



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

“Caracterización y comparación del microbioma intestinal de niños con diferentes severidades de shigellosis y de niños sin diarrea y caracterización de las cepas de *Shigella* spp. aisladas”

TESIS

Que presenta

M. en C. DAVID ALEJANDRO ALMAGUER MOLINA

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

En la especialidad de

BIOMEDICINA MOLECULAR

Directora de tesis

DRA. MARÍA TERESA ESTRADA GARCÍA

Ciudad de México

Febrero del 2024

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la dirección de la Dra. María Teresa Estrada García.

Este trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), mediante la beca 757048 y el CVU 855021.

COMITÉ ASESOR

DR. VIANNEY FRANCISCO ORTIZ NAVARRETE

INVESTIGADOR TITULAR 3C

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

CINVESTAV-IPN

DR. MICHAEL SCHNOOR

INVESTIGADOR TITULAR 3E

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

CINVESTAV-IPN

DR. JAIME GARCÍA MENA

INVESTIGADOR TITULAR 3C

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

CINVESTAV-IPN

DR. FRANCISO JAVIER TORRES LÓPEZ

JEFE DE DEPARTAMENTO

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA

EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y PARASITARIAS

INSTITUO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A mi madre Silvia Molina Rocha, por enseñarme lo que es el trabajo duro, por tu fortaleza, por tu sacrificio y por haber luchado para que pudiera salir adelante. Todo lo que he logrado y lo que me falta por alcanzar te lo debo a ti, porque me has apoyado ciegamente en cada paso y decisión que he tomado e incluso has confiado en mí cuando yo mismo he dudado de mis capacidades.

A mi hermana Sandra Gisela Almaguer Molina, por representar para mí la voz de la razón, la moral y la dedicación. Es a ti a quien le debo mi personalidad tan minuciosa y organizada, pues siempre me ha inspirado tu ejemplo y has sido mi modelo a seguir.

A mi hermano Miguel Ángel Almaguer Molina, por enseñarme que nunca es en vano luchar por nuestros sueños, que no está mal ser diferente del resto y que la satisfacción propia vale más que cumplir con los estándares de otros.

A mis sobrinos Leonardo y Zoé Barroso Almaguer, por motivarme e inspirarme, pues su inocencia me recuerda que la vida siempre es mejor de lo que parece y que nuestros problemas los creamos nosotros mismos. Lo más difícil de mi doctorado ha sido el perderme de momentos con ustedes y no verlos crecer.

A Daniel Esparza Rivera, por nunca dudar de mí, por estar a mi lado y por convencerme de que realmente puedo lograr lo que me proponga. Gracias por recordarme que la vida sí tiene sentido y que vale la pena vivirla. Siempre serás mi lugar seguro donde nunca me siento solo. INFINITAS GRACIAS.

A la Dra. Tere Estrada, por abrirme las puertas de su laboratorio y convertirlo en un hogar para mí, por darme su confianza, su empatía, sus consejos y sus palabras de aliento. Gracias a usted estoy alcanzando una meta que por un momento consideré en abandonar. Sobre todo, gracias por verme como a una persona, al mundo de la ciencia le hacen falta más personas como usted.

A mis compañeros de laboratorio, por su apoyo, por su ayuda y los momentos gratos que hemos compartido

Al Dr. Pedro Ávila, a la Dra. Adriana Becerra y al Dr. Mario Meza, por su disposición, por enseñarme y por compartir sus conocimientos conmigo. Fueron mis mentores en este camino que recorrí para convertirme en doctor. Sin embargo, les agradezco mucho más sus pláticas, sus bromas y por ser más que compañeros para mí.

A la Dra. Beth McCormick y su grupo de trabajo, por recibirme en su laboratorio y por darme la oportunidad de seguir creciendo. Estar en Massachusetts fue una experiencia que me cambió.

A mis amigos Ale y Luis, porque mi vida no sería la misma sin ustedes. Gracias por ser mi pedazo del norte en la CDMX, ha sido genial haber coincidido con ustedes.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	III
RESUMEN.....	V
ABSTRACT.....	VII
ABREVIATURAS.....	IX
INTRODUCCIÓN.....	1
I. GENERALIDADES DE LA MICROBIOTA Y DEL MICRIBIOMA.....	1
II. MICROBIOTA GASTROINTESTINAL.....	2
III. EVOLUCIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL.....	6
IV. LA DISBIOSIS Y SU PAPEL EN PATOLOGÍAS.....	10
V. EL SÍNDROME DIARREICO.....	11
VI. <i>Shigella</i> spp. COMO PATÓGENO GASTROINTESTINAL.....	14
VII. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	29
JUSTIFICACIÓN.....	31
HIPÓTESIS.....	32
OBJETIVOS.....	33
I. OBJETIVO GENERAL.....	33
II. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
I. DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO.....	34
II. TOMA DE DATOS CLÍNICOS Y CÁLCULO DE LA SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD.....	34
III. TOMA DE MUESTRAS DE HECES Y ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.....	36
IV. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Shigella</i> spp.....	37
V. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DEL MICROBIOMA INTESTINAL DE NIÑOS INFECTADOS CON <i>Shigella</i> spp. Y NIÑOS SIN DIARREA.....	38
VI. SECUENCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO DE LOS AISLADOS DE <i>Shigella</i> spp.....	40
VII. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS DE <i>Shigella</i> spp AISLADA DE LOS CASOS DE SHIGELLOSIS.....	43
VIII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	46
RESULTADOS.....	47
I. CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO Y SU ESTATUS NUTRICIONAL.....	47
II. PREVALENCIA DE LOS PATÓGENOS IDENTIFICADOS.....	48
III. PREVALENCIA DE LAS ESPECIES DE <i>Shigella</i>	52

IV. CARACTERIZACIÓN Y COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MICROBIOMA INTESTINAL ENTRE LOS NIÑOS CON SHIGELLOSIS VS LOS NIÑOS SIN DIARREA.....	53
V. CARACTERIZACIÓN Y COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MICROBIOMA INTESTINAL ENTRE LOS DIFERENTES CUADROS CLÍNICOS DE LOS NIÑOS CON SHIGELLOSIS.	60
VI. PREDECCIÓN Y COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN FUNCIONAL DEL MICROBIOMA INTESTINAL.....	62
VII. SECUENCIACIÓN DE GENOMA COMPLETO DE LAS CEPAS DE <i>Shigella</i> spp. AISLADAS DE LOS CASOS DE SHIGELLOSIS.	64
VIII. REALIZAR ENSAYOS FENOTÍPICOS ASOCIADOS AL PROCESO DE INFECCIÓN DE <i>Shigella</i> spp. CON ALGUNAS DE LAS CEPAS SECUENCIADAS.....	71
DISCUSIÓN	77
CONCLUSIONES.....	90
PERSPECTIVAS.....	92
BIBLIOGRAFÍA.....	93
ANEXOS	119

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Factores gastrointestinales característicos de cada región del aparato digestivo que determinan el tipo de microbiota identificada.	5
Figura 2. Cambios en la microbiota intestinal desde el nacimiento hasta la adultez.	8
Figura 3. El concepto de un microbioma humano nuclear.	10
Figura 4. Incidencia de muertes por diarrea desde 1990 hasta 2019.	12
Figura 5 Eventos genéticos causaron la evolución de <i>Shigella</i> spp.	14
Figura 6. Organización genómica de la región de entrada en el plásmido pINV.	16
Figura 7. Patogénesis celular de <i>Shigella</i> spp.	18
Figura 8 Comparación de la composición de la microbiota intestinal entre individuos con y sin diarrea y entre un número alto y bajo de copias del gen <i>ipaH</i> .	29
Figura 9. Frecuencia y presentación clínica de infecciones por <i>Shigella</i> spp. y <i>Salmonella</i> spp. de niños en Yucatán, México, 2005-2011.	30
Figura 10. Distribución de los casos de diarrea colectados durante el estudio Biomarcadores del año 2010-2014.	48
Figura 11. Prevalencia de los patógenos intestinales en todos los niños del estudio Biomarcadores.	50
Figura 12. Distribución de las cuatro especies de <i>Shigella</i> en todos los niños del estudio Biomarcadores.	52
Figura 13. Curvas de rarefacción de los casos de diarrea asociada a <i>Shigella</i> spp. y los controles sin diarrea.	56
Figura 14. Comparación de la diversidad α del microbioma intestinal entre los casos de diarrea asociada a <i>Shigella</i> spp. y los controles sin diarrea.	57
Figura 15. Comparación de la diversidad β del microbioma intestinal entre los casos de diarrea asociada a <i>Shigella</i> spp. y los controles sin diarrea.	58
Figura 16. Composición del microbioma intestinal presente en los casos de diarrea asociada a <i>Shigella</i> spp. y en los controles sin diarrea.	59
Figura 17. Identificación de posibles biomarcadores presentes en los casos de diarrea asociada a <i>Shigella</i> spp. y en los controles sin diarrea.	60
Figura 18. Comparación de la diversidad α y la diversidad β del microbioma intestinal entre los grupos de severidad de los casos de diarrea asociada a <i>Shigella</i> spp.	61
Figura 19. Identificación de posibles biomarcadores presentes en los casos severos de diarrea asociada a <i>Shigella</i> spp.	62
Figura 20. Vías metabólicas incrementadas en el microbioma de los controles sin diarrea.	63

Figura 21. Vías metabólicas incrementadas en el microbioma de los casos de diarrea asociada a <i>Shigella</i> spp.	63
Figura 22. Vías metabólicas presentes en el microbioma de los grupos de severidad de los casos de diarrea asociada a <i>Shigella</i> spp.	64
Figura 23. Identificación del coregenoma y del pangenoma de las cepas de <i>Shigella</i> spp. secuenciadas.	66
Figura 24. Árbol filogenético del <i>pangenome</i> de <i>Shigella</i> spp.	67
Figura 25. Matriz de presencia/ausencia de genes involucrados en el proceso de infección de <i>Shigella</i> spp.	70
Figura 26. Ensayos de invasión con cepas de <i>Shigella flexneri</i> .	72
Figura 27. Ensayos de invasión con cepas de <i>Shigella boydii</i> .	72
Figura 28. Ensayos de invasión con cepas de <i>Shigella sonnei</i> .	73
Figura 29. Capacidad de algunas cepas de <i>Shigella</i> spp. de dañar la monocapa celular.	74
Figura 30. Evaluación de la formación de placas por cepas de <i>Shigella</i> spp.	75
Figura 31. Cuantificación del área de las placas formadas por distintas cepas de <i>Shigella</i> spp.	76
Tabla 1. Prevalencia de enteropatógenos en muestras de diarrea en México.	13
Tabla 2. Prevalencia de los patógenos intestinales identificados por grupos de edad.	51
Tabla 3. Prevalencia de las cuatro especies <i>Shigella</i> spp. por grupos de edad.	52
Tabla 4. Casos severos de diarrea seleccionados para la caracterización de su microbioma.	53
Tabla 5. Casos moderados de diarrea seleccionados para la caracterización de su microbioma.	54
Tabla 6. Casos leves de diarrea seleccionados para la caracterización de su microbioma.	54
Tabla 7. Controles sin diarrea seleccionados para la caracterización de su microbioma.	55
Tabla 8. Resultados de la comparación de la diversidad α y de la diversidad β con respecto a la severidad del cuadro clínico de diarrea.	61
Tabla 9. Cepas seleccionadas para la secuenciación de su genoma.	65
Tabla suplementaria 1. Genomas de referencia descargados del NCBI.	118
Tabla suplementaria 2. Genes del NCBI que se buscaron en los genomas.	119

RESUMEN

El microbioma del tracto gastrointestinal es una comunidad ecológica compleja, influenciada por las características del nicho de colonización, por la vía de nacimiento del hospedero, su etapa de desarrollo, su dieta, etc. El microbioma intestinal juega un papel importante en procesos fisiológicos del hospedero, además de brindar protección contra patógenos. Se asocia a la presencia de patologías con la disbiosis del microbioma intestinal, sin embargo, no se tiene claro si la disbiosis es la causa o la consecuencia de dichas patologías. Un ejemplo es el síndrome diarreico, el cual es un grave problema de salud pública, representando la tercera causa de muerte en infantes <5 años y afectando particularmente a países subdesarrollados o en vías de desarrollo. Se reporta a *Shigella* spp. como el principal agente bacteriano causal de muertes por diarrea en el mundo, sin embargo, en México se desconoce la prevalencia de *Shigella* spp. Se han publicado pocos estudios sobre el impacto de *Shigella* spp. en el microbioma intestinal, los cuales sólo incluyen a infantes <5 años y la identificación de *Shigella* spp. se realizó por métodos moleculares en heces y no por cultivo. La hipótesis de este estudio es que los niños con shigelosis presentan un microbioma alterado en comparación con los niños sin diarrea y que los diferentes cuadros clínicos de shigelosis están asociados a un microbioma característico o a que las cepas de *Shigella* spp. aisladas de los casos severos tienen características particulares. Por un periodo de 4 años, de enero del 2010 a julio del 2014, se realizó un estudio de búsqueda de agentes causales de diarrea aguda, donde se reclutaron a 999 niños con diarrea y a 238 niños sin diarrea, incluyendo a los niños >60 meses. En este trabajo se identificó a *Shigella* en el 19% de los casos de diarrea, sólo por debajo de los patotipos de *Escherichia coli* diarrogénica (PEDs) y de Rotavirus. *Shigella* spp. fue significativamente más prevalente en niños >24 meses en comparación con los niños ≤24 meses. La diversidad del microbioma de los casos fue significativamente menor con respecto a los controles, además se identificaron 8 géneros microbianos con una abundancia relativa diferente entre estos grupos. Se identificaron 4 géneros con una abundancia relativa aumentada en los casos severos con respecto a los casos leves/moderados. La predicción del microbioma funcional reveló que el de los controles está enriquecido en vías que promueven la homeostasis intestinal, en contraste el de los casos está enriquecido en vías asociadas a mecanismos de patogenicidad. En el microbioma funcional de los grupos de severidad se identificaron vías enriquecidas que podrían ayudar a explicar las complicaciones sistémicas presentes en los casos severos. A partir de la secuenciación de los genomas de 20 cepas de *Shigella* spp. aisladas de los niños con shigelosis se definió al pangenoma (6,317 genes) y al coregenoma (2,853) de las cepas. En el análisis filogenético de las cepas se observó que *S. sonnei* fue la única especie que formó un clado aislado, mientras que de las 11 cepas de *S. flexneri* secuenciadas 9 se agruparon en un clado y las otras 2 se ubicaron con otras especies. La evaluación de la presencia de 29 genes asociados al proceso de patogenicidad de *Shigella* spp. mostró que los genes de las familias *ipa* e *ipg* estuvieron presentes en todas las cepas, a diferencia de los genes que codifican para proteínas efectoras, los cuales varían entre especies e incluso entre cepas, evidenciando perfiles genéticos diferentes. De los ensayos fenotípicos, se identificó una asociación entre el área de las placas líticas con las cepas que se aislaron de los casos severos, lo que sugiere que poseen una mayor capacidad de invadir a las células adyacentes y de producir a la toxina ShET2 y por ende de evadir al sistema inmune del huésped.

ABSTRACT

The microbiome of the gastrointestinal tract is a complex ecological community, influenced by the characteristics of the colonization niche, the birth route of the host, its stage of development, its diet, etc. The intestinal microbiome plays an important role in host physiological processes, in addition to providing protection against pathogens. The presence of pathologies is associated with dysbiosis of the intestinal microbiome; however, it is not clear whether dysbiosis is the cause or consequence of these pathologies. An example is diarrheal syndrome, which is a serious public health problem, representing the third cause of death in infants <5 years of age and particularly affecting underdeveloped or developing countries. *Shigella* spp. is considered the main bacterial agent causing deaths from diarrhea in the world, however, in Mexico the prevalence of *Shigella* spp. is unknown. Few studies have focused on the impact of *Shigella* spp. in the intestinal microbiome, which only include infants <5 years old and the identification of *Shigella* spp. was performed by molecular methods in feces and not by culture. The hypothesis of this study is that children with shigellosis have an altered microbiome compared to children without diarrhea and that the different clinical symptoms of shigellosis are associated with a characteristic microbiome or that strains of *Shigella* spp. isolated from severe cases have particular characteristics. For a period of 4 years, from January 2010 to July 2014, a study was carried out to search for causal agents of acute diarrhea, where 999 children with diarrhea and 238 children without diarrhea were recruited, including children >60 months. In this work, *Shigella* was identified in 19% of diarrhea cases, only below the diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes (DEPs) and Rotavirus. *Shigella* spp. was significantly more prevalent in children >24 months compared to children ≤24 months. The microbiome diversity of the cases was significantly lower compared to the controls, and 8 microbial genera were identified with a different relative abundance between these groups. 4 genera were identified with an increased relative abundance in severe cases compared to mild/moderate cases. The prediction of the functional microbiome revealed that the microbiome of the controls is enriched in pathways that promote intestinal homeostasis, in contrast the microbiome of the cases is enriched in pathways associated with pathogenicity mechanisms. In the functional microbiome of the severity groups, enriched pathways were identified that could help explain the systemic complications present in severe cases. Based on the sequencing of the genomes of 20 strains of *Shigella* spp. isolated from children with shigellosis, the pangenome (6,317 genes) and the coregenome (2,853) of the strains were defined. In the phylogenetic analysis of the strains, it was observed that *S. sonnei* was the only species that formed an isolated clade, while of the 11 *S. flexneri* strains sequenced, 9 were grouped in a clade and the other 2 were located with other species. The evaluation of the presence of 29 genes associated with the pathogenicity process of *Shigella* spp. showed that the genes of the *ipa* and *ipg* families were present in all strains, unlike the genes that code for effector proteins, which vary between species and even between strains, evidencing different genetic profiles. From the phenotypic assays, an association was identified between the area of the lytic plaques with the strains that were isolated from severe cases, which suggests that they have a greater capacity to invade adjacent cells and produce the ShET2 toxin and therefore to evade the host's immune system.

ABREVIATURAS

GIT	Gastrointestinal tract (Tracto gastrointestinal)
IEC	Intestinal epithelial cells (Células epiteliales intestinales)
SCFA	Short chain fatty acid (Ácido grasos de cadena corta)
BA	Bile acid (Ácido biliar)
PEDs	Patotipos de <i>Escherichia coli</i> diarrogénica
LPS	Lipopolisacárido
EIEC	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> (<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora)
ShET	<i>Shigella</i> enterotoxin (Enterotoxina de <i>Shigella</i>)
Ipa	Invasion plasmid antigen (Antígeno del plásmido de invasión)
pINV	Plasmid of invasion (Plásmido de invasión)
PMN	Polimorfo nuclear
T3SS	Type 3 secretion system (Sistema de secreción tipo 3)
OTU	Operational taxonomic unit (Unidad taxonómica operativa)
QIIME2	Quantitative Insights into Microbial Ecology
ASV	Amplicon sequence variant (Variantes de secuencia del amplicón)
NMDS	Non-metric multidimensional scaling (Escalamiento multidimensional no métrico)
LEfSe	Linear discriminant analysis Effect Size (Análisis discriminante lineal del tamaño del efecto)
PICRUSt	Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States
KEGG	Kyoto encyclopedia of genes and genomes (Enciclopedia de Kioto de genes y genomas)
UFCs	Unidades formadoras de colonias

INTRODUCCIÓN

I. GENERALIDADES DE LA MICROBIOTA Y DEL MICRIBIOMA

La teoría endosimbiótica propuesta en los años setenta del siglo pasado por Lynn Margulis (Sagan, 1967) considera que las relaciones simbióticas entre bacterias y eucariotes unicelulares fueron esenciales para el desarrollo de los eucariotes multicelulares, así como para la generación de diversas especies (Sachs et al., 2011). Esto ha permitido establecer que varios organelos celulares tienen un origen en microorganismos tales como la mitocondria, los cloroplastos, el retículo endoplásmico etc. (Gruber, 2019).

Por otro lado, también se había definido al “mutualismo” como la posibilidad de establecer interacciones simbióticas entre microorganismos con sus hospederos, como son: las bacterias fijadoras de nitrógeno con las leguminosas, los hongos de suelo con las angiospermas (Genre et al., 2020) o *Escherichia coli* en el intestino de los mamíferos (Gritsenko & Bukharin, 2000). Pero no fue hasta principios de este siglo que se inicia de manera intensa el estudio de las interacciones entre conglomerados de microorganismos con sus hospederos, esto ha permitido establecer de manera categórica en las últimas décadas que las interacciones entre conglomerados de microorganismos y sus hospederos eucariotes, incluyendo a los humanos, son indispensables para que se desarrollen diversos procesos fisiológicos y metabólicos, tanto en el huésped como en el hospedero.

El término “microbiota” hace referencia a los microorganismos vivos que han sido capaces de colonizar un nicho definido (Hou et al., 2022), estableciéndose en la mayoría de las superficies, incluso en las superficies de los organismos multicelulares se puede identificar una microbiota específica, la cual está constituida por consorcios microbianos específicos, conformados en su mayoría por organismos comensales y mutualistas (Turnbaugh et al., 2007). En su conjunto estos resultados indican que diferentes nichos de los seres vivos y su microbiota han evolucionado conjuntamente, estableciendo relaciones simbióticas entre el huésped y el hospedero.

Particularmente en la superficie del cuerpo humano se ha identificado un vasto número de microorganismos, a los cuales se les ha visto cohabitando e interactuando entre ellos y con su hospedero, por lo que a esta comunidad de microorganismos se le definió como “microbiota humana”. Hoy en día, diversos estudios se han dado a la tarea de caracterizar las microbiotas de varias regiones del cuerpo humano, principalmente en condiciones de ausencia de enfermedad, incluyendo: el tracto gastrointestinal y respiratorio, la piel, la mucosa oral y vaginal etc. Estos estudios han mostrado que la microbiota de cada región del cuerpo humano es específica y que incluso puede ser única por individuo (Cho & Blaser, 2012). En la actualidad se han realizado estudios comparando la microbiota de diversas regiones del cuerpo humano entre sujetos no enfermos y con enfermedades particulares, con la intención de identificar, si es posible, marcadores microbianos específicos de una enfermedad (Plottel & Blaser, 2011).

Adicionalmente, Lederberg acuñó el término “microbioma” para identificar a las comunidades ecológicas de microorganismos comensales, simbióticos y/o patógenos que habitan en nuestro cuerpo (Lederberg J & McCray A., 2001). Sin embargo, con la aparición y el desarrollo de la genómica se redefinió al “microbioma” como el conjunto de genomas (la totalidad de genes) que albergan estos consorcios microbianos residentes de un nicho particular (Ursell et al., 2012), por ejemplo, refiriéndose como “microbioma humano” a la colección de genomas de la “microbiota humana”. En este sentido, el “microbioma” abarca un concepto más amplio que la “microbiota”, pues hace referencia a la capacidad funcional de esta comunidad de microorganismos. Con base en esta explicación, resulta de gran importancia esclarecer las diferencias entre estos dos términos, ya que suelen ser usados de manera indistinta, lo cual es incorrecto.

Una característica de estas comunidades microbianas es su diversa composición, definiendo a la “diversidad” como la variedad y abundancia de organismos que forman dicha comunidad (Magurran, 2004). La diversidad está compuesta de dos componentes claves: la “riqueza” que se refiere al número total de los organismos diferentes que conforman a la comunidad y la “igualdad” (evenness) que describe diferencias en la abundancia relativa de los organismos diferentes que conforman a la comunidad (Young & Schmidt, 2008).

II. MICROBIOTA GASTROINTESTINAL

El tracto gastrointestinal (GIT), que es un tubo constituido por los órganos por donde pasan los alimentos y líquidos después de ser consumidos y es la región en donde estos se digieren, absorben y salen del cuerpo en forma de heces. Estos órganos son la boca, el esófago, el estómago, el intestino delgado, el intestino grueso, el recto y el ano. El GIT es una región del organismo que alberga una gran diversidad microbiana, donde en cada región o nicho realizan funciones fisiológicas especializadas, por lo que no es de sorprenderse que cada nicho del GIT posea una microbiota particular (Tropini et al., 2017). Esta microbiota es dependiente, por ejemplo, de las concentraciones de oxígeno, CO₂, y del pH en cada región del GIT, en otras regiones dependen de la presencia de los ácidos biliares (BAs) y de las secreciones pancreáticas, de la biodisponibilidad de los nutrientes y del agua. Todas estas características físicas y químicas del GIT en su conjunto son responsables de la presencia de diversos nichos ecológicos a lo largo del GIT del hospedero, lo que promueve una comunidad microbiana única por región (Martinez-Gury et al., 2019) Figura 1.

a. Boca

La digestión inicia en la boca, sitio donde se promueve la degradación de los macronutrientes por medio de la comunidad microbiana bucal, la cual contiene aproximadamente 10^8 - 10^{10} UFC/mL (O’Hara & Shanahan, 2006), constituida principalmente por los géneros: *Streptococcus*, *Veillonella*, *Granulicatella*, *Porphyromonas*, *Capnocytophaga*, *Haemophilus*, *Aggregatibacter* y *Corynebacterium* (Shang et al., 2018). Se ha reportado que en la cavidad bucal las bacterias del género *Corynebacterium* son las primeras en adherirse para establecer la placa dental, proporcionando puntos de anclaje para otros microorganismos (Welch et al., 2016). Se

denomina placa dental a la comunidad de microorganismos que forma una biopelícula sobre la superficie de los dientes del hospedero (Marsh, 2006).

En la boca la saliva es un factor clave para el establecimiento de las comunidades bacterianas puesto que: 1) disminuye la carga bacteriana por efecto mecánico, 2) libera enzimas digestivas que generan los nutrientes necesarios para el metabolismo bacteriano, 3) secreta mucinas que promueven la agregación bacteriana, 4) contiene varios compuestos que tienen efectos antimicrobianos (Pedersen & Belstrøm, 2019).

b. Esófago

El esófago es un conducto que comunica a la faringe con el estómago, cuya microbiota contiene aproximadamente 10^4 - 10^6 UFC/mL (O'Hara & Shanahan, 2006) y está constituida principalmente por los géneros *Rothia*, *Prevotella*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Actinobacillus* y *Sphingomonas* (May & Abrams, 2018).

c. Estómago

El estómago es la región del tracto gastrointestinal donde se lleva a cabo la digestión de los alimentos mediada por los jugos gástricos. Esta región se caracteriza por tener un pH ácido y una gruesa capa de moco recubriendo las paredes del estómago. Debido a la acidez del estómago la carga bacteriana es considerablemente menor, 10^1 - 10^2 UFC/mL (O'Hara & Shanahan, 2006), al resto del GIT. El microbioma del estómago incluye géneros como: *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Neisseria*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Veillonella*, *Rothia* y *Prevotella* (G. Nardone & Compare, 2015).

d. Intestino delgado

El intestino delgado es la sección GIT que conecta al estómago con el intestino grueso y constituye el 65% de la longitud del GIT, esta sección a su vez está subdividida en tres regiones, la más cercana al estómago es el duodeno, seguido del yeyuno y finalmente del íleon, que es la porción que se une con el intestino grueso. La carga bacteriana se ve incrementada del duodeno al íleon (Fish E.; 2022). El intestino delgado está formado por una monocapa de células epiteliales intestinales (IECs) polarizadas y esta monocapa incluye diversos tipos de células: los enterocitos, las células M, las células caliciformes, las células de Paneth y las enteroendocrinas. La distribución diferencial de estos tipos de IECs resulta en condiciones específicas para cada región del intestino delgado lo que conlleva a que cada región presente una microbiota diferencial (Peterson & Artis, 2014).

En esta región la carga microbiana es relativamente baja con respecto a la del colon, debido a su función en la absorción de macro- y micronutrientes del hospedero, disminuyendo la biodisponibilidad de nutrientes para las poblaciones bacterianas; así como por el elevado movimiento peristáltico del intestino delgado, lo que reduce el tiempo del tránsito intestinal en comparación con el colon, disminuyendo la colonización microbiana (Szarka & Camilleri, 2012).

1. Duodeno

El duodeno es el sitio en donde el quimo, que son los alimentos semidigeridos por el ácido clorhídrico y las enzimas digestivas del estómago, se mezcla con el jugo intestinal, el jugo pancreático y la bilis.

El jugo intestinal es producido por el sistema endócrino intestinal, contiene bicarbonato, que neutraliza la acidez del quimo y enzimas como la maltasa, la sacarasa y la lactasa indispensables para la degradación de los carbohidratos. El jugo pancreático también contiene bicarbonato y enzimas que participan en la degradación de proteínas como la tripsina y la quimotripsina o enzimas que degrada carbohidratos complejos y lípidos como la amilasa, y la lipasa, respectivamente, así como colecistoquinina una hormona que induce la secreción de la bilis. La bilis es producida por el hígado y secretada por la vesícula biliar que contiene a las sales biliares, al colesterol, a los fosfolípidos y a la bilirrubina. Por lo que todos estos compuestos están involucrados en el catabolismo de los carbohidratos, las proteínas y los lípidos.

Debido al cambio de pH en el duodeno en comparación con el estómago, es posible identificar un mayor número de microorganismos 10^4 - 10^5 UFC/mL (Kastl AJ., et al; 2019) en esta sección proximal del intestino delgado, donde los géneros identificados principalmente en este microbioma son: *Bifidobacterium*, *Prevotella*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Veillonella* y *Neisseria* (Zoetendal et al., 2012).

2. Yeyuno

El yeyuno es la porción del GIT donde los macronutrientes son degradados por las enzimas digestivas secretadas en el duodeno, por ende, es la región del intestino delgado en la que se lleva a cabo la mayor absorción de los nutrientes. La carga microbiana del yeyuno se ha estimado entre 10^4 - 10^7 UFC/mL (O'Hara & Shanahan, 2006) y su microbioma está principalmente constituido por los géneros: *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Prevotella* y *Streptococcus* (Zoetendal et al., 2012).

3. Íleon

El íleon es la región distal del intestino delgado y la de mayor longitud, donde se continúa con la absorción de los nutrientes que comenzó en el yeyuno. Es en esta región donde se lleva a cabo la absorción de las vitaminas, principalmente de la vitamina B12, así como la reabsorción de los ácidos biliares, lo que conlleva a una disminución en la síntesis de las sales biliares hepática (Sayin et al., 2013). Cuenta con una carga microbiana de 10^6 - 10^8 UFC/mL (O'Hara & Shanahan, 2006), en su mayoría conformada por anaerobios facultativos y obligados, principalmente por los géneros: *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Prevotella* y *Peptostreptococcus* (Zoetendal et al., 2012).

e. Colon

Es la última porción del GIT, el cual está dividido en cuatro secciones: el colon ascendente, el colon transverso, el colon descendente y el sigmoideo, así como también contiene al ciego y al recto. Dichas secciones son funcionalmente distintas, donde el colon ascendente y el colon transverso son los sitios principales de la fermentación, de la absorción del agua y de los electrolitos, mientras que en el colon descendente y en el sigmoideo se almacenan las heces fecales hasta su expulsión.

El intestino grueso alberga la mayor riqueza y abundancia microbiana del GIT, ya que su movimiento peristáltico es menos frecuente e intenso que el del intestino delgado, por lo que el tiempo del tránsito de los nutrientes es considerablemente más prolongado (>30 h) que el del intestino delgado (2½-3 h) (Szarka & Camilleri, 2012). La carga bacteriana residente del colon es de $\sim 10^{10}$ - 10^{12} UFC/mL (O'Hara & Shanahan, 2006) y

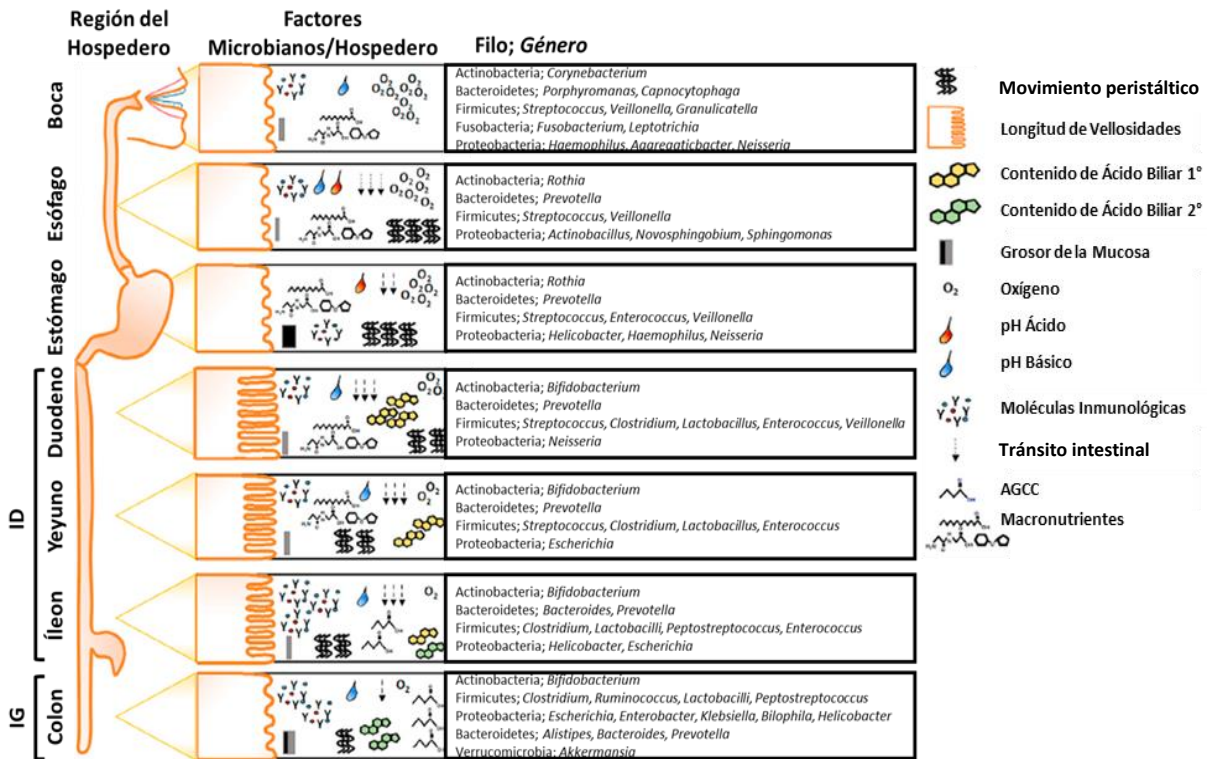


Figura 1. Factores gastrointestinales característicos de cada región del aparato digestivo que determinan el tipo de microbiota identificada. Diferentes regiones del tracto gastrointestinal realizan funciones únicas, que junto con los factores derivados del hospedero (tipos de células epiteliales, diferencias en las vellosidades, grosor de la capa de moco, movimiento peristáltico, pH, oxígeno y tránsito intestinal) resulta en una microbiota región-específica a lo largo del aparato digestivo. Factores secretados al intestino, como moléculas de la respuesta inmune o ácidos biliares tienen efectos antimicrobianos. En algunas regiones del intestino se lleva a cabo el procesamiento de la fibra dietética y la fermentación de azúcares complejos, incrementando los niveles de ácidos grasos de cadena corta que también influyen en la colonización de ciertas bacterias. ID = Intestino Delgado, IG = Intestino Grueso. **(Tomada y modificada)** (Martínez-Guryn et al., 2019)

esta comunidad microbiana se encuentra conformada principalmente por géneros como: *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Roseburia*, *Ruminococcus*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Bilophila*, *Alistipes*, *Bacteroides*, *Prevotell*, *Akkermansia* y *Bifidobacterium* (Martinez-Guryn et al., 2019).

Es en el colon ascendente y en el colon transversal donde los anaerobios estrictos, como *Clostridium*, *Eubacterium* y *Roseburia*, procesan la fibra dietética, como la lignina, también es en estas regiones donde se lleva a cabo la fermentación de los carbohidratos complejos, como el almidón, lo que resulta en la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs), como el acetato, el propionato y el butirato; los cuales son la principal fuente de energía de los colonocitos (Koh et al., 2016). Además, el ciego y el colon ascendente son los sitios del procesamiento de los ácidos biliares primarios a ácidos biliares secundarios, procesamiento mediado por el metabolismo microbiano. Por ejemplo, los géneros *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus* y *Listeria* codifican para una hidrolasa de sales biliares (BSH), responsable de la producción de ácidos biliares secundarios como: el ácido desoxicólico (DCA) y el ácido litocólico (LCA), los cuales son importantes para la emulsión y la absorción de los lípidos (Gérard, 2013; Zoetendal et al., 2012).

Los microorganismos residentes del colon, además del papel que tienen en el metabolismo de los alimentos, también regulan diversas funciones del hospedero, entre ellas el movimiento peristáltico, ya que se ha demostrado que productos del metabolismo bacteriano, como los SCFAs y el triptófano, inducen la secreción de la serotonina por las células enterocromafines, un grupo de células epiteliales gastrointestinales (Yano et al., 2015).

III. EVOLUCIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL

Se ha observado que la microbiota intestinal difiere considerablemente entre los individuos “sanos”, esto se debe a factores determinantes como la vía de parto, a la edad, al tipo de alimentación, al estilo de vida (sedentarismo, con actividad física, etc.), al estatus socioeconómico (Lewis et al., 2021), entre otros; considerándose que cada individuo tiene un microbioma característico. Sin embargo, se han identificado microbiomas cuya composición es similar y con características funcionales específicas con base en diferentes etapas de la vida (Kundu et al., 2017) Figura 2.

Las primeras etapas de la vida se dividen de la siguiente forma: El neonato (bebé) va desde el primer mes fuera del útero hasta completar el año. La Infancia (infante) abarca desde edades de 1 año-5 años. La niñez suele abarcar de los 6 años- 9/10 años (dependiendo del nivel de desarrollo físico e intelectual individual). La preadolescencia (la pubertad) suele comprender de los 9/10 años-14 años.

a. Periodo prenatal

Hasta la década pasada, se consideraba que los recién nacidos tenían su primer contacto con los microorganismos durante el parto, puesto que se consideraba a la placenta como una barrera contra la difusión de toxinas y microorganismos al flujo sanguíneo fetal. Sin embargo, recientemente, se han publicado estudios donde se reportan comunidades microbianas en placenta, líquido amniótico, sangre de cordón

umbilical y meconio; sugiriendo una posible colonización inicial *in útero* (Stinson et al., 2017).

b. Periodo neonatal

1. Vía de parto

Se ha demostrado que la vía de nacimiento juega papel importante en los géneros identificados en el microbioma intestinal del recién nacido. Los neonatos que nacen por vía vaginal están colonizado predominantemente por bacterias de los géneros: *Prevotella* y *Lactobacillus*, mientras que los neonatos nacidos por cesárea están colonizado principalmente por bacterias de los géneros *Corynebacterium* y *Propionibacterium*, *Staphylococcus*; géneros similares a los de la microbiota residente en la piel (Dominguez-Bello et al., 2010).

2. Tipo de alimentación del neonato

Una fuente adicional de transferencia microbiana postnatal son el calostro y la leche materna, abasteciendo al intestino del neonato con $\sim 8 \times 10^4 - 10^6$ bacterias diariamente. Este inóculo microbiano se encuentra formado en su mayoría por bacterias pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* y *Bacteroides* (Albesharat et al., 2011; Martín et al., 2009). En contraste, se ha observado que los neonatos que reciben una dieta basada en leche de fórmula presentan cambios en la composición de su microbioma gastrointestinal, diferente a los alimentados por leche materna, observándose un enriquecimiento en la abundancia de los géneros *Veillonella*, *Clostridioides* y *Streptococcus* (Forbes et al., 2018; Ma et al., 2020).

c. Infancia temprana

Durante los primeros dos a tres años de vida, la microbiota del infante adquiere mayor diversidad debido a los cambios en la alimentación, causados por la introducción de alimentos sólidos y de una dieta omnívora (Palmer et al., 2007). Se ha observado que disminuye la dominancia de *Bifidobacterium*, cuya principal función es la de procesar los oligosacáridos de la leche. Una vez que se inicia con la dieta de vegetales el microbioma se ve modificado, identificándose géneros bacterianos como *Fermentimonas*, *Ruminococcus* y *Faecalibacterium* géneros asociados al procesamiento de polisacáridos vegetales. Durante esta etapa también se observa un incremento en la variabilidad de la microbiota entre los infantes dependiendo de la alimentación (Koenig et al., 2011).

Esta transición parece ser crucial, puesto que la microbiota tiene influencia sobre el desarrollo de diferentes órganos y sistemas fisiológicos. Por ejemplo, se ha evidenciado la comunicación e interacción del microbioma gastrointestinal tanto con el sistema nervioso entérico (ENS), así como con el sistema nervioso central (CNS), lo que ha permitido correlacionar cambios en la composición de la microbiota en etapas tempranas y en el desarrollo de enfermedades neurológicas en etapas posteriores (Collins et al., 2014). Adicionalmente, se ha mostrado que el microbioma tiene una gran influencia en el desarrollo del sistema inmune intestinal y de enfermedades autoinmunes durante esta etapa (Cahenzli et al., 2013).

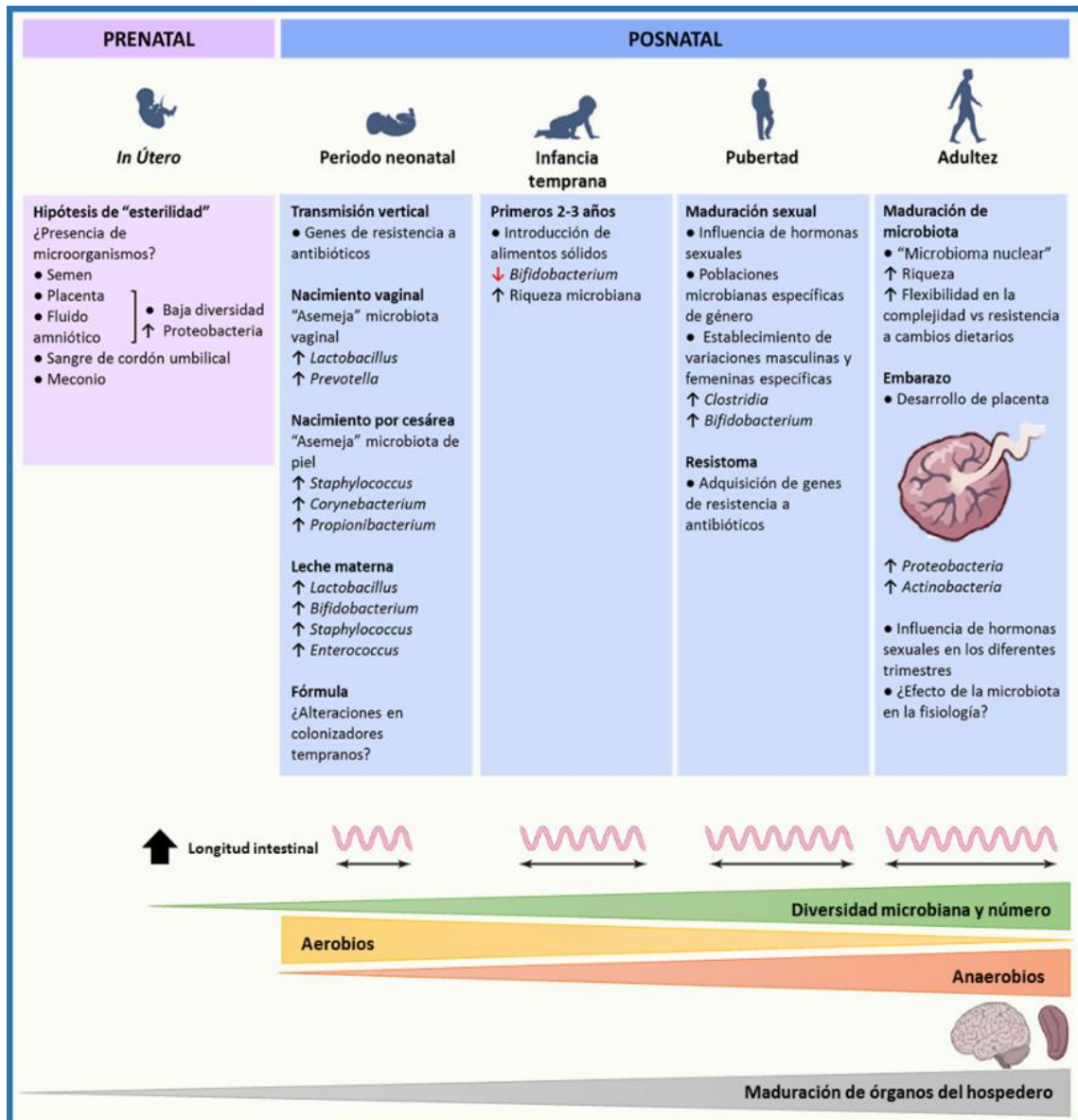


Figura 2. Cambios en la microbiota intestinal desde el nacimiento hasta la adultez. La composición de la microbiota intestinal cambia con la edad del hospedero. En la actualidad se sugiere que desde *in utero* el feto tiene una microbiota característica. La microbiota del recién nacido depende directamente de su vía de nacimiento, por parto vaginal o por cesárea, así como del tipo de dieta, leche materna o fórmula. Posteriormente, la microbiota del bebé se modifica con la introducción de alimentos sólidos, así como con la dieta omnívora que alcanzan entre los dos y tres años. Durante la pubertad, debido a la aparición de las hormonas sexuales, nuevamente se ve modificada la microbiota. Finalmente, en el adulto se genera un "microbioma nuclear" que agrega flexibilidad y reduce la vulnerabilidad a desafíos tanto internos como externos. Este proceso de maduración toma lugar en paralelo con el desarrollo de los órganos del hospedero, como el alargamiento del intestino, proporcionando nichos adicionales para que la microbiota se expanda. **(Tomada y modificada)** (Kundu et al., 2017)

d. Niñez

Durante la niñez el microbioma intestinal de los niños comienza a ser más estable, pero muestra características de un estado intermedio entre los infantes menores y los adultos (Derrien et al., 2019), por ejemplo: el género *Bifidobacterium*, que se encuentra en gran abundancia en niños menores de tres años, va disminuyendo su abundancia conforme el niño crece (Agans et al., 2011). En un estudio en el que se comparó una cohorte de niños de 7-12 años con una cohorte de adultos se observó que los niños poseen una mayor abundancia de los géneros *Bifidobacterium* y *Faecalibacterium*, mientras que los adultos presentaron una mayor abundancia del género *Bacteroides*. Además, este estudio también reportó que en los niños se encontró un enriquecimiento de los genes asociados a promover su crecimiento y desarrollo, por ejemplo: los genes involucrados en la síntesis de vitaminas y la degradación de aminoácidos (Hollister et al., 2015).

e. Pubertad

Fase asociada a cambios fisiológicos vinculados a la maduración sexual, predominantemente llevados a cabo por hormonas, lo que representa una época de gran impacto para la comunidad bacteriana intestinal y es en esta etapa en la que se ha reportado una posible microbiota específica de género (Markle et al., 2013). Estudios recientes sugieren que los adolescentes se caracterizan por un microbioma que es funcionalmente diferente al de los adultos, albergando un enriquecimiento de genes asociados a la síntesis de la vitamina B₁₂ y a la síntesis del folato en el microbioma de los pubertos, mientras que se observó un enriquecimiento de genes asociados a la fosforilación oxidativa y a la síntesis de lipopolisacárido en el microbioma de los hospederos adultos (Agans et al., 2011; Hollister et al., 2015). Además, cada vez se obtienen más evidencias de que en esta etapa el microbioma adquiere un repertorio de genes de resistencia a antibióticos, denominado “resistoma”(Moore et al., 2013).

f. Adulthood

El microbioma del adulto es más estable, debido a la presencia de colonizadores permanentes, capaces de sobreponerse a los estímulos de estrés y antibióticos (Turnbaugh & Gordon, 2009). Se sugiere que en esta etapa los individuos adultos desarrollan un microbioma nuclear funcional, a pesar de la gran variación en la composición de la microbiota entre individuos adultos (Lederberg J & McCray A., 2001) Figura 3. Entre los factores que contribuyen a la variabilidad de la microbiota están las alteraciones nutricionales/dietarias, las variaciones estacionales, los factores regionales (como la altitud), entre otros (Yatsunenکو et al., 2012). El incremento en la riqueza y la complejidad microbiana, característico de la microbiota de un adulto, es respaldado por la gradual expansión de la superficie intestinal que produce nichos adicionales para la colonización de nuevos simbioses, con una particular reducción de los microorganismos aerobios y un incremento simultáneo de los organismos anaerobios (Agans et al., 2011) Figura 2.



