 2018 Sep;69(3):718–35.
9. The Global Health Observatory. Global health estimates: Leading causes of death. WHO. 2023. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death>
10. Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, Kamath PS. Burden of liver diseases in the world. *J Hepatol*. 2019 Jan;70(1):151–71.
11. Jepsen P, Younossi ZM. The global burden of cirrhosis: A review of disability-adjusted life-years lost and unmet needs. *J Hepatol*. 2021 Jul;75:S3–S13.
12. D’Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: A systematic review of 118 studies. *J Hepatol*. 2006 Jan;44:217–31.
13. D’Amico G, Bernardi M, Angeli P. Towards a new definition of decompensated cirrhosis. *J Hepatol*. 2022 Jan;76(1):202–7
14. D’Amico G, Morabito A, D’Amico M, Pasta L, Malizia G, Rebora P, et al. Clinical states of cirrhosis and competing risks. *J Hepatol*. 2018 Mar;68(3):563–76
15. Bruno S, Saibeni S, Bagnardi V, Vandelli C, De Luca M, Felder M, et al. Mortality Risk According to Different Clinical Characteristics of First Episode of Liver Decompensation

- in Cirrhotic Patients: A Nationwide, Prospective, 3-Year Follow-Up Study in Italy. *Am J Gastroenterol*. 2013 Jul;108(7):1112–22.
16. D'Amico G, Pasta L, Morabito A, D'Amico M, Caltagirone M, Malizia G, et al. Competing risks and prognostic stages of cirrhosis: a 25-year inception cohort study of 494 patients. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014 May 24;39(10):1180–93.
 17. Ning Y, Zou X, Xu J, Wang X, Ding M, Lu H. Impact of acute kidney injury on the risk of mortality in patients with cirrhosis: a systematic review and meta-analysis. *Ren Fail*. 2022 Dec 31;44(1):1934–47.
 18. Tariq R, Hadi Y, Chahal K, Reddy S, Salameh H, Singal AK. Incidence, Mortality and Predictors of Acute Kidney Injury in Patients with Cirrhosis: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Clin Transl Hepatol*. 2020 May 25;8(2):135–42.
 19. Arvaniti V, D'Amico G, Fede G, Manousou P, Tsochatzis E, Pleguezuelo M, et al. Infections in Patients With Cirrhosis Increase Mortality Four-Fold and Should Be Used in Determining Prognosis. *Gastroenterology*. 2010 Oct;139(4):1246–1256.e5.
 20. D'Amico G, Zipprich A, Villanueva C, Sordà JA, Morillas RM, Garcovich M, et al. Further decompensation in cirrhosis: Results of a large multicenter cohort study supporting Baveno VII statements. *Hepatology*. 2024 Apr;79(4):869–81.
 21. de Franchis R. Evolving Consensus in Portal Hypertension Report of the Baveno IV Consensus Workshop on methodology of diagnosis and therapy in portal hypertension. *J Hepatol*. 2005 Jul;43(1):167–76.
 22. Zipprich A, Garcia-Tsao G, Rogowski S, Fleig WE, Seufferlein T, Dollinger MM. Prognostic indicators of survival in patients with compensated and decompensated cirrhosis. *Liver Int*. 2012 Oct;32(9):1407–14.
 23. Jalan R, D'Amico G, Trebicka J, Moreau R, Angeli P, Arroyo V. New clinical and pathophysiological perspectives defining the trajectory of cirrhosis. *J Hepatol*. 2021;75:S14–26.
 24. Moreau R, Jalan R, Gines P, Pavesi M, Angeli P, Cordoba J, et al. Acute-on-Chronic Liver Failure Is a Distinct Syndrome That Develops in Patients With Acute Decompensation of Cirrhosis. *Gastroenterology*. 2013 Jun;144(7):1426-1437.e9.
 25. Trebicka J, Fernandez J, Papp M, Caraceni P, Laleman W, Gambino C, et al. PREDICT identifies precipitating events associated with the clinical course of acutely decompensated cirrhosis. *J Hepatol*. 2021 May;74(5):1097–108.
 26. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024 May 4;74(3):229–63.
 27. Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, Singal AG, Pikarsky E, Roayaie S, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;21;7(1):6.
 28. Gracia-Sancho J, Marrone G, Fernández-Iglesias A. Hepatic microcirculation and mechanisms of portal hypertension. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019 Apr 19;16(4):221–34.

29. Gracia-Sancho J, Caparrós E, Fernández-Iglesias A, Francés R. Role of liver sinusoidal endothelial cells in liver diseases. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021 Jun 15;18(6):411–31.
30. Engelmann C, Clària J, Szabo G, Bosch J, Bernardi M. Pathophysiology of decompensated cirrhosis: Portal hypertension, circulatory dysfunction, inflammation, metabolism and mitochondrial dysfunction. *J Hepatol*. 2021 Jul;75:S49–66.
31. Martin PY, Ginès P, Schrier RW. Nitric Oxide as a Mediator of Hemodynamic Abnormalities and Sodium and Water Retention in Cirrhosis. *N Eng J Med*. 1998 Aug 20;339(8):533–41.
32. Ginès P, Solà E, Angeli P, Wong F, Nadim MK, Kamath PS. Hepatorenal syndrome. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 Sep 13;4(1):23.
33. Kaur H, Premkumar M. Diagnosis and Management of Cirrhotic Cardiomyopathy. *J Clin Exp Hepatol*. 2022 Jan;12(1):186–99.
34. Bosch J, Berzigotti A, Garcia-Pagan JC, Abraldes JG. The management of portal hypertension: Rational basis, available treatments and future options. *J Hepatol*. 2008;48:S68–92.
35. Nomura F, Ohnishi K, Terabayashi H, Nakai T, Isobe K, Takekoshi K, et al. Effect of intrahepatic portal-systemic shunting on hepatic ammonia extraction in patients with cirrhosis. *Hepatology*. 1994 Dec;20(6):1478–81.
36. Arroyo V, Angeli P, Moreau R, Jalan R, Clària J, Trebicka J, et al. The systemic inflammation hypothesis: Towards a new paradigm of acute decompensation and multiorgan failure in cirrhosis. *J Hepatol*. 2021 Mar;74(3):670–85.
37. Fernández J, Piano S, Bartoletti M, Wey EQ. Management of bacterial and fungal infections in cirrhosis: The MDRO challenge. *J Hepatol*. 2021 Jul;75 Suppl 1:S101–17.
38. Piano S, Bunchorntavakul C, Marciano S, Rajender Reddy K. Infections in cirrhosis. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2024 Aug;9(8):745–57.
39. Schmidt ML, Barritt AS, Orman ES, Hayashi PH. Decreasing Mortality Among Patients Hospitalized With Cirrhosis in the United States From 2002 Through 2010. *Gastroenterology*. 2015 May;148(5):967–977.e2.
40. Foreman MG, Mannino DM, Moss M. Cirrhosis as a Risk Factor for Sepsis and Death. *Chest*. 2003 Sep;124(3):1016–20.
41. Fernández J, Acevedo J, Weist R, Gustot T, Amoros A, Deulofeu C, et al. Bacterial and fungal infections in acute-on-chronic liver failure: prevalence, characteristics and impact on prognosis. *Gut*. 2018;67(10):1870–80.
42. Hoefs JC, Ruyon BA. Spontaneous bacterial peritonitis. *Disease-a-Month*. 1985 Sep;31(9):1–48.
43. Such J, Runyon BA. Spontaneous Bacterial Peritonitis. *Clin Infect Dis*. 1998 Oct;27(4):669–74.
44. Wiest R, Garcia-Tsao G. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology*. 2005 Mar;41(3):422–33.