Figura 3. El concepto de un microbioma humano nuclear. El microbioma humano nuclear (rojo) es el conjunto de genes presentes en un nicho determinado de todos o la mayoría de los humanos. El microbioma humano variable (azul) es el grupo de genes presentes en un nicho determinado en un subconjunto de humanos. Esta variación resulta de una combinación de factores tales como el genotipo, el estado fisiológico, el sistema inmune, la patobiología (el estado de enfermedad), el estilo de vida (incluyendo la dieta), el ambiente (en casa y/o trabajo) del hospedero y de la presencia de poblaciones transitorias de bacterias que no logran colonizar. **(Tomada y modificada)** (Lederberg J & McCray A., 2001)

IV. LA DISBIOSIS Y SU PAPEL EN PATOLOGÍAS

Se conoce como “disbiosis” cuando el microbioma intestinal se altera y pierde su equilibrio, observándose una disminución en la diversidad de la comunidad microbiana. Este desbalance en la riqueza y en la abundancia de los géneros puede ser el resultado de alteraciones en el hospedero, como desnutrición y enfermedades (Bäckhed et al., 2012). Sin embargo, no se tiene claro si esta variación es un factor que contribuye a la patología o una consecuencia de esta. Alteraciones en la abundancia de especies particulares pueden conducir a la sobreestimulación o a la supresión de la respuesta inmune, propiciando el desarrollo de enfermedades inflamatorias o la predisposición a la colonización por patógenos (Thaiss et al., 2016). Un ejemplo es la infección por *Clostridium difficile*, la cual puede causar diarrea y colitis pseudomembranosa como resultado del uso excesivo de antibióticos, los cuales alteran riqueza y abundancia de la microbiota comensal cuyo resultado es la alteración del nicho original permitiendo la colonización de *Clostridium difficile* (Antharam et al., 2013). Actualmente existen múltiples estudios que establecen una correlación entre la disbiosis y el desarrollo de múltiples patologías como: la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), la obesidad, la diabetes tipo II y el cáncer.

En el intestino distal, la disbiosis es caracterizada por la disminución de bacterias anaerobias estrictas y el incremento de anaerobias facultativas, en particular de la familia Enterobacteriaceae (Proteobacteria). Esta familia de bacterias gram-negativas, que en equilibrio representa alrededor del 0.1% de la microbiota regional, se aloja en la proximidad del epitelio debido a su alta tolerancia al oxígeno, presentando su expansión en contextos de inflamación (Lupp et al., 2007).

V. EL SÍNDROME DIARREICO

Es el conjunto de signos y síntomas que incluyen episodios de diarrea, donde las heces pueden tener sangre o moco, la presencia de fiebre, cólicos, náuseas y vómito. La deshidratación en los sujetos con diarrea está directamente involucrada con la pérdida de líquidos corporales y electrolitos, lo cual puede llevar a choque hipovolémico y muerte (Hooper et al., 2014). Por otro lado, se ha demostrado que el presentar más de 5 episodios de diarrea en los 2 primeros años de vida puede resultar en desnutrición crónica y retraso en el crecimiento, lo que está asociado con una disminución irreversible en la capacidad cognoscitiva del infante (Guerrant et al., 2001).

a. La clasificación de la diarrea

Con base en el tiempo de duración de la diarrea en días, la diarrea se clasifica en: diarrea aguda, cuya duración es menor de 14 días; diarrea persistente, de 14 a 28 días (2-4 semanas) y diarrea crónica, con una duración de más de 28 días (4 semanas) (*Diarrhea - NIDDK*, n.d.).

Con base a los microorganismos o productos de estos la diarrea se clasifica en: 1.- Diarrea secretora debida a la estimulación de la secreción activa de iones cloruro y otros iones por las células epiteliales intestinales (Remes Troche et al., 2010). Entre los activadores de los mecanismos de transporte de iones están las enterotoxinas como la toxinas termolábil y termoestable de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), la toxina colérica producida por *Vibrio cholerae* o las toxinas producidas por el género *Staphylococcus* asociadas con intoxicación alimentaria, así como la tóxica NSP4 de Rotavirus (Kaiser & Surawicz, 2012). 2.- Diarrea inflamatoria o exudativa como resultado del daño epitelial y la disminución de la superficie de absorción epitelial y por ende de los nutrientes. Las deposiciones se caracterizan por la presencia de moco, de restos hemáticos y de leucocitos, asociada con patógenos invasores como *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter* y *E. coli* enteroinvasora (EIEC) (ABERRA, 2005) o parásitos como *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* (*Diarrhoeal Disease*, n.d.).

b. La epidemiología de la diarrea

1. Relevancia a nivel mundial

A nivel mundial se reportaron ~1.53 millones de muertes por diarrea en el 2019, siendo los grupos etarios más afectados fueron los infantes <5 años y los adultos ≥70 años, con una mortalidad de ~500,664 (32.7%) y de ~611,935 (40%), respectivamente. Como se muestra en la **Figura 4 a)** la mortalidad por diarrea en los infantes ha disminuido considerablemente en las últimas tres décadas, debido a las campañas de rehidratación oral y la introducción de la vacuna de rotavirus en el mundo en la últimos 15 años, ya que paso de un 57% en 1990 a un 32% en el año 2019, sin embargo la mayoría de las muertes en la actualidad por diarrea corresponden a adultos mayores (≥70 años),

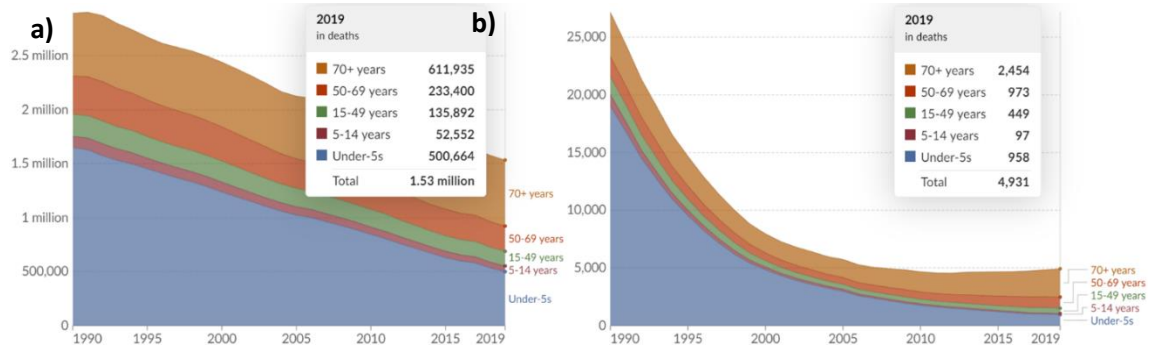


Figura 4. Incidencia de muertes por diarrea desde 1990 hasta 2019. a) Gráfico que representa las muertes por diarrea a nivel mundial. El número total de muertes se presenta en “Millones”. **b)** Gráfico que representa las muertes por diarrea en México. El número total de muertes se presenta en “Miles”. En el eje X se presentan los años que abarca el censo. En el eje Y se presenta el número de muertes por diarrea. En colores se presentan los grupos de edad: azul → <5 años, marrón → 5-14 años, verde → 15-49 años, rojo → 50-69 años, naranja → ≥70 años. El cuadro presenta los números de muertes por diarrea separadas por grupos de edad en el año 2019. **(Tomada y Modificada)** (Dadonaite, B., Ritchie, H., Roser, n.d.)

pasando del 20% en 1990 al 40% en 2019, mostrando claramente la necesidad de realizar campañas cuyo blanco sea este grupo etario, para disminuir el número de muertes que no se ha disminuido desde que se iniciaron los reportes de mortalidad por diarrea en los años noventa (Dadonaite, B., Ritchie, H., Roser, n.d.; Roth et al., 2018)

De forma general, la tasa de mortalidad más elevada del 2019 se presentó en países de África Central, donde las muertes por diarrea llegan a sobrepasar los 150 casos por cada 100,000 habitantes, seguido por países de África subsahariana y Asia del sur, con tasas de mortalidad que van de 50-150 casos por cada 100,000 habitantes, en América Latina Haití, Guatemala y Honduras tienen tasas de mortalidad de 36, 22 y 17 casos por cada 100,000 habitantes, respectivamente, mientras que en el resto del mundo la tasa de mortalidad es de ~5 casos por cada 100,000 habitantes. Estos datos reflejan que la tasa de muertes por diarrea es más de 10 veces más alta en los países en pobreza extrema en comparación con los países desarrollados (Roth et al., 2018).

Actualmente se sabe que las muertes por diarrea en los infantes son principalmente causadas por patógenos gastrointestinales, mayormente causadas por patógenos virales y bacterianos. En el 2018 se reportó que a nivel mundial Rotavirus es responsable de ~210,000 muertes (35.7%), *Shigella* spp. de ~63,000 muertes (10.8%) y Adenovirus de ~37,000 muertes (6.3%). En total, ese año se concluyó que 10 patógenos (Rotavirus, *Shigella*, Adenovirus, Norovirus, *E. coli* enterotoxigénica, Sapovirus, Astrovirus, *Cryptosporidium*, *Campylobacter* y *Salmonella*) son responsables de 3/4 de las muertes por diarrea (Troeger et al., 2018).

2. Relevancia en México

En México en 2019 se reportaron ~4,931 casos de muertes por diarrea, con una tasa de ~4.6 muertes por cada 100,000 habitantes. El grupo más afectado fue el de los

adultos ≥ 70 años con $\sim 2,454$ muertes (49.8%) por diarrea, seguido de los infantes < 5 años con ~ 958 muertes (19.4%) (Black et al., 2010). Como se muestra en la **Figura 4 b**), se observó un incremento en las muertes por diarrea en el grupo etario ≥ 70 años, pasando del 14% al 50% y una disminución con respecto a otros años en los infantes, pasando del 70% al 19%, indicando nuevamente que en el México y en el mundo el síndrome de diarreico está afectando de manera importante a los adultos mayores. En México al síndrome diarreico se le consideró como la segunda causa de mortalidad asociada a infección en infantes < 5 años, sólo precedida por las enfermedades respiratorias (Remes Troche, 2016).

Nuestro grupo de trabajo ha realizado múltiples estudios sobre la búsqueda intencionada de patógenos de diarrea en infantes < 5 años. En un estudio de diarrea de comunidad realizado en una zona conurbada de la Ciudad de México se siguió una cohorte de infantes, donde se observó que la mayoría de los casos de diarrea aguda bacteriana eran causados por los patotipos de las *E. coli* diarrogénicas (PEDs), donde *E. coli* enteropatógena (EPEC) y enterotoxigénica (ETEC) fueron los PEDs más frecuentemente identificados. En este estudio se observó una variación en el número de casos de diarrea en función de la edad, la región geográfica y la estacionalidad (Estrada-García et al., 2009).

Como se muestra en la **Tabla 1** también se han realizados varios estudios de los agentes que llevan a que un infante ingrese a urgencias pediátricas o a la unidad de rehidratación oral de los hospitales, en los cuales se ve el cambio epidemiológico después de la introducción de la vacuna contra rotavirus en México, en el 2007, donde rotavirus dejó de ser el agente infeccioso más importante causante de diarrea grave aguda y ahora son los agentes bacterianos, principalmente los PEDs seguidos de *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *Campylobacter jejuni* (Patzí-Vargas et al., 2015). La introducción de la vacunación de rotavirus en México no solo ha tenido un impacto en disminuir la severidad del cuadro clínico causado por este virus, si no de manera muy

	CDMX Mar 1998-Feb 2001 n (%)	Villahermosa, Tab. Feb 2003-Feb 2006 n (%)	Mérida, Yuc. Ene 2007-Dic 2011 n (%)	Mérida, Yuc. Ene 2010-Jul 2014 n (%)
Patógeno identificado	n = 1129	n = 620	n = 831	n = 893
Rotavirus	461 (41)	197 (32)	-	201 (22.5)
PEDs	133 (12)	140 (22.5)	232 (28)	276 (31)
<i>Shigella</i> spp.	145 (13)	23 (4)	73 (9)	96 (10.8)
<i>Salmonella enterica</i>	52 (5)	7 (1)	103 (12)	101 (11.3)
<i>Campylobacter</i> spp.	28 (2.5)	4 (0.6)	39 (5)	50 (5.6)
Parásitos	-	-	-	37 (4.1)
<i>Vibrio cholerae</i>	-	-	-	10 (1.1)
Referencia	Cerna-Cortes et al., 2003	Pacheco-Gil et al., 2007	Patzí-Vargas et al., 2015	Meza-Segura et al., 2017

Tabla 1. Prevalencia de enteropatógenos en muestras de diarrea en México. Se muestra la prevalencia de los principales agentes etiológicos causantes del síndrome diarreico. Estas prevalencias se obtuvieron a través de diversos estudios realizados en México. Los patógenos fueron identificados en muestras de heces de niños menores de 5 años que requirieron hospitalización por diarrea aguda.

importante una disminución global del número de muertes por diarrea (Richardson et al., 2011; Sánchez-Urbe et al., 2016).

VI. *Shigella* spp. COMO PATÓGENO GASTROINTESTINAL

A finales del siglo XIX *Shigella* fue identificado como el agente causal de la disentería bacilar tras su aislamiento y caracterización por el japonés Kiyoshi Shiga. *Shigella* es un bacilo Gram negativo, no motil, no esporulado, anaerobio facultativo y un patógeno intracelular facultativo. Pertenece a la familia de Enterobacteriaceae y lo que le distingue del resto de los miembros de esta familia es que es un patógeno restringido a primates, particularmente a humanos (Mattock & Blocker, 2017).

El género *Shigella* está constituido por cuatro especies, las cuales a su vez están subdivididas en serotipos de acuerdo con las variantes del antígeno-O que presentan, el cual es una parte del lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. El antígeno-O está constituido por unidades repetidas de un oligosacárido (unidad-O), el cual posee entre dos a ocho residuos de un repertorio de azúcares, haciéndolo un componente muy diverso (Mattock & Blocker, 2017). Las cuatro especies son: *S. dysenteriae* (Serogrupo A, con 15 serotipos), *S. flexneri* (Serogrupo B, con 19 serotipos), *S. boydii* (Serogrupo C, con 20 serotipos) y *S. sonnei* (Serogrupo D, con solo 1 serotipo).

Los estudios de genómica comparativa sugieren que en realidad *Shigella* pertenece a la especie *E. coli*. Por ejemplo, la divergencia entre *S. flexneri* y *E. coli* K-12 es únicamente del 1.5% (Lan et al., 2004). Adicionalmente, *E. coli* enteroinvasora (EIEC) comparte características bioquímicas, factores de virulencia y síntomas clínicos con *Shigella* spp. Con base en que EIEC posee más características de *E. coli* comensal, se cree que *Shigella* spp. adquirió la maquinaria de virulencia recientemente y se ha

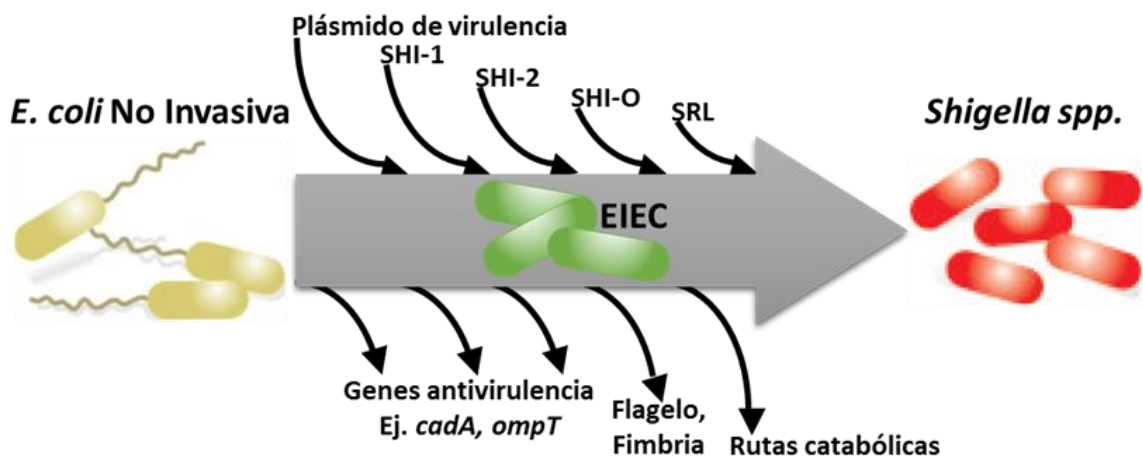


Figura 5 Eventos genéticos causaron la evolución de *Shigella* spp. Se sugiere que *Shigella* spp. evolucionó a partir de *E. coli* no patogénica, adquiriendo factores de virulencia y perdiendo loci genéticos. Debido al alto porcentaje de homología, se ubica a EIEC como una etapa intermedia del proceso. (Tomada y Modificada) (Schroeder & Hilbi, 2008)

ubicado a EIEC como una especie temprana en la evolución de *Shigella* (Schroeder & Hilbi, 2008) **Figura 5**

Shigella ha perdido varios genes funcionales (Peng et al., 2006), como: 1.- Los genes asociados a varias rutas catabólicas, por ejemplo, *Shigella* perdió los genes responsables de la fermentación de la lactosa (Ito et al., 1991), 2.- Los genes asociados con la síntesis de estructuras de superficie, por ejemplo, *Shigella* es incapaz de sintetizar un flagelo o fimbrias, los cuales son activadores del sistema inmunológico del hospedero (Tominaga et al., 2005), 3.- Los genes que atenúan o interfieren con la virulencia de *Shigella*, por ejemplo, la proteína OmpT (outer membrane protease T), la cual está presente en cepas no patogénicas de *E. coli*, en *Shigella* interviene con la localización de la proteína nucleadora de actina IcsA y en consecuencia inhibe la propagación a células adyacentes (Nakata et al., 1993). Todos estos cambios son característicos de la adaptación de las bacterias de vida libre a la vida intracelular, pues se reduce la presión selectiva y también la necesidad de responder a cambios ambientales, ya que habitan dentro de células cuyo ambiente no varía y solo requieren de genes que les permiten explotar los recursos del hospedero (Maurelli, 2007).

a. Los elementos genómicos de *Shigella* spp.

La información genética que constituye al fenotipo de *Shigella* spp. está codificada tanto en el cromosoma bacteriano como en un plásmido de virulencia, los cuales en combinación y sincronía codifican para la maquinaria molecular necesaria para la invasión del epitelio intestinal, el estilo de vida intracelular, así como los genes de virulencia que están asociados con los signos y síntomas de la enfermedad (Sansone et al., 1983). La evolución bacteriana es un proceso dinámico a través de la transferencia horizontal de genes y/o la delección de genes, por ejemplo, la adquisición e incorporación cromosómica de elementos génicos inestables que contienen genes de virulencia denominados "Islas de patogenicidad" (PAI) (F. Yang et al., 2005).

Hasta el momento, en *Shigella* se han identificado múltiples islas de patogenicidad (SHI) localizadas en el cromosoma bacteriano, cuya presencia y localización genómica difiere entre las distintas cepas, estas islas de patogenicidad contribuyen a la diversidad de los fenotipos virulencia (Schmidt & Hensel, 2004). Hasta el momento, se ha caracterizado la función específica de varios de genes codificados en estas islas de patogenicidad:

a) En la isla SHI-1 están codificados los genes para la proteasa citotóxica SigA (*Shigella* IgA-like protease homologue), como para la enterotoxina ShET1, ambas proteínas asociadas con la secreción de fluido intestinal. En la cadena complementaria a ShET1 está codificada la serin proteasa Pic (protease involved in intestinal colonization), la cual participa en la degradación del moco intestinal.

b) En las islas SHI-2 y SHI-3 se han identificados los genes *iucA-D*, *iutA* los cuales codifican para un sistema de adquisición de hierro, también en estas islas se ha identificado al gen *shiA*, el cual se describió asociado a la inhibición del proceso de inflamación. Aún se desconoce el mecanismo exacto mediante el cual actúa ShiA, pero

se reportó que en ausencia de ShiA hay un incremento en la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-17 e IL-1 β y por ende incrementa la migración de neutrófilos y células T (Ingersoll & Zychlinsky, 2006).

c) La isla SHI-O alberga los genes que modifican para la estructura del antígeno-O del LPS, asociado con la gran diversidad de los serotipos de *Shigella*. El antígeno-O participa en la evasión de la bacteria del sistema inmune del hospedero.

d) En la isla Stx-phage P27 se encuentra un operón conformado por los genes *stxA* y *stxB*, los cuales codifican para la toxina Shiga. La toxina Shiga (Stx) es una citotoxina AB₅ que inhibe la síntesis de proteínas en las células eucariotes, desencadenando la muerte celular (Gray et al., 2014).

En *Shigella* la maquinaria molecular esencial para la invasión y su sobrevivencia intracelular está codificada en el plásmido de virulencia pINV (“plásmido de invasión”), que es de ~200 kb y contiene alrededor de 100 genes. Como se muestra en la Figura 6, el núcleo de este plásmido es conocido como la “región de entrada” y mide aproximadamente 31 kb. Esta región conservada está constituida por 34 genes organizados en dos operones que se transcriben en direcciones opuestas, entre los que se encuentran los genes que codifican a las proteínas involucradas en la invasión celular. Con base en las funciones de las proteínas, los genes se clasifican en 6 grupos (Mattock & Blocker, 2017).

1.- El primer grupo está codificado por más de la mitad de la región de entrada, incluyendo al locus *mxi-spa*, el cual codifica para los componentes necesarios para el ensamblaje y la función del sistema de secreción tipo 3 (T3SS), cuya función es la de transportar aproximadamente 25 proteínas del citoplasma bacteriano a la célula eucariote. 2.- En el segundo grupo se encuentran las proteínas IpaB, IpaC e IpaD, las cuales se colocan en la punta del T3SS y forman al translocador. Como su nombre lo sugiere, esta estructura multimérica es la que se inserta en la membrana de la célula eucariote y permite la translocación de las proteínas efectoras bacterianas. 3.- El tercer grupo está representando por proteínas que son activadores transcripcionales, los

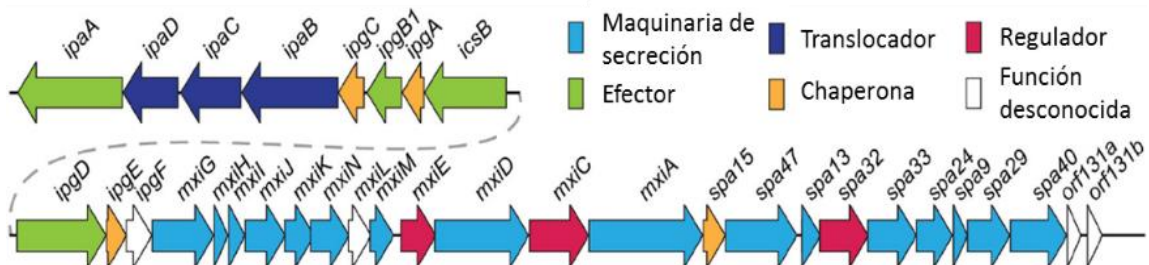


Figura 6. Organización genómica de la región de entrada en el plásmido pINV. Los genes son agrupados en dos operones, el *ipa/ipg* y el *mxi/spa*. Los genes se encuentran marcados en colores de acuerdo con su función. *Maquinaria de secreción* se refiere a los componentes del T3SS. *Translocadores* son componentes del translocón, un poro insertado dentro de la membrana del hospedero que permite la translocación de los efectores. *Chaperonas* son componentes que estabilizan a los efectores previo a su secreción de la bacteria. *Reguladores* modulan la expresión y función del T3SS. **(Tomada y modificada)** (Mattock & Blocker, 2017)

cuales regulan la expresión de los genes asociados al T3SS. 4.- El cuarto grupo consiste en las proteínas efectoras que son secretadas y que afectan a las moléculas o a los procesos de la célula hospedera. 5.- El quinto grupo está conformado por cuatro genes que codifican para las chaperonas (*ipgA*, *ipgC*, *ipgE* y *spa15*), que estabilizan a los efectores en el citoplasma bacteriano, mientras que las proteínas IpgC y Spa15 también participan en la regulación transcripcional de efectores localizados fuera de la región de entrada (Menard et al., 1994).

Además, hay otro grupo de genes que codifican para proteínas que no están codificadas en la región de entrada (Osp), que incluyen genes que codifican para proteínas efectoras que participan en funciones de virulencia posteriores a la invasión, en su mayoría secuestrando a proteínas de las células hospederas, modulando así la regulación transcripcional, la actividad metabólica y la respuesta inmune de la célula eucariote (Menard et al., 1994).

b. La transmisión y la patogénesis de *Shigella* spp.

Shigella spp. se transmite por la ruta fecal-oral, cuya dosis infectiva es sólo 10-100 UFCs (DuPont et al., 1989), una de las dosis infectivas más bajas para las bacterias enteropatógenas, lo cual se ha atribuido a la presencia de sistemas de resistencia a pH ácido, lo que le permite a *Shigella* sobrevivir al ambiente del estómago y del intestino delgado para finalmente llegar al colon, donde establece su nicho de infección.

S. flexneri ha sido la especie más estudiada de este género y de donde se tiene el mayor conocimiento sobre los mecanismos asociados a la patogénesis de *Shigella*. Como se observa en la Figura 7 se ha documentado que la infección por esta bacteria tiene varias etapas. En la fase inicial de la infección, *Shigella* no invade la barrera epitelial por el polo apical del enterocito, en su lugar induce su captación por las células M y realiza su transición a través de la capa epitelial, por lo que no tienen que activar su sistema de invasión, contenido en su plásmido de invasión, para penetrar a estas células. Las células M son células epiteliales especializadas, cuya función es la de transportar continuamente partículas del lumen intestinal y entregarlas a los ganglios linfoides secundarios, donde puede ser iniciado el procesamiento de los antígenos e inducir la respuesta inmune adaptativa contra estos antígenos (Rey et al., 2020). Tras la transcitosis, *Shigella* es liberada dentro de un compartimiento intraepitelial, donde la bacteria se encuentra con macrófagos residentes de la lámina propia los cuales fagocitan y degradan el material captado. *Shigella* asegura su supervivencia escapando de la vacuola fagocítica, activando la vía de señalización del inflamósoma e induciendo la muerte celular del macrófago vía piroptosis (Zychlinsky et al., 1996). Dicha muerte es acompañada por la liberación de citocinas proinflamatorias como la IL-1 β y la IL-18. Mientras que la IL-1 β induce la fuerte inflamación intestinal característica de la shigellosis, la IL-18 está involucrada en la generación de una respuesta antimicrobiana efectiva al activar a las células NK (Natural Killer) y promover la producción de IFN- γ , amplificando así la respuesta inmune innata (Zychlinsky et al., 1996).

Una vez liberada del macrófago, *Shigella* invade a las células epiteliales intestinales por el lado basolateral, escapa del endosoma y se replica en el citoplasma (Sansonetti, et al., 1986). *Shigella* se desplaza en el citoplasma al inducir la

polimerización dirigida de actina, lo cual permite a la bacteria propagarse a las células adyacentes, evitando así exponerse a componentes extracelulares de la respuesta inmune del hospedero (Stevens et al., 2006). Sin embargo, la invasión de las células epiteliales intestinales provoca una fuerte respuesta inflamatoria, ya que la célula detecta fragmentos de peptidoglicano intracelular y activa la vía NF- κ B, lo que induce la expresión y secreción de la IL-8, la cual promueve la migración de los neutrófilos o polimorfos nucleares (PMNs) al sitio de infección (Philpott et al., 2000).

Los neutrófilos infiltrados alteran la integridad de la barrera epitelial, permitiendo que más *Shigella* del lumen alcancen la lámina propia, exacerbando la lesión del tejido (Perdomo et al., 1994). Aunado a esto, *Shigella* es capaz de debilitar el sellado de las uniones estrechas del epitelio intestinal al alterar la composición proteica de dichas uniones (Sakaguchi et al., 2002). A la larga, los neutrófilos reclutados al sitio de infección captan y matan a las bacterias, resolviendo así la infección (Zhang et al., 2001).

La infección por *Shigella* culmina con la destrucción severa del tejido, lo que resulta en una liberación de agua, nutrientes, solutos, moco y sangre hacia el lumen

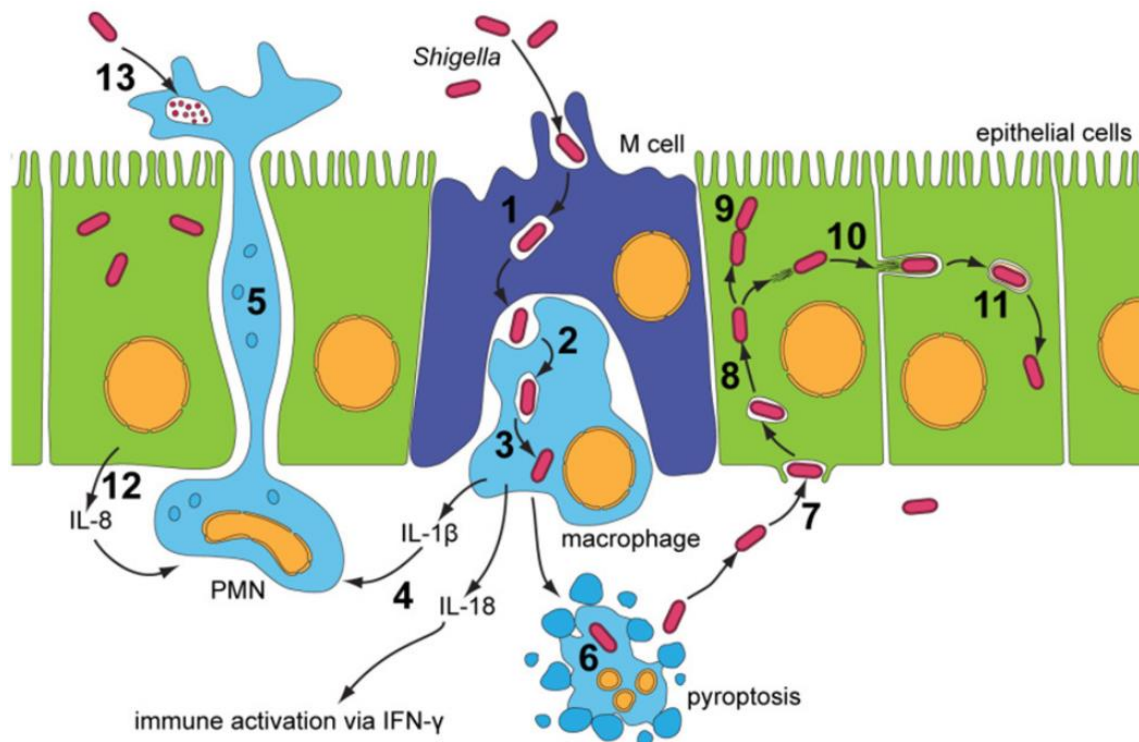


Figura 7. Patogénesis celular de *Shigella* spp. *Shigella* cruza la barrera epitelial por transcitosis a través de las células M y se encuentra con macrófagos residentes. La bacteria evade la degradación al inducir la muerte celular vía piroptosis, acompañado de una señalización proinflamatoria. La bacteria libre invade células intestinales epiteliales por el lado basolateral y se divide en el interior de estas células. La bacteria se desplaza a través del citoplasma de las células por la polimerización de actina y se dispersa hacia células adyacentes. La señalización proinflamatoria involucra a células NK y PMNs. El influjo de PMNs desintegra la hermeticidad de la barrera epitelial, exacerbando la infección y destrucción del tejido. Por otro lado, los PMNs fagocitan y matan a las bacterias, contribuyendo a la resolución de la infección. (Tomada) (Schroeder & Hilbi, 2008)

intestinal. La alteración en la homeostasis de electrolitos, así como la secreción de iones y fluido, son características distintivas de la shigellosis. Notablemente, la enterotoxina 1 y 2 de *Shigella* (ShET1, ShET2) son capaces de inducir la secreción de fluido de los tejidos hacia el intestino (Fasano et al., 1997). Además, la toxina Shiga, la cual es producida únicamente por *Shigella dysenteriae* serotipo 1, es citotóxica para una variedad de tipos celulares y responsable de lesiones vasculares en el colon, el riñón y el sistema nervioso central. Debido a su alta toxicidad, infecciones con *Shigella dysenteriae* serotipo 1 son frecuentemente asociadas con complicaciones potencialmente mortales (Cherla et al., 2003).

c. Factores y mecanismos de virulencia de *Shigella* spp.

- **SPATEs:** Las proteínas SPATEs (Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae) son una familia de proteasas que catalizan su propia secreción a través de un T5SS. *Shigella* es capaz de codificar distintas SPATEs, no todas ellas presentes en todas las cepas de *Shigella*. Dentro de las SPATEs se encuentran: SigA (*Shigella* IgA-like protease homologue), Sat (secreted autotransporter toxin), Pet (plasmid-encoded toxin), SepA (*Shigella* extracelular protein A) y Pic (protease involved in intestinal colonization). Estas proteínas presentan diferentes funciones para la invasión intestinal, como la inducción de la secreción y la degradación de la mucina, la desestabilización de adhesiones focales y de las uniones estrechas, la capacidad de enterotoxicidad, la acumulación de fluido y la descamación epitelial.
- **IcsA (VirG):** Es una proteína de membrana externa de 120 kDa, del grupo de proteínas autotrasportadoras con una secreción mediada vía Sec. Esta vía Sec consta de una translocasa integrada a la membrana citoplásmica de la bacteria que transporta proteínas no plegadas al espacio periplásmico (Natale et al., 2008). Como la mayoría de las proteínas autotrasportadoras, IcsA está compuesta de tres dominios: Una secuencia señal en el extremo N-terminal, un dominio α central y un barril β en el extremo C-terminal, el cual forma un poro en la membrana externa de la bacteria y por el que se transloca el dominio central (T. Suzuki et al., 1995).

IcsA está asociada con la capacidad de *Shigella* de adherirse a las células epiteliales intestinales (Brotcke Zumsteg et al., 2014). Aún no se ha dilucidado el mecanismo completo de regulación, pero se ha reportado que el ácido biliar ácido desoxicólico (DOC) se une a IpaD en la punta del T3SS, lo que induce el reclutamiento de IpaB y la activación del T3SS (Barta et al., 2012). Esta activación del T3SS genera un cambio conformacional de la proteína IcsA, promoviendo que se adhiera a receptores aun no identificados en la superficie de la célula eucariote (Qin et al., 2020).

Una de las funciones más estudiadas de IcsA es su papel en la propagación intercelular de *Shigella*, donde se ha reportado que IcsA actúa de forma similar a Cdc42, una GTPasa pequeña de la familia Rho, que activa a N-WASP, una proteína de andamiaje de la célula hospedera que transmite señales de la superficie celular al citoesqueleto de actina. La activación de N-WASP permite el reclutamiento de Arp2/3 (Egile et al., 1999; Shibata et al., 2002), un miembro de un complejo proteico que juega un papel en el ensamblaje del citoesqueleto de actina, lo que promueve el ensamblaje de la F-actina y la formación de filamentos en el extremo N-terminal de

N-WASP, confiriéndole a *Shigella* la fuerza propulsora para moverse a través de la célula. Actualmente, se ha descrito que además de IcsA no se requieren otros factores adicionales para el desplazamiento de *Shigella* entre célula y célula (Monack & Theriot, 2001). Sin embargo, la proteína IcsP o la estructura del LPS son indispensables para la localización polarizada de IcsA y el movimiento unidireccional de la bacteria (Egile et al., 1999).

- **IcsB:** A IcsB se le atribuye un papel fundamental en la prevención de la autofagia (Ogawa et al., 2003), mediante múltiples mecanismos: 1.- IcsB se une a IcsA, enmascarando el sitio de reconocimiento de la proteína Atg5 del hospedero, involucrada en la primera fase de la formación del autofagosoma (Ogawa et al., 2005). 2.- IcsB también puede reclutar a la proteína Toca-1 (transducer of Cdc42-dependent actin assembly) impidiendo la fagocitosis mediada por la proteína LC3 (Baxt & Goldberg, 2014a), que está asociada con la biogénesis del autofagosoma y con la selección de sustratos que serán autofagocitados. 3.- IcsB también previene que los filamentos de septina formen estructuras en forma de jaula alrededor de *Shigella* previniendo la formación de las colas de actina que desplazan a *Shigella* (J. Huang & Brumell, 2014).
- **IpaA:** Proteína involucrada en la regulación negativa de las extensiones de la membrana de las células epiteliales mediante la despolimerización de los filamentos de actina. Se ha propuesto que IpaA interactúa directamente con la vinculina, una proteína de la célula hospedera, que conecta al citoesqueleto con la matriz extracelular y la unión de IpaA-vinculina induce un cambio conformacional en la vinculina, exponiendo un sitio de unión al extremo barbado en los filamentos de F-actina, previniendo la unión de nuevos monómeros de actina y causando la despolimerización de los filamentos (Izard et al., 2006). Por lo que, IpaA previene la formación descontrolada de extensiones de actina, inducidas por IpaC en el sitio de contacto de *Shigella* (Van Nhieu, 1997).
- **IpaB:** Esta proteína bacteriana involucrada en la adhesión a las balsas lipídicas en la membrana basolateral de la célula epitelial intestinal, mediante la interacción con la glicoproteína CD44 del hospedero (Skoudy et al., 2000). La interacción entre IpaB-CD44 podría ser un factor clave para la invasión basolateral de la célula epitelial por *Shigella*. IpaB al interactuar con IpaC también participa en la formación del translocón del T3SS de *Shigella* (Lafont, 2002).

Por otro lado, IpaB participa en la inducción de piroptosis en los macrófagos del hospedero, ya que en la región hidrofóbica de IpaB se encuentra un sitio de unión a la caspasa-1, también conocida como enzima convertidora de la interleucina 1 β (ICE), caspasa que forma parte del inflamósoma con una función proinflamatoria y pro-piroptótica (Guichon et al., 2001). Cuando IpaB interactúa con la caspasa-1, el complejo IpaB-ICE escinde a los precursores de las citocinas proinflamatorias IL-1 β e IL-18 para producir a las citocinas maduras, las cuales son liberadas al ocurrir la piroptosis del macrófago (Thirumalai et al., 1997), generando un ambiente

proinflamatorio, lo que promueve la migración de PMN y la activación de células NK para la resolución de la infección.

IpaB también ha sido vinculada con el arresto del ciclo celular a través de su interacción con la proteína Mad2L2, que es un inhibidor del complejo promotor de la anafase (APC), el cual es un complejo ligasa de ubiquitina E3 (Iwai et al., 2007). Mad2L2 en las células epiteliales está involucrado en promover que estas entren a la mitosis al interactuar con Cdh1, un factor asociado al complejo APC, el cual está involucrado en prevenir la mitosis mediante la degradación de las ciclinas mitóticas. Una vez que la mitosis ha ocurrido, Mad2L2 y Cdh1 se disocian, entonces Cdh1 arresta a la célula impidiendo que esta entre a un nuevo ciclo de mitosis. IpaB interfiere con la interacción Mad2L2-Cdh1, causando que Cdh1 suprima la mitosis mediante la degradación de las ciclinas, manteniendo a las células epiteliales ancladas a la matriz extracelular y unida a las células adyacentes, favoreciendo así la formación de un mejor nicho para la replicación y colonización bacteriana (Iwai et al., 2007).

- **IpaC:** Es una proteína crucial para la formación del poro de translocación (translocón) del T3SS de *Shigella* (Blocker et al., 1999) y en consecuencia para la invasión de los enterocitos por *Shigella* (Terry et al., 2008). La inserción de IpaC en la membrana de la célula epitelial promueve el rearrreglo del citoesqueleto de actina, lo que permitirá la macropinocitosis de *Shigella* (Ménard et al., 1996). SipC, un homólogo de IpaC en *Salmonella*, es capaz de polimerizar a la actina a partir de su dominio C-terminal, por lo que se sugiere que IpaC también pueda tener esta función (Hayward, 1999). Por otro lado, también se ha sugerido que IpaC puede activar de manera indirecta a las GTPasas Cdc42 y Rac1, proponiéndolo como un mecanismo alterno para manipular la polimerización de actina (Van Nhieu, 1997).

El translocón IpaB-IpaC también participa en la lisis de varias vacuolas: 1. de la vacuola fagocítica que se forma cuando los macrófagos fagocitan a *Shigella* (Bârzu et al., 1997), 2. de la vacuola que se produce por la entrada de *Shigella* al invadir a las células epiteliales intestinales (Du et al., 2016; Osiecki et al., 2001), 3. de la vacuola de doble membrana formada por el movimiento intercelular de *Shigella* (Campbell-Valois et al., 2014a; Page et al., 1999). En un modelo de macrófagos humanos se usaron cepas de *Shigella* que sólo codificaban para las proteínas estructurales del T3SS, IpaD, IpaB e IpaC (Du et al., 2016; Sansonetti, et al., 1986). Estas cepas son capaces de inducir la lisis de la vacuola fagocítica, sin la necesidad de secretar efectores. Se ha propuesto que la inserción del translocón IpaB-IpaC en la membrana de la vacuola es lo que promueve su lisis (High et al., 1992), como resultado de la formación de poros y en consecuencia la desestabilización de la membrana vacuolar.

- **IpaD:** Esta proteína polimeriza en la punta de la aguja del T3SS (Espina et al., 2006) y actúa como un transductor de señales (Roehrich et al., 2013), indispensable para la completa activación del T3SS y la secreción de efectores, por ejemplo, detecta la presencia de activadores como a los ácidos biliares o el contacto con la membrana

de la célula eucariote. Posteriormente, IpaD actúa como un andamio donde se une IpaB y posteriormente IpaC, para formar el poro de translocación IpaB-IpaC (Veenendaal et al., 2007).

Se ha reportado que *Shigella* es capaz de inducir apoptosis en las células B, impidiendo la producción de anticuerpos contra el LPS de esta bacteria, así como células de memoria contra este antígeno (Nothelfer et al., 2014). Aún no se ha dilucidado el mecanismo exacto, pero se ha demostrado que la señalización activada por IpaD vía TLR2, presente en la membrana del linfocito B, lo que resulta en la regulación positiva de las proteínas con un dominio de muerte asociado a Fas (FADD), mientras que una molécula aún no identificada induce la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial, culminando en la apoptosis de las células B.

Las proteínas de la familia IpaH se caracterizan por tener una región de repetidos ricos en leucina (LRR) en el extremo N-terminal y una región C-terminal (CTR) altamente conservada, la cual contiene un residuo de cisteína necesario para la actividad de ligasa de ubiquitina E3 (S. Suzuki et al., 2014).

- **IpaH7.8:** Una vez que *Shigella* ha escapado de la vacuola fagocítica actúa en el citoplasma del macrófago (Paetzold et al., 2007). IpaH7.8 es una E3 ubiquitina ligasa que tiene como blanco a la proteína glomulina (GLMN), que es un inhibidor de la activación del inflamósoma, que al ser ubiquitinado es marcado para su degradación mediada por el proteosoma. Mediante este mecanismo *Shigella* puede facilitar la activación del inflamósoma, que desencadenará la muerte por piroptosis del macrófago (S. Suzuki et al., 2014).
- **IpaH9.8:** IpaH9.8 juega un papel crucial en atenuar la respuesta inflamatoria durante la infección por *Shigella*. Entre los sustratos de IpaH9.8 se incluyen a U2AF³⁵ y NEMO/IKK γ , activadores de la vía NF- κ B, a los cuales IpaH9.8 ubiquitina e induce su degradación dependiente del proteosoma, atenuando así la respuesta proinflamatoria de la célula hospedera (Ashida et al., 2010; Okuda et al., 2005).
- **IpaH0722:** IpaH0722 actúa sobre TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2), factor necesario para la activación de la vía NF- κ B mediada por TNF- α . IpaH0722 ubiquitina a TRAF2, promoviendo su degradación dependiente del proteosoma y en consecuencia reduciendo la activación de la vía NF- κ B en la célula hospedera, lo que conlleva a que no se sintetizen moléculas proinflamatorias (Ashida et al., 2007, 2013).
- **IpaJ:** IpaJ está codificada río abajo del operón *ipaBCDA* y se transcribe de forma contraria a dicho operón, razón por la que se le ha asociado con los efectores tardíos de *Shigella*. IpaJ es una cistein-proteasa que escinde preferencialmente proteínas N-miristoiladas (Burnaevskiy et al., 2013). La N-miristoilación es una modificación post-traduccional en la cual un grupo miristoil (derivado del ácido mirístico) se une covalentemente mediante un enlace amida al grupo alfa-amino del aminoácido N-terminal de un polipéptido nascente, garantizando el correcto tráfico intracelular de las

proteínas. IpaJ actúa sobre el factor de ADP-ribosilación 1 (ARF1) (Burnaevskiy et al., 2015), el cual es una GTPasa anclada a la membrana del aparato de Golgi y juega un papel en el tráfico vesicular entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006). Al escindir al grupo miristoil de la ARF1, IpaJ causa la liberación irreversible de ARF1, inhibiendo el tráfico vesicular.