45. Piano S, Tonon M, Angeli P. Changes in the epidemiology and management of bacterial infections in cirrhosis. *Clin Mol Hepatol*. 2021 Jul;27(3):437–45.
46. Bajaj JS, Kamath PS, Reddy KR. The Evolving Challenge of Infections in Cirrhosis. *N Engl J Med*. 2021 Jun 17;384(24):2317–30.
47. Dotson KM, Aitken SL, Sofjan AK, Shah DN, Aparasu RR, Garey KW. Outcomes associated with *Clostridium difficile* infection in patients with chronic liver disease. *Epidemiol Infect*. 2018 Jul;146(9):1101–5.
48. Fernández J, Prado V, Trebicka J, Amoros A, Gustot T, Wiest R, et al. Multidrug-resistant bacterial infections in patients with decompensated cirrhosis and with acute-on-chronic liver failure in Europe. *J Hepatol*. 2019 Mar;70(3):398–411.
49. Albillos A, Lario M, Álvarez-Mon M. Cirrhosis-associated immune dysfunction: Distinctive features and clinical relevance. *J Hepatol*. 2014 Dec;61(6):1385–96.
50. Albillos A, Martín-Mateos R, der Merwe S, Wiest R, Jalan R, Álvarez-Mon M. Cirrhosis-associated immune dysfunction. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2022 Feb;19(2):112–34.
51. Gao B, Jeong WI, Tian Z. Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology*. 2008 Feb;47(2):729–36.
52. Clària J, Stauber RE, Coenraad MJ, Moreau R, Jalan R, Pavesi M, et al. Systemic inflammation in decompensated cirrhosis: Characterization and role in acute-on-chronic liver failure. *Hepatology*. 2016 Oct;64(4):1249–64.
53. Bernsmeier C, Pop OT, Singanayagam A, Triantafyllou E, Patel VC, Weston CJ, et al. Patients With Acute-on-Chronic Liver Failure Have Increased Numbers of Regulatory Immune Cells Expressing the Receptor Tyrosine Kinase MERTK. *Gastroenterology*. 2015 Mar;148(3):603–615.e14.
54. Arroyo V, García-Martínez R, Salvatella X. Human serum albumin, systemic inflammation, and cirrhosis. *J Hepatol*. 2014 Aug;61(2):396–407.
55. Albillos A, de Gottardi A, Rescigno M. The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy. *J Hepatol*. 2020 Mar;72(3):558–77.
56. Caballero-Flores G, Pickard JM, Núñez G. Microbiota-mediated colonization resistance: mechanisms and regulation. *Nat Rev Microbiol*. 2023 Jun;21(6):347–60.
57. Lynch S V., Pedersen O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N Engl J Med*. 2016 Dec 15;375(24):2369–2379.
58. Santiago A, Pozuelo M, Poca M, Gely C, Nieto JC, Torras X, et al. Alteration of the serum microbiome composition in cirrhotic patients with ascites. *Sci Rep*. 2016 Apr 26;6(1):25001.
59. Solé C, Guilly S, Da Silva K, Llopis M, Le-Chatelier E, Huelin P, et al. Alterations in Gut Microbiome in Cirrhosis as Assessed by Quantitative Metagenomics: Relationship With Acute-on-Chronic Liver Failure and Prognosis. *Gastroenterology*. 2021 Jan 1;160(1):206–218.e13.
60. Gill N, Włodarska M, Finlay BB. Roadblocks in the gut: barriers to enteric infection. *Cell Microbiol*. 2011 May;13(5):660–9.

61. Assimakopoulos SF, Tsamandas AC, Tsiaoussis GI, Karatza E, Triantos C, Vagianos CE, et al. Altered intestinal tight junctions' expression in patients with liver cirrhosis: a pathogenetic mechanism of intestinal hyperpermeability. *Eur J Clin Invest*. 2012 Apr 24;42(4):439–46.
62. Appenrodt B, Grünhage F, Gentemann MG, Thyssen L, Sauerbruch T, Lammert F. Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2) variants are genetic risk factors for death and spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis. *Hepatology*. 2010 Apr;51(4):1327–33.
63. Nischalke HD, Berger C, Aldenhoff K, Thyssen L, Gentemann M, Grünhage F, et al. Toll-like receptor (TLR) 2 promoter and intron 2 polymorphisms are associated with increased risk for spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis. *J Hepatol*. 2011 Nov;55(5):1010–6.
64. Reiberger T, Ferlitsch A, Payer BA, Mandorfer M, Heinisch BB, Hayden H, et al. Non-selective betablocker therapy decreases intestinal permeability and serum levels of LBP and IL-6 in patients with cirrhosis. *J Hepatol*. 2013 May;58(5):911–21.
65. Gäbele E, Mühlbauer M, Paulo H, Johann M, Meltzer C, Leidl F, et al. Analysis of monocyte chemotactic protein-1 gene polymorphism in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *World J Gastroenterol*. 2009;15(44):5558.
66. Lutz P, Berger C, Langhans B, Grünhage F, Appenrodt B, Nattermann J, et al. A farnesoid X receptor polymorphism predisposes to spontaneous bacterial peritonitis. *Dig Liver Dis*. 2014 Nov;46(11):1047–50.
67. Alvarado-Tapias E, Guarner-Argente C, Oblitas E, Sánchez E, Vidal S, Román E, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and bacterial infections in patients with cirrhosis and ascites. *World J Hepatol*. 2018 Jan 27;10(1):124–33.
68. Nieto JC, Sánchez E, Román E, Vidal S, Oliva L, Guarner-Argente C, et al. Cytokine production in patients with cirrhosis and TLR4 polymorphisms. *World J Gastroenterol*. 2014 Dec 14;20(46):17516–24.
69. Mahmud N, Serper M, Taddei TH, Kaplan DE. The Association Between Proton Pump Inhibitor Exposure and Key Liver-Related Outcomes in Patients With Cirrhosis: A Veterans Affairs Cohort Study. *Gastroenterology*. 2022 Jul;163(1):257–269.e6.
70. Bajaj JS, Ananthakrishnan AN, Hafeezullah M, Zadornova Y, Dye A, McGinley EL, et al. *Clostridium difficile* Is Associated With Poor Outcomes in Patients With Cirrhosis: A National and Tertiary Center Perspective. *Am J Gastroenterol*. 2010 Jan;105(1):106–13.
71. Bunchorntavakul C, Reddy KR. Review article: malnutrition/sarcopenia and frailty in patients with cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2020 Jan 8;51(1):64–77.
72. Román E, Parramón M, Flavià M, Gely C, Poca M, Gallego A, et al. Frailty in outpatients with cirrhosis: A prospective observational study. *Liver Int*. 2021 Feb 29;41(2):357–68.
73. Piano S, Singh V, Caraceni P, Maiwall R, Alessandria C, Fernandez J, et al. Epidemiology and Effects of Bacterial Infections in Patients With Cirrhosis Worldwide. *Gastroenterology*. 2019 Apr 1;156(5):1368–1380.e10.

74. Angeli P, Bernardi M, Villanueva C, Francoz C, Mookerjee RP, Trebicka J, et al. EASL Clinical Practice Guidelines for the management of patients with decompensated cirrhosis. *J Hepatol*. 2018 Aug 1;69(2):406–60.
75. de Franchis R, Bosch J, Garcia-Tsao G, Reiberger T, Ripoll C, Abraldes JG, et al. Baveno VII – Renewing consensus in portal hypertension. *J Hepatol*. 2022 Apr;76(4):959-974
76. Juncu S, Minea H, Lungu A, Jucan A, Avram R, Buzuleac AM, et al. Fluoroquinolones for the Prophylaxis of Spontaneous Bacterial Peritonitis in Patients with Liver Cirrhosis: Are They Losing Ground? *Life*. 2025 Apr 2;15(4):586.
77. Di Cola S, Gazda J, Lapenna L, Ceccarelli G, Merli M. Infection prevention and control programme and COVID-19 measures: Effects on hospital-acquired infections in patients with cirrhosis. *JHEP Reports*. 2023 May 1;5(5).
78. Martin-Mateos R, González-Alonso R, Álvarez-Díaz N, Muriel A, Gaetano-Gil A, Donate Ortega J, et al. Granulocyte-colony stimulating factor in acute-on-chronic liver failure: Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Gastroenterol Hepatol*. 2023 May;46(5):350–9.
79. Gehrke N, Hövelmeyer N, Waisman A, Straub BK, Weinmann-Menke J, Wörns MA, et al. Hepatocyte-specific deletion of IL1-RI attenuates liver injury by blocking IL-1 driven autoinflammation. *J Hepatol*. 2018 May;68(5):986–95.
80. Singh V, Khurana A, Allawadhi P, Banothu AK, Bharani KK, Weiskirchen R. Emerging Role of PD-1/PD-L1 Inhibitors in Chronic Liver Diseases. *Front Pharmacol*. 2021 Dec 23;12.
81. Basavaraju M, Gunashree BS. *Escherichia coli*: An Overview of Main Characteristics. In: *Escherichia coli - Old and New Insights*. IntechOpen; 2023.
82. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004 Feb;2(2):123–40.
83. Poolman JT, Wacker M. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*, a Common Human Pathogen: Challenges for Vaccine Development and Progress in the Field. *J Infect Dis*. 2016 Jan 1;213(1):6–13.
84. Sora VM, Meroni G, Martino PA, Soggiu A, Bonizzi L, Zecconi A. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Virulence Factors and Antibiotic Resistance. *Pathogens*. 2021 Oct 20;10(11):1355.
85. Pakbin B, Brück WM, Rossen JWA. Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review. *Int J Mol Sci*. 2021 Sep 14;22(18):9922.
86. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Jan 7;8(1):26–38.
87. Murray CJL, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*. 2022 Feb;399(10325):629–55.
88. World Health Organization. WHO bacterial priority pathogens list, 2024: bacterial pathogens of public health importance, to guide research, development, and strategies to prevent and control antimicrobial resistance.

- <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/376776/9789240093461-eng.pdf?sequence=1> (últim accés 19 de juny de 2025).
89. Schinas G, Skintzi K, De Lastic AL, Rodi M, Gogos C, Mouzaki A, et al. Patterns, Cost, and Immunological Response of MDR vs. Non MDR-Bacteremia: A Prospective Cohort Study. *Pathogens*. 2023 Aug 15;12(8):1044.
 90. Wang X, Liu Y, Ding Y, Li M, Gao Y, Li T. Disease spectrum of patients with hospital-acquired multidrug-resistant organism infections in the intensive care unit: a retrospective study. *Front Microbiol*. 2025 May 19;16.
 91. Ho CS, Wong CTH, Aung TT, Lakshminarayanan R, Mehta JS, Rauz S, et al. Antimicrobial resistance: a concise update. *Lancet Microbe*. 2025 Jan;6(1):100947.
 92. Bristianou M, Panagou C, Adamis T, Raftogiannis M, Antonopoulou A, Chrisofos M, et al. The impact of multidrug resistance on the pathogenicity of *Escherichia coli*: an experimental study. *Int J Antimicrob Agents*. 2008 Mar;31(3):216–23.
 93. Auger G, Corvec S, Roquilly A, Segain JP, Lepelletier D, Reynaud A, et al. *Escherichia coli*-induced productions of pro-inflammatory cytokines are regulated by MAP kinases and G-protein but not by Akt: Relationship with phylogenetic groups and resistance patterns. *Cytokine*. 2011 Nov;56(2):290–7.
 94. Naik P, Joseph J. Difference in Host Immune response to Methicillin-Resistant and Methicillin Sensitive *Staphylococcus aureus* (MRSA and MSSA) Endophthalmitis. *Ocul Immunol Inflamm*. 2022 Jul 4;30(5):1044–54.
 95. Naik P, Singh S, Vishwakarma S, Kaur I, Dave VP, Kumar A, et al. Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Evokes Differential Inflammatory Responses in Human Microglial and Retinal Pigment Epithelial Cells. *Microorganisms*. 2020 May 14;8(5):735.
 96. Yuan S, Shen Y, Quan Y, Gao S, Zuo J, Jin W, et al. Molecular mechanism and application of emerging technologies in study of bacterial persisters. *BMC Microbiol*. 2024 Nov 16;24(1):480.
 97. Matsuura M. Structural Modifications of Bacterial Lipopolysaccharide that Facilitate Gram-Negative Bacteria Evasion of Host Innate Immunity. *Front Immunol*. 2013;4.
 98. Chen S, Lei Q, Zou X, Ma D. The role and mechanisms of gram-negative bacterial outer membrane vesicles in inflammatory diseases. *Front Immunol*. 2023 Jun 16;14:1157813.
 99. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 2000 Dec;408(6813):740–5.
 100. Francés R, Zapater P, González-Navajas JM, Muñoz C, Caño R, Moreu R, et al. Bacterial DNA in patients with cirrhosis and noninfected ascites mimics the soluble immune response established in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology*. 2008 Mar;47(3):978–85.
 101. Zapater P, Francés R, González-Navajas JM, de la Hoz MA, Moreu R, Pascual S, et al. Serum and ascitic fluid bacterial DNA: A new independent prognostic factor in noninfected patients with cirrhosis. *Hepatology*. 2008 Dec;48(6):1924–31.

102. Kronsten VT, Woodhouse CA, Zamalloa A, Lim TY, Edwards LA, Martinez-Llordella M, et al. Exaggerated inflammatory response to bacterial products in decompensated cirrhotic patients is orchestrated by interferons IL-6 and IL-8. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2022 May 1;322(5):G489-99
103. Solé C, Solà E, Morales-Ruiz M, Fernández G, Huelin P, Graupera I, et al. Characterization of Inflammatory Response in Acute-on-Chronic Liver Failure and Relationship with Prognosis. *Sci Rep*. 2016 Aug 31;6:32341
104. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020 Feb 20;382(8):727-33.
105. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020> (Últim accés: 12 d'abril de 2025).
106. Agencia Estatal Boletín Oficial del Estado. Real Decreto 463/2020, de 14 de marzo, por el que se declara el estado de alarma para la gestión de la situación de crisis sanitaria ocasionada por el COVID-19. 2020. <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2020-3692>. (Últim accés: 14 d'abril de 2025).
107. World Health Organization. Statement on the Fifteenth Meeting of the International Health Regulations (2005) Emergency Committee Regarding the Coronavirus Disease (COVID-19) Pandemic. 2023. [https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-\(covid-19\)-pandemic?adgroupsurvey=%7Badgroupsurvey%7D%26gclid=EAlaIqobChMI4Ojtsdbe_glVjQRyCh07igt4EAAYASACEgJ9pFD_BwE%26fbclid=IwAR2M8EAYiSrAodhK9p-X582nHkP2AigpSX8pYIsLsPwqYh4SG26RGokGe7E](https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-(covid-19)-pandemic?adgroupsurvey=%7Badgroupsurvey%7D%26gclid=EAlaIqobChMI4Ojtsdbe_glVjQRyCh07igt4EAAYASACEgJ9pFD_BwE%26fbclid=IwAR2M8EAYiSrAodhK9p-X582nHkP2AigpSX8pYIsLsPwqYh4SG26RGokGe7E). (Últim accés: 20 de maig de 2024).
108. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias. Actualización no 672. Enfermedad por el coronavirus (COVID-19). 2023. https://www.sanidad.gob.es/areas/alertasEmergenciasSanitarias/alertasActuales/nCov/documentos/Actualizacion_672_COVID-19.pdf?utm_source=chatgpt.com. (Últim accés 20 de juny de 2025).
109. Chow EJ, Uyeki TM, Chu HY. The effects of the COVID-19 pandemic on community respiratory virus activity. *Nat Rev Microbiol*. 2023 Mar;21(3):195-210
110. Parrón I, Carol M, Bes N, Izquierdo C, Godoy P, Barrabeig I, et al. The impact of COVID-19 pandemic on the incidence of acute gastroenteritis outbreaks in Catalonia (Spain). *Epidemiol Infect*. 2024 Dec 11;152:e10.
111. Langford BJ, So M, Raybardhan S, Leung V, Soucy JPR, Westwood D, et al. Antibiotic prescribing in patients with COVID-19: rapid review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect*. 2021 Apr;27(4):520-31.
112. Marjot T, Moon AM, Cook JA, Abd-Elsalam S, Aloman C, Armstrong MJ, et al. Outcomes following SARS-CoV-2 infection in patients with chronic liver disease: An international registry study. *J Hepatol*. 2021 Mar 1;74(3):567-77.