- **IpgB1/B2:** Estas dos proteínas comparten sólo el 25% de identidad, sin embargo, ambas poseen un motivo WxxxE, motivo común en los factores intercambiadores de guanina (GEFs), los cuales están involucrados en la activación de las GTPasas Rho (Hachani et al., 2008). Estas GTPasas son necesarias para el ensamblaje de los filamentos de actina, filamentos necesarios para formar las prolongaciones de la membrana de la célula epitelial intestinal del hospedero, lo que culminará en la macropinocitosis de *Shigella* (Ohya et al., 2005). Posteriormente, a través de las estructuras cristalográficas de estas proteínas, se confirmó que IpgB1 es capaz de interactuar específicamente con las GTPasas Cdc42 y Rac1, mientras que IpgB2 se une y activa a la GTPasa RhoA (Z. Huang et al., 2009).
- **IpgD:** IpgD actúa como una inositol (fosfoinosítido) 4-fosfatasa, cuyo principal sustrato en la célula hospedera es el fosfatidilinositol 4,5-difosfato [PtdIns(4,5)P₂/PIP₂], el cual es desfosforilado por IpgD para producir fosfatidilinositol 5-fosfato [PtdIns(5)P/PIP] (Niebuhr et al., 2002), lo que conlleva a la disminución en la fuerza de tensión de la membrana plasmática, puesto que el PtdIns(4,5)P₂ controla la fuerza de adhesión entre la membrana plasmática y el citoesqueleto de actina. Es por lo que se le ha atribuido a IpgD un papel en la formación de estructuras de entrada en el sitio de contacto de la bacteria con la célula epitelial intestinal (Niebuhr et al., 2000), pues la disminución de la fuerza de tensión en la membrana promueve la extensión de los filopodios que concluirán en la macropinocitosis de *Shigella*. Adicionalmente, en el mismo paso de la captación de *Shigella* por parte de la célula epitelial intestinal, también se ha implicado que la producción de PtdIns(5)P activa a la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K), la cual genera al PtdIns(3,4,5)P₃, el cual recluta a la proteína ARNO (ARF nucleotide binding site opener), una proteína intercambiadora de guanina (GEF) que activa a la GTPasa ARF6, la cual en estado activo promueve la remodelación de actina (Garza-Mayers et al., 2015).

Por otro lado, el incremento en los niveles de PtdIns(5)P, mediados por IpgD, promueve la fosforilación de Akt a través de la activación de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) (Mayo & Donner, 2001). La activación de la serina-treonina cinasa Akt causa que Akt fosforile y active a Mdm2, un regulador negativo de p53, inhibiendo la activación de la vía proapoptótica, estableciendo un fenotipo de supervivencia en la célula hospedera (Bergounioux et al., 2012).

Finalmente, IpgD también es capaz de interferir con la migración de las células T mediante la desfosforilación del PtdIns(4,5)P₂ (Konradt et al., 2011). La concentración de PtdIns(4,5)P₂ en la membrana plasmática de las células T es responsable de la activación de las proteínas ERM (ezrina, radixina y miosina). Estas proteínas asociadas a los filamentos de actina y que en respuesta a la estimulación por

quimiocinas permiten a las células T migrar en dirección del quimioatrayente (Salgado-Pabón et al., 2013). Se desconoce si *Shigella* es capaz de invadir las células T o sólo de inyectar a IpgD, lo que reduce la concentración de PtdIns(4,5)P₂, previniendo la migración de las células T a los sitios de infección

- **OspB:** A esta proteína se le atribuye la fosforilación y la activación de ERK (extracelular-signal-regulated kinases) y de p38 de la vía de las MAPK (Mitogen-activated protein kinases), favoreciendo la secreción de hepoxilina A3 y de IL-8 por parte de las células epiteliales intestinales, promoviendo un ambiente proinflamatorio y la migración de los neutrófilos a la zona de la infección (Ambrosi et al., 2015). Esta respuesta inmune innata del hospedero tiene el objetivo de resolver la infección por *Shigella*. Por otro lado, OspB también promueve la activación de mTOR, el regulador maestro de crecimiento celular, a través de la interacción con la proteína intermediaria IQGAPI, la cual interactúa con ERK1/2, que son los activadores de mTOR (R. Lu et al., 2015).
- **OspC3:** Es un miembro de la familia de genes *ospC* que juega un papel en la regulación negativa de la muerte celular proinflamatoria en la célula epitelial intestinal. OspC3 interactúa con la subunidad p19 de la caspasa-4, impidiendo la interacción p19-p10, inhibiendo así la activación de la caspasa-4 y la muerte por piroptosis (Kobayashi et al., 2013).
- **OspE1/E2:** Estas dos proteínas son 99% idénticas, lo cual sugiere que estas proteínas provienen de la duplicación de un gen y ambas son efectores secretados por el T3SS (Buchrieser et al., 2000). Tal parece que estas proteínas favorecen la adherencia de *Shigella*, cultivada en medio que contiene sales biliares, a la superficie apical de las células epiteliales intestinales polarizadas, ya que cepas *ospE1/ospE2* pierden esta capacidad de adherencia (Faherty et al., 2012).
- **OspF:** Es una fosfotreonina liasa, lo que significa que desfosforila a la treonina de manera irreversible (Li et al., 2007), inactivando así la vía proinflamatoria de las MAPK (Mazurkiewicz et al., 2008). Usando el modelo de asa ligada de conejo se evidenció que las cepas mutantes *ospF* promueven una mayor migración de neutrófilos y un incremento en la pérdida de la integridad de la barrera epitelial (Arbibe et al., 2007).
- **OspG:** La proteína OspG tiene un dominio de cinasa y requiere interactuar con una enzima conjugadora de ubiquitina E2 en conjunto con la ubiquitina (Pruneda et al., 2014), confiriéndole a OspG estabilidad y la conformación de cinasa activa (Grishin et al., 2014). OspG es capaz de interactuar con Ub_{CH5b}~Ub, la cual es un componente de la enzima SCF^{β-T₁CP} ligasa E3, inhibiendo la ubiquitinación de fosfo-IκBα, el inhibidor de la vía proinflamatoria NF-κB, proponiéndole un papel en la atenuación de la respuesta inflamatoria del hospedero (Kim et al., 2005).

- **OspI:** Esta proteína posee una triada catalítica con los aminoácidos C-H-D, la cual es crucial para que OspI pueda actuar como una glutamina desaminasa, interfiriendo con la activación de la vía NF- κ B a través de la vía de TRAF6 (TNF-receptor-associated-factor) (Sanada et al., 2012). Un sustrato de OspI es la proteína UBC13, una enzima conjugadora de ubiquitina E2, necesaria para la activación de TRAF6. OspI desamina específicamente a la Gln100 de UBC13, convirtiéndola en Glu, inhibiendo así la función de UBC13 y previniendo la activación de la vía TRAF6-NF- κ B (Nishide et al., 2013). Ensayos con cepas mutantes *ospI* evidenciaron el incremento en los niveles de transcritos de citocinas proinflamatorias, como IL-8, el incremento en los niveles de la fosforilación de I κ B α y el incremento en la translocación al núcleo de la subunidad p65 de la vía NF- κ B.
- **OspZ:** Esta proteína tiene diferentes funciones dependiendo de la especie de *Shigella* e inclusive entre diferentes serotipos. Por ejemplo, en *S. flexneri* OspZ parece tener un papel proinflamatorio, excepto en el serotipo 6 de *S. flexneri*, ya que en esta especie la secuencia del gen *ospZ* contiene un codón de paro en el aminoácido 188, generando una proteína trunca (Newton et al., 2010a). A través de ensayos knockout, se observó que las cepas *ospZ* promovían una menor migración de los neutrófilos, en comparación con las cepas silvestres, así como una reducción en los niveles de fosforilación de ERK1/2 y en la activación de la vía NF- κ B (Zurawski et al., 2008).
En contraste, en el resto de las especies de *Shigella* (*S. boydii*, *S. sonnei* y *S. dysenteriae*) se ha evidenciado que OspZ tiene un papel antiinflamatorio, donde aparentemente la presencia de la secuencia IDSYMK entre los aminoácidos 208-214 es crucial para que OspZ tenga esta función en estas especies (Newton et al., 2010a). OspZ actúa inhibiendo específicamente la activación de la vía NF- κ B, bloqueando la translocación nuclear de p65, en respuesta a la presencia de las citocinas TNF α e IL-1 β . Por otro lado, OspZ también es capaz de inhibir la degradación de I κ B, sin embargo, el mecanismo exacto es desconocido, pero se sugiere que podría ser por la inhibición de IKK β , responsable de la fosforilación de I κ B (Nadler et al., 2010).
- **VirA:** Esta proteína pertenece a la familia de las proteínas activadoras de las GTPasas (GAPs), las cuales comparten el dominio catalítico conservado de GTPasa para promover la hidrólisis del GTP por Rab1 (Dong et al., 2012). La GTPasa Rab1 está involucrada en el transporte vesicular del retículo endoplásmico al aparato de Golgi, además Rab1 es crucial para la formación del autofagosoma (Carlos Martín Zoppino et al., 2010). VirA estabiliza a Rab1 en el estado GDP inactivo, evitando el intercambio de la molécula GDP por una nueva molécula de GTP, interfiriendo directamente en la inducción de autofagia y alterando el tráfico vesicular (Dong et al., 2012).

También se ha reportado que VirA está involucrada indirectamente en la lisis de las vacuolas de membrana sencilla, debido a que VirA puede interactuar con múltiples GTPasas Rab, como Rab35, inhibiendo así el tráfico de endosomas, evitando la fusión de las vesículas de reciclaje con la vacuola de entrada y en consecuencia

propiciando la lisis de la vacuola que no es capaz de contener a la *Shigella* cuando esta comienza a replicarse.

La enterotoxina de *Shigella* 1 (ShET1) y la enterotoxina de *Shigella* 2 (ShET2) son factores de virulencia que inducen la secreción de líquido de los enterocitos y propician la colonización del colon por *Shigella*. A pesar de compartir nombres similares por sus propiedades como enterotoxinas, no hay homología entre los genes que codifican a ShET1 y ShET2.

- **ShET1:** En los aislados de *S. flexneri* 2a, ShET1 está codificada por los genes *set1A* y *set1B* localizados dentro de la isla de patogenicidad SHI-1, en el cromosoma (Vargas et al., 1999; YAVZORI et al., 2002). Estos genes codifican para dos subunidades diferentes de una holotoxina con una estructura A1-B5, con un peso de 55 kDa (Fasano et al., 1997). Esta holotoxina es secretada vía dependiente de Sec y por un T2SS.
- **ShET2 (OspD3):** Es una proteína de 63 kDa codificada por el gen *ospD3*, la cual se encuentra en todos los serotipos de *Shigella* uno de los tres genes *ospD* se encuentre codificado en el plásmido de invasión (Parsot et al., 2005). Los alineamientos entre los tres genes *ospD* muestran un alto grado de homología entre *ospD2* y *ospD3*, mientras que *ospD1* presenta un mayor grado de divergencia. A diferencia de ShET1, la secreción de ShET2 es dependiente del T3SS (Farfán et al., 2011).

d. Epidemiología de *Shigella* spp.

1. Relevancia Mundial

En 1892, William Osler describió a la disentería como “Una de las cuatro principales enfermedades epidémicas del mundo, la cual cobra más vidas en el trópico que el cólera”. Posteriormente, en 1897, Kiyoshi Shiga identificó al bacilo *Shigella* como la causa de una epidemia de disentería con alta mortalidad en Japón. A raíz de esto se le prestó gran atención a la epidemiología de esta enfermedad (K. Kotloff et al., 2018).

En el 2010, se reportaron ~188 millones de casos de shigellosis, dentro de los que se incluyó 62.3 millones (33%) de casos en niños <5 años con una incidencia de 2-7 casos por 100 niños al año en los países y regiones menos desarrolladas del mundo, presentándose la mayor incidencia en los infantes de entre 12-23 meses de edad. En contraste, en los países industrializados las incidencias en los niños son de tan sólo 0.02 casos por 100 niños y de 0.01 casos por 100 habitantes (Liu et al., 2016).

Para el 2017, a nivel mundial, se reportó que la shigellosis es la segunda causa de muerte por diarrea, únicamente por detrás de rotavirus. *Shigella* es responsable de alrededor de 164,300 muertes al año, representando el 12.5% de todas las muertes por diarrea, de las cuales 54,900 (~33%) corresponden a niños <5 años, particularmente del sur de Asia y de África subsahariana (Roth et al., 2018).

2. Relevancia en México

Como en la mayoría de los países de Latinoamérica, la epidemiología de *Shigella* spp. ha cambiado en los últimos 50 años. A principios de la década de los 70s, *Shigella dysenteriae* tipo 1 causó en México numerosos y severos brotes asociados con cepas multidrogoresistentes (MDR). Posteriormente, los cuadros de shigelosis causados por *S. dysenteriae* disminuyeron, incrementándose los episodios de shigelosis causados por *Shigella flexneri* (Datta & Olarte, 1974). Sin embargo, todavía a finales de la década de los 80s se aisló *S. dysenteriae* de casos de diarrea del viajero de los visitantes a la península de Yucatán, sugiriendo que esta especie aún circulaba en esas fechas en nuestro país (Centers for Disease Control (CDC), 1988).

En México, la epidemiología de las enfermedades gastrointestinales infecciosas se ha modificado en los últimos 40 años, por un lado, los programas de rehidratación oral y la introducción de la vacuna contra Rotavirus en el 2007, han tenido un enorme impacto en las tasas de mortalidad, junto con los cambios socioeconómicos que ha tenido el país, mayor acceso a agua potable, una mejora en el sistema de drenaje y en la eliminación de residuos sanitarios, etc. Entre los cambios epidemiológicos hemos observado que en los niños que requieren hospitalización o que acuden a las unidades de hidratación oral (UDHATOS) por diarrea severa presentaban cuadro clínicos de *S. flexneri*, como se menciona anteriormente, pero también se identificó a *S. sonnei* y *S. boydii*. Esta última especie se consideraba restringida al Subcontinente Indio (Kalluri et al., 2004; Woodward, 2005), pero nuestro grupo de trabajo ha sido capaz de identificar a *S. boydii* en niños mexicanos con diarrea aguda (Patz-Vargas et al., 2015). Por otro lado, los métodos moleculares han permitido identificar que los patotipos de *Escherichia coli* diarrogénicas son en la actualidad los principales agentes causales de diarrea en niños mexicanos que requieren hospitalización (Almaguer-Molina, 2024).

Finalmente, varios estudios han identificado el surgimiento de cepas drogo-resistentes de *Shigella* spp. (Zaidi et al., 2013). Sin embargo, en México, al igual que en otros países de Latino América, existen pocos estudios epidemiológicos de búsqueda intencionada de patógenos causales de gastroenteritis, así como deficientes registros de agentes causales de diarrea, incluyendo a *Shigella*, por parte de los sistemas públicos de salud, los cuales desafortunadamente se basan en el cuadro clínico y no en estudios microbiológicos, lo que dificulta comprender la magnitud y el impacto de la gastroenteritis, así como la identificación de los principales agentes de diarrea en nuestro país.

e. Influencia de *Shigella* spp. en la microbiota gastrointestinal

Hasta el momento existen pocos estudios sobre el impacto que ejerce *Shigella* en la composición de microbiota intestinal, uno de esos estudios es el que desarrollaron Lindsay B. y colaboradores (Lindsay et al., 2015) donde se dieron a la tarea de evaluar la microbiota intestinal de infantes menores a 5 años, provenientes de cuatro países subdesarrollados (Gambia, Mali, Kenia y Bangladesh). En el estudio se consideraron las muestras de heces recolectadas de diciembre del 2007 a diciembre del 2009, tomando una muestra por cada infante, resultando en un total de 3,035 muestras de heces, de las

cuales 1,735 muestras (57%) corresponden a controles sin diarrea y 1,300 muestras (43%) corresponden a casos de diarrea. En estas 3,035 muestras se evaluó la carga de EIEC/*Shigella* mediante la identificación del gen *ipaH* por qPCR, dividiendo las muestras en dos grupos: con alto número de copias del gen *ipaH* ($\geq 14,000$ copias) o con bajo número de copias del gen *ipaH* ($< 14,000$ copias). Se identificaron 404 muestras heces (13%) con alto número de copias de *ipaH*, 277 (69%) correspondieron a las muestras heces de diarrea y 127 (31%) a las muestras sin diarrea; sugiriendo una asociación entre un alto número de copias del gen *ipaH* y el cuadro clínico de diarrea.

Posteriormente, se caracterizó y comparó la composición de la microbiota intestinal de las 3,035 muestras de heces, identificando 9 géneros comunes entre los grupos, algunos de estos géneros mostraron diferencias en su abundancia relativa entre casos con diarrea y sin diarrea, así como entre las muestras con alto número de copias y con bajo número de copias de *ipaH*; resultando en cuatro grupos de estudio como se muestra en la **Figura 8**. La composición general del grupo con diarrea demostró una disminución de la abundancia relativa de bacterias anaerobias estrictas, con el respectivo incremento de las bacterias anaerobias facultativas, en comparación con el grupo sin diarrea. Particularmente, el género *Prevotella* mostró una menor abundancia en el grupo de heces con diarrea y alto número de copias de *ipaH*, mientras que se

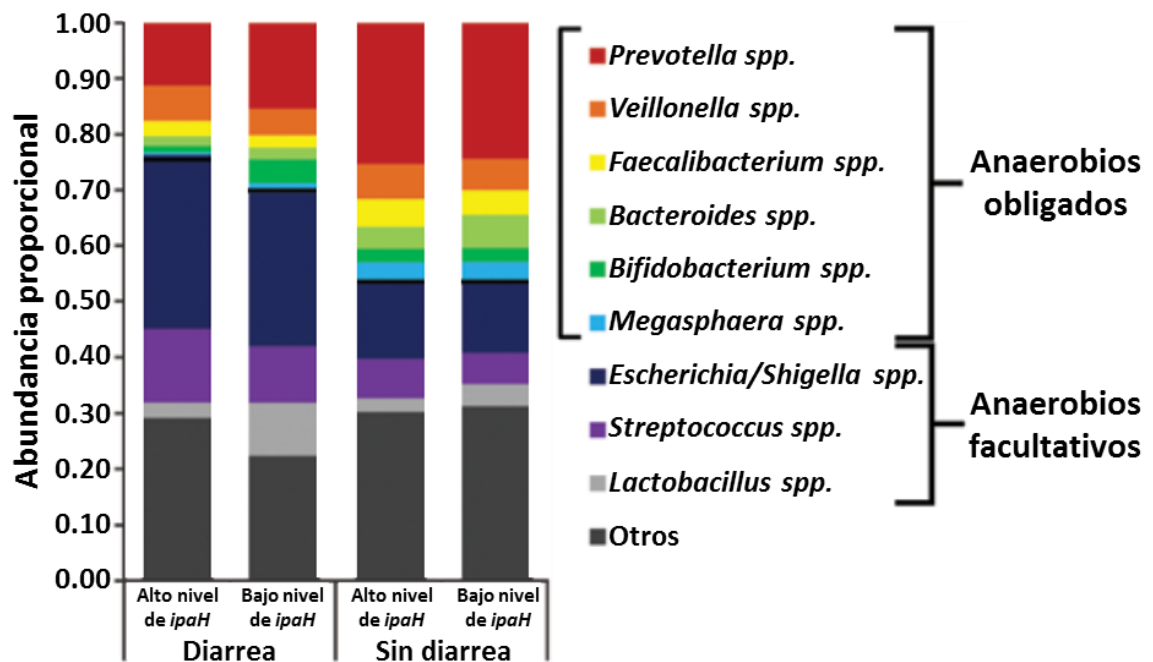


Figura 8 Comparación de la composición de la microbiota intestinal entre individuos con y sin diarrea y entre un número alto y bajo de copias del gen *ipaH*. Perfiles de la comunidad bacteriana basada en la secuenciación del gen 16S rRNA (Abundancia proporcional) de muestras con diarrea y alto nivel del gen *ipaH* (n=277), muestras con diarrea y bajo nivel del gen *ipaH* (n=1023), muestras sin diarrea y alto nivel del gen *ipaH* (n=127), muestras sin diarrea y bajo nivel del gen *ipaH* (n=1608), provenientes de infantes de países de bajos recursos. “Otros” representa los géneros que no se identificaron como 1 de los 9 géneros más abundantes. (Tomada) (Lindsay et al., 2015)

observó una mayor abundancia de *Prevotella* en el grupo sin diarrea, pero sin observar diferencia entre el número de copias de *ipaH*.

Es importante remarcar que el nivel de EIEC/*Shigella* cuantificada por qPCR representa sólo una porción del género *Escherichia/Shigella* identificado por 16S, ya que estas no pueden ser diferenciadas de las cepas comensales y otros patotipos de *E. coli* por secuenciación del gen 16S rRNA **Figura 8**. Se observó que las muestras de heces con diarrea tenían una mayor proporción de los miembros del género *Escherichia/Shigella* que las muestras sin diarrea, independiente del número de copias de *ipaH*. Sin embargo, las muestras de diarrea con alto número de copias de *ipaH* tuvieron significativamente una mayor proporción de secuencias de *Escherichia/Shigella* en comparación con las muestras de heces con diarrea con bajo número de copias de *ipaH*.

VII. ANTECEDENTES DIRECTOS

En el 2013 nuestro grupo publicó un estudio sobre la epidemiología de las bacterias entéricas *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. a partir de muestras de niños, recolectadas en un hospital de Yucatán, México. De enero del 2005 a diciembre del 2011, se admitieron 2344 niños menores de los 10 años por gastroenteritis aguda, de los cuales 2067 niños (92%) se encontraban en el grupo de <5 años (Zaidi et al., 2013).

Se recolectaron un total de 218 aislados de *Shigella* spp. y 365 aislados de *Salmonella* spp., los cuales permitieron observar una tendencia hacia el incremento en el número de infecciones por *Shigella*, logrando representar para el 2011 el 12.1% de los agentes causales de gastroenteritis aguda **Figura 9 a**). En cuanto a la distribución de las especies de *Shigella*, se observó una predominancia de *S. flexneri* (68-72%), seguida de *S. sonnei* (16-17%), *S. boydii* (5-12%) y *S. dysenteriae* (2%), respaldando lo previamente observado para el caso de México donde predomina la especie *S. flexneri*, mientras que la especie menos aislada a partir de muestras de pacientes es *S. dysenteriae* (Datta & Olarte, 1974) (Centers for Disease Control (CDC), 1988).

Al analizar los datos clínicos completos de 118 pacientes infectados con *Salmonella* spp. y de 112 pacientes infectados con *Shigella* spp. En comparación con los niños con salmonelosis, aquellos que contrajeron shigelosis presentaron significativamente más casos con fiebre ≥ 38.5 °C (17% vs 36%), más casos de diarrea con sangre (36% vs 59%), más casos con deshidratación (15% vs 27%) y más casos de convulsiones (3% vs 11%) **Figura 9 b**). Mostrando que los niños con shigelosis presentan cuadros clínicos más severos que los niños con salmonelosis y por ende con un mayor riesgo de muerte.

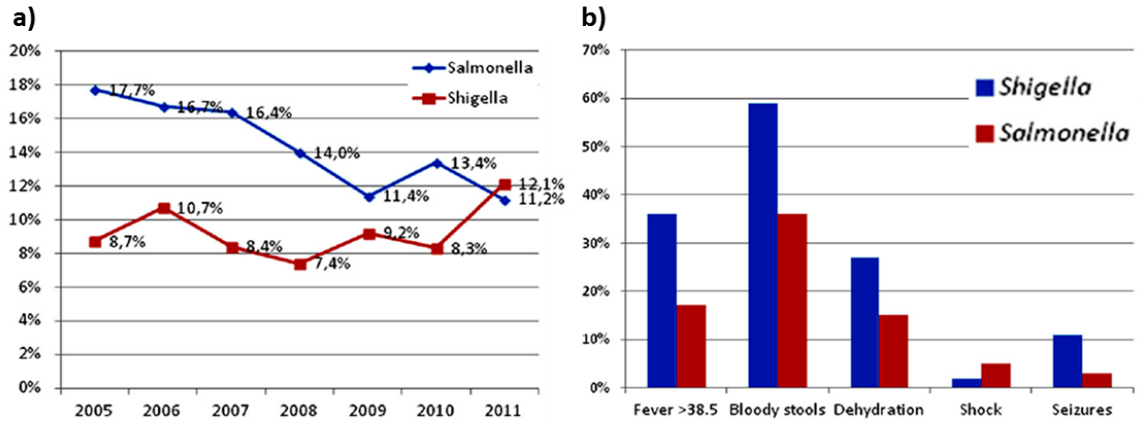


Figura 9. Frecuencia y presentación clínica de infecciones por *Shigella* spp. y *Salmonella* spp. de niños en Yucatán, México, 2005-2011. a) Como se observa, hubo un incremento en el número de casos de shigelosis del 2010 (8.3%) al 2011 (12.1%). Mientras que se observó una disminución significativa de la gastroenteritis causada por *Salmonella* spp., del 2005 (17.7%) al 2011 (11.2%) ($p < 0.001$). **b)** Los niños con shigelosis tuvieron dos veces más casos de fiebre ≥ 38.5 °C, heces con sangre y deshidratación; y casi cuatro veces más casos de convulsiones que los niños con salmonelosis. Los niños con salmonelosis fueron más propensos a ser admitidos con shock hipovolémico. (Tomada) (Zaidi et al., 2013)

JUSTIFICACIÓN

Está claro que el microbioma del tracto gastrointestinal es una comunidad ecológica compleja que juega un papel importante en múltiples procesos fisiológicos del hospedero, además de brindar protección contra la colonización por patógenos, mientras que la disbiosis está asociada con el inicio o el desarrollo de enfermedades y de diversas patologías. Un ejemplo de estas enfermedades es el síndrome diarreico, el cual continúa siendo un serio problema de salud pública tanto en México como en el mundo, representando la tercera causa de muerte en infantes menores de 5 años a nivel mundial.

Shigella spp. es el principal agente etológico de brotes y casos de diarrea con sangre, presentando la mayor tasa de incidencia en países subdesarrollados, pero no limitándose a estos. Sin embargo, en México en general hay muy pocos estudios de búsqueda intencionada de patógenos causantes de diarrea, por lo que desconocemos la importancia real de este patógeno en nuestro país. Previamente, nuestro grupo de investigación demostró que *Shigella* spp. es la bacteria causal de los casos más severos en niños que requieren hospitalización por diarrea aguda, puesto que se le asoció a diarrea con sangre en el 59% de los casos y a episodios de convulsiones en el 11% de los casos.

Hasta el momento, en México se han realizados pocos estudios sobre la caracterización del microbioma de niños con y sin diarrea, y ninguno del microbioma asociada a la shigellosis. En este estudio se realizó la caracterización de la composición del microbioma en niños con shigellosis, se identificaron los géneros bacterianos asociados con esta enfermedad y se determinó si las manifestaciones clínicas más severas de la shigellosis, como la diarrea con sangre y las convulsiones, están asociadas a un microbioma particular, a cepas de *Shigella* spp. con factores específicos de virulencia o a ambos.

HIPÓTESIS

Los niños con shigellosis presentan un microbioma alterado en comparación con los controles y los diferentes cuadros clínicos están asociados a un microbioma característico o a cepas de *Shigella* spp. con características particulares.

OBJETIVOS

I. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar y comparar el microbioma intestinal de niños con shigellosis vs. niños sin diarrea y entre los diferentes cuadros clínicos (severo, moderado y leve), así como caracterizar diferentes cepas de *Shigella* spp. aisladas de estos casos de shigellosis.

II. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.** Establecer la prevalencia de los casos de *Shigella* spp. en todos los niños del estudio Biomarcadores 2010-2014.
- 2.** Caracterizar y comparar la composición del microbioma intestinal entre los niños con shigellosis vs los niños sin diarrea y entre los diferentes cuadros clínicos de los niños con shigellosis.
- 3.** Predecir y comparar la composición funcional entre el microbioma de los niños con shigellosis vs el microbioma de los niños sin diarrea y entre los microbiomas asociados a la severidad de los cuadros clínicos de shigellosis.
- 4.** Realizar la secuenciación de las cepas de *Shigella* spp. aisladas de los pacientes y evaluar posibles factores de virulencia.
- 5.** Realizar ensayos fenotípicos asociados al proceso de infección de *Shigella* spp. con algunas de las cepas secuenciadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

Por un periodo de 4 años, del 2010 al 2014, se realizó un estudio de casos y controles de búsqueda intencionada de patógenos asociados con diarrea. Casos: Niños (0-10 años) con diarrea aguda adquirida en la comunidad, con menos de 8 días de evolución y que llegaron a urgencias pediátricas del “Hospital General Agustín O’Horán” en Mérida, Yucatán. Controles: Niños sin diarrea pareados por edad, que asistieron a la clínica de vacunación o a urgencias pediátricas (porque presentaban fracturas simples) en el “Hospital General Agustín O’Horán”. Pacientes con enfermedades gastrointestinales o trastornos inmunológicos, así como niños con cirugías recientes del tracto digestivo fueron excluidos del estudio.

Declaración ética: Sólo se incluyeron en el estudio los casos y los controles que accedieron a participar y cuyos padres o tutores firmaron el formato de consentimiento informado. Las muestras sólo se utilizaron para investigación. El estudio fue aprobado por el comité de ética del “Hospital General Agustín O’Horán” en Mérida, Yucatán y por el comité de bioética para estudios de investigación en humanos del CINVESTAV-IPN.

II. TOMA DE DATOS CLÍNICOS Y CÁLCULO DE LA SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD.

En la admisión de los niños, a través de encuestas realizadas por el personal capacitado del hospital, se recabaron los datos demográficos y clínicos de los niños con y sin diarrea. La información que se recabó fue:

- Datos demográficos
- Datos al ingreso (datos antropométricos, antecedentes, padecimiento actual, tratamiento previo)
- Evaluación clínica al ingreso
- Tratamiento al ingreso
- Toma de muestras de sangre y heces para pruebas de laboratorio
- Evaluación clínica a las 48 y 72 horas posterior al ingreso
- Evolución al día del egreso
- Resultados de pruebas de laboratorio
- Complicaciones

a. Cálculo de la severidad de la diarrea con base en la escala Ruuska-Vesikari modificada

Con el historial clínico recolectado de los pacientes, se utiliza la escala de Ruuska-Vesikari (Ruuska & Vesikari, 1990) modificada, esta escala contempla los siguientes parámetros:

1. Máximo número de deposiciones en 24 h (puntos)
 - a) 1-3 (1)
 - b) 4-5 (2)

- c) ≥ 6 (3)
- 2. Duración de la diarrea en días (puntos)
 - a) 1-4 (1)
 - b) 5 (2)
 - c) ≥ 6 (3)
- 3. Máximo número de vómitos en 24 h (puntos)
 - a) 1 (1)
 - b) 2-4 (2)
 - c) ≥ 5 (3)
- 4. Duración del vómito en días (puntos)
 - a) 1 (1)
 - b) 2 (2)
 - c) ≥ 3 (3)
- 5. Temperatura corporal máxima en °C (puntos)
 - a) 37.1 °C – 38.4 °C (1)
 - b) 38.5 °C – 38.9 °C (2)
 - c) ≥ 39 °C (3)
- 6. Severidad de la deshidratación (puntos)
 - a) Nada (0)
 - b) Leve (2)
 - c) Moderada/Severa (3)
- 7. Tratamiento (puntos)
 - a) Solución de rehidratación oral (1)
 - b) Hospitalización (2)

Con base en la sumatoria del puntaje que se obtiene de la escala se establece la severidad del caso de diarrea: Leve 0-8 puntos; Moderada 9-14 puntos; Severa ≥ 15 puntos. Sin embargo, ya que originalmente esta escala fue diseñada para evaluar la severidad de infecciones causadas por Rotavirus, fue modificada para también poder evaluar la severidad de la diarrea causada por bacterias, por lo que se realizaron las siguientes consideraciones: ante la presencia de complicaciones clínicas tales como sangre en heces, choque hipovolémico, alteraciones hidroelectrolíticas o sepsis; se incrementa en un nivel la severidad del cuadro clínico. Además, aquellos casos cuyo cuadro clínico presenten convulsiones se establecen directamente como casos severos.

b. Determinación del estatus nutricional

Usando los datos antropométricos, la edad y el género de cada niño, se realiza la determinación de su estado nutricional, con base en los estándares de crecimiento infantil de la OMS. Para los niños <5 años se emplean los índices peso/talla y talla/edad

para determinar un estado de desnutrición aguda o de desnutrición crónica, respectivamente. Para los niños ≥ 5 años se calcula el índice de masa corporal (IMC) empleando su peso y talla.

III. TOMA DE MUESTRAS DE HECES Y ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Adicionalmente, se colectaron las muestras de heces de cada niño, cada muestra recolectada se dividió en dos tubos: un tubo contenía medio de transporte Cary Blair para el aislamiento de patógenos entéricos y un tubo que no tenía medio de transporte se guardó en congelación a -70 °C, para la posterior detección de Rotavirus y para evaluar el microbioma. Los tubos se transportaron al Laboratorio de Investigación del Hospital General Agustín O'Horán en un periodo máximo de 48 horas.

A todas las muestras de heces colectadas en el tubo con medio de transporte Cary Blair, tanto de los casos como de los controles, se les realizó la búsqueda e identificación de bacterias causales de diarrea como *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. y *Vibrio* spp., usando medios selectivos. Las muestras se inocularon en los agares XLD y Hektoen entérico para la identificación de *Salmonella* spp. y *Shigella* spp., en los agares verde brillante, tetrationato y Rappaport para la identificación de *Salmonella* spp., en el agar TCBS y agua peptonada alcalina para la identificación de *Vibrio* spp., en el agar Cefex para la identificación de *Campylobacter* spp. y en el agar MacConkey para la identificación de *Escherichia coli*. Todas las placas y tubos se incubaron a 37° C por 18-24 h y algunos casos hasta 48 h. La identificación de los aislados presuntivos de *Shigella* y *Salmonella* se realizó por pruebas bioquímicas convencionales y el resultado se confirmó con tiras API 20E (BioMerieux, Marcy l'Etoile, Francia). En el caso de la identificación de aislados presuntivos de *E. coli*, se seleccionaron cinco colonias con características de *E. coli* de cada placa de agar MacConkey, se confirmó la identificación de *E. coli* mediante pruebas bioquímicas convencionales. La detección rápida de Rotavirus se realizó por prueba de aglutinación en latex (Pastorex Rotavirus, BioRad, Hercules, EUA) y posteriormente se realizó la detección de Rotavirus por ELISA (Premier Rotaclone, Meridian Bioscience Inc., Cincinnati, USA) y PCR. A partir del año 2013 a las muestras de heces se les realizó la búsqueda de Adenovirus, Norovirus y Astrovirus por RT-PCR. Se realizó la búsqueda de parásitos como *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Ascaris lumbricoides* y *Trichuris trichiura*.

Las colonias de *E. coli* seleccionadas fueron caracterizadas para determinar la presencia de genes de virulencia asociados con los 6 patotipos de *E. coli* diarrogénica descritos hasta el momento (DAEC, EAEC, ETEC, EPEC, EIEC y EHEC) utilizando dos PCR multiplex de punto final, previamente descritos y desarrollados en nuestro laboratorio (López-Saucedo *et al.* 2003, Meza-Segura *et al.* 2020). Para todos los ensayos de PCR, se preparan lisados de bacterias resuspendiendo una colonia aislada en 1 mL de agua MiliQ en un tubo Eppendorf, el tubo se hierva por 1 minuto y se usan 2 μ L del lisado bacteriano como templado de cada PCR multiplex Finalmente, los productos de PCR se visualizan en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio

IV. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Shigella* spp.

Con el propósito de aislar e identificar cepas de *Shigella* spp., se colocan 10 mL de la muestra en 90 mL de agua peptonada, se mezcla y se deja reposar por 30 min. Posteriormente, la muestra se inocula por estría cruzada sobre los agares XLD y Hektoen entérico, los cuales son los medios de cultivo selectivos y diferenciales utilizados para el aislamiento de *Shigella* spp. y *Salmonella* spp. Las placas inoculadas se incuban a 37 °C por 18-24 h.

1. En el agar XLD las colonias de *Shigella* spp. son transparentes y parecen de color rojo por el color del medio, esto se debe a que las colonias de *Shigella* no fermentan la xilosa, la lactosa, ni la sacarosa, por lo que el rojo fenol no vira a amarillo. Además, las colonias de *Shigella* spp. son incapaces de descarboxilar a la lisina, por lo que no se produce un color rojo-púrpura alrededor de las colonias y son incapaces de producir H₂S, por lo que no se producen colonias con el centro negro.

2. En el agar Hektoen entérico las colonias de *Shigella* spp. son transparentes y parecen de color verde por el color del medio, esto debido a que estas colonias no fermentan la lactosa, la sacarosa, ni la salicina, por lo que no se promueve que el medio vire a naranja o amarillo. Además, las colonias de *Shigella* spp. son incapaces de producir H₂S, por lo que no se producen colonias con el centro negro.

Se selecciona una colonia con características de *Shigella* spp. y de cada colonia se toma la mitad para realizar pruebas bioquímicas convencionales de identificación y la otra mitad de la colonia se inocula en agar peptonado. La identificación bioquímica de cada una de las posibles colonias de *Shigella* spp. aisladas se realiza mediante un panel de cinco pruebas: Triple Sugar Iron (TSI), Lysine Iron Agar (LIA), Motility Indol Ornithine (MIO), Simmons' Citrate, y ureasa. En la prueba de TSI se analiza la fermentación de la glucosa, de lactosa y de la sacarosa, la formación de H₂S y la producción de gas; en la prueba de LIA se evalúa la descarboxilación de la lisina; en la prueba de MIO se determina la movilidad, la descarboxilación de la ornitina y la producción de indol a partir del triptófano; en el agar de Simmons' Citrate se analiza el uso de citrato como fuente de carbono; en la prueba de ureasa se evalúa la capacidad de las bacterias de desdoblar la urea. Se seleccionan aquellas cepas glucosa positivas, lactosa/sacarosa negativas, así como negativas para la producción de H₂S y gas, lisina descarboxilasa negativas, citrato negativas, ureasa negativa y no son mótils.

Finalmente, todos los aislados identificados como *Shigella* fueron seroagrupados, es decir, se usaron mezclas de inmunosueros para poder identificar las especies de *Shigella* (*S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. boydii* y *S. dysenteriae*) y únicamente los aislados de *S. dysenteriae* fueron serotipificados.

V. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DEL MICROBIOMA INTESTINAL DE NIÑOS INFECTADOS CON *Shigella* spp. Y NIÑOS SIN DIARREA

a. Selección de las muestras de heces a analizar

Para la selección de las muestras de heces de niños con diarrea se consideraron aquellas muestras en las que se identificó a *Shigella* spp. como el único patógeno, negativas para todas las otras bacterias (*E. coli*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Vibrio cholerae*), parásitos (*E. histolytica*, *G. lamblia*, *C. parvum*, *A. lumbricoides* y *T. trichiura*) y virus (Rotavirus), así como las muestras positivas del 2013 a Adenovirus, Norovirus y Astrovirus.

Se incluyeron los siguientes grupos de estudio: **1.** Todos los casos severos de shigellosis, **2.** Todos los casos moderados de shigellosis, **3.-** Dos casos leves de shigellosis pareados por edad con los casos severos **4.** Controles, niños sin diarrea y coprocultivo negativo a cualquier patógeno intestinal, se incluyeron al menos dos controles pareados por edad con los casos severos. Por lo que al final se incluyeron un total 31 muestras de heces de niños con diarrea y 35 muestras de heces de niños sin diarrea.

b. Extracción del DNA de las muestras de heces

La extracción de DNA bacteriano se realiza utilizando el QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, cat. No. 51604), siguiendo las instrucciones del proveedor. Se realiza a partir de 220 mg de la muestra de heces congelada y la extracción se finaliza con el DNA eluido en 100 uL del Buffer ATE. La concentración del DNA y la pureza de las muestras se determina con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (NanoDrop Technologies). La presencia del gen 16S rRNA en la muestra del DNA extraído, se determina por PCR punto final, utilizando iniciadores previamente reportados que hibridan con un sitio conservado del gen 16S rRNA y amplifican un fragmento de 107 pb del gen y se visualiza por electroforesis en un gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio.

c. Secuenciación del gen 16S rRNA

Para identificar los géneros bacterianos que componen al microbioma se realizó la secuenciación del gen 16S rRNA, el cual tiene una longitud aproximada de 1.5 kb y contiene nueve regiones variables, distribuidas entre regiones altamente conservadas. Las regiones conservadas del gen se emplean para el diseño de iniciadores universales que permitirán la secuenciación, mientras que las regiones variables del gen son usadas en la clasificación taxonómica de los microorganismos.

La generación de las bibliotecas a partir del DNA extraído de las heces y su secuenciación se realizaron por el “Laboratorio de Servicios Genómicos” del “LANGEBIO-CINVESTAV”, usando la plataforma 2 x 300 pb de extremos pareados en el sistema MiSeq de Illumina. Para este proyecto, se amplificaron las regiones variables V3-V5 del gen del rRNA 16S usando los primer 357-F y CD-R, los cuales hibridan en

regiones conservadas que flanquean dichas regiones variables y generarán un amplicón de ~650 pb. Los amplicones obtenidos dependerán de la especie o género de bacteria

d. Análisis de la diversidad bacteriana

De la secuenciación se generaron archivos intermedios de análisis en formato FASTQ, consistentes en archivos “demultiplexados” (Separación de las lecturas con base en la secuencia de los índices que etiquetan las muestras de cada biblioteca). El análisis de los archivos se procesó usando la plataforma QIIME2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2, versión 2020.2), las secuencias pareadas se filtraron en función de su calidad y longitud, utilizando el “script-q-score” integrado a QIIME2. Para obtener las ASV (variantes de secuencia del amplicón). Posteriormente, las secuencias fueron recortadas para obtener amplicones de 240 pb, usando el programa Deblur. La asignación y agrupación taxonómica de los ASV en OTUs (Operational Taxonomic Units) con una identidad del 99% se realizó mediante el programa Trained Naive Bayes de QIIME2, el cual compara las lecturas contra la base de datos SILVA 132-99nb. Los datos resultantes se exportaron del entorno QIIME2 a RStudio, donde se generaron los gráficos y se realizaron las pruebas estadísticas correspondientes. Las secuencias de una sola lectura (singletons) y los ASV identificados como mitocondriales o de cloroplastos se eliminaron de la tabla de abundancia.

Con el propósito de determinar los índices de diversidad alfa (la diversidad taxonómica por muestra), se usó la función `rarefy_even_depth`, con la cual se realizó un muestreo aleatorio de 23,432 lecturas por muestra, lo cual corresponde al valor más bajo del número de secuencias en una de las muestras secuenciadas. Con estos datos se generó una tabla de riqueza por muestra (el número observado de ASV) utilizando los paquetes `microbiome` y `phyloseq` en el ambiente de R para establecer el índice de diversidad de Shannon.

Para determinar la diversidad beta (comparación de las diferencias taxonómicas entre las comunidades de los grupos de estudio) se usó la abundancia normalizada de cada género por muestra, para calcular el índice de diversidad de Bray-Curtis mediante la función `ordinate` del paquete `phyloseq` y se generaron los gráficos NMDS (Non-metric multidimensional scaling).

Los gráficos de abundancia relativa de los taxones a nivel de género se realizaron en el ambiente R. Los gráficos de barras ilustran todos aquellos taxones que presentaron una abundancia relativa mayor o igual al 1%, mientras que los taxones restantes se agruparon en la barra de “Otros”. Los paquetes `ggplot`, `reshape2` y `heatmap` se utilizaron para realizar los gráficos.

Para evaluar si los grupos taxonómicos permiten explicar la enfermedad diarreica, se realizó la predicción de posibles biomarcadores, eligiendo los géneros resultantes del análisis LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size). Los datos se dividieron en dos grupos, uno para generar el modelo aleatorio discriminatorio (denominado entrenamiento) y otro para la validación del modelo. Se probó el modelo lineal generalizado, el cual es un algoritmo de entrenamiento supervisado, que permite

el manejo de múltiples variables simultáneamente, tanto de tipo binomial o de valores y que no cumplen con una distribución normal. La capacidad discriminatoria de los modelos fue evaluada mediante la página AUC, utilizando diferentes funciones como glm, predict, step, roc.curve de los paquetes ROSE, pROC y Verification en el ambiente de RStudio.

e. Predicción de las rutas metabólicas

Para la caracterización y predicción del perfil funcional de las comunidades microbianas en las muestras se partió de las secuencias identificadas del gen 16S rRNA y se realizó empleando la paquetería Tax4Fun, mediante el ambiente de R. Para la comparación de la composición funcional de las comunidades microbianas se utilizó el software PICRUST2 (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved State, v1.1.1), usando los OTUs identificados a nivel de género y se compararon contra la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), la cual según KEGG Orthology (KO) contiene los genes ortólogos de las diferentes bacterias como referencia para las funciones y así obtener el perfil funcional. En el caso de este proyecto se utilizó el nivel 3 de esta base de datos.

VI. SECUENCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO DE LOS AISLADOS DE *Shigella* spp.

a. Purificación del DNA de las cepas de *Shigella* spp.

Se seleccionaron 20 cepas de *Shigella* spp. (11 cepas de *Shigella flexneri*, 4 cepas de *Shigella boydii* y 5 cepas de *Shigella sonnei*), 6 cepas aisladas de pacientes con casos severos de diarrea, 5 cepas aisladas de pacientes con casos moderados de diarrea y 9 cepas aisladas de pacientes de casos leves de diarrea. Es importante resaltar que se buscó incluir el mayor número de cepas aisladas de niños sin desnutrición para evitar que la severidad de la enfermedad pudiera atribuirse al estado nutricional. Sin embargo, se incluyeron 7 cepas aisladas de niños con desnutrición para poder completar el número de cepas a secuenciar.