113. Park D, Houston K, Duong NK, Dharia N, Kamath PS, Bajaj JS. Reduction in Nosocomial Infections in Patients With Cirrhosis During the COVID-19 Era Compared with Pre-COVID-19: Impact of Masking and Restricting Visitation. *Am J Gastroenterol*. 2022 Nov;117(11):1874–6.
114. Torras C, Bañares J, Martí-Carretero A, Acin V, Pagès L, Gutiérrez-Rios L, et al. Comparison of Bacterial Infections in Patients With Cirrhosis Between Hospitals With and Without Liver Transplant in Catalonia. *Liver Int*. 2025 May 11;45(5):e70076
115. Juanola A, Ma AT, de Wit K, Gananandan K, Roux O, Zaccherini G, et al. Novel prognostic biomarkers in decompensated cirrhosis: a systematic review and meta-analysis. *Gut*. 2024 Jan;73(1):156–65.
116. Naghavi M, Vollset SE, Ikuta KS, Swetschinski LR, Gray AP, Wool EE, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. *The Lancet*. 2024 Sep;404(10459):1199–226.
117. WHO. Global action plan on antimicrobial resistance. Geneva: World Health Organization, 2015. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241509763>
118. Cassell K, Zipfel CM, Bansal S, Weinberger DM. Trends in non-COVID-19 hospitalizations prior to and during the COVID-19 pandemic period, United States, 2017–2021. *Nat Commun*. 2022 Dec 1;13(1).
119. Pan SJ, Hou Y, Yang YP, Wang GG, Chen XY, Qian WY, et al. Relationship between nosocomial infections and coronavirus disease 2019 in the 88: clinical characteristics and outcomes from a Chinese Tertiary-Care Hospital. *BMC Infect Dis*. 2022 Nov 11;22(1):836.
120. Lastinger LM, Alvarez CR, Kofman A, Konnor RY, Kuhar DT, Nkwata A, et al. Continued increases in the incidence of healthcare-associated infection (HAI) during the second year of the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2023 Jun;44(6):997-1001
121. Weiner-Lastinger LM, Pattabiraman V, Konnor RY, Patel PR, Wong E, Xu SY, et al. The impact of coronavirus disease 2019 (COVID-19) on healthcare-associated infections in 2020: A summary of data reported to the National Healthcare Safety Network. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2022 Jan 3;43(1):12–25.
122. Baker MA, Sands KE, Huang SS, Kleinman K, Septimus EJ, Varma N, et al. The Impact of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) on Healthcare-Associated Infections. *Clin Infect Dis*. 2022 May 30;74(10):1748–54.
123. Rawson TM, Moore LSP, Castro-Sanchez E, Charani E, Davies F, Satta G, et al. COVID-19 and the potential long-term impact on antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2020 Jul 1;75(7):1681–4.
124. Bentivegna E, Alessio G, Spuntarelli V, Luciani M, Santino I, Simmaco M, et al. Impact of COVID-19 prevention measures on risk of health care-associated *Clostridium difficile* infection. *Am J Infect Control*. 2021 May 1;49(5):640–2.
125. Jeon K, Jeong S, Lee N, Park MJ, Song W, Kim HS, et al. Impact of COVID-19 on Antimicrobial Consumption and Spread of Multidrug-Resistance in Bacterial Infections. *Antibiotics*. 2022 Apr 1;11(4):535

126. Bentivegna E, Luciani M, Arcari L, Santino I, Simmaco M, Martelletti P. Reduction of Multidrug-Resistant (MDR) Bacterial Infections during the COVID-19 Pandemic: A Retrospective Study. *Int J Environ Res Public Health*. 2021 Jan 23;18(3):1003
127. Lo SH, Lin CY, Hung CT, He JJ, Lu PL. The impact of universal face masking and enhanced hand hygiene for COVID-19 disease prevention on the incidence of hospital-acquired infections in a Taiwanese hospital. *Int J Infect Dis*. 2021 Mar;104:15-8.
128. Cole J, Barnard E. The impact of the COVID-19 pandemic on healthcare acquired infections with multidrug resistant organisms. *Am J Infect Control*. 2021 May 1;49(5):653–4.
129. Fernández J, Acevedo J, Castro M, Garcia O, Rodríguez De Lope C, Roca D, et al. Prevalence and risk factors of infections by multiresistant bacteria in cirrhosis: a prospective study. *Hepatology*. 2012 May;55(5):1551-61.
130. Barbosa C, Cowell AJ, Dowd WN. Alcohol Consumption in Response to the COVID-19 Pandemic in the United States. *J Addict Med*. 2021 Jul;15(4):341–4.
131. Bodilsen J, Nielsen PB, Sogaard M, Dalager-Pedersen M, Speiser LOZ, Yndigegn T, et al. Hospital admission and mortality rates for non-covid diseases in Denmark during covid-19 pandemic: Nationwide population based cohort study. *The BMJ*. 2021 May 24;373.
132. Shaheen AA, Kong K, Ma C, Doktorchik C, Coffin CS, Swain MG, et al. Impact of the COVID-19 Pandemic on Hospitalizations for Alcoholic Hepatitis or Cirrhosis in Alberta, Canada. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2022 May 1;20(5):e1170–9.
133. Gonzalez HC, Zhou Y, Nimri FM, Rupp LB, Trudeau S, Gordon SC. Alcohol-related hepatitis admissions increased 50% in the first months of the COVID-19 pandemic in the USA. *Liver Int*. 2022 Apr 24;42(4):762–4.
134. Martin-Loeches I, Torres A, Rinaudo M, Terraneo S, de Rosa F, Ramirez P, et al. Resistance patterns and outcomes in intensive care unit (ICU)-acquired pneumonia. Validation of European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) and the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) classification of multidrug resistant organisms. *J Infect*. 2015 Mar;70(3):213-22.
135. Tabah A, Koulenti D, Laupland K, Misset B, Valles J, Bruzzi de Carvalho F, et al. Characteristics and determinants of outcome of hospital-acquired bloodstream infections in intensive care units: the EUROBACT International Cohort Study. *Intensive Care Med*. 2012 Dec;38(12):1930–45.
136. Song KH, Jeon JH, Park WB, Park SW, Kim H Bin, Oh MD, et al. Clinical outcomes of spontaneous bacterial peritonitis due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species: A retrospective matched case-control study. *BMC Infect Dis*. 2009 Apr 12;9:41.
137. Vardakas KZ, Rafailidis PI, Konstantelias AA, Falagas ME. Predictors of mortality in patients with infections due to multi-drug resistant Gram negative bacteria: The study, the patient, the bug or the drug? *J Infect*. 2013 May;66(5):401–14.