Cada cepa se siembra en agar MacConkey por estría cruzada y se incuba por 24 h a 37 °C. Posteriormente, se toma una colonia aislada y se inocula en 5 mL de caldo LB, dejándolo incubar en agitación por 24 h a 37 °C a 200 rpm. Una vez transcurrido este tiempo, se centrifuga el cultivo a 4,500 rcf durante 20 minutos a 4 °C, se elimina el sobrenadante y la pastilla se lava una vez con 5 mL de PBS estéril 1X. Nuevamente, se centrifuga el cultivo a 4500 rcf durante 20 minutos a 4 °C, se elimina nuevamente el sobrenadante y se resuspende en 400 µL de buffer de lisis (Tris HCl 10 mM pH 7.4, EDTA 10 mM, NaCl 150 mM, SDS 0.4%), se puede incrementar el volumen del buffer de lisis si el botón de bacterias es muy grande. La muestra se pasa a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se le agregan 4 µL de proteinasa K (20 mg/mL), la solución se homogeniza y se deja en incubación durante toda la noche a 42 °C. Al día siguiente, se agrega 1 volumen de una solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se homogeniza vigorosamente en vortex por 2 minutos y se centrifuga a 14,000 rpm por 10 minutos a 4 °C, se recupera la fase acuosa superior y se deposita en un tubo Eppendorf

de 1.5 mL. A continuación, se agregan 4 μL de una solución de RNAsa A (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y se incuba por 1 h a 60 °C. Tras la incubación, se agrega 1 volumen de una solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se homogeniza vigorosamente en vortex por 2 minutos y se centrifuga a 14,000 rpm por 10 minutos a 4 °C, se recupera la fase acuosa superior y se deposita en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. A este volumen recuperado, se le agregan 2 volúmenes de una solución de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se homogeniza vigorosamente en vortex por 2 minutos y se centrifuga a 14 000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Posteriormente, se recupera el sobrenadante, se le agrega 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío, se homogeniza por inversión e incuba por 10 minutos a temperatura ambiente. Concluido el tiempo de incubación, se centrifuga a 12,000 rpm por 20 minutos, se elimina el sobrenadante, se lava la pastilla con 500 μL de etanol al 70%, se agita la muestra en vortex por unos segundos, se centrifuga a 12,000 rpm por 15 minutos. Finalmente, se retira el exceso de alcohol, las muestras se dejan secar al aire cerca del mechero y cada una de las muestras se resuspende en 100 μL de agua desionizada estéril. Se determina la concentración y la pureza de cada muestra empleando un NanoDrop 2000. Se analiza la integridad del DNA mediante electroforesis cargando 1 μg de DNA en un gel de agarosa al 1%.

b. Secuenciación del DNA

A partir de las extracciones del DNA se preparan soluciones con $>2 \mu\text{g}$ de DNA en una concentración $>200 \text{ ng}/\mu\text{L}$ y con las relaciones 260/280 y 260/230 ≥ 1.8 . Los genomas se secuenciaron en la “Unidad de Genómica Avanzada” (UGA)-LANGEBIO del CINVESTAV, empleando la plataforma MiSeq de Illumina, generando lecturas pareadas de una longitud máxima de 301 nt (2 x 300 nt) y una profundidad de secuenciación de 60 X.

c. Análisis de la calidad, ensamblaje y anotación de los genomas

Todos los procesos bioinformáticos se realizaron en Ubuntu 20.04 como un subsistema de Windows para Linux (WSL).

Primero, se verificó que las lecturas (reads) correspondieran a la bacteria de interés a través de OneCodex. Este programa compara las lecturas contra bases de datos y es capaz de detectar por homología de qué bacteria provienen, lo que permite identificar una posible contaminación por otro microorganismo, la cual podría reducir la eficiencia del ensamblaje. Posteriormente, la calidad de las lecturas se evaluó en FastQC v0.12.0 y para aquellas lecturas que presentaban una disminución en su índice de calidad se realizó un ajuste de calidad usando Trimmomatic v0.39.

Los genomas se ensamblaron *de novo* con SPAdes v3.15.5 el cual consta de 3 etapas: **1.** La corrección de errores de lecturas con la herramienta BayesHammer, **2.** El ensamblaje iterativo del genoma a partir de las lecturas con la herramienta SPAdes (Para esta etapa, dado que las lecturas tenían una longitud máxima de 301 nt, se usaron valores de k-mero de 21, 33, 55, 77, 99 y 127), **3.** La prevención y corrección de posibles alineamientos erróneos o indels (inserciones y/o deleciones) con la herramienta

MismatchCorrector. La calidad de los ensamblados se evaluó usando QCAST (Quality Assessment Tool) y comparando contra un genoma de referencia para cada una de las 3 especies de *Shigella* secuenciadas. El uso de un genoma de referencia permite detectar contigs híbridos de regiones que deberían estar separadas, segmentos invertidos, segmentos faltantes o inserciones.

La anotación de los genomas se refiere al proceso por el cual se identifican las características de interés en las secuencias de DNA y se les adjudican información biológica, esto se realizó utilizando el programa Prokka v1.13.4.

d. Cálculo del coregenoma y del pangenoma y análisis filogenético

Entre los archivos generados a partir de la anotación de los ensamblados están los archivos .gff (General Feature Format), los cuales son archivos utilizados para almacenar la descripción de los genes y otras características de las secuencias del DNA, del RNA o de las proteínas. A partir de estos archivos se realizó el cálculo del coregenoma y del pangenoma usando la herramienta Panaroo v1.3.4, en el modo "estricto" y se usó el alineador PRANK para el alineamiento de los genes anotados. Se realiza el alineamiento de múltiples secuencias basado en la identificación del coregenoma y empleando el core_threshold de 0.95, lo que significa que alineará en el coregenoma a todos los genes presentes en al menos el 95% de los aislados. Los gráficos del pangenoma se generaron usando Roary v3.11.2.

Para analizar la distribución filogenética de los 20 genomas secuenciados (11 de *Shigella flexneri*, 5 de *Shigella sonnei* y 4 de *Shigella boydii*) se incluyeron 20 genomas de referencia, 5 de cada especie de *Shigella* (*S. boydii*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri* y *S. sonnei*). Para este análisis se usó la herramienta VAMPhyRE (Virtual Analysis Method for Phylogenomic fingerPrint Estimation), la cual realiza comparaciones del genoma completo usando VGF (Virtual Genomic Fingerprints). Esta herramienta fue diseñada para maximizar la variabilidad de las secuencias genómicas y reconocer patrones específicos, incluso cuando las secuencias genómicas están emparentadas. Los árboles se visualizaron y editaron con iTOL (interactive Tree of Life).

e. Identificación de genes de virulencia

Para la búsqueda de genes de virulencia se evaluaron los ensamblados de las 20 cepas de *Shigella* spp. secuenciadas. La detección de genes de virulencia se realizó empleando secuencias nucleotídicas de genes asociados con la severidad del proceso de infección de *Shigella* y se compararon contra los contigs generados por el ensamblaje, los cuales se analizaron mediante un alineamiento de BLAST nucleótido-nucleótido (BLAST v2.15.0). Se anotaron como positivas aquellas secuencias que mostraron un porcentaje de homología y de cobertura mayor o igual al 80%.

VII. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS DE *Shigella* spp AISLADA DE LOS CASOS DE SHIGELLOSIS

a. Curvas de crecimiento

Dos días previos a realizar el ensayo, se siembra por estría cruzada la cepa de *Shigella* spp. en placas con TSA (Agar soya tripticasa)-rojo-Congo 0.03% y las placas se incubaron por 24 h a 37 °C. A partir de una colonia aislada, se inoculan 5 mL de TSB (Caldo soya tripticasa) y el cultivo se incuba por 14 horas a 37 °C a 200 rpm. El día del experimento, se inoculan 200 µL del pre-inóculo en dos tubos con 20 mL de TSB a 37 °C a 200 rpm. 1.- Del primer tubo, se toman 200 µL del cultivo cada 20 minutos por 2.5 h, se colocan en un pozo de una placa de 96 pozos y se mide la absorbancia del cultivo a 600 nm. Se toman mediciones a los 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 y 150 minutos. 2.- El segundo cultivo se mantiene en incubación continua por 2.5 h, concluido este tiempo se realizan diluciones seriadas hasta alcanzar las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} , se toman 100 µL de cada una de estas diluciones para inocular una placa con TSA-rojo-Congo 0.03% y las placas se incuban por 24 h a 37 °C. Al día siguiente se realiza la cuenta de UFC. A partir de estas curvas de crecimiento y de las cuentas viables se realizan posteriores curvas de crecimiento y conteos de UFC, pero ajustando el volumen del pre-inóculo del que se inician los cultivos líquidos, para que al término de las 2.5 h obtengamos la misma concentración de bacterias en cada cultivo.

b. Ensayo de invasión

En transwells invertidos se agrega una capa de colágeno y sobre ella se siembran células T84, las cuales se incuban en medio DMEM/F-12 (Suero fetal bovino al 10% y Pen-Strep al 1%) a 37 °C, con 5% de CO₂, en humedad y hasta alcanzar una confluencia aproximada del 95%.

Dos días previos a realizar el ensayo, se siembra por estría cruzada la cepa de *Shigella* spp. en placas con TSA-con rojo-Congo 0.03% y las placas se incuban por 24 h a 37 °C. Un día previo a realizar el ensayo, a partir de una colonia aislada, se inoculan 5 mL de TSB y el cultivo se incuba por 14 horas a 37 °C a 200 rpm. Este mismo día, también se evalúa la resistencia eléctrica trans-epitelial (TEERS) de los cultivos celulares y se seleccionan los cultivos que presenten resistencias en un intervalo entre 8,000 – 13,000 ohms. Para el ensayo de invasión apical se utilizan los cultivos en un intervalo entre 8,000 – 11,000 ohms, mientras que para el ensayo de invasión basolateral se utilizan los cultivos en un intervalo entre 11,000 – 13,000 ohms.

El día del experimento, se toma del pre-inóculo un volumen determinado para cada cepa en 20 mL de TSB y se incuba por 2.5 horas a 37 °C a 200 rpm. Durante el tiempo de incubación, se seleccionan los transwells como se indica anteriormente, dependiendo de si el ensayo es apical o basolateral, seleccionando 4 transwells por cada cepa a analizar. Concluido el tiempo de incubación del cultivo bacteriano, se homogeniza utilizando un vortex, se transfiere 1 mL del cultivo a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se coloca en hielo. Los 19 mL restantes de cultivo se centrifugan por 25 minutos a 4 °C a 4,500 rpm con pausa lenta. Durante estos 25 minutos, se realiza la primera cuenta viable,

el tubo con 1 mL de cultivo que se había colocado en hielo se agita en vortex por 30 segundos, de este tubo se toman 10 μL y se agregaron a un tubo que contiene 990 μL de HBBS+ (Dilución 10^{-2}), se repite todo este proceso y se generan las una diluciones 10^{-4} y 10^{-5} , se toman 100 μL de estas dos últimas diluciones, se siembran por espatulación en una caja de Petri con TSA-rojo-Congo 0.03% y se incuban a 37°C por 24 h, al día siguiente se determina el número de UFCs en cada caja. Por otro lado, al concluir los 25 minutos de centrifugación del cultivo antes mencionado, se descarta el sobrenadante y el botón de bacterias se resuspende en 10 mL de HBSS+ frío. Posteriormente, las bacterias se vuelven a centrifugar por 25 minutos a 4°C a 4,500 rpm. En lo que se centrifugan las bacterias, los transwells con las células T84 se retiran de la placa de 24 pozos usando pinzas y se enjuagan por inmersión en HBSS+ precalentado a 37°C , se enjuagan tres veces y al finalizar los lavados se colocan los transwells en una placa de 24 pozos que contine 1 mL de HBSS+ en cada pozo y se agregan 200 μL de HBSS+ al interior del transwell, la placa se coloca en la incubadora de 37°C , con 5% de CO_2 y en humedad. Al concluir los 25 minutos de centrifugación del cultivo de bacterias, se elimina el sobrenadante y el botón de bacterias se resuspende en 19mL de HBSS+ frío. El cultivo se homogeniza por 30 segundos utilizando un vortex, se transfiere 1 mL del cultivo a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y a partir de él se preparó el inóculo, que para la infección basolateral tiene que estar en volumen final de 120 μL y para la invasión la invasión apical tiene que estar en un volumen final de 40 μL .

- En la infección basolateral los transwells se retiran de la placa de 24 pozos usando pinzas, se elimina el HBSS+ del interior del transwell, los transwells se vuelven a color en la placa de 24 pozos y se les agregan los 120 μL del inóculo.
- En la infección apical los transwells se retiran de la placa de 24 pozos y se invierten de tal manera que las células T84 quedan expuestas en la superficie del transwell y se colocan en una cámara húmeda, preparada con sanitas y agua MilliQ, y se les agregan los 40 μL del inóculo sobre la superficie de las células.

Los transwells de cada experimento con las bacterias se incuban durante 3 horas a 37°C . Transcurrido este tiempo de incubación los transwells se sacan de la incubadora, se elimina por inversión la bacteria, el transwell se coloca en un plato de 24 pozos nuevo al que previamente se le había agregado 1 mL de HBSS+ frío a cada pozo a y al interior del transwell se agregan 200 μL de HBSS+. Este paso se repitió hasta completar 3 lavados y para cada lavado el transwell se mueve a un pozo nuevo. Una vez finalizados los lavados, los transwells se enjuagaron tres veces en una solución de gentamicina a una concentración de 0.48 mg/mL y se elimina la solución por inversión, la cuarta vez que se sumergen en la solución de gentamicina no se invierten y se colocan en una placa de 24 pozos que contiene 1 mL de la solución de gentamicina 0.48/HBSS mg/mL, a cada pozo se le agrega solución de gentamicina hasta que quede cubierto por completo el transwell y se incuba por 3 horas a 37°C . Posteriormente, se realizan nueve lavados de cada transwell con HBSS+ estéril utilizando por cada tres lavados un vaso de precipitado entre dos mecheros. Al concluir el noveno lavado, se sacude el transwell para eliminar la mayor cantidad de la solución de lavados y se colocan los transwell en una placa de 24 pozos que contiene 800 μL de tritón 1X y se agregan 200 μL de tritón

1X en el interior del transwell, los transwells se incuban por 30 minutos a 4 °C en movimiento utilizando un agitador de balanceo, al finalizar la incubación se rompen las membranas de los transwell punzándolas con la punta de una micropipeta de 1000 µL, se homogenizan los lisado por pipeteo, se incuba la placa de 24 pozos con los lisados celulares por 30 minutos a 4 °C en movimiento. Finalmente, se toma el 1 mL del lisado celular y se coloca en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se preparan diluciones 10^{-1} y 10^{-2} en HBSS+ estéril, se toman 100 µL de cada dilución, se siembran por espatulación en una caja de Petri con TSA-rojo-Congo 0.03%, se incuban por 24 horas a 37 °C y al día siguiente se determinan las UFCs.

c. Ensayo de formación de placas líticas

En una placa de 6 pozos se siembran células T84 que están en medio DMEM/F-12 (Suero fetal bovino al 10% y Pen-Strep al 1%), se incuban a 37 °C, con 5% de CO₂, en humedad, hasta alcanzar una confluencia aproximada del 95%. Dos días previos a realizar el ensayo, se siembra por estría cruzada la cepa de *Shigella* spp. en cajas de Petri con TSA-rojo-Congo 0.03% y se incuban por 24 h a 37 °C. Se selecciona por asada una colonia aislada y se resuspende en 5 mL de TSB y se incuba por 14 horas a 37 °C a 200 rpm.

La primera vez que se analiza una cepa se tiene que estandarizar la concentración del inóculo por lo que se utilizan diferentes diluciones de éste (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}), como control positivo se utiliza la cepa de referencia de *S. flexneri* 2457T en una dilución 1:50 en HBSS+ y como control negativo la cepa de referencia de *S. flexneri* BS103 que no contiene el plásmido de invasión, también en una dilución 1:50 HBSS+.

El día del experimento, se toma del pre-inóculo un volumen determinado para cada cepa y se agregan en 20 mL de TSB, se incuban por 2.5 horas a 37 °C a 200 rpm y el cultivo se centrifuga por 25 minutos a 4 °C a 4,500 rpm. Al terminar la centrifugación, se descarta el medio de cultivo bacteriano y el botón de bacterias se resuspende en 10 mL de HBSS+ frío, se agita en vortex y se centrifuga por 25 minutos a 4 °C a 4,500 rpm. Durante estos 25 minutos, a las células T84 en cada pozo se les remueve el medio de cultivo y se les agregan 2 mL de HBSS+ precalentado a 37 °C por las paredes del pozo sin tocar la monocapa, se incuba a 37 °C. Concluida la centrifugación, nuevamente se descarta el sobrenadante y el botón bacteriano se resuspende en 30 mL de HBSS+ frío, a partir del cual se preparan las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} en HBSS+.

En la campana de flujo laminar, se remueve el HBSS+ de cada pozo del cultivo celular y se agregan 400 µL de la cada una de las diluciones (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}), además en cada placa se tiene un pozo de control positivo *S. flexneri* 2457T y un pozo del control negativo *S. flexneri* BS103. La placa se centrifuga por 10 minutos, a temperatura ambiente, a 700 rcf y se incuba por 2 horas a 37 °C y cada 15 a 20 minutos se agita suavemente la placa para garantizar que el inóculo cubra todo el pozo. Al finalizar el tiempo de la infección, se le agregan a cada pozo 2 mL de HBSS+ para disminuir la concentración bacteriana, se remueve sobrenadante del pozo por succión con vacío, cuidadosamente y se agregan 4 mL de DMEM/F-12 (Suero fetal bovino al 10%) con gentamicina (Concentración final 100 µg/mL), la placa se incuba por 4 días a

37 °C. Pasado este tiempo se retira el medio DMEM/F-12 con gentamicina de cada pozo se agregan 4 mL de medio DMEM/F-12 (Suero fetal bovino al 10%) con rojo neutro al 2%, las células se incuban por 2 horas a 37 °C, transcurrido el tiempo de tinción, se remueve el medio, las células se fijan con 1 mL de formaldehído por 20 minutos a temperatura ambiente y se remueve el formaldehído. Finalmente se enumeran las placas por pozo y el tamaño de las placas se mide al microscopio en μm^2 .

VIII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos de la prevalencia de *Shigella* spp. en las poblaciones de estudio, se realizaron mediante pruebas de contingencia usando la prueba exacta de Fisher (FET) con el software GraphPad PRISM® 5.0.

Los análisis estadísticos del microbioma se realizaron en la plataforma R, en la interfaz de RStudio. La diferencia de los índices de diversidad alfa entre los grupos fue evaluada mediante la prueba de Wilcoxon. La diversidad beta fue evaluada entre los grupos comparando la distancia de disimilitud de Bray-Curtis por PERMANOVA (Permutational multivariate analysis of variance), utilizando la función de adonis con 1,000 permutaciones mediante el paquete vegan. También se utilizó una prueba de corrección del valor p por el método False Discovery Rate (FDR).

La comparación de la abundancia de los taxones entre los grupos (diarrea, sin diarrea, severidad etc) se determinó mediante la prueba de rango de Kruskal-Wallis o Wilcoxon acoplada al análisis LEfSe.

Para establecer las vías metabólicas que están enriquecidas en cada grupo se realizó con el programa STAMP (Statistical Analysis of Metagenomic Profiles, v2.1.3) a partir de las vías metabólicas obtenidas con PRICRUST.

Las comparaciones entre las cepas de *Shigella* spp. en los ensayos de invasión y de formación de placas se realizaron por la prueba U de Mann-Whitney (MWUT) con el software GraphPad PRISM® 5.0.

Todos los resultados significativos se obtendrán considerando un valor $p < 0.05$.

RESULTADOS

I. CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO Y SU ESTATUS NUTRICIONAL.

Este estudio se desarrolló por un periodo de 4 años, de enero del 2010 a julio del 2014, tiempo en el que se reclutaron 999 niños con diarrea aguda (casos) en urgencias pediátricas o UDHATOS (Unidad de hidratación oral), cuyo intervalo de edad fue de 0-10 años, 586 fueron varones (58.66%) y 413 niñas (41.34%). También se reclutaron un total 238 niños sin diarrea (controles), con un intervalo de edad de 0-11 años, en urgencias pediátricas que acudieron por fracturas simples o que acudieron a la unidad de vacunación. De los 238 controles, 122 fueron varones (51.26%) y 116 niñas (48.74%).

Como muestra en la **Figura 10** los 999 casos de diarrea aguda se dividieron en grupos:

1.- El primer grupo incluye los casos con diarrea a los que no se les identificó ningún de los 16 patógenos evaluados en este estudio. Este grupo estuvo formado por 373 casos (37.34%), 214 varones (57.37%) y 159 niñas (42.63%) y la edad promedio fue de 2.2 años. Del total de niños del grupo, 182 (48.79%) tuvieron desnutrición, de estos 56 (30.77%) tuvieron desnutrición aguda y 126 (69.23%) tuvieron desnutrición crónica.

2.- El segundo grupo incluye los casos con diarrea a los cuales que se les identificó al menos uno de los 16 patógenos buscados. Este grupo estuvo formado por un total 626 casos (62.66%), 372 varones (59.42%) y 254 niñas (40.58%), la edad promedio de los niños fue de 2.5 años. De los 626 casos, 301 (48.08%) niños tuvieron desnutrición, 106 (35.22%) tuvieron desnutrición aguda y 195 (64.78%) tuvieron desnutrición crónica. Este grupo lo dividimos a su vez en dos subgrupos:

2.1.- El subgrupo de infección simple, que corresponden a los casos a los que se les identifico solo uno de los 16 patógenos que se buscaron que incluyo 384 (61.34%) niños de los 626 casos en los que se identificó algún patógeno. De los 384 niños del grupo, 174 (45.31%) tuvieron desnutrición, 70 niños (40.23%) presentaban desnutrición aguda y 104 niños (59.77%) presentaban desnutrición crónica.

2.2.- El subgrupo de infección mixta, que corresponden a los casos de diarrea donde se identificaron dos o más patógenos. Este grupo estuvo formado por 242 (38.66%) niños de los 626 casos en los que se identificó algún patógeno. De los 242 niños del grupo, 127 (52.48%) tuvieron desnutrición, 36 niños (28.35%) presentaban desnutrición aguda y 91 niños (71.65%)* presentaban desnutrición crónica.

Al realizar la comparación entre los casos con infección simple e infección mixta y los estatus nutricionales, se observó que de manera significativa los niños con desnutrición crónica tienen una mayor probabilidad de tener una infección mixta (FET $p < 0.05$, OR=1.701, IC 1.045-2.772).

3.- El tercer grupo incluye a los 238 controles sin diarrea. Este grupo estuvo conformado por 120 controles a los que no se les identifico ninguno de los 16 patógenos

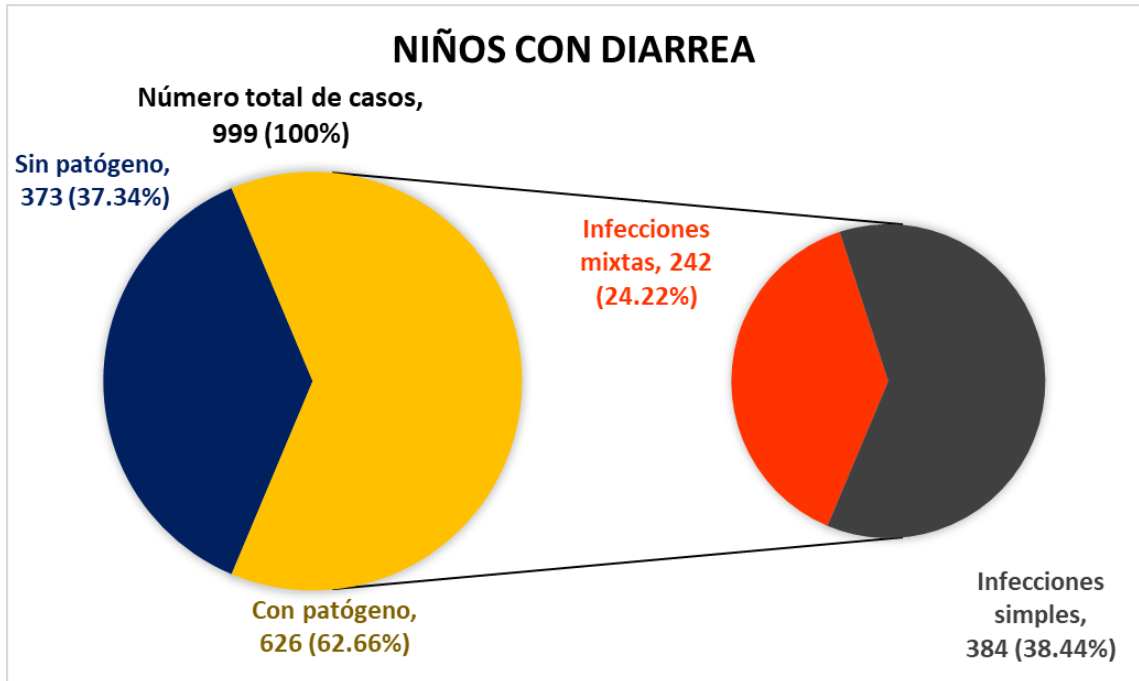


Figura 10. Distribución de los casos de diarrea colectados durante el estudio Biomarcadores del año 2010-2014. En el estudio lograron colectarse 999 muestras de diarrea que cumplieron con los criterios de inclusión, los cuales se dividieron en 373 casos de diarrea sin patógeno identificado y 626 casos de diarrea con al menos un patógeno. El grupo de casos de diarrea con patógeno se dividió en 242 casos de infecciones mixtas y 384 casos de patógeno único.

caracterizados, con un intervalo de edad de 0-11, donde 60 fueron varones y 60 fueron niñas.

II. PREVALENCIA DE LOS PATÓGENOS IDENTIFICADOS.

Como se muestra en la **Figura 11** de los 16 patógenos identificados en los 626 casos con diarrea, los patógenos más prevalentes fueron los patotipos de *Escherichia coli* diarrogénica (PEDs) con una prevalencia de 309 (49.36%) casos, seguido de Rotavirus en 237 (37.86%) casos, *Shigella* spp. en 118 (18.85%) casos, *Salmonella* spp. en 115 (18.37%) casos, *Campylobacter* spp. en 52 (8.31%) casos, parásitos en 48 (7.67%) casos y *V. cholerae* en 16 (2.56%) casos.

Como se muestra en la **Tabla 2** los casos de diarrea se dividieron en 6 grupos etéreos de: 0-12 meses, >12-24 meses, >24-36 meses, >36-48 meses, >48-60 meses y >60 meses. Los PEDs fueron los patógenos más prevalentes en los infantes de 0-36 meses, representando al menos el 50% de los casos de diarrea con patógenos en estos grupos etarios, indicando la importancia de la búsqueda de los 6 PEDs en estudios de diarrea. También se observó que los PEDs están significativamente asociados como agentes causales de diarrea en el grupo de infantes ≤ 24 meses en comparación con los grupos etarios de infantes >24 meses (FET $p < 0.05$, OR=1.388, IC 1.018-1.898). Es interesante que Rotavirus fue el patógeno intestinal más prevalente en los niños de >36 meses y el análisis estadístico indica que los infantes >24 meses tienen

significativamente mayor número de casos diarrea causada por Rotavirus que los ≤ 24 meses (FET $p < 0.01$, OR=1.64, IC 1.118-2.26).

Por otro lado, *Shigella*, el segundo patógeno bacteriano más prevalente y el tercer agente causal de diarrea después de Rotavirus. En comparación con los PEDs se identificó *Shigella* spp. más frecuentemente en las heces de los niños con diarrea > 24 meses, siendo 4 veces más probable que los niños > 24 meses tengan shigellosis que los infantes ≤ 24 meses (FET $p < 0.0001$, OR=3.592, IC 2.315-5.489). Es importante mencionar que inclusive es 3 veces más frecuente identificar casos de Shigellosis en los niños > 60 meses que en los infantes ≤ 24 meses (FET $p < 0.001$, OR=3.192, IC 1.795-5.696). Además, cuando consideramos a los 999 casos de diarrea aguda colectados y comparamos la prevalencia de *Shigella* spp. en los niños > 60 meses vs en los niños ≤ 60 meses, encontramos que es casi 2 veces más probable que se identifique a *Shigella* spp en un niño > 60 meses con diarrea que en un niño ≤ 60 meses* (FET $p < 0.05$, OR=1.733, IC 1.036-2.850), sugiriendo la relevancia de contemplar a este grupo etario y no sólo a aquellos infantes < 5 años, como hacen la mayoría de los estudios de diarrea en niños, lo que permitirá caracterizar la epidemiología real de *Shigella* spp.

Salmonella spp. y *Campylobacter* spp. se identificaron más frecuentemente en infantes 0-12 meses, siendo 2 veces más frecuentemente aislados en las heces de infantes ≤ 24 meses que en niños > 24 meses (FET $p < 0.001$, OR=2.3, IC 1.464-3.521) (FET $p < 0.01$, OR=2.428, IC 1.315-4.449). En contraste, la frecuencia de la identificación de parásitos en las heces de los niños con diarrea fue significativamente más prevalentes en los niños > 24 meses, donde se observó que es casi 6 veces más probable que los niños de este grupo etario estén infectados con un parásito que los infantes ≤ 24 meses (FET $p < 0.0001$, OR=5.848, IC 2.85-12.17). Por otro lado, *Vibrio cholerae* fue el único patógeno bacteriano con mayor prevalencia en los niños > 60 meses en comparación con los niños ≤ 60 meses, siendo casi 4 veces más probable que *V. cholerae* este asociado con los casos de diarrea en este grupo etario (FET $p < 0.05$, OR=3.975, IC 1.413-10.55).

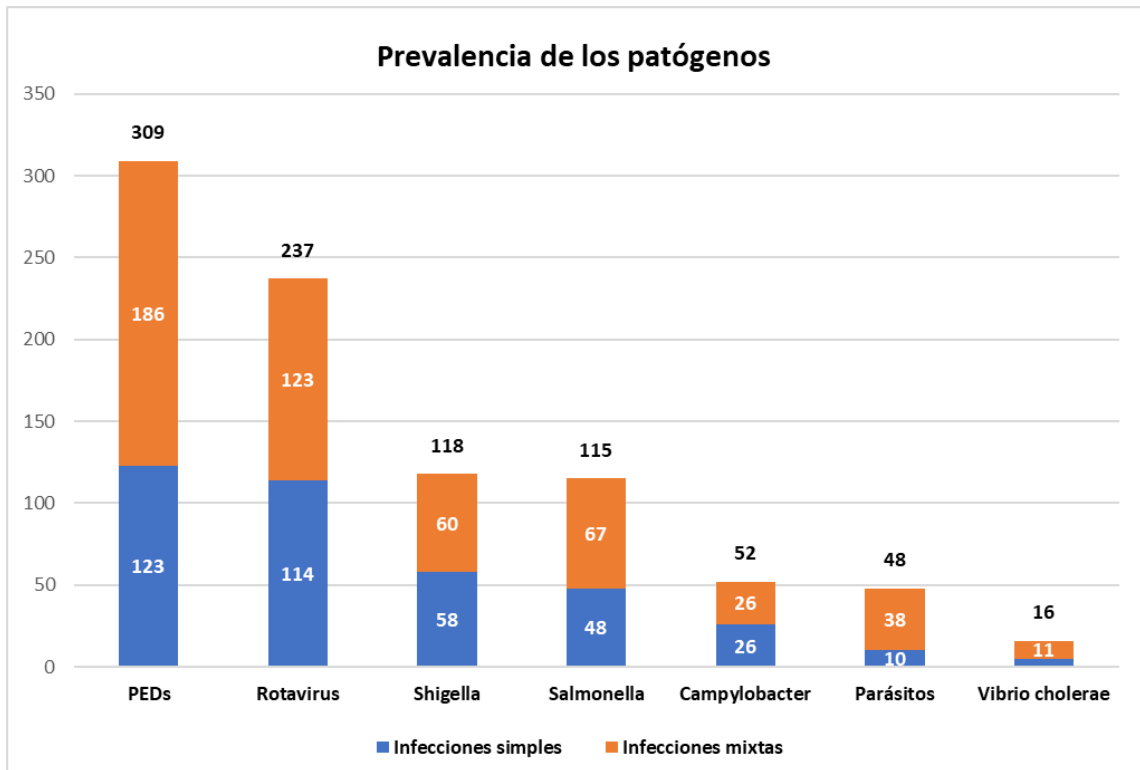


Figura 11. Prevalencia de los patógenos intestinales en todos los niños del estudio Biomarcadores. Se presenta el número de casos en los que se identificó cada uno de los 7 patógenos buscados durante el estudio. En la parte superior de cada barra se muestra el número total de casos en los que se identificó al patógeno. Cada barra muestra el número de casos de patógeno único (en azul) y el número de casos de patógeno mixto (en naranja) donde se identificó al patógeno.

Número de casos (%)											
Edad en meses	Casos de diarrea	Casos con patógenos	Infección mixta	Infección simple	DEPs	Rotavirus	<i>Shigella</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Campylobacter</i>	Parásitos	<i>Vibrio cholerae</i>
0-12	337	187 (55.49)	64 (34.22)	123 (65.78)	103 (55.08)	51 (27.27)	11 (5.88)	56 (29.95)	23 (12.3)	1(0.53)	5 (2.67)
>12-24	254	154 (60.63)	53 (34.42)	101 (65.58)	78 (50.65)	60 (38.96)	24 (15.58)	25 (16.23)	15 (9.74)	8 (5.19)	2 (1.3)
>24-36	148	108 (72.97)	51 (47.22)	57 (52.78)	54 (50.00)	43 (39.81)	36 (33.33)	10 (9.26)	5 (4.63)	18 (16.67)	0 (0)
>36-48	80	54 (67.5)	28 (51.85)	26 (48.15)	27 (50.00)	30 (55.56)	15 (27.78)	7 (12.96)	5 (9.26)	5 (9.26)	2 (3.70)
>48-60	49	37 (75.51)	14 (37.84)	23 (62.16)	14 (37.84)	17(45.95)	9 (24.32)	4 (10.81)	2 (5.41)	6 (16.22)	1 (2.7)
>60	131	86 (65.65)	32 (37.21)	54 (62.79)	33 (38.37)	36 (41.86)	23 (26.74)	13 (15.12)	2 (2.33)	10 (11.63)	6 (6.98)
Total	999	626 (62.66)	242 (38.66)	384 (61.34)	309 (49.36)	237 (37.86)	118 (18.84)	115 (18.85)	52 (8.31)	48 (7.67)	16 (2.56)

Tabla 2. Prevalencia de los patógenos intestinales identificados por grupos de edad. Los 999 casos de diarrea se separaron en 6 grupos etarios, representados por las filas de la tabla. En cada celda se especifica el número de casos (%) identificados para cada condición especificada en las columnas.

III. PREVALENCIA DE LAS ESPECIES DE *Shigella*.

Como se ilustra en la **Figura 12**, la especie más prevalente de los niños con diarrea fue *Shigella flexneri* la cual se identificó en 84 (71%) casos de diarrea de los 118 casos positivos para *Shigella*, seguido por *S. sonnei* que se aisló de 19 casos (16%), *S. boydii* en 12 (10%) y por último 3 casos (3%) *S. dysenteriae*, estos tres casos fueron de infecciones mixtas. Todas las especies mostraron mayor prevalencia (70%) en el grupo de mayor de 24 meses. *S. flexneri* y *S. boydii* fueron más prevalentes en el grupo etario de mayor de 24 meses a 36 con 29% y 58%, respectivamente, mientras que *S. sonnei* mostro una mayor prevalencia en el grupo etario de mayor de 60 meses (42%) **Tabla 3**.

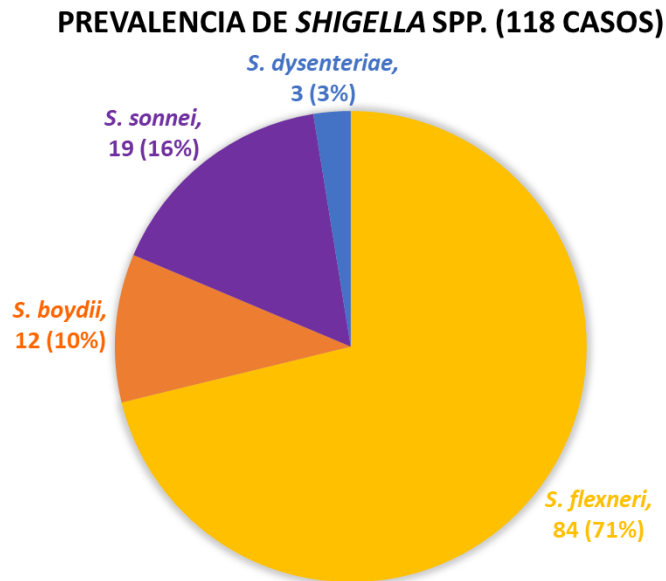


Figura 12. Distribución de las cuatro especies de *Shigella* en todos los niños del estudio Biomarcadores. En el gráfico de pastel se representa el número de casos (%) en los que se identificó a cada especie de *Shigella*.

Número de casos de <i>Shigella</i> spp. (%)					
Edad en meses	<i>Shigella</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>S. boydii</i>	<i>S. dysenteriae</i>
0-12	11	10 (90.9)	1 (9.1)	0 (0)	0 (0)
>12-24	24	18 (75)	4 (16.6)	1 (4.2)	1 (4.2)
>24-36	36	25 (69.5)	3 (8.3)	7 (19.4)	1 (2.8)
>36-48	15	12 (80)	2 (13.3)	1 (6.7)	0 (0)
>48-60	9	7 (77.8)	1 (11.1)	1 (11.1)	0 (0)
>60	23	12 (52.2)	8 (34.8)	2 (8.7)	1 (4.3)
Total	118	84 (71)	19 (16)	12 (10)	3 (3)

Tabla 3. Prevalencia de las cuatro especies *Shigella* spp. por grupos de edad. Características de los niños catalogados como “caso severo de diarrea” donde se identificó a *Shigella* como patógeno único y que se seleccionaron para analizar su microbioma.

IV. CARACTERIZACIÓN Y COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MICROBIOMA INTESTINAL ENTRE LOS NIÑOS CON SHIGELLOSIS VS LOS NIÑOS SIN DIARREA.

a. Características de los grupos de estudio

Con el objetivo de entender el papel que juega *Shigella* spp. sobre el microbioma intestinal, analizamos un total de 31 casos de diarrea aguda en donde *Shigella* spp. fue el único patógeno aislado de las muestras de heces de estos pacientes. Se incluyeron todas las muestras de heces los niños que tuvieron casos severos de shigellosis con base en la escala modificada de Ruuska-Vesikari (Descrita en la sección de Materiales y métodos), en total fueron 8 casos severos. Como se ilustra en la **Tabla 4** fueron 6 casos de *S. flexneri* 1 de *S. boydii* y 1 de *S. sonnei*, de los cuales todos presentaron convulsiones y 5 de los niños tuvieron diarrea con sangre con la excepción de dos casos de *S. flexneri* y el único caso de *S. sonnei*. También se incluyeron todas las muestras de heces de los casos de diarrea moderada, en total fueron 7 pacientes como se observa en la **Tabla 5**. Las especies aisladas de estos casos fueron 5 *S. flexneri*, 1 de *S. boydii* y 1 de *S. sonnei*, 6 de estos casos presentaron diarrea con sangre con excepción de un caso de *S. flexneri*. Finalmente, como se muestra en la **Tabla 6**, de los 34 casos leves de shigellosis en el estudio, se seleccionaron 16 (47%) muestras de heces, 2 casos por cada caso severo pareados por edad.

Con respecto a los 120 niños controles sin ningún patógeno identificado en heces, se seleccionaron 35 (29%) muestras donde al menos 2 de los controles fueron pareados por edad con los casos severos de diarrea, en un intervalo de edad de 0-7 años, incluyendo a 18 varones y a 17 niñas **Tabla 7**.

8 CASOS SEVEROS DE DIARREA								
Clave de la muestra	Genero	Edad en meses	Grupo etario	Especie de Shigella	Peso (Kg)	Talla (m)	Estado nutricional	Complicaciones sistémicas
CA009	M	11.1	≤24 meses	<i>S. flexneri</i>	8.2	0.71	Normal	Convulsiones
CA438	F	88.8	>60 meses	<i>S. flexneri</i>	28	1.4	Normal	Convulsiones, desequilibrio hidroelectrolítico, hyponatremia severa
CA536	F	30.4	>24 meses	<i>S. boydii</i>	13	0.83	Desn. crónica	Convulsiones
CA821	M	15.9	≤24 meses	<i>S. flexneri</i>	9.4	0.76	Normal	Convulsiones, desequilibrio hidroelectrolítico
CA863	M	22	≤24 meses	<i>S. sonnei</i>	11.1	NA	NA	Convulsiones
CA898	M	39.6	>24 meses	<i>S. flexneri</i>	13.5	0.95	Normal	Convulsiones
CA1012	M	12.6	≤24 meses	<i>S. flexneri</i>	12	0.71	Desn. crónica	Convulsiones
CA1016	M	27.1	>24 meses	<i>S. flexneri</i>	17.3	0.7	Desn. crónica	Convulsiones

Tabla 4. Casos severos de diarrea seleccionados para la caracterización de su microbioma. Características de los niños catalogados como “caso severo de diarrea” donde se identificó a *Shigella* como patógeno único y que se seleccionaron para analizar su microbioma.

7 CASOS MODERADOS DE DIARREA								
Clave de la muestra	Genero	Edad en meses	Grupo etario	Especie de Shigella	Peso (Kg)	Talla (m)	Estado nutricional	Complicaciones sistémicas
CA120	M	20.1	≤24 meses	<i>S. flexneri</i>	9.35	0.8	Normal	Ninguna
CA426	M	59.6	>24 meses	<i>S. flexneri</i>	16.7	1.19	Desn. aguda	Ninguna
CA449	F	94.8	>60 meses	<i>S. sonnei</i>	31.6	1.1	Normal	Ninguna
CA524	M	27.3	>24 meses	<i>S. flexneri</i>	18	0.76	Desn. crónica	Ninguna
CA561	M	35.1	>24 meses	<i>S. flexneri</i>	14.5	0.94	Normal	Ninguna
CA606	F	108	>60 meses	<i>S. boydii</i>	23.5	1.21	Normal	Ninguna
CA876	F	58.5	>24 meses	<i>S. flexneri</i>	15	0.93	Desn. crónica	Ninguna

Tabla 5. Casos moderados de diarrea seleccionados para la caracterización de su microbioma. Características de los niños catalogados como “caso moderado de diarrea” donde se identificó a *Shigella* como patógeno único y que se seleccionaron para analizar su microbioma.

16 CASOS LEVES DE DIARREA								
Clave de la muestra	Genero	Edad en meses	Grupo etario	Especie de Shigella	Peso (Kg)	Talla (m)	Estado nutricional	Complicaciones sistémicas
CA042	M	91.2	>60 meses	<i>S. flexneri</i>	21	1.25	Desn. aguda	Ninguna
CA059	M	8.8	≤24 meses	<i>S. flexneri</i>	9.8	0.74	Normal	Ninguna
CA062	F	24.2	≤24 meses	<i>S. flexneri</i>	12	0.83	Normal	Ninguna
CA159	M	26.6	>24 meses	<i>S. boydii</i>	11.2	0.92	Desn. aguda	Ninguna
CA236	M	38.4	>24 meses	<i>S. flexneri</i>	12.8	0.99	Desn. aguda	Ninguna
CA323	F	45.6	>24 meses	<i>S. flexneri</i>	15	1.1	Desn. aguda	Ninguna
CA330	M	23.9	≤24 meses	<i>S. sonnei</i>	12	0.79	Desn. crónica	Ninguna
CA335	M	10.2	≤24 meses	<i>S. flexneri</i>	10.14	0.76	Normal	Ninguna
CA448	F	29.5	>24 meses	<i>S. flexneri</i>	13	0.94	Normal	Ninguna
CA454	M	13.7	≤24 meses	<i>S. flexneri</i>	10.6	0.8	Normal	Ninguna
CA543	F	31	>24 meses	<i>S. flexneri</i>	11.9	0.88	Normal	Ninguna
CA587	F	12.8	≤24 meses	<i>S. sonnei</i>	9	0.72	Normal	Ninguna
CA781	M	88.8	>60 meses	<i>S. sonnei</i>	24.9	1.25	Normal	Ninguna
CA893	F	13.7	≤24 meses	<i>S. sonnei</i>	8	0.72	Normal	Ninguna
CA1018	F	27.9	>24 meses	<i>S. flexneri</i>	13.6	0.87	Normal	Ninguna
CA1042	F	23.2	≤24 meses	<i>S. flexneri</i>	8	0.75	Desn. crónica	Ninguna

Tabla 6. Casos leves de diarrea seleccionados para la caracterización de su microbioma. Características de los niños catalogados como “caso leve de diarrea” donde se identificó a *Shigella* como patógeno único y que se seleccionaron para analizar su microbioma.