138. Recker M, Laabei M, Toleman MS, Reuter S, Saunderson RB, Blane B, et al. Clonal differences in *Staphylococcus aureus* bacteraemia-associated mortality. *Nat Microbiol*. 2017;2(10):1381–8.
139. Jacob S, Jacob SA, Thoppil J. Targeting sepsis through inflammation and oxidative metabolism. *World J Crit Care Med*. 2025 Mar 9;14(1).
140. Gauba A, Rahman KM. Evaluation of Antibiotic Resistance Mechanisms in Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics*. 2023 Nov;12(11):1590.
141. Frasinariu OE, Ceccarelli S, Alisi A, Moraru E, Nobili V. Gut-liver axis and fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: An input for novel therapies. *Dig Liver Dis*. 2013 Jul;45(7):543–51.
142. Spohn R, Buwitt-Beckmann U, Brock R, Jung G, Ulmer AJ, Wiesmüller KH. Synthetic lipopeptide adjuvants and Toll-like receptor 2—structure–activity relationships. *Vaccine*. 2004 Jun;22(19):2494–9.
143. Oviedo-Boyso J, Bravo-Patiño A, Baizabal-Aguirre VM. Collaborative Action of Toll-Like and Nod-Like Receptors as Modulators of the Inflammatory Response to Pathogenic Bacteria. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:1–16.
144. Patin E, Hasan M, Bergstedt J, Rouilly V, Libri V, Urrutia A, et al. Natural variation in the parameters of innate immune cells is preferentially driven by genetic factors. *Nat Immunol*. 2018;19(3):302–14.
145. Arango Duque G, Descoteaux A. Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. *Front Immunol*. 2014 Oct 7;5.
146. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J Interferon Cytokine Res*. 2009 Jun;29(6):313–26.
147. Carlini V, Noonan DM, Abdalalem E, Goletti D, Sansone C, Calabrone L, et al. The multifaceted nature of IL-10: regulation, role in immunological homeostasis and its relevance to cancer, COVID-19 and post-COVID conditions. *Front Immunol*. 2023 Jun 8;14:1161067
148. Guarner C, Soriano G. Bacterial translocation and its consequences in patients with cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2005;17(1):27–31.

ANNEXES

10. ANNEXES

10.1. Annex I: Resolució del Comitè d'Ètica



Sant Antoni Ma Claret, 167 · 08025 Barcelona
Tel. 93 291 90 00 · Fax 93 291 94 27
e-mail: santpau@santpau.cat
www.santpau.cat

DICTAMEN DEL COMITÈ DE ÈTICA DE LA INVESTIGACIÓ CON MEDICAMENTOS

Dña Milagros Alonso Martínez, Secretaria del Comitè Ètic de Investigació con Medicamentos de la Fundació de Gestió Sanitària del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona,

CERTIFICA

Que este Comitè ha evaluado la propuesta del promotor, para que se realice el estudio:

TÍTULO: Estudio de la respuesta inmune de las células del líquido ascítico frente a bacterias multirresistentes en pacientes con cirrosis.			
PROMOTOR: INSTITUT DE RECERCA HSCSP			
CÓDIGO	Nº EudraCT	VERSIÓN	Ref. HSCSP
IIBSP-RES-2018-91	NO PROCEDE	1. Fecha: 28/09/18.	18/314 (OTROS)
Hoja de información al participante y consentimiento informado, versión: 1. Fecha: 28/09/2018			

Y considera que:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, teniendo en cuenta los beneficios esperados.
- La capacidad de los investigadores y las instalaciones y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como el plan de reclutamiento de los sujetos.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.

Por tanto este CEIm acepta que dicho estudio sea realizado en el **Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona)** por el investigador principal G. SORIANO PASTOR.

Lo que firmo en Barcelona, a 30 de enero de 2019.

FUNDACIÓ DE GESTIÓ SANITÀRIA DE
L'HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU
COMITÈ ÈTIC D'INVESTIGACIÓ CLÍNICA

Dra. Milagros Alonso Martínez



Sant Antoni Ma Claret, 167 · 08025 Barcelona
 Tel. 93 291 90 00 · Fax 93 291 94 27
 e-mail: santpau@santpau.cat
 www.santpau.cat

DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS

Dña Milagros Alonso Martínez, Secretaria del Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos de la Fundació de Gestió Sanitària del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona,

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la **modificación** propuesta por el promotor, al estudio abajo referenciado:

TÍTULO: Estudio de la respuesta inmune frente a bacterias multirresistentes en pacientes con cirrosis.		
PROMOTOR: INSTITUT DE RECERCA HSCSP		
CÓDIGO	Nº EudraCT	Ref. HSCSP
IIBSP-RES-2018-91	NO PROCEDE	18/314(OTROS)

Consistente en:

Modificación relevante Nº 1

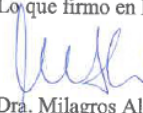
Protocolo versión: 2, fecha: 05/05/2020.

HIP/CI versión: 2, fecha: 05/05/2020.

Y emite: **INFORME FAVORABLE**

SANT PAU

Lo que firmo en Barcelona, a 10 de junio de 2020.


 Dra. Milagros Alonso Martínez

COMITÈ D'ÈTICA D'INVESTIGACIÓ
 AMB MEDICAMENTS (CEIm)

10.2. Annex II: Comunicacions en congressos relacionades amb la tesi

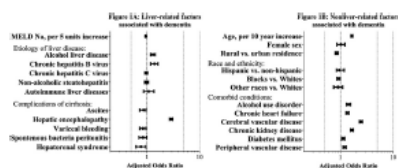
10.2.1. Comunicació 1:

Berta Cuyàs; Anna Huerta; Maria Poca; Edilmar Alvarado; Anna Brujats ; Eva Román; Carlos Guarner Aguilar; Àngels Escorsell; Germán Soriano. *Impact of the COVID-19 pandemic on the incidence and type of infections in hospitalized patients with cirrhosis. The International Liver Congress 2022. Londres. 22 al 26 de juny de 2022. Comunicació pòster. J Hepatol 2022 vol. 77(S1), S900*

POSTER PRESENTATIONS

comorbid illnesses, cirrhosis etiology, and cirrhosis complications (all defined by ICD-10-CM codes).

Results: The cohort included 71,552 veterans with cirrhosis, who were mostly men (96.2%) with a median age of 65.7 years (IQR 61–70). Ten percent ($n = 7,295$) of the overall cohort had a diagnosis code of dementia overall, which increased to 12.4% among patients ≥ 65 years. Dementia was significantly associated with age (adjusted odds ratio and 95% confidence interval, AOR per 10-years: 1.64 [1.58–1.71]), white race (1.09 [1.01, 1.16]), urban residence (1.19 [1.11, 1.27]), alcohol-related cirrhosis (1.30 [1.18–1.44]), hepatitis B (1.39 [1.18–1.62]), alcohol use disorder (1.42 [1.29–1.6]), cerebral vascular disease, peripheral vascular disease, diabetes, chronic kidney disease, and chronic heart failure, and negatively associated with MELD-Na (0.95 [0.92–0.95]/5 points) in multivariate logistic regression (Figures 1A and 1B). Dementia was significantly positively associated with HE (2.87 [2.68–3.08]), but negatively associated with other cirrhosis complications in these models.



Conclusion: Diagnostic codes for dementia were found in 10% of Veterans with cirrhosis and most strongly associated with HE, but not other complications of cirrhosis. Furthermore, alcohol use disorder along with cardiovascular risk factors were associated with dementia, but not NASH itself. Further research is needed to determine strategies to differentiate between HE and dementia and manage this population with specific needs to prevent burden on families, patients and VHA system.

SATS19

Bacterial infections as a predisposing factor for the development of portal vein thrombosis in cirrhotic patients: a prospective study

Leonardo De Marco¹, Filippo Cattazzo¹, Michele Bevilacqua¹, Anna Mantovani¹, Andrea Dalbeni¹, David Sacerdoti¹. ¹Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata Verona, Medicina interna C/Liver Unit, Verona, Italy

Email: leonardo.demarco93@gmail.com

Background and aims: Non-malignant portal vein thrombosis (PVT) is one of the complications of liver cirrhosis. The predisposing factors for PVT in cirrhotic patients are not entirely clear. The aim of this study was to identify possible clinical risk factors related to the development of PVT in patients with liver cirrhosis.