35 CONTROLES SIN DIARREA						
Clave de la muestra	Genero	Edad en meses	Grupo etario	Peso (Kg)	Talla (m)	Estado nutricional
CO017	M	9.5	≤24 meses	7.9	0.64	Desn. crónica
CO061	M	11.1	≤24 meses	12.75	0.9	Normal
CO093	M	87.6	>60 meses	19.1	1.1	Normal
CO245	F	86.4	>60 meses	31.9	1.17	Normal
CO018	M	30.5	>24 meses	12.5	0.8	Desn. crónica
CO158	M	30	>24 meses	12	0.91	Normal
CO024	M	15.2	≤24 meses	11.8	0.77	Normal
CO186	F	14.8	≤24 meses	9.3	0.76	Normal
CO104	M	39.2	>24 meses	10.2	0.9	Desn. crónica
CO149	M	39.6	>24 meses	16.3	0.93	Normal
CO160	F	18	≤24 meses	9.5	0.79	Normal
CO203	F	23	≤24 meses	11.5	0.835	Normal
CO030	M	12.4	≤24 meses	7	0.71	Desn. aguda
CO169	M	12.9	≤24 meses	10	0.71	Desn. crónica
CO026	M	26	>24 meses	10	0.8	Desn. crónica
CO199	F	28.4	>24 meses	11	0.85	Normal
CO006	F	7.3	≤24 meses	7.5	0.69	Normal
CO013	M	15.6	≤24 meses	9.9	0.73	Desn. crónica
CO023	M	6.7	≤24 meses	8.4	0.68	Normal
CO043	F	24.8	≤24 meses	10.5	0.81	Normal
CO044	F	2	≤24 meses	4.5	0.53	Desn. crónica
CO049	F	23.4	≤24 meses	12	0.79	Desn. crónica
CO080	F	17.5	≤24 meses	11	0.78	Normal
CO085	F	8.2	≤24 meses	8.6	0.7	Normal
CO087	F	18.5	≤24 meses	10	0.74	Desn. crónica
CO089	M	28.1	>24 meses	11.5	0.82	Desn. crónica
CO100	M	26.3	>24 meses	14.1	0.92	Normal
CO103	F	29.8	>24 meses	16	0.93	Normal
CO120	F	14.1	≤24 meses	8	0.74	Normal
CO205	M	8.4	≤24 meses	8.2	0.657	Desn. crónica
CO208	F	16.8	≤24 meses	8.9	0.7	Desn. crónica
CO222	M	19.8	≤24 meses	9.5	0.8	Normal
CO227	M	24.6	≤24 meses	9.7	0.82	Desn. aguda
CO229	F	19	≤24 meses	8.5	0.65	Desn. crónica
CO240	F	1.8	≤24 meses	11.5	0.8	Normal

Tabla 7. Controles sin diarrea seleccionados para la caracterización de su microbioma. Características de los niños catalogados como “control sin diarrea” donde no se identificaron patógenos y que se seleccionaron para analizar su microbioma.

b. Análisis y comparación del microbioma intestinal

A partir de las 66 muestras de heces seleccionadas, se realizó la extracción del DNA total y se realizó la secuenciación de las regiones hipervariables V3-V5 del gen 16S rRNA con la tecnología MiSeq de Illumina, generando un total de 4,166,840 lecturas, las cuales se analizaron en QIIME2. Estas lecturas presentaron un intervalo de 23,432 lecturas (la muestra con menor número de lecturas) – 109,471 lecturas (la muestra con mayor número de lecturas), las cuales se agruparon en 2,289 OTUs bacterianos, de los cuales 224 correspondieron a nivel de género. Se seleccionaron aleatoriamente 23,432 lecturas de cada muestra, con el propósito de representar la riqueza (número de OTUs diferentes) dentro de cada muestra y se graficaron las curvas de rarefacción. Estas curvas se usan para representar a la riqueza de OTUs, cuyo uso correcto es comparar estas curvas únicamente cuando han cubierto casi la riqueza completa dentro de la muestra, lo cual se evidencia cuando la curva alcanza la asíntota. Como se muestra en la **Figura 13** las curvas de rarefacción de las 66 muestras, representando en color cian a las curvas graficadas a partir de las muestras de los casos y en naranja a las curvas graficadas a partir de las muestras de controles. En la imagen se puede ver que las 66 curvas alcanzaron la asíntota y se evidencia que en las muestras de los casos es donde se identificó el menor número de OTUs observados.

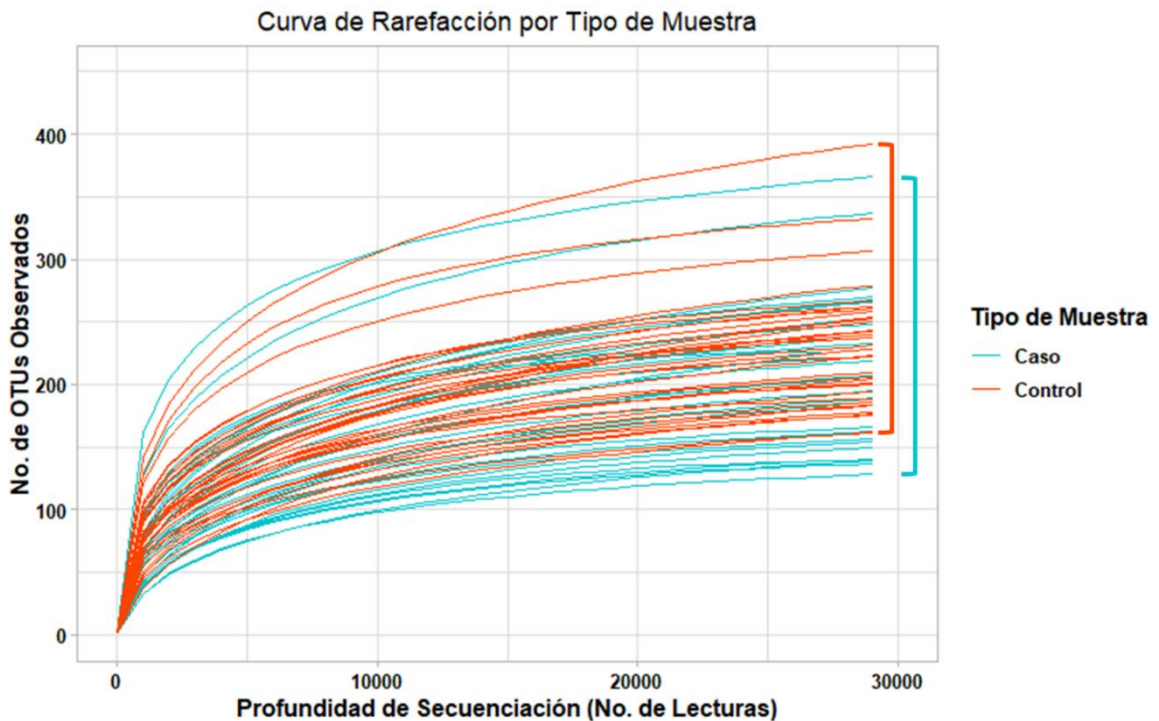


Figura 13. Curvas de rarefacción de los casos de diarrea asociada a *Shigella* spp. y los controles sin diarrea. En color cian se presentan las curvas de rarefacción de correspondientes a los casos de diarrea, mientras que en color naranja se presentan las curvas de rarefacción correspondientes a los controles sin diarrea. En el eje X se representa el número de lecturas (secuencias) analizadas y en el eje Y se representa el número de OTUs identificados. (Indicador de la riqueza en la muestra).

Posteriormente, evaluamos la diversidad α del microbioma intestinal, la cual se define como la comparación de la diversidad microbiana entre muestras dentro del mismo grupo, contemplando factores como: la riqueza, la igualdad y la abundancia. En la **Figura 14** se muestran los resultados de este análisis, usando el índice de diversidad de Shannon. En la **Figura 14 a)** podemos observar una reducción en la diversidad α de las muestras de los casos en comparación con las muestras de los controles ($p < 0.001$). Una vez que encontramos esta reducción en la diversidad α , quisimos identificar si alguno de los grupos de severidad (severo, moderado o leve) en particular era el que presentaba una reducción en su diversidad α con respecto a los controles **Figura 14 b)**, pero encontramos que los tres grupos presentaron una reducción significativa en su diversidad α , independientemente del grado de severidad (los casos severos vs los controles, $p < 0.01$), (los casos moderados vs los controles, $p < 0.05$), (los casos leves vs los controles, $p < 0.05$).

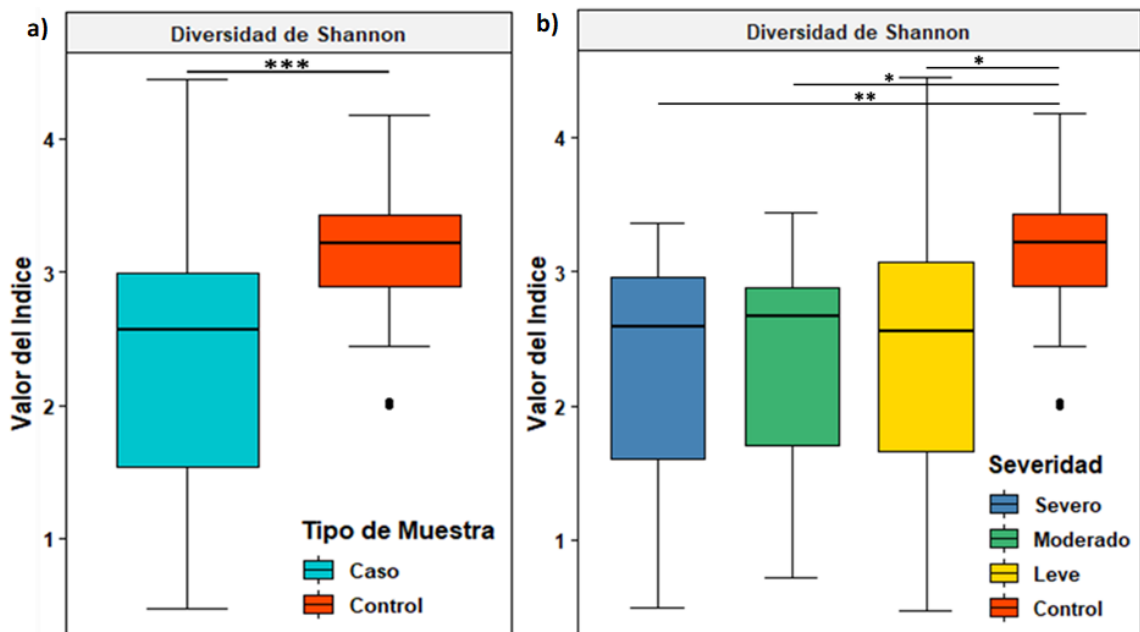


Figura 14. Comparación de la diversidad α del microbioma intestinal entre los casos de diarrea asociada a *Shigella* spp. y los controles sin diarrea. Se usaron gráficos de caja y el índice de la diversidad de Shannon para representar la diversidad α . **a)** Representa la comparación de la diversidad α entre los casos con diarrea y los controles sin diarrea, en cian y en naranja, respectivamente. **b)** Representa la comparación de la diversidad α entre los casos de diarrea, separados por la severidad del caso: el grupo de casos severos en azul, el grupo de casos moderados en verde y el grupo de casos leves en amarillo; los controles sin diarrea en naranja. Se usó la prueba de Wilcoxon $p < 0.05$, $** < 0.01$, $*** < 0.001$, $**** < 0.0001$.

Evaluamos la diversidad β que determina que tan diferentes son las comunidades microbianas, comparando a la comunidad microbiana en los casos con respecto a la comunidad microbiana en los controles, la cual mide el grado de heterogeneidad o disimilitud entre diferentes comunidades. Para definir nuestras comunidades establecimos que estas estarían formadas por los OTUs que estuvieran compartidos en al menos el 15% de las muestras del mismo grupo y dichas comunidades se evaluaron

mediante una escala multidimensional no métrica (NMDS), basada en el algoritmo de disimilitud de Bray-Curtis. El algoritmo de Bray-Curtis genera un valor que se ubica entre 0 y ± 1 y mientras este valor se encuentre más alejado del cero mayor es la disimilitud entre las comunidades.

En la **Figura 15 a)** podemos observar que la diversidad β de la comunidad de los casos es significativamente diferente a la de la comunidad de los controles (p ajustada por $\text{fdr} < 0.001$). A continuación, comparamos las comunidades microbianas de los tres grupos de severidad de los casos contra la comunidad microbiana de los controles **Figura 15 b)**, donde las comunidades de casos graves, moderados y leves fueron estadísticamente diferentes a la de la comunidad de los controles (p ajustada por $\text{fdr} < 0.01$).

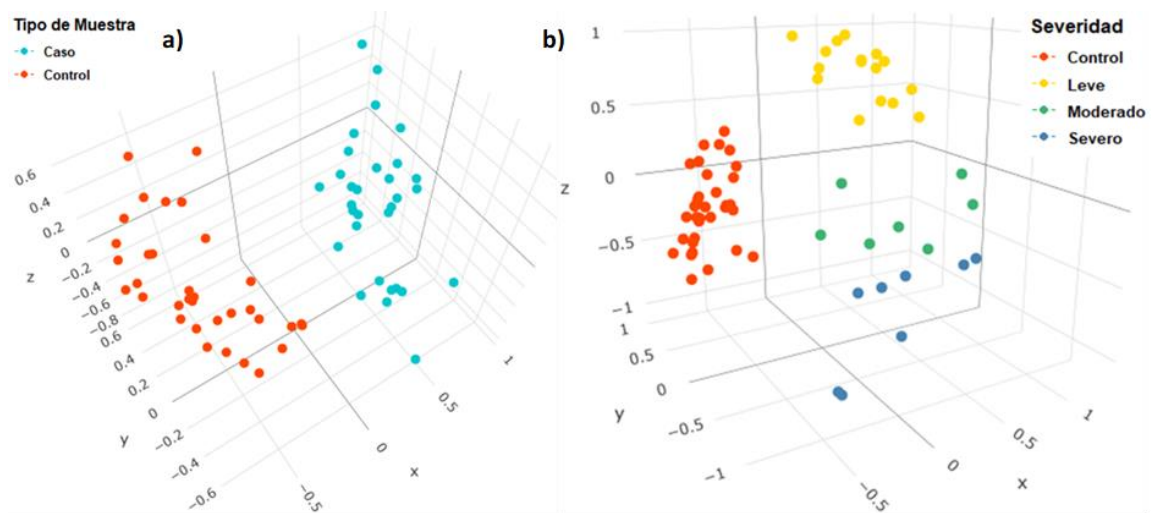


Figura 15. Comparación de la diversidad β del microbioma intestinal entre los casos de diarrea asociada a *Shigella* spp. y los controles sin diarrea. Se usaron gráficos NMDS para representar la diversidad β de las comunidades microbianas. **a)** Representa la comparación de la diversidad β entre la comunidad microbiana de los casos con diarrea (en cian) y la comunidad microbiana de los controles sin diarrea (en naranja). **b)** Representa la comparación de la diversidad β entre las comunidades microbianas de los casos con diarrea, separados por la severidad del caso: la comunidad de casos severos (en azul), la comunidad de casos moderados (en verde) y la comunidad de casos leves (en amarillo) vs la comunidad de los controles sin diarrea (en naranja).

Basados en las diferencias de la diversidad α y la diversidad β entre los casos y los controles, determinamos si estas diferencias se debían a la composición del microbioma intestinal a nivel de género. Se identificaron 224 géneros diferentes, de los cuales 60 géneros presentaron una abundancia relativa estadísticamente diferente entre los casos y los controles, aplicando la prueba de Wilcoxon ($p < 0.05$), donde en los casos de diarrea 33 de estos géneros están disminuidos y 27 géneros están incrementados, con respecto a los controles.

En la **Figura 16** se muestran los 19 géneros que tuvieron una abundancia relativa \geq al 1% y en la tabla de la **Figura 16** se resaltan los 8 géneros con una abundancia relativa significativamente diferente mostrando que 5 géneros (*Bacteroides*, *Bifidobacterium*,

Parabacteroides, *Collinsella* y *Flavonifractor*) disminuyeron, mientras que 3 géneros (*Neisseria*, *Haemophilus* y *Escherichia/Shigella*) incrementaron en los casos con respecto a los controles.

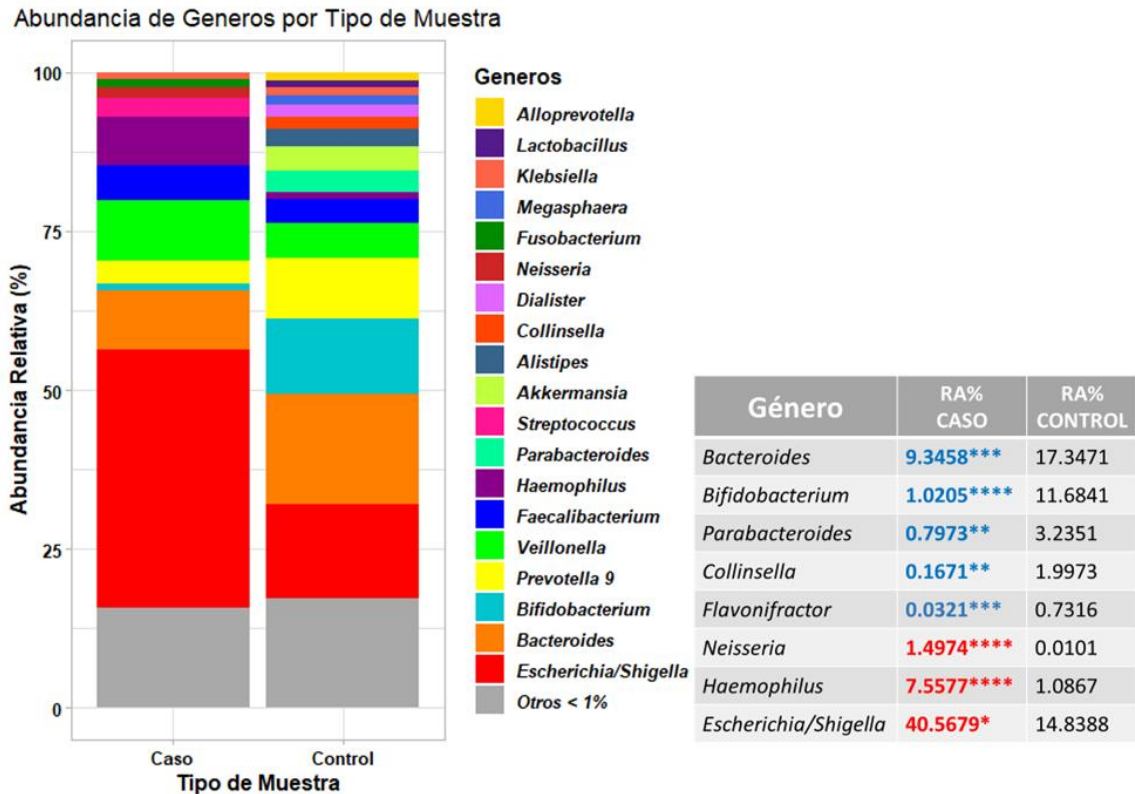


Figura 16. Composición del microbioma intestinal presente en los casos de diarrea asociada a *Shigella* spp. y en los controles sin diarrea. Representación de la composición de la microbiota de los 31 casos con diarrea asociada a *Shigella* y de los 35 controles sin diarrea. En esta representación se muestran los géneros más abundantes (Con una abundancia relativa >1%) de cada microbioma. En la tabla junto al gráfico se muestran los 8 géneros que presentaron una diferencia estadísticamente significativa entre ambas microbiotas: en azul se resaltan los géneros con una abundancia menor en los caso con respecto a los controles y en rojo se resaltan los géneros con una abundancia mayor en los casos con respecto a los controles. Se usó la prueba de Wilcoxon $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$, $p^{***} < 0.001$, $p^{****} < 0.0001$.

Realizamos un análisis LEfSe con el propósito de identificar posibles biomarcadores alterados en el microbioma de los casos con respecto al microbioma de los controles. Para realizar este análisis se estableció como punto de corte un puntaje de LDA de 3 y se realizó la prueba de Kluskall. En la **Figura 17** se muestran los resultados de este análisis, donde se identificaron 28 géneros con una presencia estadísticamente diferente ($p < 0.05$), 11 géneros identificados en los casos y 17 géneros identificados en los controles. Dentro de los posibles biomarcadores de los casos y los controles se identificaron los 8 géneros previamente mencionados, 3 géneros asociados a los casos: *Escherichia/Shigella* ($p < 0.05$), *Haemophilus* ($p < 0.0001$) y *Neisseria* ($p < 0.0001$); así como 5 géneros asociados a los controles: *Bifidobacterium* ($p < 0.0001$), *Bacteroides* ($p < 0.01$), *Parabacteroides* ($p < 0.01$), *Collinsella* ($p < 0.01$) y *Flavonifractor* ($p < 0.001$). De

esta forma demostramos que los 8 géneros fueron identificados estadísticamente diferentes entre ambos grupos, mediante dos análisis bioinformáticos distintos.

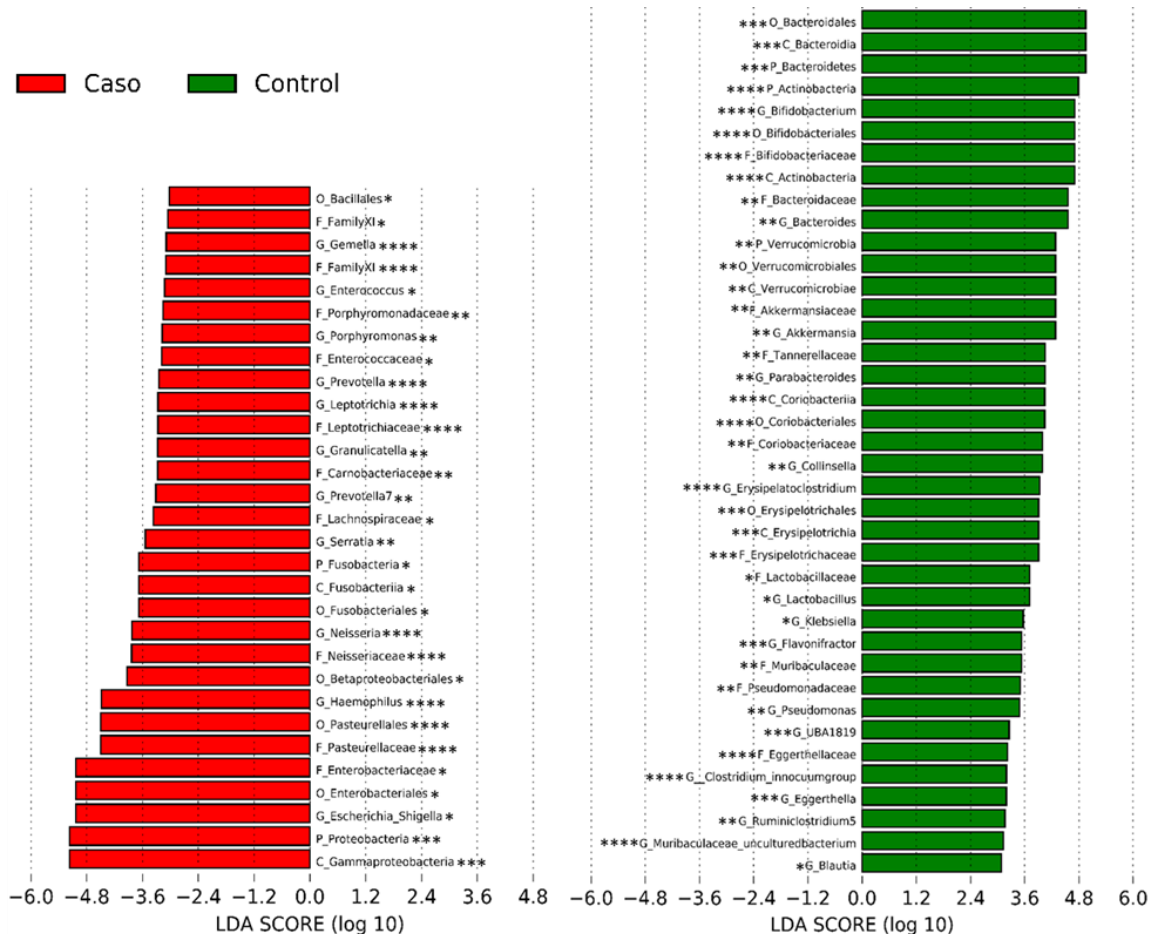


Figura 17. Identificación de posibles biomarcadores presentes en los casos de diarrea asociada a *Shigella* spp. y en los controles sin diarrea. Análisis LEfSe de los taxones bacterianos diferencialmente abundante entre los 31 casos con diarrea asociada a *Shigella* y los 35 controles sin diarrea. Los taxones que se muestran en la figura presentan un valor de LDA mayor a 3. Se usó la prueba de Kluskal $p < 0.05$, $** < 0.01$, $*** < 0.001$, $**** < 0.0001$. P=Phylum, C=Clase, O=Orden, F=Familia, G=Género.

V. CARACTERIZACIÓN Y COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MICROBIOMA INTESTINAL ENTRE LOS DIFERENTES CUADROS CLÍNICOS DE LOS NIÑOS CON SHIGELLOSIS.

Como se muestra en la **Figura 18**, evaluamos si había diferencias en el microbioma intestinal asociado a la severidad del cuadro clínico de diarrea, por lo que comparamos la diversidad α y la diversidad β entre los tres diferentes cuadros de severidad (Leve vs Severo, Leve vs Moderado y Moderado vs Severo), además de realizar las comparaciones entre las agrupaciones Leve/Moderado vs Severo y Leve vs Moderado/Severo. Sin embargo, no identificamos diferencia significativa entre ninguna de estas comparaciones **Tabla 8**.

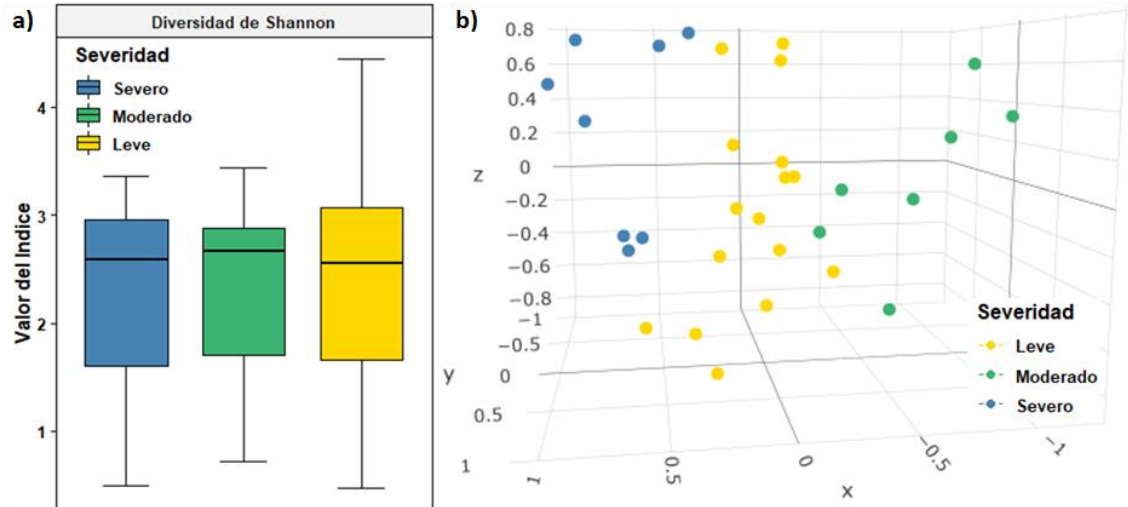


Figura 18. Comparación de la diversidad α y la diversidad β del microbioma intestinal entre los grupos de severidad de los casos de diarrea asociada a *Shigella spp.* **a)** Se usaron gráficos de caja y el índice de la diversidad de Shannon para representar la diversidad α . Representa la comparación de la diversidad α entre los casos con diarrea, separados por la severidad del caso: el grupo de casos severos en azul, el grupo de casos moderados en verde y el grupo de casos leves en amarillo. **b)** Representa la comparación de la diversidad β entre las comunidades microbianas de los casos con diarrea, separados por la severidad del caso: la comunidad de casos severos en azul, la comunidad de casos moderados en verde y la comunidad de casos leves en amarillo.

Comparación	Diversidad α (Prueba de Wilcoxon)	Diversidad β (p ajustada por fdr)
Leve vs Moderado	$p = 0.8195$	$p = 0.99$
Leve vs Severo	$p = 0.881$	$p = 0.487$
Moderado vs Severo	$p = 1$	$p = 0.132$
Leve/Moderado vs Severo	$p = 0.912$	$p = 0.404$
Leve vs Moderado/Severo	$p = 0.8001$	$p = 0.293$

Tabla 8. Resultados del análisis y comparación de la diversidad α y de la diversidad β con respecto a la severidad del cuadro clínico de diarrea.

Al comparar la abundancia de los géneros del microbioma intestinal entre la severidad de los cuadros clínico de diarrea, se observó que 4 géneros: *Azospirillum*, *Bilophila* y *Stenotrophomonas* ($p < 0.05$) y *Brevibacillus* ($p < 0.01$) estaban incrementados significativamente en los casos severos en comparación con los casos leves/moderados. Cabe mencionar que estos 4 géneros tienen una abundancia relativa $< 1\%$, por lo que se muestra su dispersión mediante gráficos de cajas en la **Figura 19 a)**, y en la tabla inferior izquierda de la **Figura 19** se presenta la abundancia relativa de cada género. Una vez que se identificaron estas diferencias estadísticamente significativas, se buscaron aquellos posibles biomarcadores asociados al cuadro clínico de diarrea entre los grupos de severidad leve/moderado vs severo **Figura 19 b)**. Para este análisis LEfSe se estableció

como punto de corte un puntaje de LDA de 2 y se realizó la prueba de Wilcoxon, identificando que 3 de los 4 géneros previamente mencionados estaban presentes (*Bilophila* y *Azospirillum* con $p < 0.05$ y *Brevibacillus* con $p < 0.01$), sugiriendo que tal vez se puedan utilizar como posibles biomarcadores de casos severos de diarrea.

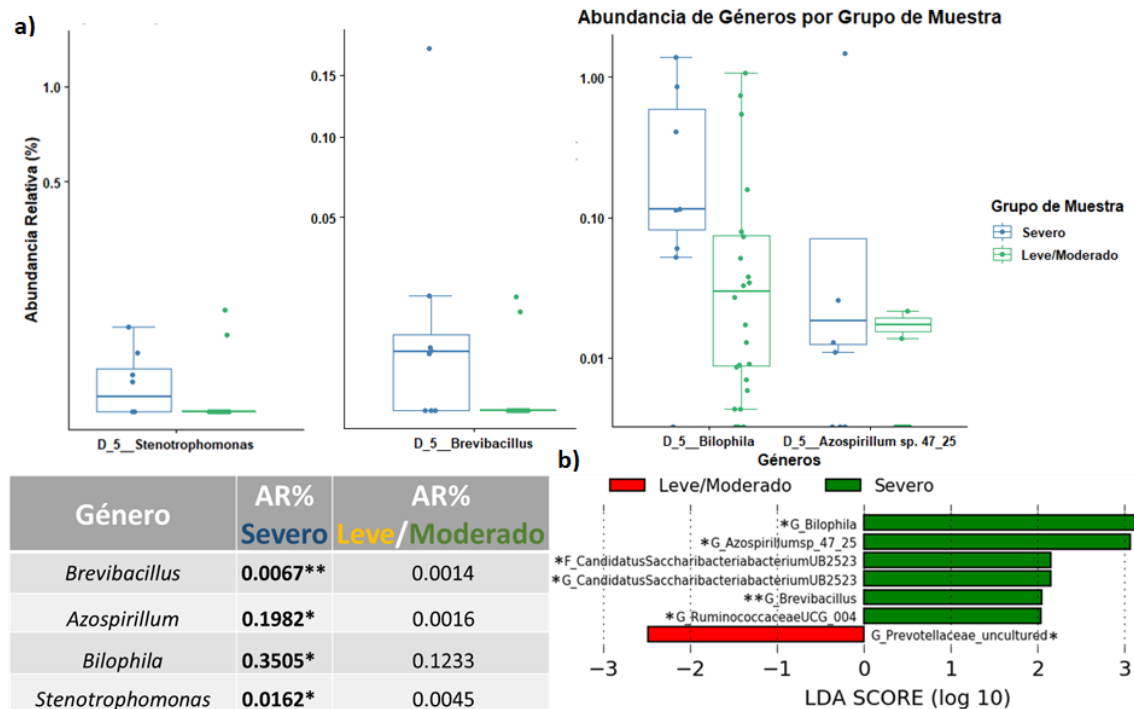


Figura 19. Identificación de posibles biomarcadores presentes en los casos severos de diarrea asociada a *Shigella* spp. a) Abundancia relativa de los 4 géneros que presentan un incremento estadísticamente significativo en los 8 casos severos de diarrea asociada a *Shigella* en comparación con los 23 casos leves/moderados. En la tabla se presentan los valores de la abundancia relativa de los 4 géneros b) Análisis LEfSe de los taxones bacterianos diferencialmente abundante entre el grupo de casos severos con diarrea asociada a *Shigella* y el grupo de casos leves/moderados. Los taxones que se muestran en la figura presentan un valor de LDA mayor a 2. Se usó la prueba de Wilcoxon $p < 0.05$, $** < 0.01$.

VI. PREDECCIÓN Y COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN FUNCIONAL DEL MICROBIOMA INTESTINAL.

Con base en el análisis de PICRUST es posible establecer teóricamente los componentes funcionales del microbioma, lo cual también puede orientar hacia que productos metabólicos deben de identificarse en las muestras de heces de estos pacientes y controles. Este análisis de PRICUST se basa en las abundancias relativas previamente identificadas a nivel de género y en la comparación contra las bases de datos KEGG. Usando una prueba de t de Student sin corrección, se encontró que la posible estructura funcional del microbioma en los casos asociados a *Shigella* spp. es significativamente diferente a la estructura funcional del microbioma de los controles ($p < 0.05$). Como se ilustra en la **Figura 20** se identificaron 40 vías posiblemente enriquecidas en el microbioma de los controles, mientras que se encontraron 43 vías posiblemente enriquecidas en el microbioma de los casos **Figura 21**.

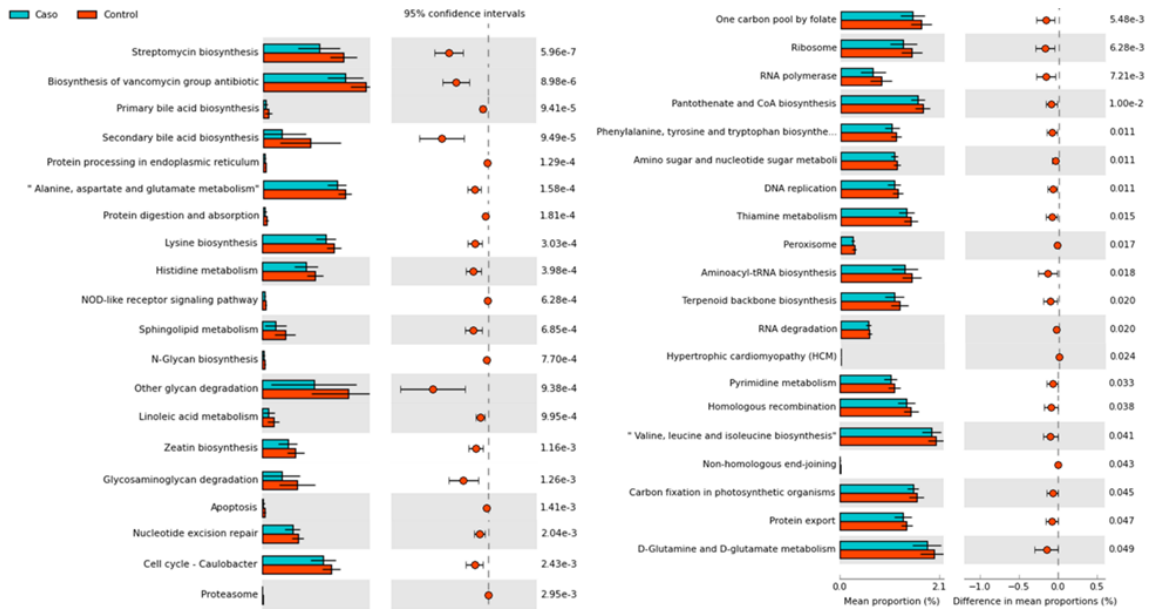


Figura 20. Vías metabólicas incrementadas en el microbioma de los controles sin diarrea. Mediante gráficos de barras se evidencian las 40 vías metabólicas con un incremento estadísticamente significativo en los controles (en color naranja) en comparación con los casos asociados a *Shigella* (en color cian). Los gráficos de círculos muestran la diferencia en las proporciones medidas entre los dos tipos de muestra. Se usó la prueba de t sin corrección. $p < 0.05$.

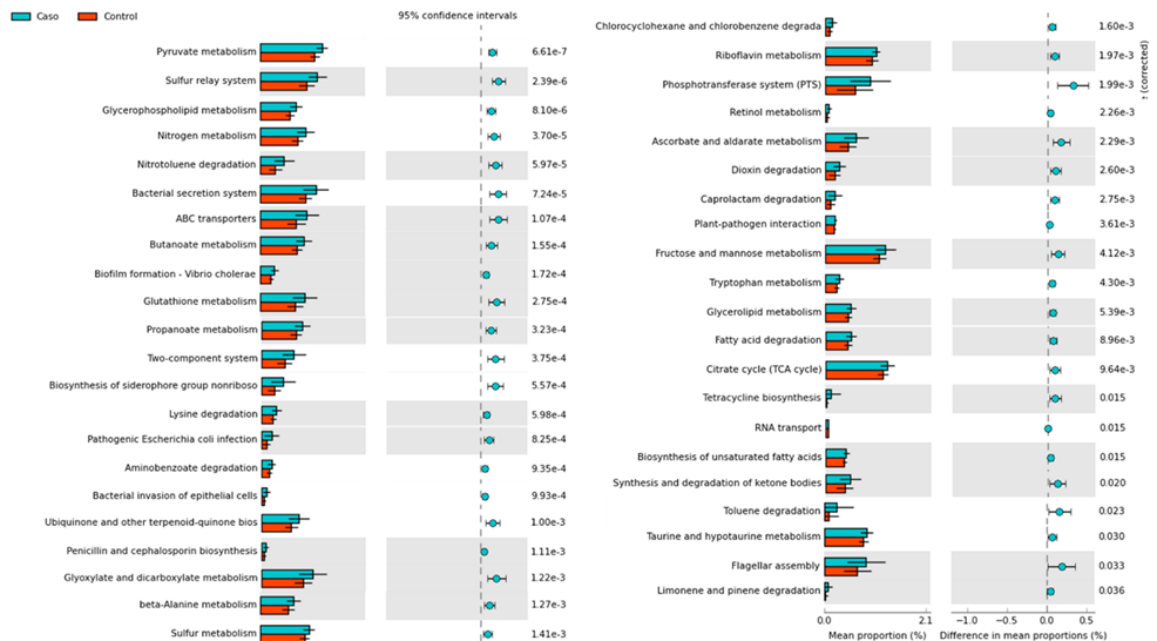


Figura 21. Vías metabólicas incrementadas en el microbioma de los casos de diarrea asociada a *Shigella* spp. Mediante gráficos de barras se evidencian las 43 vías metabólicas con un incremento estadísticamente significativo en los casos asociados a *Shigella* (en color cian) en comparación con los controles (en color naranja). Los gráficos de círculos muestran la diferencia en las proporciones medidas entre los dos tipos de muestra y los valores corregidos de p. Se usó la prueba de t sin corrección. $p < 0.05$.

Por otro lado, al predecir el microbioma funcional asociado a la severidad del cuadro clínico de los casos se identificaron 6 vías con un enriquecimiento significativamente diferente ($p < 0.05$). Se identificaron 5 posible vías enriquecidas en el microbioma asociado a casos severos de diarrea, mientras que se identificó 1 posible vía enriquecida en el microbioma asociado a casos leves/moderados **Figura 22**.

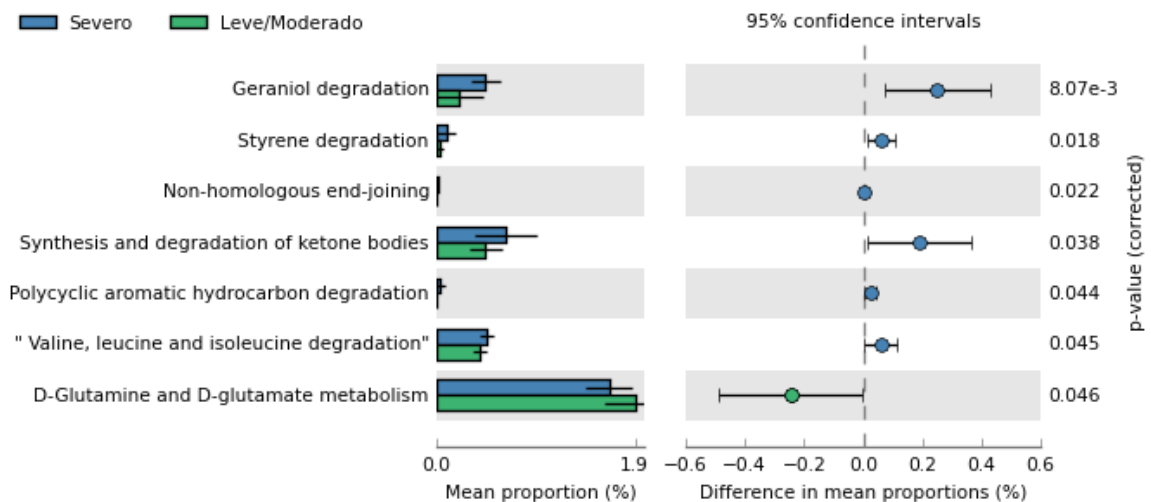


Figura 22. Vías metabólicas presentes en el microbioma de los grupos de severidad de los casos de diarrea asociada a *Shigella* spp. Se evidencian las 7 vías metabólicas con un incremento estadísticamente significativo en los casos severos de diarrea asociada a *Shigella* (en color azul) o los casos leves/moderados (en color verde). Los gráficos de círculos muestran la diferencia en las proporciones medidas entre los dos grupos de severidad y los valores corregidos de p. Se usó la prueba de t sin corrección. $p < 0.05$.

VII. SECUENCIACIÓN DE GENOMA COMPLETO DE LAS CEPAS DE *Shigella* spp. AISLADAS DE LOS CASOS DE SHIGELLOSIS.

a. Identificación del coregenoma y del pangenoma de las cepas de *Shigella* spp.

Una de las metas del presente trabajo fue establecer si hay una conexión directa entre la severidad del caso clínico y la cepa de *Shigella* spp aislada del paciente. Por lo que se mandaron a secuenciar 20 cepas de *Shigella* que contenían el plásmido de invasión y así poder integrar los genomas **Tabla 8**.

Una vez que ensamblados y anotamos los genomas de las 20 cepas, se caracterizaron tanto el coregenoma como el pangenoma. En la **Figura 23 a)** se muestra el pangenoma de las 20 cepas, el cual se define como el número total de genes presentes en las cepas, el cual está constituido por un total de 6,317 genes (en azul). Las 20 cepas, representadas por el árbol que se ubica en el lado izquierdo del gráfico, se comparan contra una matriz de presencia/ausencia de genes, donde cada fila de la matriz representa a una cepa. En la matriz se muestra al coregenoma como la región donde las 20 cepas tienen la presencia de todos los genes (en azul sólido) y conforme nos desplazamos hacia la derecha de la matriz es donde se muestra el genoma accesorio, que son los genes que no son compartidos por todas las cepas (en marcas blancas se muestra la ausencia del gen).

CEPAS SELECCIONADAS PARA SECUENCIAR							
Cepa	Especie de <i>Shigella</i>	Clave de la muestra	Severidad del caso	Género	Edad en meses	Estado nutricional	Complicaciones sistémicas
MXSh1	<i>S. flexneri</i>	CA009	Severo	M	11.1	Normal	Convulsiones
					88.8		Convulsiones, desequilibrio hidroelectrolítico, hyponatremia severa
MXSh2	<i>S. flexneri</i>	CA438	Severo	F		Normal	Convulsiones, desequilibrio hidroelectrolítico
MXSh3	<i>S. flexneri</i>	CA821	Severo	M	15.9	Normal	Convulsiones
MXSh4	<i>S. flexneri</i>	CA898	Severo	M	39.6	Normal	Convulsiones
MXSh5	<i>S. flexneri</i>	CA1012	Severo	M	12.6	Desn. crónica	Convulsiones
MXSh6	<i>S. flexneri</i>	CA120	Moderado	M	20.1	Normal	Ninguna
MXSh7	<i>S. flexneri</i>	CA426	Moderado	M	59.6	Desn. aguda	Ninguna
MXSh8	<i>S. flexneri</i>	CA561	Moderado	M	35.1	Normal	Ninguna
MXSh9	<i>S. flexneri</i>	CA059	Leve	M	8.8	Normal	Ninguna
MXSh10	<i>S. flexneri</i>	CA454	Leve	M	13.7	Normal	Ninguna
MXSh11	<i>S. flexneri</i>	CA1042	Leve	F	23.2	Desn. crónica	Ninguna
MXSh12	<i>S. boydii</i>	CA536	Severo	F	30.4	Desn. crónica	Convulsiones
MXSh13	<i>S. boydii</i>	CA606	Moderado	F	108	Normal	Ninguna
MXSh14	<i>S. boydii</i>	CA159	Leve	M	26.6	Desn. aguda	Ninguna
MXSh15	<i>S. boydii</i>	CA877	Leve	M	28.4	Desn. aguda	Ninguna
MXSh16	<i>S. sonnei</i>	CA449	Moderado	F	94.8	Normal	Ninguna
MXSh17	<i>S. sonnei</i>	CA330	Leve	M	23.9	Desn. crónica	Ninguna
MXSh18	<i>S. sonnei</i>	CA458	Leve	F	117.6	Normal	Ninguna
MXSh19	<i>S. sonnei</i>	CA587	Leve	F	12.8	Normal	Ninguna
MXSh20	<i>S. sonnei</i>	CA781	Leve	M	88.8	Normal	Ninguna

Tabla 9. Cepas seleccionadas para la secuenciación de su genoma. Características de las 20 cepas de *Shigella* spp. que se seleccionaron para secuenciar, así como las características clínicas del caso de diarrea a partir del que se aisló cada cepa.

En la **Figura 23 b) y c)** se muestra la distribución del pangenoma, con 2,853 genes formando el coregenoma, que representa a los genes presentes en el 100% de las cepas secuenciadas y los 3,464 genes restantes conforman el genoma accesorio, el cual se divide en: el “soft-coregenome” que representa a los genes presentes en el 95% de las cepas secuenciadas (19 cepas en este estudio) y está integrado por 286 genes, el “shellgenome” que representa a los genes presentes en más del 10% de las cepas secuenciadas (3-18 cepas en este estudio) y está integrado por 2,565 genes y el “cloudgenome” que representa a los genes presentes en el 10% o menos de las cepas secuenciadas (menos de 3 cepas en este estudio) y está integrado por 613 genes.

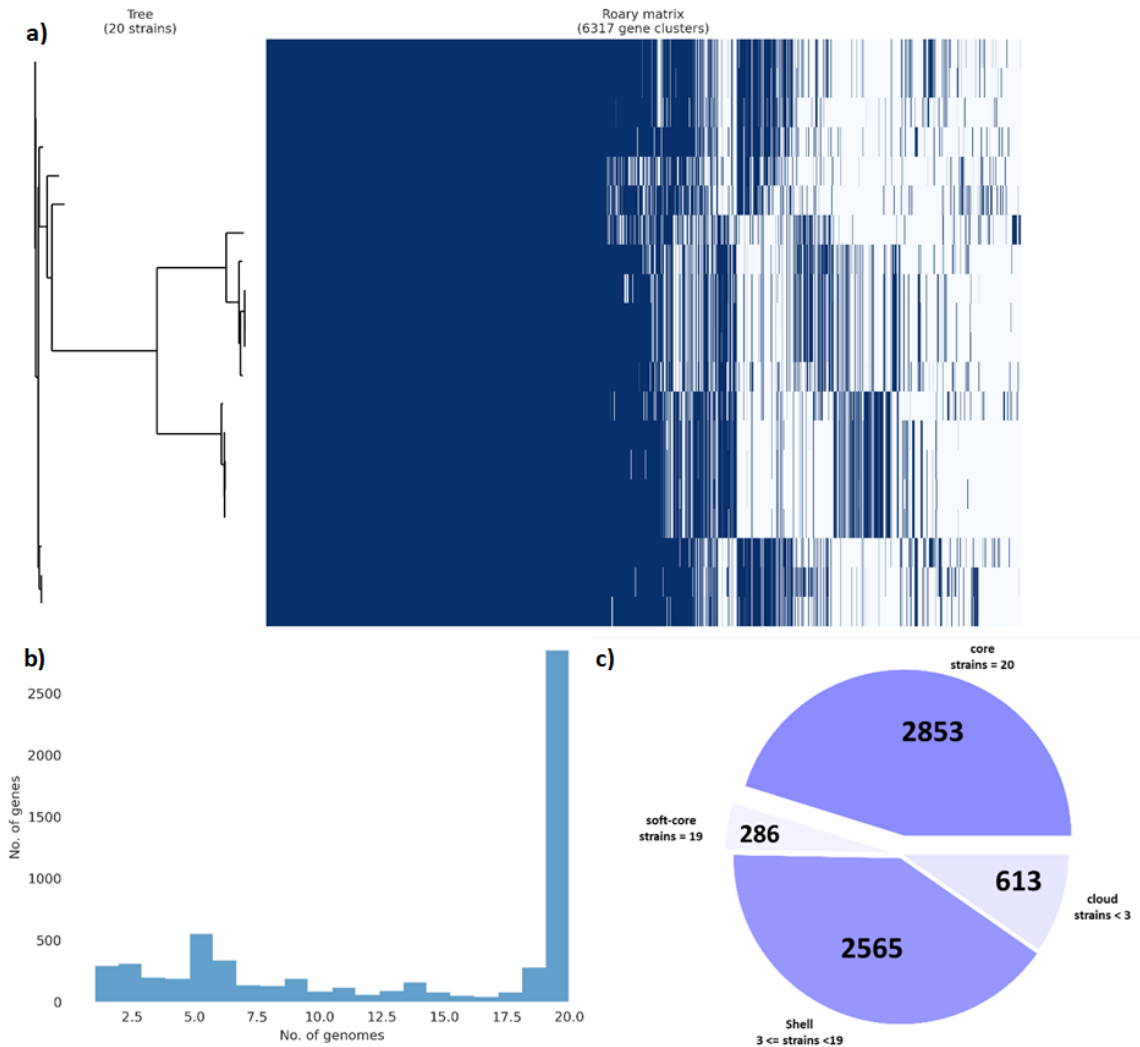


Figura 23. Identificación del coregenoma y del pangenoma de las cepas de *Shigella* spp. secuenciadas. a) Árbol generado a partir de los 20 genomas de *Shigella* spp. secuenciados y comparado con una matriz de presencia y ausencia de los genes que conforman el *coregenome* y los genes accesorios. **b)** Gráfico de barras con la frecuencia en la que se encuentran los genes con respecto a los 20 genomas secuenciados. **c)** Gráfico de pastel que representa la distribución de los genes dependiendo del número de aislados en los que estén presentes. Se definió como *core* a los genes presentes en las 20 cepas, como *soft core* a los genes presentes en 19 cepas, como *shell* a los genes presentes en 18-3 cepas y como *cloud* en menos de 3 cepas.

b. Análisis filogenético de las cepas de *Shigella* spp.

Una vez identificado el pangenoma de las 20 cepas, se procedió a realizar el análisis filogenético de las cepas, para esto se incluyeron 20 genomas de referencia de *Shigella* descargados del NCBI, 5 genomas por especie de *Shigella* (*S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei* y *S. dysenteriae*) **Tabla suplementaria 1.**

En la **Figura 24** se muestra el árbol filogenético construido a partir de los 40 genomas de *Shigella*, donde se observa que *Shigella sonnei* forma un clado (en color morado) que incluye a las cepas secuenciadas en este estudio (MXSh16-20), pero cabe mencionar que nuestras cepas constituyen un subclado diferente al de las cepas de referencia. De las 11 cepas de *S. flexneri* que se secuenciaron en este estudio (MXSh1-11), 9 cepas formaron un clado con las 5 cepas de referencia de *S. flexneri* (en color amarillo) y las 2 cepas restantes se identificaron en clados diferentes, uno constituido principalmente por las cepas de *S. boydii* (en color naranja), en el cual están incluidas las 4 cepas de nuestro estudio (MXSh12-15) y el otro clado constituido por las 5 cepas de referencia de *S. dysenteriae* (en color azul). 7 de las cepas de *S. flexneri* (MXSh1-4,7-9) forman un subclado dentro del clado de *S. flexneri* (en color amarillo), mientras que las otras 2 cepas (MXSh5,10) divergen de este subclado.

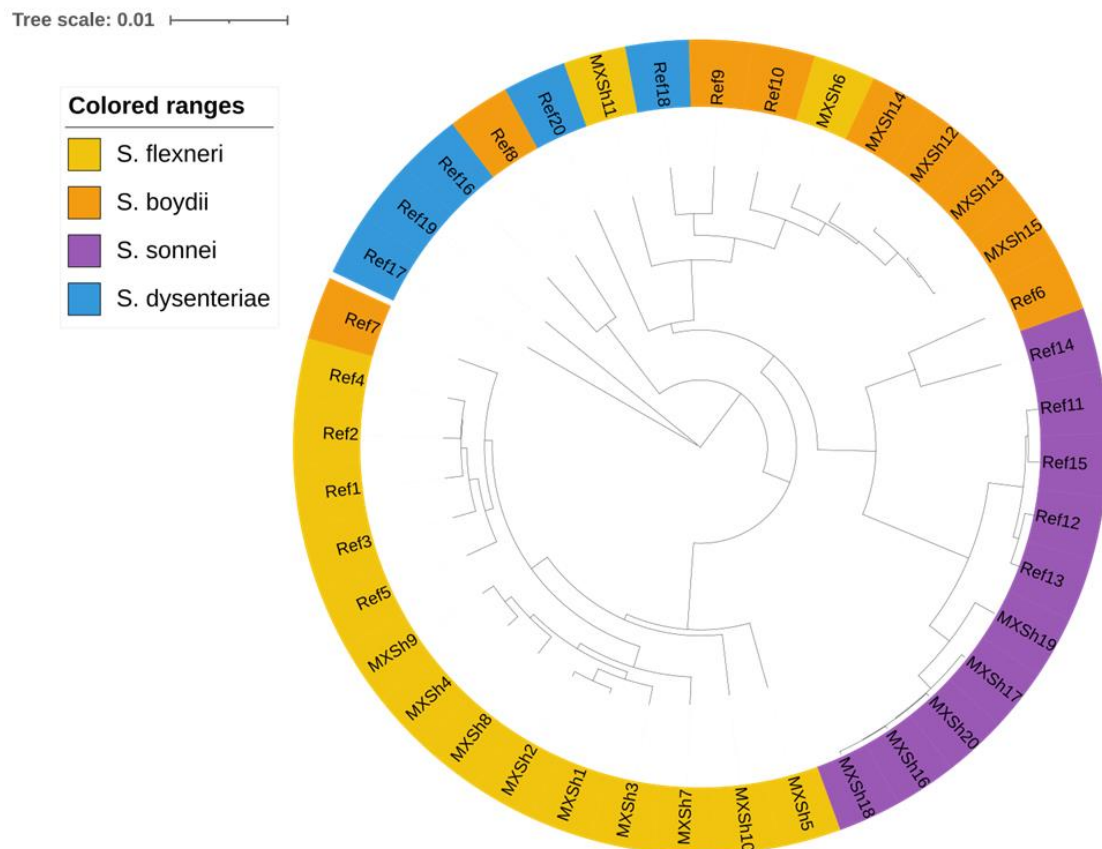


Figura 24. Árbol filogenético del pangenome de *Shigella* spp. El árbol se generó a partir de los 20 genomas de *Shigella* spp. secuenciados y los 20 genomas de referencia descargados (5 cepas de *Shigella flexneri*, 5 cepas de *Shigella boydii*, 5 cepas de *Shigella sonnei* y 5 cepas de *Shigella dysenteriae*), con base en la presencia o ausencia de los 11,027 grupos de genes del pangenome de las 40 cepas de *Shigella* spp. Las especies de *Shigella* están representadas con distintos colores: *S. flexneri* en amarillo, *S. boydii* en naranja, *S. sonnei* en morado y *S. dysenteriae* en azul. Los genomas secuenciados en este estudio se indican como “MXSh” y los genomas de referencia como “Ref”.

c. Identificación de genes asociados a la patogénesis de *Shigella* spp.

Se realizó la búsqueda dirigida de 29 genes previamente caracterizados e involucrados en la patogénesis de *Shigella* spp. La búsqueda se realizó por homología mediante un Blast con secuencias de la base de datos del NCBI **Tabla suplementaria 2**. En la **Figura 25** se muestra la matriz que se realizó a partir de la presencia/ausencia de los 29 genes en cada uno de los 20 genomas. Para determinar la presencia de un gen se determinaron como positivos aquellos alineamientos que presentaron una homología y una cobertura $\geq 80\%$. Si el alineamiento presentaba una homología $\geq 80\%$ la celda se marcó en gris, si el alineamiento presentaba una homología $\geq 95\%$ la celda se marcó en color negro.

En la matriz se describe que todos los genes que constituyen a las familias *ipa* e *ipg*, así como los genes *icsA*, *icsB*, *virA*, *ospB* y *ospF* están presentes en las 11 cepas *S. flexneri*, en las 4 de *S. boydii* y en las 5 de *S. sonnei* con una homología $\geq 95\%$.

Comenzando con las cepas de *S. flexneri*, basándonos en los 29 genes buscados, esta fue la especie que presentó un perfil genético más heterogéneo entre las 11 cepas que se secuenciaron. Por ejemplo, en 7 de las 11 cepas se encontró la forma de *ospZ* que posee un codón de paro prematuro, generando una proteína más corta, en 3 cepas se encontró el gen de *ospZ* que codifica para la proteína completa y en una cepa no se encontró. El gen *ospD3* que codifica para la enterotoxina 2 de *Shigella* (ShET2) sólo se encontró ausente en 2 cepas de *S. flexneri* (MXSh4 y MXSh9). Dentro de las cepas de *S. flexneri* resulta importante resaltar a la cepa MXSh11, pues es la única de las 20 cepas que no posee los genes *ospE1/E2* (Genes que codifican a proteínas con funciones de adhesinas), ni el gen *ospI* (Asociado con la reducción de la activación de la vía NF- κ B), además de ser la única cepa de *S. flexneri* que posee los genes *ospC3* y *ospG* con una homología menor al 95%. En contraste con la mayoría de las cepas de *S. flexneri*, MXSh11 codifica para la forma completa de OspZ. De forma similar, la cepa MXSh6 también presenta un perfil genético distinto del resto de las cepas de *S. flexneri*, siendo más similar al de las cepas de *S. boydii*, pues al igual que las cepas MXSh12, MXSh13, MXSh14 y MXSh15, no codifica para la proteína OspG, codifica para la forma completa de OspZ y codifica para la SPATE SigA. Por otro lado, logramos observar que el porcentaje de homología de los genes en esta cepa es similar al de las cepas de *S. boydii* e incluso presentando un patrón de cambio de nucleótidos similar al de las cepas de *S. boydii*.

Por otro lado, las cepas de *S. boydii* presentan un perfil genético muy similar, donde logramos observar que las 4 cepas tienen la presencia de los mismos 22 genes y la ausencia de los mismos 7 genes. En el caso de las cepas de *S. sonnei*, presentan un patrón genético más heterogéneo que las cepas de *S. boydii*, pero menos heterogéneo que las cepas de *S. flexneri*, teniendo la presencia de los mismos 21 genes y la ausencia de los mismos 6 genes, presentando diferencias sólo en los genes *ospC1* y *ospC3*. El gen *ospC1* se encontró ausente en las cepas MXSh17 y MXSh18, pero presente en las otras 3 cepas, mientras que el gen *ospC3* está presente únicamente en las cepas MXSh16 y MXSh18 con una homología $\geq 80\%$.

En lo que respecta a las SPATEs (Serin Protease Auto-Transporters of Enterobacteriaceae) sólo las cepas de *S. flexneri*, exceptuando a MXSh6 y MXSh11, codifican para SepA; en el caso de Pic, esta proteasa sólo se encontró en la cepa MXSh7 y como sugiere el dogma, también fue la única cepa donde se encontraron codificadas las dos subunidades de la enterotoxina ShET1 (Genes *setA* y *setB*), dado que estas dos subunidades se localizan en la secuencia complementaria de *pic*; la serin-proteasa SigA se encontró codificada en todas las cepas de *S. boydii* y *S. sonnei*, así como en las cepas MXSh6, MXSh7 y MXSh11 de *S. flexneri*; Sat se encontró sólo en 3 cepas de *S. flexneri*, en MXSh5 y MXSh10 con una homología $\geq 95\%$ y en MXSh7 con una homología $\geq 80\%$; por último, en ninguna de las 20 cepas se identificó la presencia del gen que codifica para la proteasa Pet.

Considerando los resultados de los alineamientos de los 29 genes tiene sentido que la cepa MXSh11, en la **Figura 25**, se ubique separa del resto de las cepas de *S. flexneri*, pero además separada de las cepas de *S. sonnei* y *S. boydii*, pues de las 20 cepas secuenciadas en este estudio fue la que presentó un perfil genético más diferente. Por otro lado, a partir de estos mismos resultados, también se vuelve más claro que la cepa MXSh6 se ubique junto a las cepas de *S. boydii*. De manera similar, las cepas MXSh5 y MXSh10, las únicas 2 cepas en las que se encontró el gen *sat* con una homología $\geq 95\%$, se encuentran en un extremo del clado donde se ubicaron la cepas de *S. flexneri*, mientras que las cepas MXSh4 y MXSh9, las únicas 2 cepas en las que se observó la ausencia del gen *ospD3*, se ubicaron en el extremo opuesto del clado en el que se ubicaron a las cepas de *S. flexneri* secuenciadas por nosotros.



Figura 25. Matriz de presencia/ausencia de genes involucrados en el proceso de infección de *Shigella* spp. En la matriz se presentan 29 genes buscados en los 20 genomas secuenciados en este estudio. Estos 29 genes se encuentran involucrados en al menos uno de los pasos del proceso de infección del epitelio intestinal por parte de *Shigella* spp. La presencia o ausencia del gen se indica según el color indicado en la parte inferior de la matriz. El gen *ospZ* presenta una forma "prematura" en algunas cenas de *Shigella flexneri* debido a la presencia de un codón de paro prematuro y este forma se representa con el color morado en la celda del gen. Las especies de *Shigella* están representadas con distintos colores: *S. flexneri* en amarillo, *S. boydii* en naranja y *S. sonnei* en morado.

VIII. REALIZAR ENSAYOS FENOTÍPICOS ASOCIADOS AL PROCESO DE INFECCIÓN DE *Shigella* spp. CON ALGUNAS DE LAS CEPAS SECUENCIADAS.

a. Sincronización de las curvas de crecimiento.

Para iniciar estos experimentos fue necesario estandarizar las curvas de crecimiento de cada cepa, ya que son aislados clínicos que no se comportan como las cepas de referencia. La estandarización de las curvas de crecimiento permite determinar los tiempos para obtener un cultivo sincrónico de bacterias a partir del cual se realizan las inoculaciones de los ensayos fenotípicos, usando las concentraciones bacterianas adecuadas. Determinamos que los aislados de *S. flexneri* y *S. boydii*, de nuestros pacientes llegaban a la mitad de la fase exponencial a los 150 minutos. Cabe mencionar que en *S. sonnei* el plásmido de invasión se pierde muy fácilmente y corroboramos que esta especie muestra diferencia morfológica entre las cepas de *S. sonnei* que tienen el plásmido y las que no lo tienen. Por lo que las cepas de *S. sonnei* cuando tienen el plásmido nos dan curvas de crecimiento más largas que las que no lo tienen.

b. Ensayos de invasión.

Ya que la invasión de las células epiteliales es un paso importante durante la infección por *Shigella* spp, por lo que se evaluó la eficiencia de invasión de diferentes cepas de *Shigella*. Los ensayos de invasión se realizaron en células T84 polarizadas, realizando los ensayos de invasión basolateral y apical.

De las 13 cepas de *S. flexneri* secuenciadas se probaron 7 cepas en el ensayo de invasión. Como podemos observar en la **Figura 26** la cepa MXSh3 es la cepa que presenta significativamente el mayor porcentaje de invasión, en ambos ensayos de invasión ($p < 0.01$), mientras que la cepa MXSh11 no mostró la capacidad de invadir las células epiteliales, tanto en la invasión basolateral como en la invasión apical. Por otro lado, al comparar la cepa MXSh1 vs MXSh2 y la cepa MXSh9 vs MXSh7, las cepas MXSh1 y MXSh9 presentan un mayor porcentaje de invasión que las cepas MXSh2 y MXSh7 en los ensayos de invasión basolateral, respectivamente ($p < 0.05$, $p < 0.01$). Sin embargo, al realizar los ensayos de invasión apical y comparar los resultados de las mismas cepas, podemos observar que ahora las cepas MXSh2 y MXSh7 presentan un porcentaje de invasión significativamente mayor que el de las cepas MXSh1 y MXSh9, respectivamente ($p < 0.05$). Estos resultados sugieren que, mientras que las cepas MXSh1 y MXSh9 son más eficientes en la invasión de las células epiteliales, las cepas MXSh2 y MXSh7 parecen ser más eficientes cruzando la barrera epitelial, el cual es un paso importante durante la infección por *Shigella*.

Posteriormente, se evaluó la capacidad de invasión de las 4 cepas de *S. boydii* secuenciadas en este estudio. Lo primero que llama la atención en los resultados representados en la **Figura 27** es el porcentaje de invasión de la cepa MXSh15, tanto en los ensayos de invasión basolateral como en los ensayos de invasión apical, siendo su porcentaje de invasión significativamente el mayor de todas las cepas de *S. boydii* probadas ($p < 0.001$). Por el contrario, podemos observar que la cepa MXSh13 no fue capaz de invadir a las células epiteliales en ninguno de los ensayos de invasión. Mientras

tanto, las cepas MXSh12 y MXSh14, al igual que la cepa de referencia de *S. boydii* 602068, presentaron significativamente un menor porcentaje de invasión con respecto a la cepa de referencia de *S. flexneri* 2457T en los ensayos de invasión basolateral. Sin embargo, al comparar los resultados de los ensayos de invasión apical podemos observar que hay una recuperación en el porcentaje de invasión de las cepas MXSh12, MXSh14 y 602068 de *S. boydii*, no presentando diferencia significativa al comparar la capacidad de invasión de estas tres cepas con la capacidad de invasión de la cepa de referencia de *S. flexneri*.

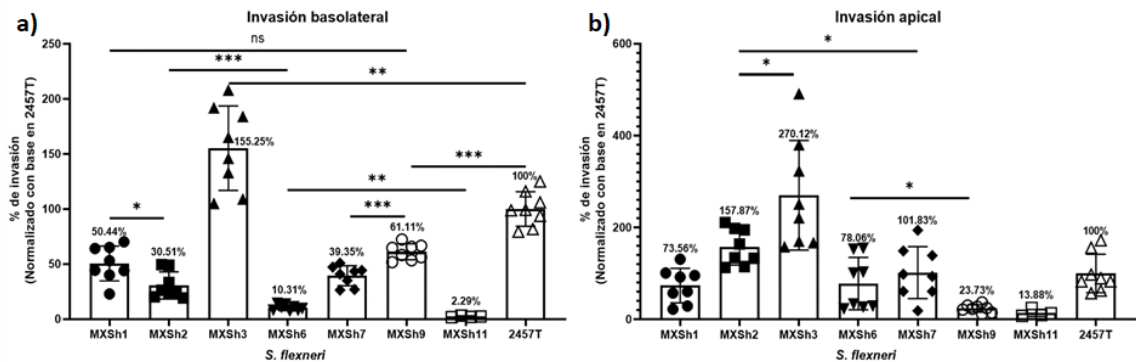


Figura 26. Ensayos de invasión con cepas de *Shigella flexneri*. a) Ensayo de invasión basolateral. b) Ensayo de invasión apical. Ensayo con 7 de las cepas que se secuenciaron en este estudio y la cepa de referencia de *S. flexneri* 2457T. En el eje X se especifican las cepas evaluadas y en el eje Y el porcentaje de invasión con respecto a la cepa de referencia 2457T. Se usó la prueba U de Mann-Whitney. p *<0.05, **<0.01, ***<0.001, ****<0.0001.

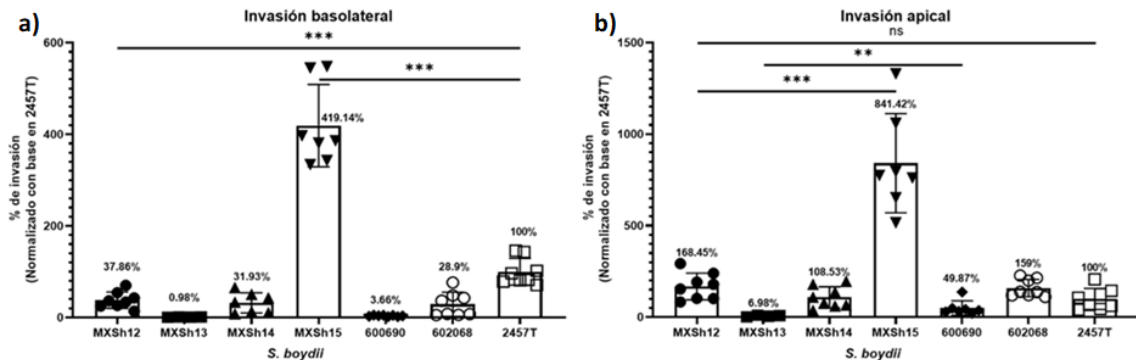


Figura 27. Ensayos de invasión con cepas de *Shigella boydii*. a) Ensayo de invasión basolateral. b) Ensayo de invasión apical. Ensayo con 4 de las cepas que se secuenciaron en este estudio, 2 cepas de referencia de *S. boydii* y la cepa de referencia de *S. flexneri* 2457T. En el eje X se especifican las cepas evaluadas y en el eje Y el porcentaje de invasión con respecto a la cepa de referencia 2457T. Se usó la prueba U de Mann-Whitney. p *<0.05, **<0.01, ***<0.001, ****<0.0001.

Finalmente, se evaluó la capacidad de invasión de las 5 cepas de *S. sonnei* secuenciadas en este estudio. Como podemos observar en la **Figura 28**, de las 5 cepas evaluadas la cepa MXSh19 es la única que no presenta la capacidad de invadir a las células epiteliales, mientras que el resto de las cepas de *S. sonnei*, incluyendo a la cepa de referencia de *S. sonnei* 53G-7F1, presentan en ambos ensayos de invasión un

porcentaje de invasión significativamente menor que el observado en la cepa la cepa de referencia de *S. flexneri* 2457T ($p < 0.01$). La cepa MXSh16 presenta un porcentaje de invasión basolateral significativamente menor que el de las cepas MXSh17, MXSh18 y MXSh20, sin embargo, no presentó diferencia significativa en su capacidad de invasión con respecto a nuestras otras tres cepas al realizar los ensayos de invasión apical, sugiriendo ser una cepa eficiente en su capacidad de cruzar la monocapa celular.

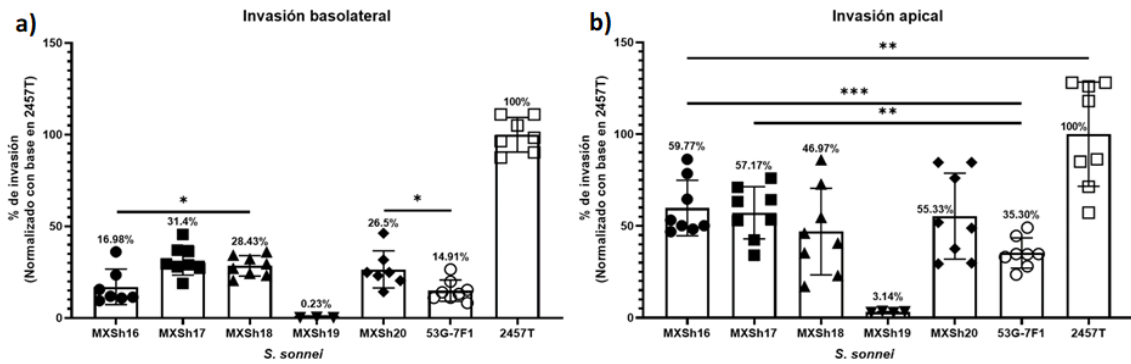


Figura 28. Ensayos de invasión con cepas de *Shigella sonnei*. a) Ensayo de invasión basolateral. b) Ensayo de invasión apical. Ensayo con 5 de las cepas que se secuenciaron en este estudio, la cepa de referencia de *S. sonnei* y la cepa de referencia de *S. flexneri* 2457T. En el eje X se especifican las cepas evaluadas y en el eje Y el porcentaje de invasión con respecto a la cepa de referencia 2457T. Se usó la prueba U de Mann-Whitney. $p < 0.05$, $** < 0.01$, $*** < 0.001$, $**** < 0.0001$.

c. Ensayos de formación de placas.

Este ensayo consiste en la infección de una monocapa de células T84, con una cepa de *Shigella* y transcurrida la infección, se incuban las células en un medio de cultivo celular que contiene gentamicina (un antibiótico que no ingresa a la célula), por lo que elimina de la superficie de las células a las bacterias que no penetraron. Puesto que se ha documentado que la toxina ShET2 solo se libera cuando la bacteria está dentro de la célula y causa la lisis de las células, este ensayo indica que la cepa de *Shigella* invadió a las células, además de que también estas bacterias realizaron la migración a células adyacentes.

El primer acercamiento fue usar concentraciones elevadas de bacterias y evaluar el daño o destrucción de la monocapa celular infectada. A partir de este primer acercamiento se identificaron tres fenotipos diferentes como los que se muestran en la **Figura 29**: donde observamos que la cepa MXSh2 destruye por completo la monocapa celular, mientras que las cepas MXSh12 y la MXSh20 no destruyen la monocapa completamente, pero causan daño severo a la monocapa. Por otro lado, cepas como la MXSh4 y la MXSh13 no causaron ningún daño a la monocapa celular, a pesar de utilizar altas concentración de bacterias durante la infección. Este resultado parece correlacionar con los resultados del ensayo de invasión, pues las cepas que no invadieron a las células T84 tampoco generaron daño a la monocapa. Finalmente, la cepa MXSh15 sólo causó un daño mínimo a las células (Como se observa en la parte inferior del pozo), lo que resulta interesante, pues esta cepa mostró una elevada

capacidad de invasión, pero no fue capaz de generar placas en la monocapa celular. Este resultado podría sugerir que esta cepa posee un defecto en la migración a células adyacentes y es por ello que se observa daño en la monocapa, pero no formación de placas.

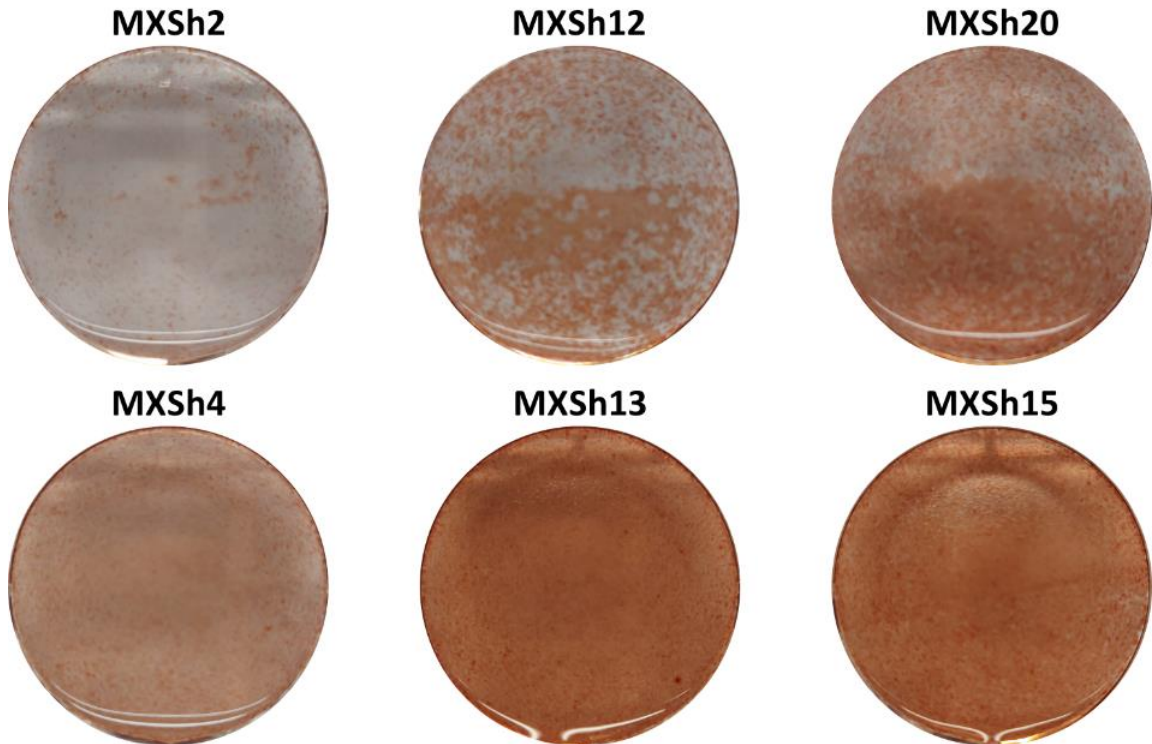


Figura 29. Capacidad de algunas cepas de *Shigella* spp. de dañar la monocapa celular. En la imagen se muestra el resultado del ensayo realizado con 6 cepas secuenciadas en este estudio. Las 3 cepas que se usaron en los 3 pozos superiores del plato fueron capaces de destruir la monocapa de células T84, las cepas MXSh4 y MXSh13 no generaron daño y la cepa MXSh15 generó daño mínimo sin causar la destrucción de la monocapa.

Evaluamos aquellas cepas que si dañaban la monocapa y se estandarizaron concentraciones de estas bacterias que resultaran en la formación de placas líticas aisladas. En la **Figura 30 a)** podemos observar el resultado de uno de estos ensayos, donde logramos obtener placas aisladas, además también se observó que distintas cepas de *Shigella* spp. producen placas líticas de diferentes tamaños, por ejemplo, en la imagen podemos observar que la cepa MXSh1 generó placas con una mayor área que la cepa MXSh7. El tercer pozo en la imagen representa el control negativo del ensayo el cual contiene a las células T84 inoculadas con la cepa de *S. flexneri* BS103 que no tiene el plásmido de invasividad. Posteriormente, como se observa en la **Figura 30 b)**, se midió el área de las placas aisladas usando, el software ZEN Microscopy, delimitando cuidadosamente el borde de la placa **Figura 30 c)**. Se realizaron dos experimentos independientes con duplicados por cepa y se graficaron los valores.

Los resultados obtenidos de las 10 cepas evaluadas (*S. flexneri*: MXSh1, MXSh2, MXSh3, MXSh6, MXSh7; *S. boydii*: MXSh12, MXSh14; *S. sonnei*: MXSh16, MXSh17,

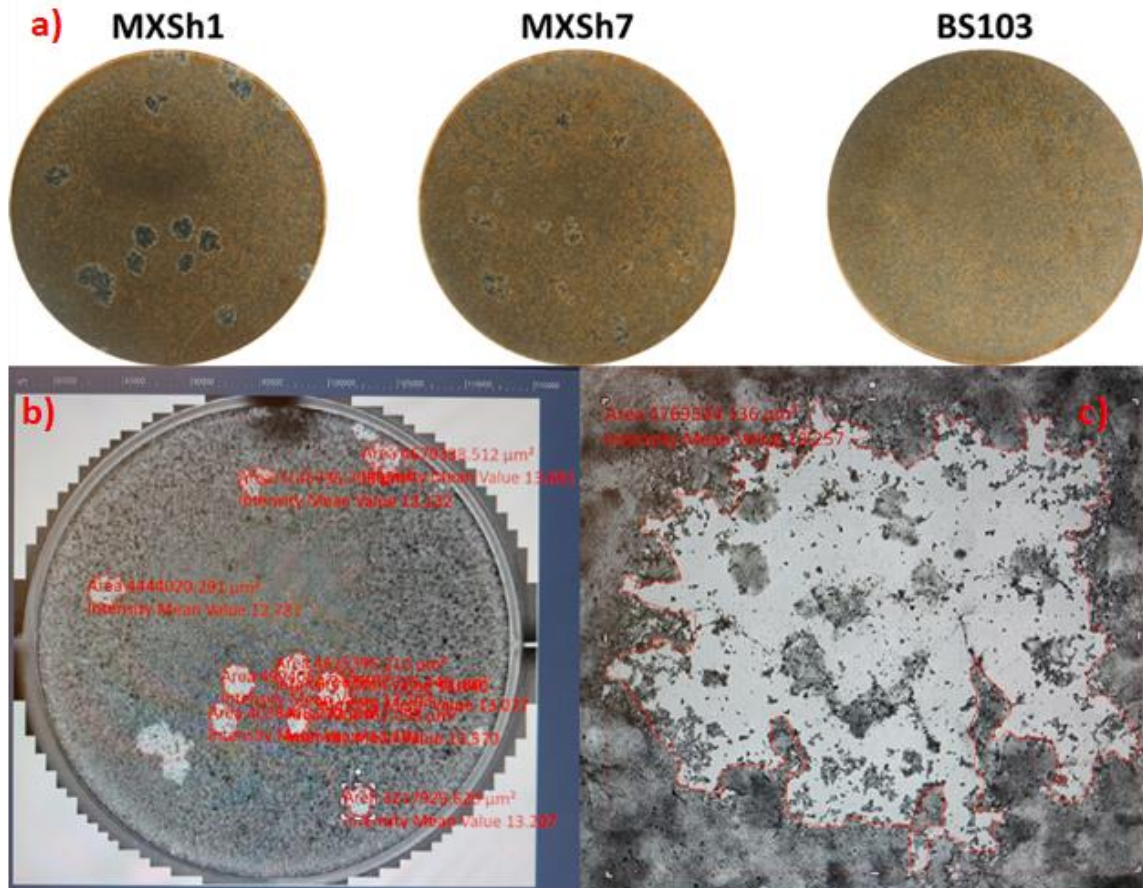


Figura 30. Evaluación de la formación de placas por cepas de *Shigella* spp. a) Resultado de un ensayo de formación de placas en una monocapa de células T84. Hay una diferencia entre el tamaño de las placas generadas por las cepas MXSh1 y MXSh7. Como control negativo se usó la cepa sin plásmido de invasión BS103. b) Los pozos donde se realizó el ensayo de formación de placas se fotografió al microscopio y se midió el área de las placas aisladas. c) El área de la placa se midió delimitando cuidadosamente el borde de la placa.

MXSh20), se muestran en la **Figura 31** con un gráfico de violín, donde en el eje X están los nombres de las cepas y la especie, mientras que en el eje Y tenemos el área de las placas en μm^2 ; para realizar la estadística de los resultados se usó la prueba U de Mann-Whitney.

En la imagen podemos observar que las cepas *S. flexneri* MXSh1 y MXSh3 son las que generaron las placas de mayor área, seguidas de la cepa MXSh2 y están tres cepas fueron aisladas de casos severos de diarrea. Hacia el lado derecho del gráfico, se muestran los resultados de las cepas de las cepas de *S. flexneri* MXSh6 y MXSh7, aisladas de casos moderados de diarrea en donde se observa claramente que el tamaño del área de las placas es significativamente menor que el de las cepas de *S. flexneri* aisladas de casos severos.

Se evaluaron en este ensayo las cepas de *S. boydii* MXSh12 aislada de un caso severo de diarrea y MXSh14 aislada de un caso leve. Como se muestra en el gráfico,

nuevamente, la cepa aislada del severo MXSh12 produjo placas de un tamaño significativamente mayor que las placas producidas por la cepa MXSh14. La cepa de *S. sonnei*, MXSh16 aislada de un caso moderado de diarrea formó placas significativamente menores que las placas de las cepas MXSh17 y MXSh20 aisladas de casos leves.

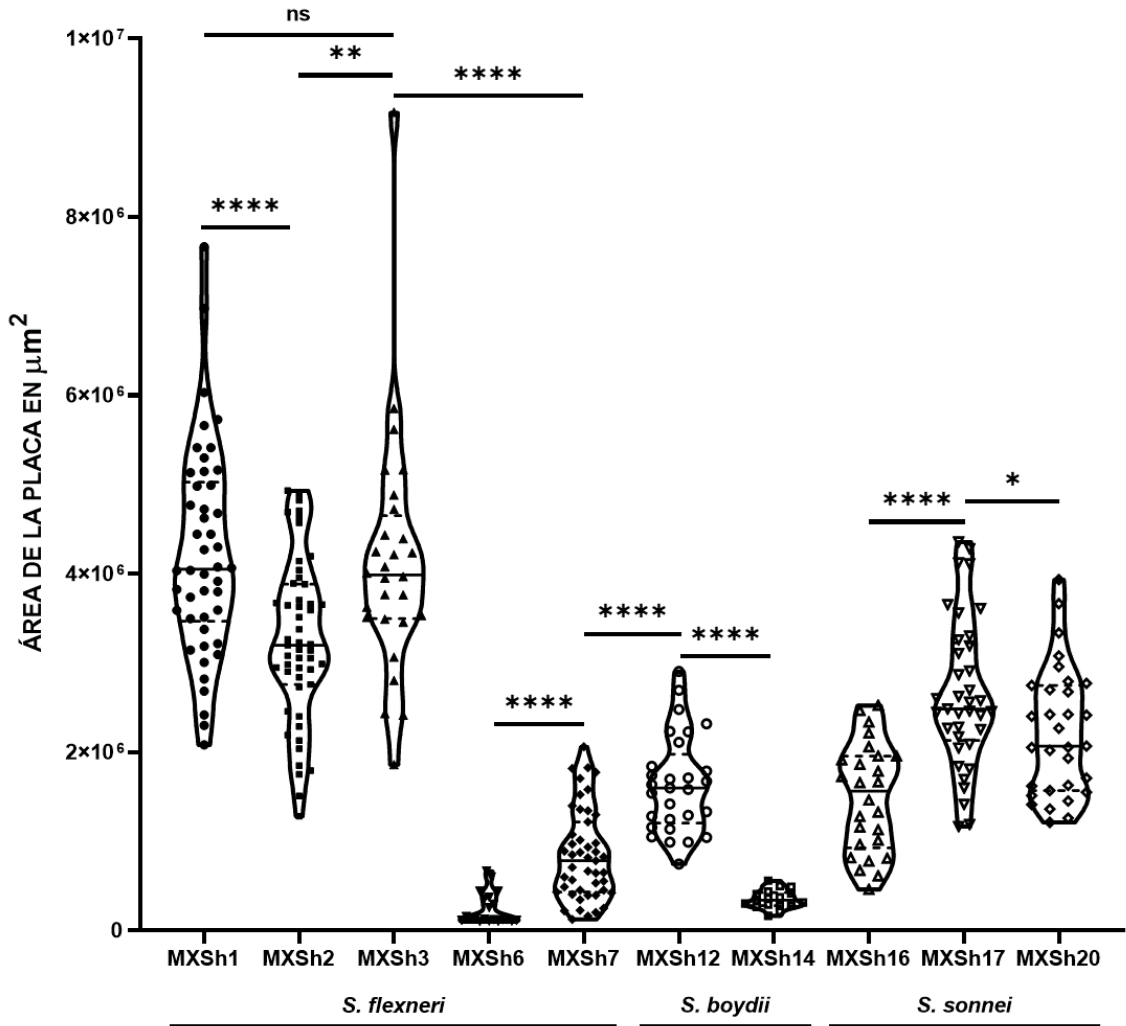


Figura 31. Cuantificación del área de las placas formadas por distintas cepas de *Shigella* spp. Se presenta el área de las placas en un gráfico de violín, los cuales indican la mediana y los percentiles 25 y 75. En el eje X se mencionan las 10 cepas de *Shigella* spp. evaluadas, separadas en 3 especies: *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. sonnei*. En el eje Y se encuentra el valor del área de la placa en µm². Se usó la prueba U de Mann-Whitney. p* < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001, **** < 0.0001.

DISCUSIÓN

Han sido varios los estudios que han reportado que el mayor número de casos de diarrea se presentan en países subdesarrollados y en vías de desarrollo, principalmente asociados a problemas de sanitización del agua y de los alimentos (Black et al., 2010; Kosek et al., 2003; K. L. Kotloff et al., 2012). Dentro de los grupos históricamente más afectados suele resaltarse al de los niños <5 años (Hartman et al., 2023; K. L. Kotloff et al., 2013; Platts-Mills et al., 2015), lo que explica porque, a pesar de que este estudio no estuvo enfocado sólo en niños <5 años, la edad media de los niños de nuestro estudio fue de 2.4 años.

En los resultados epidemiológicos identificamos que los PEDs fueron los patógenos más prevalentes, como se observa en la **Figura 11**, algo que ya se había observado en el análisis previo de este estudio (Meza Segura, 2017; Patzi-Vargas et al., 2015). Sin embargo, estos estudios sólo se enfocaron en niños <5 años, por lo que era importante realizar el análisis de la población completa reclutada para establecer la prevalencia real de *Shigella* spp. Durante la tesis doctoral de Meza-Segura se evaluó un total de 893 casos de diarrea, donde identificaron a los PEDs, a Rotavirus y a *Salmonella* spp. como los 3 patógenos causales de diarrea más prevalentes. Sin embargo, al considerar a todos los niños del estudio, pudimos evidenciar que *Shigella* spp. ahora se ubica como el tercer patógeno más prevalente, desplazando a *Salmonella* spp. a la cuarta posición. Este aumento en los números de casos de diarrea asociada a *Shigella* spp. sobre el número de casos de diarrea asociada a *Salmonella* spp. concuerda con el aumento observado y previamente reportado por nuestro grupo de trabajo, como se observa en la **Figura 9** (Zaidi et al., 2013).

En este trabajo se reporta que los PEDs fueron particularmente prevalentes en el grupo etario de ≤ 24 meses (<2 años), presentes en el 53.1% de los casos de diarrea en los que se identificaron patógenos, como se evidencia en la **Tabla 2**. Ya ha sido ampliamente reportada la prevalencia de los PEDs en los infantes <5 años (Khairy et al., 2020; Saka et al., 2019; Zhou et al., 2018), pero en aquellos estudios en los que se han enfocado en infantes de menor edad o que han dividido su población en grupos etarios concuerdan con que la mayor prevalencia identificada es en los niños ≤ 24 meses (Estrada-Garcia et al., 2009; Mwape et al., 2023; Ochoa et al., 2016). Por otro lado, Rotavirus, el segundo patógeno más recurrente **Figura 11**, se identificó significativamente más prevalente en niños >24 meses, específicamente en los niños mayores >36-48 meses, presente en el 55% de los casos de diarrea en los que se identificaron patógenos **Tabla 2**. Estos resultados correlacionan con la introducción de la vacuna de Rotavirus en México durante el 2007, sugiriendo que durante los años en los que se realizó el estudio, del 2010 al 2014, los niños de mayor edad que fueron incluidos en los casos de diarrea no habían sido vacunados contra Rotavirus, explicando los resultados obtenidos (Esparza-Aguilar et al., 2009; Perez Schael et al., 2012; Richardson et al., 2010).

Con lo anteriormente explicado y con base en los resultados obtenidos, sugerimos a *Shigella* spp. como el patógeno causante de diarrea más prevalente en niños >24 meses en nuestro estudio, como se evidenció en la **Tabla 2**. Este resultado es

muy similar a lo reportado en el GEMS (Global Enteric Multicenter Study), un estudio de casos y controles de diarrea en niños <5 años, desarrollado en 7 países de África y Asia. En este estudio se identificó a *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) y a *Shigella* spp. como los patógenos bacterianos más prevalentes, reportando a *Shigella* spp. como el patógeno más prevalente en los niños de 24-59 meses (K. L. Kotloff et al., 2012; The et al., 2016). De forma similar, otros reportes identifican a *Shigella* spp. como un patógeno importante en niños <5 años, resaltando que la prevalencia tiende a disminuir en los niños más pequeños, al igual que lo que se pudo observar en este trabajo (Gebrekidan Kahsay & Teklemariam, 2015; Thompson et al., 2014). Además, algunos estudios reportaron la mayor prevalencia de *Shigella* en niños >5 años (Herwana et al., 2010; Moosavian et al., 2019), respaldando la relevancia de evaluar la prevalencia de este patógeno en todos los niños colectados en este estudio.