Method: We prospectively collected data of 229 consecutive cirrhotic patients followed in our Liver Unit in Verona, enrolled from 2017 to 2020 with a median follow-up of 3.3 years. PVT was determined by ultrasound, computer tomography and/or magnetic resonance imaging. Malignant PVT was considered an exclusion criteria.

Results: Of the 229 patients with liver cirrhosis 26 (11%) developed non-malignant PVT. 17 (65%) were male, with a mean age of 67.3 ± 12.3 y. In patients with non-neoplastic PVT compared to the remaining population, we observed that the prevalence of bacterial infections (sepsis, pneumonia, urinary tract infections, cholangitis, gastroenteritis, bacteraemia, spontaneous bacterial peritonitis) that required hospitalization was significantly higher (50% vs 27.2%; $p = 0.017$). In the multivariate logistic regression analysis, when adjusted for age, sex, type 2 diabetes mellitus and chronic kidney disease, PVT was significantly and independently associated with bacterial

infections (OR 2.72 [95% CI 1, 12 to 6.57; $p = 0.026$]) and hepatocellular carcinoma (HCC) (OR 2.87 [95% CI 1.11 to 7.41; $p = 0.029$]).

Conclusion: Our study showed that bacterial infections requiring hospitalization in patients with liver cirrhosis could be a predisposing factor for the development of PVT. Further studies will be needed to confirm this evidence.

SATS20

Impact of the COVID-19 pandemic on the incidence and type of infections in hospitalized patients with cirrhosis

Berta Cuyàs¹, Anna Huerta¹, Maria Poca^{1,2}, Edilmar Alvarado-Tapias^{1,2}, Anna Brujats¹, Eva Roman^{1,2,3}, Carlos Guarner^{1,2}, Àngels Escorsell^{1,2}, German Soriano^{1,2}. ¹Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, UAB, Gastroenterology, Barcelona, Spain; ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERHD), Spain; ³School of Nursing EU-Sant Pau, Spain

Email: gsoriano@santpau.cat

Background and aims: Infections are a major cause of morbidity and mortality in patients with cirrhosis, especially those caused by multiresistant bacteria. Restrictive measures implemented due to the COVID-19 pandemic have changed hospital protocols; social distancing, hand washing, personal protective equipments. This situation may have changed the incidence and types of infections in patients with cirrhosis during the pandemic. We aimed to compare the infections in patients with cirrhosis hospitalized before the COVID-19 pandemic versus those hospitalized during the pandemic.

Method: We retrospectively analysed the infections in patients with cirrhosis hospitalized in the Gastroenterology department at a high complexity hospital, during the pre-pandemic period (3/2019–2/2020) and during the pandemic (3/2020–2/2021). Baseline characteristics, type of infections, type of bacteria, multiresistance and mortality were evaluated.

Results: A total of 421 episodes of hospitalization were analysed: 252 pre-pandemic and 169 during the pandemic (mean number of hospitalizations/month 21.0 ± 5.2 vs 14.1 ± 3.8 , $p = 0.001$). Patients' baseline MELD was lower in the pre-pandemic group (9 ± 3.7 vs 12 ± 5 , $p < 0.001$). A total of 223 infections were detected in 42% of hospitalizations (40.9% vs 43.8%, $p = 0.55$), and the percentage of nosocomial infections was 43.4% vs 42.6% ($p = 0.89$). Spontaneous bacterial peritonitis and respiratory infections were less frequent during the pandemic (24.8% of total infections in the pre-pandemic period vs 13.8% during the pandemic, and 22.5% vs 17%, respectively) and urinary tract infections were more frequent (22.5% vs 33%) ($p = NS$). Culture positivity rate was similar (55% vs 60.6%, $p = 0.40$), and gram-negative bacteria were the most frequent bacteria isolated in both groups. We found a non-significant trend to a lower rate of multiresistant bacteria in the pandemic group (25.4% vs 19.3%, $p = 0.41$). ACLF incidence was 18.4% vs 12.9% ($p = 0.27$), and 30-day mortality was 14% vs 11.7% ($p = 0.62$).

Conclusion: There were less hospitalizations of patients with cirrhosis in the Gastroenterology department during the COVID-19 pandemic but they had worse baseline liver function. The incidence of infections and the rate of nosocomial infections were similar despite the restrictive measures. A non-significant trend to a lower rate of multiresistant bacteria and spontaneous bacterial peritonitis, and higher percentage of urinary infections were observed during the pandemic.

10.2.2. Comunicació 2:

Berta Cuyàs, Elisabet Cantó, Elisabet Sanchez, Elisenda Miró, Edilmar AlvaradoTapias, Eva Roman, Maria Poca, Ferran Navarro, Àngels Escorsell, Silvia Vidal, German Soriano.
The in vitro immune response of mononuclear cells to Escherichia coli is not dependent on antibiotic multidrug resistance. The International Liver Congress 2025. Amsterdam.
07 al 10 de maig de 2025. Comunicació pòster. J Hepatol 2025 vol. 82 (S1), S161–S162

Failure (EF CLIF), a private, non-profit research organization supported by unrestricted grants from Grifols and Genfit.

THU-138
Albumin infusion improves albumin binding capacity in patients with cirrhosis and MHE on gut-specific therapy
Anna Mestre¹, Raquel Horrillo¹, Andrew Fagan¹, Ruben Sabido¹, Jordi Vidal¹, Ricardo Gonzalo¹, Maria Isabel Bravo¹, Montserrat Costa¹, Jasmohan Bajaj². ¹Scientific Innovation Office, Grifols, Barcelona, Spain; ²Virginia Commonwealth University and Richmond VAMC, Richmond, United States
Email: anna.mestre@grifols.com

Background and aims: Minimal hepatic encephalopathy (MHE), or cognitive impairment that affects patient's quality of life (QoL), can persist despite adequate HE gut-directed therapy such as lactulose/rifaximin. Albumin has been investigated in HE for its potential therapeutic benefits related to non-oncotic functions, particularly on its capacity to bind, transport and modulate biologically active molecules such as fatty acids, proinflammatory mediators and reactive oxygen species. In the HEAL study (NCT03585257), albumin infusions in patients with cirrhosis and MHE were associated with improved cognitive function and psychosocial QoL. The aim of the present study was to characterize the albumin binding capacity of patients from the HEAL study and its correlation with cognitive parameters.

Method: Serum samples from 47 patients included in the HEAL study were analyzed. This was a double-blind, placebo-controlled randomized clinical trial in outpatients with cirrhosis and MHE on HE therapy, who received either weekly intravenous infusions of albumin 1.5 g/kg or saline over 5 weeks. The impairment in the drug albumin binding capacity to Sulfadiazine Binding Site II (ABC) was determined using a specific fluorescent marker. Results were compared with age-matched healthy controls (HC) (n=13). Cognitive response was evaluated with psychometric hepatic encephalopathy score (PHES). Wilcoxon test was used to assess the differences in ABC of patients versus HC at baseline. Lasting effects were analyzed with a mixed model for repeated measures. Relationship between cognitive impairment and ABC was assessed through Spearman correlations. All analyses were performed with R (v4.3.0).

Results: At baseline, albumin from patients with cirrhosis and MHE tended to present lower binding capacity compared to HC (80.13 [72.4–92.6] vs 93.28 [82.2–96.3]; median [IQR]; p=0.086), which led to a statistically significant decrease in effective albumin for transport (30.2 mg/mL [25.9–32.8] vs 35.1 mg/mL [33.1–36.6]; p<0.001). Albumin infusions increased progressively the content of albumin binding capacity, reaching 36.1 mg/mL at the end of the study (p=0.022, compared to placebo). Moreover, the increased functionality of albumin for transport correlated with a higher PHES at the end of treatment (binding capacity: p=0.04, r=0.33; total binding: p=0.06, r=0.29).