Algo interesante que ha revelado el estudio de la epidemiología de *Shigella* spp., es que hay una distribución geográfica definida de las especies de *Shigella* spp.. Se ubica a *S. flexneri* como la especie con mayor prevalencia en los países subdesarrollados o en vías de desarrollo de África, de Asia y de América, siendo *S. flexneri* la causante del ~70% de los brotes de diarrea asociada a *Shigella* en estos países (Gu et al., 2012; Kahsay & Muthupandian, 2016; Nikfar et al., 2017; The et al., 2016), mientras que *S. sonnei* es la causante del ~20% de los casos de diarrea en los países en vía de desarrollo, pero la principal especie identificada en los países desarrollados, siendo la responsable de hasta el 80% de las infecciones asociadas a *Shigella* en Europa y en el norte de América (Libby et al., 2020; Matanza & Clements, 2023; Muthuirulandi Sethuvel et al., 2020). Estos datos reportados concuerdan con los resultados presentados en la **Figura 12**, donde mostramos que de los 118 casos de diarrea en los que se identificó a *Shigella* spp., el 71% y el 16% de ellos corresponden a *S. flexneri* y a *S. sonnei*, respectivamente. Por otro lado, se reporta que las especies *S. boydii* y *S. dysenteriae* son responsables de <10% de las infecciones en el mundo por *Shigella* spp. (The et al., 2016). La especie *S. boydii* se consideraba restringida a la India, por lo que era raro que esta especie causara brotes de diarrea en otras partes del mundo (Khan et al., 1985). Sin embargo, el serotipo 20 de *S. boydii* se identificó en viajeros de centro América, lo que demostró que la epidemiología de esta especie no era tan simple como se predecía (Kalluri et al., 2004; Woodward et al., 2005). Estos antecedentes respaldan que en este estudio *S. boydii* represente el 10% de los casos en los que se identificó a *Shigella*, lo que podría estar asociado con la proximidad geográfica entre el estado de Yucatán en México y centro América. Por último, la especie *S. dysenteriae* sólo representó el 3% de los casos con *Shigella* en nuestro estudio, siendo la especie menos prevalente, similar a lo reportado para el resto del mundo donde se reporta que esta especie es la causante de <5% de las infecciones por *Shigella* (Bardhan et al., 2010; The et al., 2016).

Una vez que explicada la elevada prevalencia de *Shigella* spp. en este estudio, nos dimos a la tarea de intentar identificar la razón por la que el cuadro clínico de diarrea asociada a *Shigella* spp. es más severo que el cuadro clínico asociado a otros patógenos gastrointestinales. Nuestro primer acercamiento fue caracterizar el microbioma de los

niños con shigellosis y compararlo con el microbioma de los niños sin diarrea, con la idea de que la disbiosis generada por la infección por *Shigella* podría explicar la severidad del cuadro clínico. En el gráfico de las curvas de rarefacción en la **Figura 13** se muestra que todas las curvas de rarefacción alcanzaron la asíntota, lo que sugiere que la secuenciación ha cubierto la riqueza completa de las muestras de heces. Este resultado es importante para los posteriores análisis de diversidad, ya que algunos estudios de diarrea asociada a patógenos gastrointestinales discuten la posibilidad de variación de sus resultados debido a la falta de la cobertura de la riqueza en sus muestras (Gallardo et al., 2017; Ling et al., 2014). La falta de cobertura en la riqueza de la muestra, demostrada en sus curvas de rarefacción incompletas, podría ser la responsable de un sesgo al estudiar la diversidad en las muestras (Chao & Jost, 2012; Zou et al., 2023)

Al comparar la diversidad α **Figura 14** y la diversidad β **Figura 15** entre las muestras de heces de casos con diarrea y las muestras de heces de controles sin diarrea observamos tanto una reducción en la diversidad α como una disimilitud en la diversidad β de los casos de diarrea en comparación con los controles. Esta reducción en la diversidad del microbioma intestinal ya ha sido previamente reportada por varios grupos, por ejemplo: el grupo de Gallardo P. reportó que la composición del microbioma era estadísticamente diferente entre niños chilenos con diarrea asociada a los PEDs y los niños sin diarrea ($p=0.002$) (Gallardo et al., 2020) y de forma similar Rouhani observó en niños peruanos que la frecuencia y la duración de los episodios de diarrea estaban negativamente asociados con la riqueza y la diversidad del microbioma ($p<0.05$) (Iancu et al., 2023; J. Lu et al., 2020; Rouhani et al., 2020). Adicionalmente, el grupo de Rasko comparó la diversidad α entre casos positivos a *Shigella* con y sin diarrea y controles negativos a *Shigella* con y sin diarrea, donde observaron que no es la presencia de *Shigella* el factor determinante para la reducción en la diversidad α ($p=0.52$), si no la presencia de la diarrea ($p=0.012$) (Ndungo et al., 2022).

Cuando comparamos la composición del microbioma de las muestras de heces de casos de shigellosis vs las muestras de heces de controles sin diarrea, resalta la diferencia estadística en la abundancia relativa de 8 géneros, como se evidencia en la **Figura 16**. Se compararon los resultados de este trabajo con uno de los pocos estudios sobre el impacto de *Shigella* en el microbioma intestinal (Lindsay et al., 2015), en el cuál únicamente se reportan los 9 géneros con la abundancia relativa más alta y donde destacan tres diferencias significativas, mientras que nuestro estudio muestra a todos aquellos géneros con una abundancia relativa $\geq 1\%$, lo que dificulta establecer las diferencias y similitudes entre los estudios. Sin embargo, los 9 géneros reportados por el estudio de Lindsay y colaboradores también fueron identificados entre los géneros del gráfico de barras de la **Figura 16**, aunque con una abundancia relativa diferente. Además, en nuestro estudio la abundancia relativa de los géneros *Bacteroides* (Zafar & Saier, 2021) y *Bifidobacterium* (Alessandri et al., 2021; Hidalgo-Cantabrana et al., 2017) presentaron una disminución estadísticamente significativa en las muestras de los casos de diarrea vs las muestras de los controles sin diarrea, mientras que ellos no mencionan una variación significativa en estos dos géneros. Por otro lado, ellos reportan una disminución significativa en la abundancia relativa del género *Prevotella*, así como un

incremento en la abundancia relativa del género *Streptococcus*, ambos en las muestras de diarrea vs las muestras sin diarrea, mientras que los resultados de nuestro trabajo no evidencian un cambio significativo en ninguno de estos 2 géneros. Todas estas comparaciones permiten concluir que, a pesar de que ambos estudios muestran similitudes, también se observan claras variaciones, las cuales podrían ser influenciadas por factores extrínsecos como la localización geográfica del estudio, la dieta de los infantes, el hecho de que en su estudio no seleccionaron muestras con *Shigella* como patógeno único o que en las muestras de los controles que se usaron para nuestro estudio no se identificaron patógenos.

Al integrar los resultados de la alteración de la composición del microbioma intestinal en los casos en comparación con los controles observados en la **Figura 16** y la **Figura 17** y la predicción del microbioma funcional de ambos grupos, mostrada en la **Figura 20**, fue cuando se intentó responder a la pregunta ¿Cómo participan los 5 géneros disminuidos en los casos de diarrea en la homeostasis del microbioma?:

a) El género *Bifidobacterium* posee la capacidad de metabolizar un amplio repertorio de carbohidratos (Tojo et al., 2014; Turróni et al., 2018), desde los carbohidratos de origen vegetal, como el almidón (Kelly et al., 2021), los oligosacáridos de la leche materna (HMO) (Thomson et al., 2018) e inclusive los carbohidratos secretados por el hospedero (Zúñiga et al., 2018), como las mucinas (Kato et al., 2017; Turróni et al., 2011). *Bifidobacterium* es capaz de usar todas estas fuentes de carbono para producir ácidos grasos de cadena corta, principalmente acetato y butirato (Rivière et al., 2016), que ingresan a los colonocitos y son utilizados como fuente de energía (Bottacini et al., 2017).

b) El género *Flavonifractor* está asociado con el metabolismo de los flavonoides (Justesen et al., 2000), que son los metabolitos secundarios de productos vegetales, generando subproductos que promueven la supervivencia de las células epiteliales (Rodríguez-Castaño et al., 2020).

c) El género *Bacteroides* promueve el equilibrio de las bacterias residentes del lumen intestinal: 1. Generando azúcares biodisponibles para aquellas bacterias incapaces de metabolizar carbohidratos (Flint et al., 2012; Foley et al., 2016; Grondin et al., 2017), 2. Estableciendo la comunicación con otras bacterias a través de exosomas (vesículas) (Bryant et al., 2017; Elhenawy et al., 2014; Jones et al., 2020), 3. Controlando la expansión de patobiontes a través de la secreción de bacteriocinas (Coyne et al., 2019; Roelofs et al., 2016) o por contacto directo a través de su T6SS (Coyne et al., 2016; Coyne & Comstock, 2019).

d) El género *Parabacteroides* está vinculado con la prevención de la ruptura de la barrera intestinal promoviendo la formación de uniones adherentes y estrechas (Zaylaa et al., 2018). Además, *Parabacteroides* produce succinato (de Vadder & Mithieux, 2018; Wang et al., 2019), el cual es un producto intermedio durante la síntesis del propionato. El succinato es sustrato utilizado en la gluconeogénesis intestinal (De Vadder et al., 2016), promoviendo la homeostasis de la glucosa en el cuerpo humano

(Mithieux, 2009). También se ha reportado que el género *Parabacteroides* es capaz de promover un ambiente tolerogénico y anti-inflamatorio (Kverka et al., 2011; Liew et al., 2016; Neff et al., 2016; Ouyang et al., 2011; J. Zhang et al., 2019).

e) El género *Collinsella* está asociado con el procesamiento de los ácidos biliares, promoviendo su paso a ácidos biliares secundarios, favoreciendo así la emulsificación, la absorción y el metabolismo de los lípidos de la dieta (Fujio-Vejar et al., 2017; Gomez-Arango et al., 2018; Wegner et al., 2017).

Muchas de estas funciones convergen en los modelos propuestos por Litvak y Alaire (Allaire et al., 2018; Litvak et al., 2018), donde los microorganismos que procesan la fibra proveniente de la dieta, específicamente anaerobios obligados (Byndloss & Bäumlér, 2018), generan SCFAs, de los cuales particularmente el butirato es metabolizado por los colonocitos diferenciados, ubicados en el borde de las criptas del colon, este proceso es caracterizado por un elevado consumo de oxígeno, resultando en una concentración de oxígeno <1%, manteniendo un ambiente anaeróbico en el lumen intestinal (Fan et al., 2015). Específicamente PPAR- γ (Receptor activado por proliferadores de peroxisomas- γ), un receptor nuclear, es activado por el butirato (Duszka et al., 2017; Lefebvre et al., 1999), promoviendo así la integridad de la barrera epitelial (Furuta et al., 2001; Ogasawara et al., 2010), suprime la expresión del gen que codifica para la “Sintetasa de óxido nítrico” y promueve la β -oxidación mitocondrial de ácidos grasos y fosforilación oxidativa. Una vez que el ácido graso es transportado al interior de la célula se le adiciona un grupo “CoA” y para que el acil graso-CoA generado pueda ser transportado a través de la membrana mitocondrial el acil graso-CoA entra a la β -oxidación, el cual es un proceso de cuatro pasos, del cual resulta un acetil-CoA y un acil graso-CoA 2 carbonos más corto por cada ciclo de β -oxidación (Charo, 2007). Este acetil-CoA entra en el ciclo del ácido tricarbóxico y los NADH y FADH₂, producidos tanto en la β -oxidación como en el ciclo TCA, son usados en la fosforilación oxidativa para producir ATP, etapa en la que se consume el O₂ que había entrado por difusión al epitelio intestinal (Byndloss et al., 2017).

Todos estos géneros y sus vías asociadas se encuentran desregulados en los niños con diarrea asociada a *Shigellosis*, como se muestra en la **Figura 20** y en la **Figura 21**, lo que nos hizo preguntarnos “¿Cómo participan en la disbiosis los 3 géneros incrementados en los casos de diarrea asociada a *Shigella* spp?”

a) Cuando llega al colon *Shigella*, esta bacteria puede colonizar la mucosa gracias a la producción de serin-proteasas, atraviesa la barrera intestinal, infecta a los colonocitos, promueve un ambiente proinflamatorio y todo esto, junto la secreción de enterotoxinas por parte de *Shigella*, promueve el daño del epitelio intestinal (Gillis et al., 2018). Durante este mecanismo de infección, *Shigella* contribuye al enriquecimiento de algunas de las vías que identificamos enriquecidas en los casos de diarrea, como: *Sistemas de secreción bacterianos, como el T3SS de *Shigella* spp. y el T6SS específicamente presente en *Shigella sonnei*; *Transportadores con casetes de unión de unión a ATP, encontrados en los T1SS; *Infección por *E. coli* patogénicas, dado que *Shigella* spp. está genéticamente asociada a *E. coli*; *Invasión bacteriana de células

epiteliales. En conjunto, todos estos procesos mencionados desencadenan la alteración del microbioma intestinal, lo pudimos observar en los análisis de diversidad.

Litvak y colaboradores explican en su modelo (Litvak et al., 2018) que bacterias entéricas promueven un ambiente proinflamatorio a través de sus factores de virulencia, reduciendo la abundancia de los microorganismos productores de SCFAs (Rivera-Chávez et al., 2016), junto con la capacidad de las Gammaproteobacterias para metabolizar SCFAs (Bronner et al., 2018; Spiga et al., 2017), por ejemplo: los géneros *Escherichia*, *Shigella*, *Haemophilus*, *Serratia*; todos estos son géneros con una mayor abundancia relativa en nuestros casos de diarrea. Esta reducción en la disponibilidad de SCFAs promueve que los colonocitos cambien a un metabolismo asociado a la inflamación (Charo, 2007), los cuales se caracterizan por tornar su metabolismo a una glicólisis anaeróbica, incrementando la liberación de lactato y la difusión de O₂, junto con la producción de óxido nítrico por la iNOS (Sintetasa de óxido nítrico inducible). Este óxido nítrico puede ser usado por bacterias anaerobias facultativas o microaerófilas como un aceptor de electrones (Winter et al., 2010, 2013), mientras que el lactato liberado provee una fuente de carbono para las bacterias (Gillis et al., 2018). Es bajo estas nuevas condiciones del colon que se promueve la colonización por bacterias que en son menos abundantes en los niños sin diarrea, por ejemplo:

b) El género *Haemophilus* se ha asociado con la colonización de mucosas afectadas, respaldada por el uso de NAD como sustrato de crecimiento (Reidl et al., 2000). NAD es liberado durante el metabolismo de los ácidos biliares o es liberado por los eritrocitos, mientras que específicamente *H. influenzae* también requiere hemina como factor de crecimiento, encontrando un ambiente favorable en la diarrea con sangre, causada por el daño epitelial (Olivart et al., 2017). Adicionalmente, *Haemophilus* posee un ciclo de ácido tricarbóxico incompleto, típicamente encontrado en bacterias fermentativas, pero en contraste con estas *Haemophilus* posee una versátil cadena respiratoria con 5 deshidrogenasas capaces de metabolizar lactato y NADH y al menos 6 reductasas, permitiéndole usar como aceptores de electrones al oxígeno y a los compuestos nitrogenados (Othman et al., 2014), todos estos presentes en el ambiente de disbiosis asociada a *Shigella*;

c) El género *Neisseria*, al igual que *Shigella*, es capaz de formar biopelículas, contribuyendo así al enriquecimiento de esta vía en nuestros casos de diarrea, permitiéndole adaptarse y colonizar nichos con un elevado flujo de líquidos, como es la región nasofaríngea, la uretra, los cuales son nichos recurrentes de esta bacteria, pero también podría colonizar el colon con diarrea (Schoen et al., 2014). Aunado a esto, ya se ha reportado la preferencia de *Neisseria* por el lactato como fuente de carbono, el cual es catabolizado a una tasa más rápida que la glucosa. Además, *Neisseria* posee la capacidad de crecer en condiciones microaeróbicas, pues posee un tipo de Citocromo C Oxidasa que, bajo condiciones limitadas de oxígeno, puede usar óxido nítrico como sustrato respiratorio (Y. Huang et al., 2010). Para este proceso respiratorio *Neisseria* requiere hierro, por lo que posee sistemas de captación de hierro que se basan en receptores de alta afinidad a proteínas asociadas a hierro, como la transferrina, la lactoferrina y la hemoglobina (Perkins-Balding et al., 2004), contribuyendo al

enriquecimiento de vías como: *Sistema de dos componentes, sistema con la función de censar el ambiente y bajo la presencia de los estímulos apropiados promueve la proliferación celular; *Biosíntesis de sideróforos, encontrando un ambiente favorable en la diarrea con sangre asociada a la colonización por *Shigella*.

Todos estos cambios generan un panorama completamente diferente del que se encontraría en los niños control sin diarrea, donde la reducción en la abundancia relativa de las bacterias fermentativas y el incremento de las bacterias microaerofílicas contribuyen al enriquecimiento de la vía del ácido tricarboxílico (TCA)

Al comparar el microbioma asociado a la severidad del cuadro clínico de los casos con diarrea, no identificamos diferencia significativa entre ninguna de las comparaciones realizadas, ni en la diversidad α ni en la diversidad β , evidenciado en la **Figura 18**. Esto es diferente de lo observado por Ling en su estudio de diarrea asociada con *Clostridium difficile* (Ling et al., 2014), donde encontraron diferencia significativa entre los casos de diarrea asociada con la severidad del caso de diarrea. Sin embargo, en el caso de dicho estudio, la severidad del cuadro clínico está directamente asociada con el número de toxinas que es capaz de codificar la cepa de *Clostridium difficile*, donde aquella cepa que sintetiza a las toxinas A y B está asociada con los casos más severos. Mientras que en nuestras cepas de *Shigella* spp. no observamos una correlación entre las toxinas que codifica y la severidad del caso de diarrea, al menos en lo que respecta a las enterotoxinas ShET1 y ShET2.

Por otro lado, mediante dos análisis bioinformáticos distintos, se identificaron 3 géneros bacterianos aumentados en los casos severos con respecto a los casos leves/moderados de los géneros bacterianos, como se muestra en la **Figura 19**. Ay las vías diferencialmente enriquecidas entre los cuadros clínicos severos y los cuadros clínicos leves/moderados, vías mostradas en la **Figura 22**, podrían sugerir una explicación a las complicaciones sistémicas presentes en los casos severos de shigelosis:

a) El género *Bilophila* se ha reportado incrementado en eventos proinflamatorios, como la apendicitis, la colitis ulcerativa y el cáncer de colon. Brevemente les explico que, los ácidos biliares son secretados como sales biliares, que son desconjugadas para pasar a ácidos biliares primarios y posteriormente a secundarios, como se explicó para el caso del género *Collinsella* (Foley et al., 2019). Se sabe que *Bilophila* usa a la taurina como sustrato de crecimiento y bajo condiciones óptimas, como es la dieta rica en lípidos, este género incrementa su abundancia relativa. Se ha reportado que *Bilophila* previene el metabolismo de los ácidos biliares, causando el aumento en la relación de los ácidos primarios vs los ácidos secundarios (Natividad et al., 2018). Esto concuerda con el enriquecimiento de las vías: *Biosíntesis de ácidos biliares, en los controles sin diarrea y *Metabolismo de la taurina, en los casos de diarrea. Del metabolismo de la taurina *Bilophila* libera sulfuro de hidrógeno, el cual se ha sugerido como el responsable de capacidad de inducir un ambiente proinflamatorio (Peck et al., 2019), contribuyendo así al enriquecimiento de vías como: *Metabolismo del sulfuro y *Liberación del sulfuro.

b) Desde el siglo pasado se reportó que los aminoácidos ramificados (la valina, la leucina y la isoleucina) pueden ser usados como una fuente alterna de energía por bacterias (Massey et al., 1976), plantas (Binder, 2010) y mamíferos (Harper et al., 1984), cuyas vías catabólicas generan intermediarios como acetyl-CoA y propionil-CoA. El catabolismo de estos tres aminoácidos usa las mismas enzimas en los primeros 2 pasos: 1.- la primera reacción es realizada por una transaminasa con un α -cetoglutarato como aceptor, generando tres diferentes α -cetoácidos. 2.- la segunda reacción es realizada por una α -cetoácido deshidrogenasa, generando tres diferentes derivados de CoA (acil-CoA). A partir de este punto, cada acil-CoA sigue su propio camino. La degradación de la isoleucina culmina en la generación de acetyl-CoA y propionil-CoA, la degradación de la valina también culmina en la generación de propionil-CoA, los cuales pueden ser degradados y producir succinil-CoA, un intermediario del ciclo TCA (Vía que ya explicamos previamente que se encuentra enriquecida en los casos de diarrea); mientras que la degradación de la leucina genera acetoacetato (un cuerpo cetónico) y acetyl-CoA, ambos usados como fuente de energía (Gipson et al., 2017; Harper et al., 1984). Además, otros compuestos orgánicos, como los terpenos y los alcoholes de cadena larga, también pueden ingresar a estas vías catalíticas, por ejemplo: los terpenos son convertidos a *cis*-geranyl-CoA (G-CoA), el cual tras algunas reacciones puede converger con la vía de la degradación de la leucina (Aguilar et al., 2008; Harper et al., 1984). El acetoacetato y el acetyl-CoA promueven la síntesis de cuerpos cetónicos y el succinil-CoA la síntesis de glucosa.

Los cuerpos cetónicos son una familia moléculas pequeñas compuesta por tres miembros: la acetona (Ac), el β -hidroxibutirato (BHB) y el acetoacetato (AcAc). La producción de cuerpos cetónicos, cetogénesis, es un mecanismo metabólico adaptativo para producir energía cuando las reservas de glucosa u otros carbohidratos son limitadas (Bendridi et al., 2022; Rich, 1990). Han sido diversos los estudios enfocados en los beneficios de la dieta cetogénica, la cual se caracteriza por un déficit en el consumo de carbohidratos, un consumo elevado de lípidos y una ingesta adecuada de proteínas (Miranda et al., 2012). Esta dieta ha sido tradicionalmente usada para tratar diversas patologías, como: el cáncer (Branco et al., 2016), la obesidad (Dashti et al., 2007; Paoli, 2014), la diabetes (Bolla et al., 2019), enfermedades neurodegenerativas (Enders et al., 2023) y epilepsia (McNally & Hartman, 2012; Wheless, 2008). Estudios *in vivo* sugieren que los cuerpos cetónicos pueden presentar propiedades anticonvulsivas (Rho et al., 2002; SEYMOUR et al., 1999; Uhlemann & Neims, 1972) y se ha propuesto que el mecanismo de acción podría ser a través de la regulación de los niveles del glutamato y del ácido γ -aminobutírico (GABA), los principales neurotransmisores excitatorio e inhibitorio, respectivamente. Se sugiere que en un cerebro en cetosis hay un incremento en la conversión de glutamato a glutamina, la cual es captada por las neuronas, donde es eventualmente convertida en GABA (McNally & Hartman, 2012; Yudkoff et al., 2008). Se ha reportado que las bacterias intestinales son capaces de producir D-Glutamato, el cual puede ser usado como sustrato para la síntesis de GABA (Baj et al., 2019; Chang et al., 2020). Por otro lado, se ha demostrado que la implementación de una dieta cetogénica tiene un impacto sobre el microbioma intestinal, modificando su composición y en consecuencia su actividad (David et al., 2014; Paoli et al., 2019; Reddel et al., 2019;

Rew et al., 2022). Olson y colaboradores desarrollaron un estudio donde administraron una dieta cetogénica a dos modelos murinos de convulsiones, logrando observar un incremento en los géneros bacterianos *Akkermansia* y *Parabacteroides*, correlacionando con un cambio en el perfil metabolómico del lumen del colon, del suero y del hipocampo, elevando los niveles de GABA/glutamato en el hipocampo. En conjunto, este trabajo fue capaz de establecer una conexión entre la dieta cetogénica y el papel del microbioma intestinal al modular la susceptibilidad a convulsiones (Olson et al., 2018).

Esta explicación, nos permite dar sentido a los resultados de las vías enriquecidas en los casos severos de diarrea, casos en los que todos los niños presentaron convulsiones. Podemos sugerir que, en un ambiente de falta de biodisponibilidad de nutrientes en el lumen intestinal, como asumimos que es el caso para los niños con desnutrición del estudio, así como sucedería durante la diarrea severa, las microorganismos podrían usar moléculas alternas a los carbohidratos para generar energía, por ejemplo: activando la vía de *Degradación de la valina, leucina e isoleucina, la cual evidenciamos que es capaz de conectar con la vía de *Degradación del geraniol y ambas vías culminan con la producción de acetoacetato y acetil-CoA. A partir de estas moléculas las bacterias son capaces de obtener la energía, enriqueciendo la vía de *Síntesis y degradación de los cuerpos cetónicos. Debemos recordar que estas vías son presentes en los microorganismos residentes, no en el metabolismo del hospedero, por lo que podríamos sugerir que cuando las bacterias activan estas vías reducen la biodisponibilidad de moléculas para que el hospedero realice su propia cetogénesis en el hígado, la cual vimos que tiene un papel en promover la presencia de géneros bacterianos capaces de modular la susceptibilidad a convulsiones. Es por esto anteriormente mencionado, que podría hacer sentido que la vía del *Metabolismo de D-glutamina y D-glutamato esté enriquecida en los casos leves/moderados con respecto a los casos severos, pues el correcto metabolismo de estos neurotransmisores está asociado con un papel anticonvulsivo.

Sin embargo, no hay que olvidar que el modelo murino en el que se evaluó el papel anticonvulsivo de la dieta cetogénica era un modelo susceptible a convulsiones. A uno de los ratones se le provocaban las convulsiones eléctricamente, mientras que el otro ratón era genéticamente predispuesto a presentar las convulsiones, lo que podría sugerirnos que hace falta un estímulo adicional además de la ausencia de una dieta cetogénica y la alteración del microbioma intestinal. En los niños de este estudio, esto podría explicarse por las complicaciones sistémicas reportadas, pues en muchos de ellos se reportó “desequilibrio hidroelectrolítico” asociado a la diarrea. Hay múltiples reportes que establecen que un desbalance severo de electrolitos puede manifestar síntomas neurológicos o convulsiones y que las convulsiones suelen presentarse principalmente en el desbalance del nivel de sodio (hiponatremia), pero también en el desbalance del nivel de calcio (hipocalcemia), del nivel de potasio (hipocalcemia) y/o del nivel de magnesio (hipomagnesemia) (Castilla-Guerra et al., 2006; R. Nardone et al., 2016).

Finalmente, realizamos la caracterización de cepas de *Shigella* spp. aisladas de los casos con diarrea de este estudio. A partir de la secuenciación del genoma completo de 20 cepas de *Shigella* aisladas de los casos de diarrea de este estudio, mas 20

genomas de referencia descargados del NCBI, realizamos la identificación del coregenoma y del pangenoma de esta colección de cepas y con base en los cambios en las secuencias del genoma conservado, así como en la presencia de genes accesorios, pudimos diseñar el árbol filogenético presentado en la **Figura 24**. De forma general, resalta que en nuestro árbol filogenético del género *Shigella* los 40 genomas se separan en clados casi específicos para cada una de las 4 especies de *Shigella*, con la excepción de 2 cepas de *S. flexneri* y 2 cepas de *S. boydii*.

Los primeros trabajos sobre la filogenia y evolución del género *Shigella* reportaron que el género *Shigella* estaba compuesto de tres clados principales (C1, C2 y C3) y un número pequeño de serotipos que no se incluían en ninguno de los clados (Sahl et al., 2015; The et al., 2016).

Por un lado, en el clado C3 se ubicó a todos los serotipos de *S. flexneri*, excepto al serotipo 6, así como al serotipo 12 de *S. boydii* (Pupo et al., 2000). Los datos reportados por Pupo y colaboradores son muy similares a lo que podemos observar en nuestro árbol filogenético de la **Figura 24**, donde podemos observar que en el clado de mayor tamaño se ubicaron a la mayoría de los genomas de *S. flexneri* (9 de los genomas de *S. flexneri* secuenciados en este estudio y los 5 genomas de referencia de *S. flexneri*) y un genoma de *S. boydii* (el genoma de referencia 7), el cual podría corresponder al serotipo 12 de *S. boydii*.

Mientras tanto, en los clados C1 y C2 se agruparon a la mayoría de los serotipos de *S. dysenteriae* y *S. boydii*, así como al serotipo 6 de *S. flexneri* (Pupo et al., 2000; J. Yang et al., 2007). En el segundo clado más grande de nuestro árbol filogenético podemos observar un resultado que se asemeja a lo anteriormente descrito, donde la mayoría de los genomas de *S. boydii* (los 4 genomas de *S. boydii* secuenciados en este estudio y los genomas de referencia de *S. boydii* 9 y 10), 2 genomas de *S. dysenteriae* (los genomas de referencia 18 y 20) y 2 genomas de *S. flexneri* (los genomas de *S. flexneri*, secuenciado en este estudio, MXSh6 y MXSh11). Estos resultados podrían sugerir que las cepas MXSh6 y MXSh11, identificadas como *Shigella flexneri* mediante antisueros, corresponden al serotipo 6, pues está reportado que este serotipo está filogenéticamente alejado del resto de serotipos de *S. flexneri* y está más relacionado con *S. boydii* (Mai et al., 2021).

Finalmente, dentro de los serotipos que no se ubicaron en ningún clado se encontraban los serotipos 1, 8 y 10 de *S. dysenteriae*, el serotipo 13 de *S. boydii* y el único serotipo de *S. sonnei* (The et al., 2016). De nuevo, en el árbol filogenético de la **Figura 24** podemos observar que 4 genomas no se ubicaron dentro los clados del árbol, 3 genomas de *S. dysenteriae* (los genomas de referencia 16, 17 y 19) y un genoma de *S. boydii* (el genoma de referencia 8), el cual podría corresponder al serotipo 13 de *S. boydii*.

En lo que respecta a *S. sonnei*, debió a que esta especie sólo presenta un serotipo, resulta lógico que no se ubicara dentro de los clados previamente mencionados. Los resultados de la secuenciación de los genomas de cepas de *S. sonnei*

de todo el mundo estiman que esta especie se diferenci6 de un ancestro en com6n hace <400 a6os (Holt et al., 2012), por lo que los 10 genomas de *S. sonnei* que usamos para construir el 6rbol en la **Figura 24** que se separan un mismo clado, el cual a su vez se separa en 2 subclados: en un clado donde se ubican los 5 genomas de *S. sonnei* que secuenciamos en este estudio (MXSh16-20) y en el otro clado los 5 genomas de referencia de *S. sonnei* (Ref11-15). A diferencia de las otras especies de *Shigella*, *S. sonnei* expresa un ant6geno O el cual est6 codificado por el mismo gen que se posee *Plesiomonas shigelloides* (Shepherd et al., 2000), lo que ayuda a justificar que *S. sonnei* es agrupe en un clado independiente del resto de las especies.

Retomando al serotipo 6 de *S. flexneri*, Newton y colaboradores evidenciaron en el 2010 que todos los serotipos de *S. flexneri* codifican para una forma trunca de la prote6na OspZ, a excepci6n del serotipo 6 de *S. flexneri* que codifica para la forma completa de OspZ, al igual que *S. boydii* (Newton et al., 2010b). En la matriz de presencia/ausencia de genes, representada en la **Figura 25**, podemos observar que las cepas MXSh6, MXSh10 y MXSh11 codifican para la forma completa de OspZ, mientras que la cepa MXSh5 presenta la ausencia completa del gen *ospZ*. En la secci6n de los resultados se describi6 que la cepa MXSh6 presentaba un perfil gen6tico que se asemejaba al identificado en las cepas de *S. boydii*, con la ausencia de los genes *ospG* y *sepa*, pero con la presencia de *sigA* (Mai et al., 2021) y a su vez esta asociaci6n filogen6tica con *S. boydii* podr6a explicar el resultado del ensayo de formaci6n de placas, donde las placas formadas por la cepa MXSh6 son de menor 6rea que las del resto de las cepas de *S. flexneri* y de un 6rea similar a las de las cepas de *S. boydii*.

Adicionalmente, se sugiere que la diversidad gen6tica y el gran n6mero de serotipos dentro del g6nero *Shigella* pueden ser explicados mediante tres procesos claves: 1.- varios reportes han sugerido que la diferenciaci6n entre *Shigella* y *E. coli* no ha sido un evento 6nico, si no que la diferenciaci6n de *Shigella* ha ocurrido a partir de m6ltiples ancestros en ocasiones independientes (Kaas et al., 2012; Pupo et al., 2000; Touchon et al., 2009; Y. Zhang & Lin, 2012), generando la teor6a en la cual diferentes cepas fundadoras de *Shigella* han ganado, de forma independiente, el pl6smido de invasi6n que le permite ser un pat6geno intracelular, 2.- la adquisici6n de pl6smidos que codifican para genes de virulencia, como: el pl6smido pHS-2 que promueve la s6ntesis de una cadena de ant6geno O de mayor longitud (Hong & Payne, 1997; R6hel & Szatmari, 1996), los pl6smidos que les confieren resistencia a antibi6ticos (Baker et al., 2015, 2018; Gu et al., 2012; Holt et al., 2013), entre otros, 3.- la adquisici6n de elementos m6viles que han contribuido a la p6rdida y a la ganancia de genes, lo que ha contribuido a transformar a esta bacteria en un pat6geno restringido a humanos (Ochman & Davalos, 2006; Siguier et al., 2014; Wagner & de la Chaux, 2008; F. Yang, 2005). Estos procesos sugieren una explicaci6n a la agrupaci6n de serotipos de *S. boydii* en clados con serotipos de *S. flexneri* o *S. dysenteriae*, as6 como justifica que la cepa MXSh11 de *S. flexneri*, la cepa que presenta el perfil gen6tico con mayor diferencia entre las 20 cepas secuenciadas en este estudio se ubique en el mismo clado que *S. dysenteriae*, mientras que las cepas MXSh5 y MXSh10 s6 se ubicaron en el clado con el resto de las *S. flexneri*.

Como se mencionó en la sección de resultados, el cultivo y la sincronización de las cepas de *S. sonnei* resultó ser el más complicado de realizar durante los ensayos fenotípicos, debido a que esta especie era la más propensa a perder el plásmido de invasión. Desde los años 80, Sansonetti reportó que el plásmido de invasión de *Shigella* era indispensable para la virulencia de esta bacteria, demostrando la presencia de cepas de *Shigella* virulentas y avirulentas (Sansonetti et al., 1981) y a finales de los años 90, Schuch R. y colaboradores observaron en *S. flexneri* 2a que la inestabilidad del plásmido de invasión estaba asociada con la expresión de los genes de invasión, presentándose un mayor crecimiento de colonias avirulentas al cultivar las bacterias a 37°C o al sobre expresar a los activadores de la transcripción de los genes de invasión (Schuch & Maurelli, 1997). En la actualidad se sabemos que *S. sonnei* es más inestable en mantener al plásmido de invasión que *S. flexneri*, ya que *S. flexneri* cuenta con cinco sistemas para mantener al plásmido: dos sistemas de partición y tres sistemas toxina-antitoxina (Pilla & Tang, 2018); mientras que *S. sonnei* sólo cuenta con dos sistemas de partición, uno de ellos diferente de los de *S. flexneri* y un sistema toxina-antitoxina (Martyn et al., 2022).

Adicional a la mayor tasa de pérdida del plásmido de invasión, *S. sonnei* es la única de las cuatro especies que presenta cambios en la morfología de sus colonias al perder el plásmido de invasión, pues es la única de las especies que codifica al antígeno O en el plásmido de invasión, identificando a aquellas colonias con morfología pequeña y lisa como las que mantienen el plásmido, mientras que las colonias con morfología más grande y rugosa son aquellas que han perdido el plásmido (Torraca et al., 2020; Wu et al., 2021). Estas colonias con morfología rugosa presentaron un menor tiempo de replicación que las colonias con morfología lisa, por lo que al concluir con los tiempos de cultivo de las cepas de *S. sonnei* obteníamos un cultivo mixto de bacterias virulentas que mantuvieron el plásmido de invasión y de bacterias avirulentas que perdieron el plásmido de invasión, lo que es casi seguro que influye en los resultados obtenidos durante los ensayos de invasión y de formación de placas, sugiriendo que los resultados de estos ensayos *in vitro* podrían no reflejar la verdadera capacidad de patogenicidad de las cepas de *S. sonnei* en el hospedero, resaltando la importancia de desarrollar un modelo *in vivo*.

Por otro lado, en las tres especies de *Shigella* identificamos cepas que mantuvieron el plásmido de invasión y que no fueron capaces de invadir a las células epiteliales y/o de formar placas en la monocapa celular, como se muestra en la **Figura 26**, en la **Figura 27** y en la **Figura 28**. El ensayo de formación de placas es una prueba funcional clásica que permite evaluar dos pasos importantes en el ciclo de la infección de *Shigella*: el evento de invasión y la diseminación a células adyacentes (Oaks et al., 1985). A través de este ensayo se han logrado identificar diferentes factores de virulencia, por ejemplo, se ha reportado que la pérdida de genes que codifican a proteínas como *IcsA* (Bernardini et al., 1989; Brotcke Zumsteg et al., 2014), *IcsB* (Baxt & Goldberg, 2014b), *IpaB* e *IpaC* (Campbell-Valois et al., 2014b) están principalmente asociados con defectos en los procesos de invasión o diseminación a células adyacente de *Shigella*. Sin embargo, como mostramos en la **Figura 25** estos 4 genes se encontraron

presentes en las 20 cepas de secuenciadas y con la misma homología. Este resultado podría sugerir que el defecto en estos pasos del ciclo de infección de *Shigella* puede ser atribuido a la ausencia de otros genes, como genes asociados a la estructura y el ensamblaje del T3SS, por ejemplo, se ha reportado que las cepas de *Shigella mxiD* pierden su capacidad de invasión (Sharma & Puhar, 2019). También se ha evidenciado que genes ajenos al plásmido de invasión participan en el ciclo de infección de *Shigella*, por ejemplo, Hong y colaboradores reportaron que las cepas de *Shigella vpsC* y *vpsA*, dos genes codificados en el cromosoma de *Shigella*, presentaron un defecto en la formación de placas, pero mostraron una capacidad de invasión similar al de las cepas WT (Hong et al., 1998). Estas cepas de *Shigella vpsC* y *vpsA* podrían sugerir una explicación del resultado de la cepa MXSh15, una de nuestras cepas de *S. boydii* que presentó un elevado porcentaje de invasión, pero fue incapaz de formar placas.

Una segunda posibilidad es que haya algún defecto en la expresión de los genes de virulencia. Haidar-Ahmad y colaboradores detallan la cascada de regulación de la expresión de los genes de virulencia en *Shigella* (Haidar-Ahmad et al., 2023), la cual se basa en la presencia de una proteína reguladora tipo histona (H-NS) (Picker & Wing, 2016) y de los tres activadores maestros de la transcripción VirF, VirB y MxiE. *Shigella* es capaz de percibir múltiples factores ambientales que tienen una influencia directa en esta cascada de regulación de la expresión de los genes de virulencia, por ejemplo, a temperaturas <32°C H-NS se une a los promotores de *virF* y *virB*, silenciando la expresión de *virF* y *virB* (Beloïn & Dorman, 2003), mientras que a 37°C se debilita la unión de H-NS al promotor de *virF*, permitiendo la expresión de *virF* (Di Martino et al., 2016). También se ha observado que, a un pH inferior al fisiológico, pH 7.4, (Nakayama & Watanabe, 1995), en la ausencia de fosfato (C. Yang et al., 2012), de Mg⁺² (Lin et al., 2017) o de una fuente de carbono que active la glucólisis (Gore & Payne, 2010) hay una reducción en la expresión de *virF*; mientras que, en bajas concentraciones de hierro intracelular (Mey et al., 2021; Troxell & Hassan, 2013) o en condiciones anaeróbicas (Marteyn et al., 2010) se reprime la expresión de *virB*. Por último, debemos recordar que *Shigella* es un patógeno intracelular restringido a humanos, por lo que no se cuenta con un modelo animal para la infección por *Shigella*, mientras que las condiciones óptimas para activar la expresión de los genes de virulencia de *Shigella* aún no se han logrado reproducir en cultivos *in vitro*, lo que ha retrasado el entendimiento de los mecanismos de virulencia y la identificación de posibles blancos terapéuticos en este patógeno de relevancia mundial.

CONCLUSIONES

- *Shigella* spp. es el tercer agente causal de diarrea aguda más prevalente y el segundo agente bacteriano más prevalente. *Shigella* spp. fue el agente bacteriano causal de diarrea aguda más prevalente en los niños >24 meses. Se identificó a *Shigella* spp. significativamente más prevalente en los niños >60 meses que en los niños ≤24 meses. El número de casos de diarrea asociada a *Shigella* spp. no estuvo asociado con el estatus nutricional de los niños o con la severidad del cuadro clínico de la enfermedad. La especie de *Shigella* más prevalente fue *S. flexneri*, representando ~70% de los casos de shigelosis, seguida de *S. sonnei*, *S. boydii* y *S. dysenteriae*, respectivamente.
- El microbioma de los casos de diarrea presentó una diversidad α significativamente menor y una diversidad β significativamente diferente con respecto al microbioma de los controles sin diarrea. El microbioma de los tres grupos de severidad del cuadro clínico de la diarrea (leve, moderado y severo) presentó una diversidad α significativamente menor y una diversidad β significativamente diferente con respecto al microbioma de los controles.
- Al comparar la composición del microbioma de los casos con el microbioma de los controles se identificaron 8 géneros con una abundancia relativa significativamente diferente entre los casos y los controles: 5 géneros (*Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Collinsella*, *Flavonifractor* y *Parabacteroides*) se identificaron con una abundancia relativa disminuida y 3 géneros (*Escherichia/Shigella*, *Haemophilus* y *Neisseria*) se identificaron con una abundancia relativa aumentada en los casos con respecto a los controles. Mediante un análisis LEfSe se identificaron a los mismos 3 géneros como posibles biomarcadores de los casos y los mismos 5 géneros como posibles biomarcadores de los controles.
- No se identificó diferencia significativa al comparar las diversidades α y β entre los tres grupos de severidad de la diarrea. Se identificaron 4 géneros (*Azospirillum*, *Bilophila*, *Brevibacillus* y *Stenotrophomonas*) con una abundancia relativa significativamente mayor en el grupo de casos severos con respecto al grupos de casos leves/moderados. Mediante un análisis LEfSe se identificaron a 3 de los 4 géneros (*Azospirillum*, *Bilophila* y *Brevibacillus*) como posibles biomarcadores de casos severos.
- Al predecir y comparar el microbioma funcional de los casos y de los controles, se identificaron 40 vías enriquecidas en el microbioma de los controles, con vías asociadas al mantenimiento de la homeostasis intestinal y al metabolismo de los nutrientes de la dieta. Por otro lado, se identificaron 43 vías enriquecidas en el microbioma de los casos, con vías asociadas a mecanismos de patogenicidad y al metabolismo de productos de la glicólisis anaeróbica. Estas vías enriquecidas en los casos parecieran correlacionar con las vías metabólicas reportadas para

los géneros con una abundancia relativa aumentada en los casos. Además, al comparar el microbioma funcional de los tres grupos de severidad, se identificaron 6 vías enriquecidas en el grupo de casos severos y 1 vía enriquecida en el grupo de casos leves/moderados. Estas vías podrían ayudar a explicar la severidad del cuadro clínico, como las complicaciones sistémicas presentes en los casos severos.

- Al realizar el análisis filogenético de las 20 cepas secuenciadas, la especie *S. sonnei* fue la única especie que formó un clado separado de las otras 3 especies. De las 11 cepas de *S. flexneri* que se secuenciaron en este estudio, 9 cepas formaron un clado con las 5 cepas de referencia de *S. flexneri* y las 2 cepas restantes se identificaron en clados diferentes, uno constituido principalmente por las cepas de *S. boydii*, en el cual están incluidas las 4 cepas de nuestro estudio y el otro clado constituido por las 5 cepas de referencia de *S. dysenteriae*. Durante la búsqueda de la presencia o ausencia de 29 genes que codifican para proteínas asociadas al proceso de patogénesis de *Shigella* spp., se identificó en las cepas un perfil genético que pareciera correlacionar con la distribución del análisis filogenético.
- En la caracterización fenotípica de las cepas, no se observó una correlación entre la severidad del cuadro clínico y la capacidad de invasión de las cepas, mientras que aquellas cepas que no presentaron la capacidad de invasión fueron las mismas que no fueron capaces de formar placas y este defecto en el paso de invasión no parece correlacionar con los 29 genes buscados en los genomas. Las 3 cepas que formaron las placas líticas más grande fueron cepas de *S. flexneri* aisladas de casos severos. La cepa MXSh15 de *S. boydii*, que presentó una eficiente capacidad de invasión, no fue capaz de formar placas líticas, pero sí genero daño en la monocapa celular. Es posible que esta cepa presente algún defecto en la migración a células adyacentes, lo que podría explicar su incapacidad en la formación de placas.

PERSPECTIVAS

- Realizar los análisis de regresión logística multivariada que permitan identificar una posible asociación entre las variables del historial clínico o los datos antropométricos del paciente y la composición del microbioma intestinal.
- Realizar los análisis de redes que permitan predecir tanto a las interacciones microbianas, así como a aquellos miembros del microbioma intestinal que desempeñan un papel importante en la interacción de la comunidad establecida.
- Cuantificar la carga bacteriana de *Shigella* spp. en las muestras de heces de los casos y de los controles y comparar la carga bacteriana entre casos severos, moderados y leves.
- Buscar por espectrometría de masas, en las muestras de heces, los metabolitos bacterianos asociados con el microbioma funcional predicho en este estudio.
- Comparar el genoma accesorio de las 20 cepas secuenciadas con bases de datos de factores de virulencia y comparar los resultados entre especies y entre los grupos de severidad del caso del que fueron aisladas.
- Realizar ensayos fenotípicos adicionales con las cepas secuenciadas de *Shigella* spp., como : inducción de piroptosis en macrófagos, inducción de migración de neutrófilos, formación de biopelículas y la prueba de Sereny.