Conclusion: Albumin binding capacity was impaired in patients with cirrhosis and MHE on lactulose and rifaximin, which was restored to normal levels in parallel with improvement in cognitive function after albumin administration. Our data suggested that albumin treatment could exert its beneficial effects through the restoration of albumin transport functionality, over and above traditional HE therapies.

THU-139
Glycated albumin is increased in patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy already on gut-directed therapy and links with cognitive and quality of life impairment
Anna Mestre¹, Raquel Horrillo¹, Andrew Fagan¹, Ruben Sabido¹, Jordi Vidal¹, Ricardo Gonzalo¹, Maria Isabel Bravo¹, Montserrat Costa¹, Jasmohan Bajaj². ¹Scientific Innovation Office, Grifols, Barcelona, Spain; ²Virginia Commonwealth University and Richmond VAMC, Richmond, United States

POSTER PRESENTATIONS

United States
Email: anna.mestre@grifols.com

Background and aims: Cognitive impairment in cirrhosis can persist despite adequate treatment of HE with gut-directed therapies such as lactulose and rifaximin. This impairment, or minimal hepatic encephalopathy (MHE), negatively impacts outcomes. Albumin has shown benefit in HE patients with improved cognitive function and psychosocial quality of life (QoL) (HEAL study, NCT03585257). The aim of the present study was to describe albumin post-translational modifications (PTMs) of patients with cirrhosis and MHE compared to healthy controls (HC) and its correlation with clinical parameters, since structural modifications of albumin could alter albumin's non-oncotic functions.

Method: Serum samples from 24 cirrhosis patients in the HEAL study without diabetes and 10 age-matched HC were evaluated. Albumin PTMs were assessed on the intact mass protein (top-down) by using ultra HPLC coupled to electrospray ionization mass spectrometer (LC-ESI-qTOF-MS) and expressed as percentage of relative intensity. Principal Component Analysis (PCA), Limma Bioconductor package and Wilcoxon test were used to assess the differences in PTMs of patients versus HC. Relationship between cognitive impairment, QoL, and PTMs was assessed through Spearman correlations. All analyses were performed with R (v4.3.0).

Results: PCA showed good separation between samples from HC and non-diabetic patients with cirrhosis and MHE. Fourteen out of 25 PTMs presented statistically significant differences between both groups. In comparison to HC, albumin from patients showed less native albumin (50.13 [44.6–55.0] vs 56.13 [54.5–57.2]; median [IQR]; p=0.05) and less truncated forms (5 PTMs) [6.33 [5.4–7.0] vs 7.03 [6.5–8.7]; p=0.025], as well as more overall glycated forms (13 PTMs) [14.85 [12.4–16.1] vs 10.53 [9.5–10.9]; p<0.001] being the forms HSA+Glyc and HSA+Cys+Glyc the most relevant. Decreased native albumin correlated with worse cognitive testing (psychometric hepatic encephalopathy score) (p=0.05, r=0.41), and the increase of HSA+Glyc, HSA+2Glyc and HSA+3Glyc forms correlated with poor QoL (p<0.01, r=0.58; p=0.01, r=0.56; p=0.02, r=0.46, respectively).

Conclusion: Albumin from patients with cirrhosis and MHE even without diabetes shows higher glycation versus HC. These structural alterations contributed to decrease native albumin levels that could impair non-oncotic albumin functions in these patients.

THU-140
The in vitro immune response of mononuclear cells to Escherichia coli is not dependent on antibiotic multidrug resistance
Berta Cuyàs^{1,2}, Elisabet Cantó¹, Elisabet Sanchez^{1,2}, Elisenda Miró⁴, Edilmar Alvarado-Tapias^{1,2}, Eva Roman^{1,2}, Maria Poca^{1,2}, Ferran Navarro^{1,2}, Àngels Escorsell^{1,2}, Silvia Vidal^{1,2}, German Soriano^{1,2}. ¹Department of Gastroenterology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ²CIBERehd, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; ³Department of Infectious Diseases, Institut de Recerca Sant Pau (IR Sant Pau), Barcelona, Spain; ⁴Department of Microbiology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain
Email: bcuyas@santpau.cat

Background and aims: Multidrug-resistant organisms (MDRO) pose a serious global health threat. Infections caused by MDRO are increasing and are associated with poor outcomes, especially in patients with cirrhosis, although the underlying mechanisms are not fully understood and may involve variations in the elicited immune response. The aim was to evaluate whether the immune response to multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from cirrhotic patients differs from the response to antibiotic-susceptible *E. coli* strains.

Method: Surface and nuclear protein extracts were obtained from multidrug-resistant *E. coli* (n=6) and antibiotic-susceptible *E. coli* (n=6) strains isolated from bacteremia and spontaneous bacterial peritonitis in patients with cirrhosis. These extracts were used to

POSTER PRESENTATIONS

stimulate in vitro peripheral blood mononuclear cells from healthy donors (n=8). After 48 hours of culture, we quantified several mediators of immune response (IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-10, IL-12p70, MCP-1, IL-6, IL-8, MIP-1α, and MIP-1β) in the supernatant using Luminex or ELISA. The results were normalized using a ratio to mediator production by a reference *E. coli* strain (ATCC[®] 25922), and analyzed with the Mann-Whitney test and multivariable linear regression models.

Results: The mediators with the highest production were IL-1β in surface extracts (ratio of 2.15±2.87 for multidrug-resistant vs. 2.47±2.56 for sensitive strains, p=0.54) and IL-10 and MCP-1 in nuclear extracts (ratios of 1.24±2.38 vs. 2.46±4.07, p=0.15, and 1.71±1.84 vs. 1.29±1.56, p=0.33, respectively). No statistically significant differences were observed in the production of any mediators between multidrug-resistant and susceptible strains. However, differences in mediators production were noted among the various healthy donors, except for IFN-γ and IL-6 in surface extract and MCP-1 in nuclear extract, in which production was similar across donors.

Conclusion: Multidrug-resistant *E. coli* strains produced an in vitro immune mediator profile similar to that of antibiotic-susceptible strains. However, differences in mediator production were significantly associated with donor variability. The poor prognosis linked to infections caused by multidrug-resistant *E. coli* does not appear to be related to a different immune response compared to susceptible strains.

THU-142-YI
Early detection of hepatic encephalopathy using wearable sensors: preliminary data

Clelia Azeo¹, Maria Stella Franzè², Giorgio Lo Giudice³, Dario Milone⁴, Cristiano De Marchis⁵, Roberto Filomà⁶, Gaia Caccamo⁷, Concetta Pitrone⁸, Carlo Saitta⁹, Irene Cacciola⁶. ¹Department of clinical and experimental medicine, University Hospital of Messina, Messina (Italy); ²Internal medicine and hepatology Unit, University Hospital of Messina, Messina (Italy); ³Department of clinical and experimental medicine, University Hospital of Messina, Messina (Italy); ⁴Department of medicine and surgery, University of Enna "Kore", Enna (Italy); ⁵Department of Biochemical and dental sciences and morphofunctional imaging, University of Messina, Messina (Italy); ⁶Laboratory of Biomechanical BioMed, Department of Engineering, University of Messina, Messina (Italy); ⁷Messina, Italy; ⁸Internal medicine and hepatology Unit, University Hospital of Messina, Messina (Italy); ⁹Department of clinical and experimental medicine, University Hospital of Messina, Messina (Italy). Internal medicine and hepatology Unit, University Hospital of Messina, Messina (Italy). Email: clelia.azeo@gmail.com

Background and aims: Hepatic encephalopathy (HE) is a common complication of liver cirrhosis, with clinical manifestations ranging from mild neuropsychiatric symptoms to coma. Covert HE (CHE) diagnosis is difficult because specific symptoms and validated tests are lacking. This study evaluates its presence by using wearable sensors.

Method: Thirty-four cirrhotic patients and five control cases (without liver disease) were enrolled at the Medicine and Hepatology Unit of the University Hospital of Messina between August 2024 and October 2024. Study cohort was evaluated by positioning 6 sensors on the dorsum of both hands and the flexors/extensors muscles of forearms: 2 configured as Inertial Measurement Units (IMUs) (continuously measuring linear acceleration and angular velocity on 3 axes) and 4 configured as IMUs with additional electrogoniometry channels. Data were recorded during arm extension with palms facing up/down (repeated twice) and arm extension with palms extended for at least 10 seconds. The frequency domain analyzed all the documented signals, extracting features from each signal power spectrum. ANOVA, Kruskal-Wallis, and Eta Squared tests

were applied for feature sampling, and the Birch method was used for unsupervised clustering.

Results: Twenty-two subjects were males (mean age 63±14 years). Available clinical data identified 22 of 34 (64.7%) cirrhotic patients without overt HE (oHE), with a possible CHE, and 12 (35.3%) with an overt HE (oHE). Diseased subjects exhibited frequency peaks between 3 and 8 Hz, with significantly higher energy content than the control group. Five features were found to be relevant in the selection process: Left-hand Mean Frequency (LHMF) Gyroscope X, LHMF Gyroscope Y, LH Difference between Power inside boundaries and outside Accelerometer Y, LH Amplitude spectrum outside ratio Gyroscope Z, and Right-Hand MF (RHMf) Gyroscope Y. A comparison of features showed significant differences between the 3 groups (controls vs. non-HE vs. oHE): LHMF Gyroscope X (5.5±0.5 vs. 5.9±1.3 vs. 7.2±1.6 Hz, p=0.04), LHMF Gyroscope Y (11.0±2.5 vs. 7.9±2.5 vs. 9.9±2.3 Hz, p=0.04), LH Difference between Power inside boundaries and outside (-1.1±1.3 vs. -4.5±11.2 vs. -0.2±1.9 m/s², p=0.01), LH Amplitude spectrum outside ratio (356.6±272.6 vs. 266.7±140.8 vs. 374.2±143.2, p=0.01), and RHMf (11.1±1.4 vs. 7.7±2.7 vs. 7.9±2.9 Hz, p=0.04). The unsupervised clustering identified 3 groups of patients: 4 in cluster 1, 15 in cluster 2, and 11 in cluster 3. Nine patients did not cluster with others. The unsupervised analysis clustered 68.2% of cases as potential CHE, 13.6% as healthy, and 18.2% as oHE. Clustering identified original diagnosis in 77% of patients, but 4 cases clinically evaluated as non-HE showed typical features for oHE.

Conclusion: Wearable IMUs present a promising, noninvasive, objective method for early diagnosis of CHE and oHE. However, increasing the sample size would be crucial for broader use.

THU-143-YI
TLR7-mediated immunomodulation in experimental liver fibrosis

Dimitrios Patsias¹, Eoin Mitchell², ZuoBin Liu¹, Sarah M. G. Morel³, Lauren Roberts⁴, Cathrin Gude⁵, Lucia A. Possasani⁶, Prakash Ramachandran⁷, Mark R. Thursz⁸, Mark J. W. McPhail¹, Evangelos Triantafyllou¹. ¹Section of Hepatology and Gastroenterology, Department of Metabolism, Digestion and Reproduction, Imperial College London, London, United Kingdom; ²Centre for Inflammation Research, Institute for Regeneration and Repair, University of Edinburgh, Edinburgh, United Kingdom; ³Department of Inflammation Biology, King's College London, London, United Kingdom
Email: d.patsias@imperial.ac.uk

Background and aims: Cirrhosis, a global healthcare burden, is characterized by liver fibrosis, immune dysregulation, and impaired pathogen clearance that contribute to an increased infection risk and mortality. Here, we assessed the administration of a Toll Like Receptor (TLR) 7 agonist (R848) in toxin- and diet-induced mouse models of liver fibrosis with or without infectious challenge, as a novel immune-modulatory strategy to restore antimicrobial responses.

Method: Fibrosis was induced in C57BL/6J male and female mice by a choline-deficient, L-Amino-Acid defined High-Fat-Diet (CDA-HFD) for 8 weeks compared to normal diet (ND), or b) intra-peritoneal (i.p.) injections of CCl₄ (0.4 μL/g) twice-weekly for 6 weeks compared to control (oil). During the last week of treatments, mice received three i.p. injections of saline (PBS) or TLR7 agonist (R848; 1 mg/kg). Liver immune cells were assessed by flow cytometry; tissue fibrosis and hepatic damage were quantified in Picro Sirius Red (PSR) stained liver sections and serum, respectively. In separate experiments (6 weeks control vs CCl₄), *Escherichia coli* (E. coli) was intravenously administered. After 24 hours, mice were culled; liver and spleen were harvested, and tissue lysates were plated on agar to quantify bacterial load.

Results: Compared to PBS, R848-treated CDA-HFD and CCl₄-fibrotic mice displayed increased numbers of conventional dendritic cells (cDC1, cDC2, NK, CD8⁺ and CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ T_H cells. Moreover, monocyte, neutrophil, Kupffer cell and liver-recruited monocyte-derived macrophage numbers did not differ between groups.

10.3. Annex III: Beca obtinguda per a la realització d'aquesta tesi doctoral

“Ajut per a Iniciació a la Recerca” de la Societat Catalana de Digestologia. S’adjunta el certificat a continuació:



Societat
Catalana de
Digestologia

Dra. Berta Cuyas

Benvolguda companya,

En qualitat de President de la Societat Catalana de Digestologia (SCD), tinc el plaer de comunicar-te que el comitè científic avaluador de les beques 2018 i la junta directiva de la nostra Societat han decidit adjudicar-te l'Ajut per Iniciació a la Recerca que sol·licitaves, dotat amb 6.000 € bruts.

Per al teu coneixement t'informo que, per tal de poder efectuar el pagament d'aquest ajut, pots triar entre les següents opcions:

- Cobrament individual: cal que ens envïis les teves dades personals: nom i cognoms, adreça postal completa, NIF, i IBAN d'un compte corrent del que en siguis titular.
- Cobrament a través d'una fundació: cal un certificat de la fundació on consti que tu col·labores amb aquesta fundació (al certificat ha de constar el títol del projecte guanyador de l'ajut), així com les dades fiscals i l'IBAN d'un compte corrent de la fundació, i una carta teva on manifestis expressament que vols cobrar l'ajut a través d'aquesta fundació.
- Cobrament a través d'una fundació privada: el mateix que a l'apartat anterior (certificat on consti que col·labores amb l'entitat i amb el títol del projecte guanyador de l'ajut, les dades fiscals i l'IBAN d'un compte corrent de l'entitat, i la teva carta), però, en aquest cas, al tractar-se d'una institució privada, també necessitem els seus estatuts per a constatar que es tracta d'una entitat d'utilitat pública.

Tan aviat com rebem la documentació correcta corresponent a una de les tres vies procedirem al pagament de l'ajut.

Per últim, d'acord a la normativa de la convocatòria de les beques, en el termini de tres mesos després de la finalització de l'ajut, hauràs de presentar una memòria de la tasca realitzada, acompanyada del preceptiu informe del teu director o responsable del centre/servei on hakis desenvolupat el projecte. A més, la SCD et podrà demanar la presentació d'una comunicació del treball realitzat en una de les seves sessions ordinàries o en el transcurs del seu congrés anual. Finalment, recorda que has de fer constar el suport rebut per part de la Societat en totes les publicacions que se'n derivin d'aquest ajut.

Aprofito l'ocasió per a donar-te, en nom de la Junta Directiva de SCD, la més cordial enhorabona.



Dr. Antoni Castells
President

Barcelona, 4 de juliol de 2018