BIBLIOGRAFÍA

- ABERRA, F. (2005). Evaluación de la diarrea aguda. In *Intestino grueso y delgado. Los Requisitos en Gastroenterología* (pp. 21–30). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-84-8174-821-5.50002-0>
- Agans, R., Rigsbee, L., Kenche, H., Michail, S., Khamis, H. J., & Paliy, O. (2011). Distal gut microbiota of adolescent children is different from that of adults. *FEMS Microbiology Ecology*, *77*(2), 404–412. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01120.x>
- Aguilar, J. A., Díaz-Pérez, C., Díaz-Pérez, A. L., Rodríguez-Zavala, J. S., Nikolau, B. J., & Campos-García, J. (2008). Substrate Specificity of the 3-Methylcrotonyl Coenzyme A (CoA) and Geranyl-CoA Carboxylases from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *190*(14), 4888–4893. <https://doi.org/10.1128/JB.00454-08>
- Albesharat, R., Ehrmann, M. A., Korakli, M., Yazaji, S., & Vogel, R. F. (2011). Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. *Systematic and Applied Microbiology*, *34*(2), 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.12.001>
- Alessandri, G., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2021). The genus bifidobacterium: From genomics to functionality of an important component of the mammalian gut microbiota running title: Bifidobacterial adaptation to and interaction with the host. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *19*, 1472–1487. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.03.006>
- Allaire, J. M., Crowley, S. M., Law, H. T., Chang, S.-Y., Ko, H.-J., & Vallance, B. A. (2018). The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends in Immunology*, *39*(9), 677–696. <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.04.002>
- Almaguer-Molina, D. (2024). *Caracterización y comparación del microbioma intestinal de niños con diferentes severidades de shigellosis y de niños sin diarrea y caracterización de las cepas de Shigella spp aisladas.*
- Ambrosi, C., Pompili, M., Scribano, D., Limongi, D., Petrucca, A., Cannavacciuolo, S., Schippa, S., Zagaglia, C., Grossi, M., & Nicoletti, M. (2015). The *Shigella flexneri* OspB effector: an early immunomodulator. *International Journal of Medical Microbiology*, *305*(1), 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.11.004>
- Antharam, V. C., Li, E. C., Ishmael, A., Sharma, A., Mai, V., Rand, K. H., & Wang, G. P. (2013). Intestinal dysbiosis and depletion of butyrogenic bacteria in *Clostridium difficile* infection and nosocomial diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, *51*(9), 2884–2892. <https://doi.org/10.1128/JCM.00845-13>
- Arbibe, L., Kim, D. W., Batsche, E., Pedron, T., Mateescu, B., Muchardt, C., Parsot, C., & Sansonetti, P. J. (2007). An injected bacterial effector targets chromatin access for transcription factor NF- κ B to alter transcription of host genes involved in immune responses. *Nature Immunology*, *8*(1), 47–56. <https://doi.org/10.1038/ni1423>
- Ashida, H., Kim, M., Schmidt-Supprian, M., Ma, A., Ogawa, M., & Sasakawa, C. (2010). A bacterial E3 ubiquitin ligase IpaH9.8 targets NEMO/IKK γ to dampen the host NF- κ B-mediated inflammatory response. *Nature Cell Biology*, *12*(1), 66–73. <https://doi.org/10.1038/ncb2006>
- Ashida, H., Nakano, H., & Sasakawa, C. (2013). *Shigella* IpaH0722 E3 Ubiquitin Ligase Effector Targets TRAF2 to Inhibit PKC–NF- κ B Activity in Invaded Epithelial Cells. *PLoS Pathogens*, *9*(6), e1003409. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003409>

- Ashida, H., Toyotome, T., Nagai, T., & Sasakawa, C. (2007). *Shigella* chromosomal IpaH proteins are secreted via the type III secretion system and act as effectors. *Molecular Microbiology*, 63(3), 680–693. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05547.x>
- Bäckhed, F., Fraser, C. M., Ringel, Y., Sanders, M. E., Sartor, R. B., Sherman, P. M., Versalovic, J., Young, V., & Finlay, B. B. (2012). Defining a healthy human gut microbiome: Current concepts, future directions, and clinical applications. In *Cell Host and Microbe* (Vol. 12, Issue 5, pp. 611–622). <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.10.012>
- Baj, A., Moro, E., Bistoletti, M., Orlandi, V., Crema, F., & Giaroni, C. (2019). Glutamatergic Signaling Along The Microbiota-Gut-Brain Axis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1482. <https://doi.org/10.3390/ijms20061482>
- Baker, K. S., Dallman, T. J., Ashton, P. M., Day, M., Hughes, G., Crook, P. D., Gilbert, V. L., Zittermann, S., Allen, V. G., Howden, B. P., Tomita, T., Valcanis, M., Harris, S. R., Connor, T. R., Sintchenko, V., Howard, P., Brown, J. D., Petty, N. K., Gouali, M., ... Thomson, N. R. (2015). Intercontinental dissemination of azithromycin-resistant shigellosis through sexual transmission: a cross-sectional study. *The Lancet Infectious Diseases*, 15(8), 913–921. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00002-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00002-X)
- Baker, K. S., Dallman, T. J., Field, N., Childs, T., Mitchell, H., Day, M., Weill, F.-X., Lefèvre, S., Tourdjman, M., Hughes, G., Jenkins, C., & Thomson, N. (2018). Horizontal antimicrobial resistance transfer drives epidemics of multiple *Shigella* species. *Nature Communications*, 9(1), 1462. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03949-8>
- Bardhan, P., Faruque, A. S. G., Naheed, A., & Sack, D. A. (2010). Decrease in shigellosis-related deaths without *Shigella* spp.-specific interventions, Asia. *Emerging Infectious Diseases*, 16(11), 1718–1723. <https://doi.org/10.3201/eid1611.090934>
- Barta, M. L., Guragain, M., Adam, P., Dickenson, N. E., Patil, M., Geisbrecht, B. V., Picking, W. L., & Picking, W. D. (2012). Identification of the bile salt binding site on IpaD from *Shigella flexneri* and the influence of ligand binding on IpaD structure. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 80(3), 935–945. <https://doi.org/10.1002/prot.23251>
- Bârză, S., Benjelloun-Touimi, Z., Phalipon, A., Sansonetti, P., & Parsot, C. (1997). Functional analysis of the *Shigella flexneri* IpaC invasin by insertional mutagenesis. *Infection and Immunity*, 65(5), 1599–1605. <https://doi.org/10.1128/iai.65.5.1599-1605.1997>
- Baxt, L. A., & Goldberg, M. B. (2014a). Host and Bacterial Proteins That Repress Recruitment of LC3 to *Shigella* Early during Infection. *PLoS ONE*, 9(4), e94653. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094653>
- Baxt, L. A., & Goldberg, M. B. (2014b). Host and bacterial proteins that repress recruitment of LC3 to *Shigella* early during infection. *PloS One*, 9(4), e94653. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094653>
- Beloin, C., & Dorman, C. J. (2003). An extended role for the nucleoid structuring protein H-NS in the virulence gene regulatory cascade of *Shigella flexneri*. *Molecular Microbiology*, 47(3), 825–838. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03347.x>
- Bendridi, N., Selmi, A., Balcerczyk, A., & Pirola, L. (2022). Ketone Bodies as Metabolites and Signalling Molecules at the Crossroad between Inflammation and Epigenetic Control of Cardiometabolic Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), 14564. <https://doi.org/10.3390/ijms232314564>
- Bergounioux, J., Elisee, R., Prunier, A.-L., Donnadieu, F., Sperandio, B., Sansonetti, P., & Arbibe, L. (2012). Calpain Activation by the *Shigella flexneri* Effector VirA Regulates Key Steps in the Formation and Life of the Bacterium's Epithelial Niche. *Cell Host & Microbe*, 11(3), 240–252. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.01.013>

- Bernardini, M. L., Mounier, J., d'Hauteville, H., Coquis-Rondon, M., & Sansonetti, P. J. (1989). Identification of icsA, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(10), 3867–3871. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.10.3867>
- Binder, S. (2010). Branched-Chain Amino Acid Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis Book*, 8, e0137. <https://doi.org/10.1199/tab.0137>
- Black, R. E., Cousens, S., Johnson, H. L., Lawn, J. E., Rudan, I., Bassani, D. G., Jha, P., Campbell, H., Walker, C. F., Cibulskis, R., Eisele, T., Liu, L., & Mathers, C. (2010). Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *The Lancet*, 375(9730), 1969–1987. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60549-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60549-1)
- Blocker, A., Gounon, P., Larquet, E., Niebuhr, K., Cabiaux, V., Parsot, C., & Sansonetti, P. (1999). The Tripartite Type III Secretion of *Shigella flexneri* Inserts IpaB and IpaC into Host Membranes. *The Journal of Cell Biology*, 147(3), 683–693. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.3.683>
- Bolla, Caretto, Laurenzi, Scavini, & Piemonti. (2019). Low-Carb and Ketogenic Diets in Type 1 and Type 2 Diabetes. *Nutrients*, 11(5), 962. <https://doi.org/10.3390/nu11050962>
- Bottacini, F., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2017). Omics of bifidobacteria: research and insights into their health-promoting activities. *The Biochemical Journal*, 474(24), 4137–4152. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160756>
- Branco, A. F., Ferreira, A., Simões, R. F., Magalhães-Novais, S., Zehowski, C., Cope, E., Silva, A. M., Pereira, D., Sardão, V. A., & Cunha-Oliveira, T. (2016). Ketogenic diets: from cancer to mitochondrial diseases and beyond. *European Journal of Clinical Investigation*, 46(3), 285–298. <https://doi.org/10.1111/eci.12591>
- Bronner, D. N., Faber, F., Olsan, E. E., Byndloss, M. X., Sayed, N. A., Xu, G., Yoo, W., Kim, D., Ryu, S., Lebrilla, C. B., & Bäuml, A. J. (2018). Genetic Ablation of Butyrate Utilization Attenuates Gastrointestinal Salmonella Disease. *Cell Host & Microbe*, 23(2), 266–273.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.01.004>
- Brotcke Zumsteg, A., Goosmann, C., Brinkmann, V., Morona, R., & Zychlinsky, A. (2014). IcsA is a *Shigella flexneri* adhesin regulated by the type III secretion system and required for pathogenesis. *Cell Host & Microbe*, 15(4), 435–445. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.03.001>
- Brotcke Zumsteg, A., Goosmann, C., Brinkmann, V., Morona, R., & Zychlinsky, A. (2014). IcsA Is a *Shigella flexneri* Adhesin Regulated by the Type III Secretion System and Required for Pathogenesis. *Cell Host & Microbe*, 15(4), 435–445. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.03.001>
- Bryant, W. A., Stentz, R., Le Gall, G., Sternberg, M. J. E., Carding, S. R., & Wilhelm, T. (2017). In Silico Analysis of the Small Molecule Content of Outer Membrane Vesicles Produced by *Bacteroides thetaiotaomicron* Indicates an Extensive Metabolic Link between Microbe and Host. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2440. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02440>
- Buchrieser, C., Glaser, P., Rusniok, C., Nedjari, H., D'Hauteville, H., Kunst, F., Sansonetti, P., & Parsot, C. (2000). The virulence plasmid pWR100 and the repertoire of proteins secreted by the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. *Molecular Microbiology*, 38(4), 760–771. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02179.x>
- Burnaevskiy, N., Fox, T. G., Plymire, D. A., Ertelt, J. M., Weigele, B. A., Selyunin, A. S., Way, S. S., Patrie, S. M., & Alto, N. M. (2013). Proteolytic elimination of N-myristoyl modifications by the *Shigella* virulence factor IpaJ. *Nature*, 496(7443), 106–109. <https://doi.org/10.1038/nature12004>

- Burnaevskiy, N., Peng, T., Reddick, L. E., Hang, H. C., & Alto, N. M. (2015). Myristoylome Profiling Reveals a Concerted Mechanism of ARF GTPase Deacylation by the Bacterial Protease IpaJ. *Molecular Cell*, *58*(1), 110–122. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.040>
- Byndloss, M. X., & Bäumlner, A. J. (2018). The germ-organ theory of non-communicable diseases. *Nature Reviews. Microbiology*, *16*(2), 103–110. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.158>
- Byndloss, M. X., Olsan, E. E., Rivera-Chávez, F., Tiffany, C. R., Cevallos, S. A., Lokken, K. L., Torres, T. P., Byndloss, A. J., Faber, F., Gao, Y., Litvak, Y., Lopez, C. A., Xu, G., Napoli, E., Giulivi, C., Tsoilis, R. M., Revzin, A., Lebrilla, C. B., & Bäumlner, A. J. (2017). Microbiota-activated PPAR- γ signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. *Science (New York, N.Y.)*, *357*(6351), 570–575. <https://doi.org/10.1126/science.aam9949>
- Cahenzli, J., Köller, Y., Wyss, M., Geuking, M. B., & McCoy, K. D. (2013). Intestinal microbial diversity during early-life colonization shapes long-term IgE levels. *Cell Host and Microbe*, *14*(5), 559–570. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.10.004>
- Campbell-Valois, F.-X., Schnupf, P., Nigro, G., Sachse, M., Sansonetti, P. J., & Parsot, C. (2014a). A Fluorescent Reporter Reveals On/Off Regulation of the Shigella Type III Secretion Apparatus during Entry and Cell-to-Cell Spread. *Cell Host & Microbe*, *15*(2), 177–189. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.005>
- Campbell-Valois, F.-X., Schnupf, P., Nigro, G., Sachse, M., Sansonetti, P. J., & Parsot, C. (2014b). A fluorescent reporter reveals on/off regulation of the Shigella type III secretion apparatus during entry and cell-to-cell spread. *Cell Host & Microbe*, *15*(2), 177–189. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.005>
- Carlos Martín Zoppino, F., Damián Militello, R., Slavin, I., Álvarez, C., & Colombo, M. I. (2010). Autophagosome Formation Depends on the Small GTPase Rab1 and Functional ER Exit Sites. *Traffic*, *11*(9), 1246–1261. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01086.x>
- Castilla-Guerra, L., Fernández-Moreno, M. del C., López-Chozas, J. M., & Fernández-Bolaños, R. (2006). Electrolytes Disturbances and Seizures. *Epilepsia*, *47*(12), 1990–1998. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00861.x>
- Centers for Disease Control (CDC). (1988). Shigella dysenteriae type 1 in tourists to Cancun, Mexico. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, *37*(31), 465. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3135475>
- Chang, C.-H., Lin, C.-H., & Lane, H.-Y. (2020). d-glutamate and Gut Microbiota in Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(8), 2676. <https://doi.org/10.3390/ijms21082676>
- Chao, A., & Jost, L. (2012). Coverage-based rarefaction and extrapolation: standardizing samples by completeness rather than size. *Ecology*, *93*(12), 2533–2547. <https://doi.org/10.1890/11-1952.1>
- Charo, I. F. (2007). Macrophage polarization and insulin resistance: PPAR γ in control. *Cell Metabolism*, *6*(2), 96–98. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.07.006>
- Cherla, R. P., Lee, S. Y., & Tesh, V. L. (2003). Shiga toxins and apoptosis. In *FEMS Microbiology Letters* (Vol. 228, Issue 2, pp. 159–166). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00761-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00761-4)
- Cho, I., & Blaser, M. J. (2012). The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics*, *13*(4), 260–270. <https://doi.org/10.1038/nrg3182>
- Collins, J., Borojevic, R., Verdu, E. F., Huizinga, J. D., & Ratcliffe, E. M. (2014). Intestinal microbiota influence the early postnatal development of the enteric nervous system. *Neurogastroenterology and Motility*, *26*(1), 98–107. <https://doi.org/10.1111/nmo.12236>
- Coyne, M. J., Béchon, N., Matano, L. M., McEneaney, V. L., Chatzidaki-Livanis, M., & Comstock, L. E. (2019). A family of anti-Bacteroidales peptide toxins wide-spread in the human gut

- microbiota. *Nature Communications*, 10(1), 3460. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11494-1>
- Coyne, M. J., & Comstock, L. E. (2019). Type VI Secretion Systems and the Gut Microbiota. *Microbiology Spectrum*, 7(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PSIB-0009-2018>
- Coyne, M. J., Roelofs, K. G., & Comstock, L. E. (2016). Type VI secretion systems of human gut Bacteroidales segregate into three genetic architectures, two of which are contained on mobile genetic elements. *BMC Genomics*, 17, 58. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2377-z>
- Dadonaite, B., Ritchie, H., Roser, M. (n.d.). *Diarrheal diseases*. 2018. Retrieved June 9, 2020, from <https://ourworldindata.org/diarrheal-diseases>
- Dalal, S. R., & Chang, E. B. (2014). The microbial basis of inflammatory bowel diseases. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 124, Issue 10, pp. 4190–4196). American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI72330>
- Dashti, H. M., Mathew, T. C., Khadada, M., Al-Mousawi, M., Talib, H., Asfar, S. K., Behbahani, A. I., & Al-Zaid, N. S. (2007). Beneficial effects of ketogenic diet in obese diabetic subjects. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 302(1–2), 249–256. <https://doi.org/10.1007/s11010-007-9448-z>
- Datta, N., & Olarte, J. (1974). R Factors in Strains of Salmonella typhi and Shigella dysenteriae 1 Isolated During Epidemics in Mexico: Classification by Compatibility. In *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* (Vol. 5, Issue 3).
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. V., Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S. B., Dutton, R. J., & Turnbaugh, P. J. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505(7484), 559–563. <https://doi.org/10.1038/nature12820>
- De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., Zitoun, C., Duchamp, A., Bäckhed, F., & Mithieux, G. (2016). Microbiota-Produced Succinate Improves Glucose Homeostasis via Intestinal Gluconeogenesis. *Cell Metabolism*, 24(1), 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.06.013>
- de Vadder, F., & Mithieux, G. (2018). Gut-brain signaling in energy homeostasis: the unexpected role of microbiota-derived succinate. *The Journal of Endocrinology*, 236(2), R105–R108. <https://doi.org/10.1530/JOE-17-0542>
- Derrien, M., Alvarez, A.-S., & de Vos, W. M. (2019). The Gut Microbiota in the First Decade of Life. *Trends in Microbiology*, 27(12), 997–1010. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.08.001>
- Di Martino, M. L., Falconi, M., Micheli, G., Colonna, B., & Prosseda, G. (2016). The Multifaceted Activity of the VirF Regulatory Protein in the Shigella Lifestyle. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 3, 61. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2016.00061>
- Diarrhea - NIDDK*. (n.d.). Retrieved February 3, 2024, from <https://www.niddk.nih.gov/health-information/digestive-diseases/diarrhea>
- Diarrhoeal disease*. (n.d.). Retrieved February 3, 2024, from <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>
- Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., & Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(26), 11971–11975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002601107>
- Dong, N., Zhu, Y., Lu, Q., Hu, L., Zheng, Y., & Shao, F. (2012). Structurally Distinct Bacterial TBC-like GAPs Link Arp GTPase to Rab1 Inactivation to Counteract Host Defenses. *Cell*, 150(5), 1029–1041. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.050>

- D'Souza-Schorey, C., & Chavrier, P. (2006). ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(5), 347–358. <https://doi.org/10.1038/nrm1910>
- Du, J., Reeves, A. Z., Klein, J. A., Twedt, D. J., Knodler, L. A., & Lesser, C. F. (2016). The type III secretion system apparatus determines the intracellular niche of bacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(17), 4794–4799. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520699113>
- DuPont, H. L., Levine, M. M., Hornick, R. B., & Formal, S. B. (1989). Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. *The Journal of Infectious Diseases*, 159(6).
- Duszka, K., Oresic, M., Le May, C., König, J., & Wahli, W. (2017). PPAR γ Modulates Long Chain Fatty Acid Processing in the Intestinal Epithelium. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12). <https://doi.org/10.3390/ijms18122559>
- Egile, C., Loisel, T. P., Laurent, V., Li, R., Pantaloni, D., Sansonetti, P. J., & Carlier, M.-F. (1999). Activation of the Cdc42 Effector N-Wasp by the *Shigella flexneri* IcsA Protein Promotes Actin Nucleation by Arp2/3 Complex and Bacterial Actin-Based Motility. *The Journal of Cell Biology*, 146(6), 1319–1332. <https://doi.org/10.1083/jcb.146.6.1319>
- Elhenawy, W., Debelyy, M. O., & Feldman, M. F. (2014). Preferential packing of acidic glycosidases and proteases into Bacteroides outer membrane vesicles. *mBio*, 5(2), e00909-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.00909-14>
- Enders, J., Jack, J., Thomas, S., Lynch, P., Lasnier, S., Cao, X., Swanson, M. T., Ryals, J. M., Thyfault, J. P., Puchalska, P., Crawford, P. A., & Wright, D. E. (2023). Ketolysis is required for the proper development and function of the somatosensory nervous system. *Experimental Neurology*, 365, 114428. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2023.114428>
- Esparza-Aguilar, M., Bautista-Márquez, A., González-Andrade, M. del C., & Richardson-López-Collada, V. L. (2009). Mortalidad por enfermedad diarreica en menores, antes y después de la introducción de la vacuna contra el rotavirus. *Salud Pública de México*, 51(4), 285–290.
- Espina, M., Olive, A. J., Kenjale, R., Moore, D. S., Ausar, S. F., Kaminski, R. W., Oaks, E. V., Middaugh, C. R., Picking, W. D., & Picking, W. L. (2006). IpaD Localizes to the Tip of the Type III Secretion System Needle of *Shigella flexneri*. *Infection and Immunity*, 74(8), 4391–4400. <https://doi.org/10.1128/IAI.00440-06>
- Estrada-Garcia, T., Lopez-Saucedo, C., Thompson-Bonilla, R., Abonce, M., Lopez-Hernandez, D., Santos, J. I., Rosado, J. L., DuPont, H. L., & Long, K. Z. (2009). Association of Diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes with Infection and Diarrhea among Mexican Children and Association of Atypical Enteropathogenic *E. coli* with Acute Diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(1), 93–98. <https://doi.org/10.1128/JCM.01166-08>
- Faherty, C. S., Redman, J. C., Rasko, D. A., Barry, E. M., & Nataro, J. P. (2012). *Shigella flexneri* effectors OspE1 and OspE2 mediate induced adherence to the colonic epithelium following bile salts exposure. *Molecular Microbiology*, 85(1), 107–121. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08092.x>
- Fan, Y.-Y., Davidson, L. A., Callaway, E. S., Wright, G. A., Safe, S., & Chapkin, R. S. (2015). A bioassay to measure energy metabolism in mouse colonic crypts, organoids, and sorted stem cells. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 309(1), G1-9. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00052.2015>
- Farfán, M. J., Toro, C. S., Barry, E. M., & Nataro, J. P. (2011). *Shigella* enterotoxin-2 is a type III effector that participates in *Shigella* -induced interleukin 8 secretion by epithelial cells. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 61(3), 332–339. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00778.x>

- Fasano, A., Noriega, F. R., Liao, F. M., Wang, W., Levine, M. M., Fasano R Noriega FM Liao W Wang MM Levine, A. F., & Fasano, A. (1997). Effect of shigella enterotoxin 1 (ShET1) on rabbit intestine in vitro and in vivo Gastroenterology and Nutrition A Fasano Center for Vaccine. In *Gut* (Vol. 40).
- Flint, H. J., Scott, K. P., Duncan, S. H., Louis, P., & Forano, E. (2012). Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes*, 3(4), 289–306. <https://doi.org/10.4161/gmic.19897>
- Foley, M. H., Cockburn, D. W., & Koropatkin, N. M. (2016). The Sus operon: a model system for starch uptake by the human gut Bacteroidetes. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 73(14), 2603–2617. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2242-x>
- Foley, M. H., O’Flaherty, S., Barrangou, R., & Theriot, C. M. (2019). Bile salt hydrolases: Gatekeepers of bile acid metabolism and host-microbiome crosstalk in the gastrointestinal tract. *PLoS Pathogens*, 15(3), e1007581. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007581>
- Forbes, J. D., Azad, M. B., Vehling, L., Tun, H. M., Konya, T. B., Guttman, D. S., Field, C. J., Lefebvre, D., Sears, M. R., Becker, A. B., Mandhane, P. J., Turvey, S. E., Moraes, T. J., Subbarao, P., Scott, J. A., & Kozyrskyj, A. L. (2018). Association of Exposure to Formula in the Hospital and Subsequent Infant Feeding Practices With Gut Microbiota and Risk of Overweight in the First Year of Life. *JAMA Pediatrics*, 172(7), e181161. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2018.1161>
- Fujio-Vejar, S., Vasquez, Y., Morales, P., Magne, F., Vera-Wolf, P., Ugalde, J. A., Navarrete, P., & Gotteland, M. (2017). The Gut Microbiota of Healthy Chilean Subjects Reveals a High Abundance of the Phylum Verrucomicrobia. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1221. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01221>
- Furuta, G. T., Turner, J. R., Taylor, C. T., Hershberg, R. M., Comerford, K., Narravula, S., Podolsky, D. K., & Colgan, S. P. (2001). Hypoxia-inducible factor 1-dependent induction of intestinal trefoil factor protects barrier function during hypoxia. *The Journal of Experimental Medicine*, 193(9), 1027–1034. <https://doi.org/10.1084/jem.193.9.1027>
- Gallardo, P., Izquierdo, M., Vidal, R. M., Chamorro-Veloso, N., Rosselló-Móra, R., O’Ryan, M., & Farfán, M. J. (2017). Distinctive Gut Microbiota Is Associated with Diarrheagenic Escherichia coli Infections in Chilean Children. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 424. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00424>
- Gallardo, P., Izquierdo, M., Vidal, R. M., Soto, F., Ossa, J. C., & Farfan, M. J. (2020). Gut Microbiota-Metabolome Changes in Children With Diarrhea by Diarrheagenic E. coli. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00485>
- Garza-Mayers, A. C., Miller, K. A., Russo, B. C., Nagda, D. V., & Goldberg, M. B. (2015). Shigella flexneri Regulation of ARF6 Activation during Bacterial Entry via an IpgD-Mediated Positive Feedback Loop. *mBio*, 6(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.02584-14>
- Gebrekidan Kahsay, A., & Teklemariam, Z. (2015). Prevalence of Shigella among diarrheic children under-5 years of age attending at Mekelle health center, north Ethiopia. *BMC Research Notes*, 8(1), 788. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1752-1>
- Genre, A., Lanfranco, L., Perotto, S., & Bonfante, P. (2020). Unique and common traits in mycorrhizal symbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 18(11), 649–660. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0402-3>
- Gérard, P. (2013). Metabolism of cholesterol and bile acids by the gut microbiota. *Pathogens*, 3(1), 14–24. <https://doi.org/10.3390/pathogens3010014>
- Gillis, C. C., Hughes, E. R., Spiga, L., Winter, M. G., Zhu, W., Furtado de Carvalho, T., Chanin, R. B., Behrendt, C. L., Hooper, L. V., Santos, R. L., & Winter, S. E. (2018). Dysbiosis-Associated

- Change in Host Metabolism Generates Lactate to Support Salmonella Growth. *Cell Host & Microbe*, 23(1), 54-64.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.11.006>
- Gipson, A. B., Morton, K. J., Rhee, R. J., Simo, S., Clayton, J. A., Perrett, M. E., Binkley, C. G., Jensen, E. L., Oakes, D. L., Rouhier, M. F., & Rouhier, K. A. (2017). Disruptions in valine degradation affect seed development and germination in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 90(6), 1029–1039. <https://doi.org/10.1111/tpj.13538>
- Gomez-Arango, L. F., Barrett, H. L., Wilkinson, S. A., Callaway, L. K., McIntyre, H. D., Morrison, M., & Dekker Nitert, M. (2018). Low dietary fiber intake increases Collinsella abundance in the gut microbiota of overweight and obese pregnant women. *Gut Microbes*, 9(3), 189–201. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1406584>
- Gore, A. L., & Payne, S. M. (2010). CsrA and Cra influence Shigella flexneri pathogenesis. *Infection and Immunity*, 78(11), 4674–4682. <https://doi.org/10.1128/IAI.00589-10>
- Gray, M. D., Lampel, K. A., Strockbine, N. A., Fernandez, R. E., Melton-Celsa, A. R., & Maurelli, A. T. (2014). Clinical Isolates of Shiga Toxin 1a–Producing *Shigella flexneri* with an Epidemiological Link to Recent Travel to Hispaniola. *Emerging Infectious Diseases*, 20(10), 1669–1677. <https://doi.org/10.3201/eid2010.140292>
- Grishin, A. M., Condos, T. E. C., Barber, K. R., Campbell-Valois, F.-X., Parsot, C., Shaw, G. S., & Cygler, M. (2014). Structural Basis for the Inhibition of Host Protein Ubiquitination by Shigella Effector Kinase OspG. *Structure*, 22(6), 878–888. <https://doi.org/10.1016/j.str.2014.04.010>
- Gritsenko, V. A., & Bukharin, O. V. (2000). [The ecological and medical aspects of the symbiosis between Escherichia coli and man]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii*, 3, 92–99.
- Grondin, J. M., Tamura, K., Déjean, G., Abbott, D. W., & Brumer, H. (2017). Polysaccharide Utilization Loci: Fueling Microbial Communities. *Journal of Bacteriology*, 199(15). <https://doi.org/10.1128/JB.00860-16>
- Gruber, A. (2019). What's in a name? How organelles of endosymbiotic origin can be distinguished from endosymbionts. *Microbial Cell*, 6(2), 123–133. <https://doi.org/10.15698/mic2019.02.668>
- Gu, B., Cao, Y., Pan, S., Zhuang, L., Yu, R., Peng, Z., Qian, H., Wei, Y., Zhao, L., Liu, G., & Tong, M. (2012). Comparison of the prevalence and changing resistance to nalidixic acid and ciprofloxacin of Shigella between Europe–America and Asia–Africa from 1998 to 2009. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40(1), 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.02.005>
- Guerrant, R. L., Van Gilder, T., Slutsker, L., Tauxe, R. V., Hennessy, T., Griffin, P. M., Pickering, L. K., Steiner, T. S., Thielman, N. M., DuPont, H., Bradley Sack, R., Tarr, P., Neill, M., Nachamkin, I., Reller, L. B., Osterholm, M. T., & Bennish, M. L. (2001). Practice Guidelines for the Management of Infectious Diarrhea. *Clinical Infectious Diseases*, 32(3), 331–351. <https://doi.org/10.1086/318514>
- Guichon, A., Hersh, D., Smith, M. R., & Zychlinsky, A. (2001). Structure-Function Analysis of the Shigella Virulence Factor IpaB. *Journal of Bacteriology*, 183(4), 1269–1276. <https://doi.org/10.1128/JB.183.4.1269-1276.2001>
- Hachani, A., Biskri, L., Rossi, G., Marty, A., Ménard, R., Sansonetti, P., Parsot, C., Van Nhieu, G. T., Bernardini, M. L., & Allaoui, A. (2008). IpgB1 and IpgB2, two homologous effectors secreted via the Mxi-Spa type III secretion apparatus, cooperate to mediate polarized cell invasion and inflammatory potential of Shigella flexneri. *Microbes and Infection*, 10(3), 260–268. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.11.011>

- Haidar-Ahmad, N., Manigat, F. O., Silué, N., Pontier, S. M., & Campbell-Valois, F.-X. (2023). A Tale about Shigella: Evolution, Plasmid, and Virulence. *Microorganisms*, *11*(7). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071709>
- Harper, A. E., Miller, R. H., & Block, K. P. (1984). Branched-Chain Amino Acid Metabolism. *Annual Review of Nutrition*, *4*(1), 409–454. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.04.070184.002205>
- Hartman, R. M., Cohen, A. L., Antoni, S., Mwenda, J., Weldegebriel, G., Biey, J., Shaba, K., de Oliveira, L., Rey, G., Ortiz, C., Tereza, M., Fahmy, K., Ghoniem, A., Ashmony, H., Videbaek, D., Singh, S., Tondo, E., Sharifuzzaman, M., Liyanage, J., ... Nakamura, T. (2023). Risk Factors for Mortality Among Children Younger Than Age 5 Years With Severe Diarrhea in Low- and Middle-income Countries: Findings From the World Health Organization-coordinated Global Rotavirus and Pediatric Diarrhea Surveillance Networks. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *76*(3), e1047–e1053. <https://doi.org/10.1093/cid/ciac561>
- Hayward, R. D. (1999). Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive Salmonella. *The EMBO Journal*, *18*(18), 4926–4934. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.18.4926>
- Herwana, E., Surjawidjaja, J. E., Salim, O. C., Indriani, N., Bukitwetan, P., & Lesmana, M. (2010). SHIGELLA-ASSOCIATED DIARRHEA IN CHILDREN IN SOUTH JAKARTA, INDONESIA. In *Jl. Kyai Tapa* (Vol. 260, Issue 2).
- Hidalgo-Cantabrana, C., Delgado, S., Ruiz, L., Ruas-Madiedo, P., Sánchez, B., & Margolles, A. (2017). Bifidobacteria and Their Health-Promoting Effects. *Microbiology Spectrum*, *5*(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.BAD-0010-2016>
- High, N., Mounier, J., Prévost, M. C., & Sansonetti, P. J. (1992). IpaB of Shigella flexneri causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole. *The EMBO Journal*, *11*(5), 1991–1999. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05253.x>
- Hollister, E. B., Riehle, K., Luna, R. A., Weidler, E. M., Rubio-Gonzales, M., Mistretta, T. A., Raza, S., Doddapaneni, H. V., Metcalf, G. A., Muzny, D. M., Gibbs, R. A., Petrosino, J. F., Shulman, R. J., & Versalovic, J. (2015). Structure and function of the healthy pre-adolescent pediatric gut microbiome. *Microbiome*, *3*, 36. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0101-x>
- Holt, K. E., Baker, S., Weill, F.-X., Holmes, E. C., Kitchen, A., Yu, J., Sangal, V., Brown, D. J., Coia, J. E., Kim, D. W., Choi, S. Y., Kim, S. H., da Silveira, W. D., Pickard, D. J., Farrar, J. J., Parkhill, J., Dougan, G., & Thomson, N. R. (2012). Shigella sonnei genome sequencing and phylogenetic analysis indicate recent global dissemination from Europe. *Nature Genetics*, *44*(9), 1056–1059. <https://doi.org/10.1038/ng.2369>
- Holt, K. E., Thieu Nga, T. V., Thanh, D. P., Vinh, H., Kim, D. W., Vu Tra, M. P., Campbell, J. I., Hoang, N. V. M., Vinh, N. T., Minh, P. Van, Thuy, C. T., Nga, T. T. T., Thompson, C., Dung, T. T. N., Nhu, N. T. K., Vinh, P. V., Tuyet, P. T. N., Phuc, H. Le, Lien, N. T. N., ... Baker, S. (2013). Tracking the establishment of local endemic populations of an emergent enteric pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(43), 17522–17527. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308632110>
- Hong, M., Gleason, Y., Wyckoff, E. E., & Payne, S. M. (1998). Identification of two Shigella flexneri chromosomal loci involved in intercellular spreading. *Infection and Immunity*, *66*(10), 4700–4710. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.10.4700-4710.1998>
- Hong, M., & Payne, S. M. (1997). Effect of mutations in Shigella flexneri chromosomal and plasmid-encoded lipopolysaccharide genes on invasion and serum resistance. *Molecular Microbiology*, *24*(4), 779–791. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.3731744.x>

- Hooper, L., Bunn, D., Jimoh, F. O., & Fairweather-Tait, S. J. (2014). Water-loss dehydration and aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 136–137, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2013.11.009>
- Hou, K., Wu, Z.-X., Chen, X.-Y., Wang, J.-Q., Zhang, D., Xiao, C., Zhu, D., Koya, J. B., Wei, L., Li, J., & Chen, Z.-S. (2022). Microbiota in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 135. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4>
- Huang, J., & Brumell, J. H. (2014). Bacteria–autophagy interplay: a battle for survival. *Nature Reviews Microbiology*, 12(2), 101–114. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3160>
- Huang, Y., Reimann, J., Singh, L. M. R., & Adelroth, P. (2010). Substrate binding and the catalytic reactions in cbb3-type oxidases: the lipid membrane modulates ligand binding. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797(6–7), 724–731. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.03.016>
- Huang, Z., Sutton, S. E., Wallenfang, A. J., Orchard, R. C., Wu, X., Feng, Y., Chai, J., & Alto, N. M. (2009). Structural insights into host GTPase isoform selection by a family of bacterial GEF mimics. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(8), 853–860. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1647>
- Iancu, M. A., Profir, M., Roşu, O. A., Ionescu, R. F., Cretoiu, S. M., & Gaspar, B. S. (2023). Revisiting the Intestinal Microbiome and Its Role in Diarrhea and Constipation. *Microorganisms*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092177>
- Ingersoll, M. A., & Zychlinsky, A. (2006). ShiA Abrogates the Innate T-Cell Response to *Shigella flexneri* Infection. *Infection and Immunity*, 74(4), 2317–2327. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.4.2317-2327.2006>
- Ito, H., Kido, N., Arakawa, Y., Ohta, M., Sugiyama, T., & Kato, N. (1991). Possible mechanisms underlying the slow lactose fermentation phenotype in *Shigella* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(10), 2912–2917. <https://doi.org/10.1128/aem.57.10.2912-2917.1991>
- Iwai, H., Kim, M., Yoshikawa, Y., Ashida, H., Ogawa, M., Fujita, Y., Muller, D., Kirikae, T., Jackson, P. K., Kotani, S., & Sasakawa, C. (2007). A Bacterial Effector Targets Mad2L2, an APC Inhibitor, to Modulate Host Cell Cycling. *Cell*, 130(4), 611–623. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.043>
- Izard, T., Tran Van Nhieu, G., & Bois, P. R. J. (2006). *Shigella* applies molecular mimicry to subvert vinculin and invade host cells. *The Journal of Cell Biology*, 175(3), 465–475. <https://doi.org/10.1083/jcb.200605091>
- Jones, E. J., Booth, C., Fonseca, S., Parker, A., Cross, K., Miquel-Clopés, A., Hautefort, I., Mayer, U., Wileman, T., Stentz, R., & Carding, S. R. (2020). The Uptake, Trafficking, and Biodistribution of *Bacteroides thetaiotaomicron* Generated Outer Membrane Vesicles. *Frontiers in Microbiology*, 11, 57. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00057>
- Justesen, U., Arrighi, E., Larsen, B. R., & Amado, R. (2000). Degradation of Flavonoid Glycosides and Aglycones During in vitro Fermentation with Human Faecal Flora. *LWT - Food Science and Technology*, 33(6), 424–430. <https://doi.org/10.1006/fstl.2000.0681>
- Kaas, R. S., Friis, C., Ussery, D. W., & Aarestrup, F. M. (2012). Estimating variation within the genes and inferring the phylogeny of 186 sequenced diverse *Escherichia coli* genomes. *BMC Genomics*, 13(1), 577. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-577>
- Kahsay, A. G., & Muthupandian, S. (2016). A review on Sero diversity and antimicrobial resistance patterns of *Shigella* species in Africa, Asia and South America, 2001-2014. *BMC Research Notes*, 9(1), 422. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2236-7>
- Kaiser, L., & Surawicz, C. M. (2012). Infectious causes of chronic diarrhoea. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 26(5), 563–571. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2012.11.001>

- Kalluri, P., Cummings, K. C., Abbott, S., Malcolm, G. B., Hutcheson, K., Beall, A., Joyce, K., Polyak, C., Woodward, D., Caldeira, R., Rodgers, F., Mintz, E. D., & Strockbine, N. (2004). Epidemiological features of a newly described serotype of *Shigella boydii*. *Epidemiology and Infection*, *132*(4), 579–583. <https://doi.org/10.1017/s0950268804002377>
- Katoh, T., Maeshibu, T., Kikkawa, K.-I., Gotoh, A., Tomabeche, Y., Nakamura, M., Liao, W.-H., Yamaguchi, M., Ashida, H., Yamamoto, K., & Katayama, T. (2017). Identification and characterization of a sulfoglycosidase from *Bifidobacterium bifidum* implicated in mucin glycan utilization. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *81*(10), 2018–2027. <https://doi.org/10.1080/09168451.2017.1361810>
- Kelly, S. M., Munoz-Munoz, J., & van Sinderen, D. (2021). Plant Glycan Metabolism by *Bifidobacteria*. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 609418. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.609418>
- Khairy, R. M. M., Fathy, Z. A., Mahrous, D. M., Mohamed, E. S., & Abdelrahim, S. S. (2020). Prevalence, phylogeny, and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* pathotypes isolated from children less than 5 years old with community acquired- diarrhea in Upper Egypt. *BMC Infectious Diseases*, *20*(1), 908. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05664-6>
- Khan, M. U., Roy, N. C., Islam, R., Huq, I., & Stoll, B. (1985). Fourteen years of shigellosis in Dhaka: an epidemiological analysis. *International Journal of Epidemiology*, *14*(4), 607–613. <https://doi.org/10.1093/ije/14.4.607>
- Kim, D. W., Lenzen, G., Page, A.-L., Legrain, P., Sansonetti, P. J., & Parsot, C. (2005). The *Shigella flexneri* effector OspG interferes with innate immune responses by targeting ubiquitin-conjugating enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(39), 14046–14051. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504466102>
- Kobayashi, T., Ogawa, M., Sanada, T., Mimuro, H., Kim, M., Ashida, H., Akakura, R., Yoshida, M., Kawalec, M., Reichhart, J.-M., Mizushima, T., & Sasakawa, C. (2013). The *Shigella* OspC3 Effector Inhibits Caspase-4, Antagonizes Inflammatory Cell Death, and Promotes Epithelial Infection. *Cell Host & Microbe*, *13*(5), 570–583. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.04.012>
- Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight, R., Angenent, L. T., & Ley, R. E. (2011). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(SUPPL. 1), 4578–4585. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000081107>
- Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., & Bäckhed, F. (2016). From Dietary Fiber to Host Physiology_ Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell*, *165*(6).
- Konradt, C., Frigimelica, E., Nothelfer, K., Puhar, A., Salgado-Pabon, W., di Bartolo, V., Scott-Algara, D., Rodrigues, C. D., Sansonetti, P. J., & Phalipon, A. (2011). The *Shigella flexneri* Type Three Secretion System Effector IpgD Inhibits T Cell Migration by Manipulating Host Phosphoinositide Metabolism. *Cell Host & Microbe*, *9*(4), 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.03.010>
- Kosek, M., Bern, C., & Guerrant, R. L. (2003). The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bulletin of the World Health Organization*, *81*(3), 197–204.
- Kotloff, K. L., Blackwelder, W. C., Nasrin, D., Nataro, J. P., Farag, T. H., van Eijk, A., Adegbola, R. A., Alonso, P. L., Breiman, R. F., Golam Faruque, A. S., Saha, D., Sow, S. O., Sur, D., Zaidi, A. K. M., Biswas, K., Panchalingam, S., Clemens, J. D., Cohen, D., Glass, R. I., ... Levine, M. M. (2012). The Global Enteric Multicenter Study (GEMS) of Diarrheal Disease in Infants and Young Children in Developing Countries: Epidemiologic and Clinical Methods of the

- Case/Control Study. *Clinical Infectious Diseases*, 55(suppl_4), S232–S245. <https://doi.org/10.1093/cid/cis753>
- Kotloff, K. L., Nataro, J. P., Blackwelder, W. C., Nasrin, D., Farag, T. H., Panchalingam, S., Wu, Y., Sow, S. O., Sur, D., Breiman, R. F., Faruque, A. S., Zaidi, A. K., Saha, D., Alonso, P. L., Tamboura, B., Sanogo, D., Onwuchekwa, U., Manna, B., Ramamurthy, T., ... Levine, M. M. (2013). Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet (London, England)*, 382(9888), 209–222. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60844-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60844-2)
- Kotloff, K., Riddle Mark S, Platts-Mills, J. A., Pavlinac, P., & Zaidi, A. (2018). Shigellosis. *The Lancet*, 391(10122). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)33296-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33296-8)
- Kundu, P., Blacher, E., Elinav, E., & Pettersson, S. (2017). Our Gut Microbiome: The Evolving Inner Self. In *Cell* (Vol. 171, Issue 7, pp. 1481–1493). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.024>
- Kverka, M., Zakostelska, Z., Klimesova, K., Sokol, D., Hudcovic, T., Hrnčir, T., Rossmann, P., Mrazek, J., Kopecny, J., Verdu, E. F., & Tlaskalova-Hogenova, H. (2011). Oral administration of Parabacteroides distasonis antigens attenuates experimental murine colitis through modulation of immunity and microbiota composition. *Clinical and Experimental Immunology*, 163(2), 250–259. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04286.x>
- Lafont, F. (2002). Initial steps of Shigella infection depend on the cholesterol/sphingolipid raft-mediated CD44-IpaB interaction. *The EMBO Journal*, 21(17), 4449–4457. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf457>
- Lan, R., Alles, M. C., Bonohoe, K., Martinez, M. B., & Reeves, P. R. (2004). Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive Escherichia coli and Shigella spp. *Infection and Immunity*, 72(9), 5080–5088. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.9.5080-5088.2004>
- Lederberg J, & McCray A. (2001). Ome sweet 'omics: – a genealogical treasury of words. *Scientist*, 15(8).
- Lefebvre, M., Paulweber, B., Fajas, L., Woods, J., McCrary, C., Colombel, J. F., Najib, J., Fruchart, J. C., Datz, C., Vidal, H., Desreumaux, P., & Auwerx, J. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is induced during differentiation of colon epithelium cells. *The Journal of Endocrinology*, 162(3), 331–340. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1620331>
- Lewis, C. R., Bonham, K. S., McCann, S. H., Volpe, A. R., D'Sa, V., Naymik, M., De Both, M. D., Huentelman, M. J., Lemery-Chalfant, K., Highlander, S. K., Deoni, S. C. L., & Klepac-Ceraj, V. (2021). Family SES Is Associated with the Gut Microbiome in Infants and Children. *Microorganisms*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081608>
- Li, H., Xu, H., Zhou, Y., Zhang, J., Long, C., Li, S., Chen, S., Zhou, J.-M., & Shao, F. (2007). The Phosphothreonine Lyase Activity of a Bacterial Type III Effector Family. *Science*, 315(5814), 1000–1003. <https://doi.org/10.1126/science.1138960>
- Libby, T., Clogher, P., Wilson, E., Oosmanally, N., Boyle, M., Eikmeier, D., Nicholson, C., McGuire, S., Cieslak, P., Golwalkar, M., Geissler, A., & Vugia, D. (2020). Disparities in Shigellosis Incidence by Census Tract Poverty, Crowding, and Race/Ethnicity in the United States, FoodNet, 2004-2014. *Open Forum Infectious Diseases*, 7(2), ofaa030. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa030>
- Liew, F. Y., Girard, J.-P., & Turnquist, H. R. (2016). Interleukin-33 in health and disease. *Nature Reviews. Immunology*, 16(11), 676–689. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.95>
- Lin, Z., Cai, X., Chen, M., Ye, L., Wu, Y., Wang, X., Lv, Z., Shang, Y., & Qu, D. (2017). Virulence and Stress Responses of Shigella flexneri Regulated by PhoP/PhoQ. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2689. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02689>

- Lindsay, B., Oundo, J., Hossain, M. A., Antonio, M., Tamboura, B., Walker, A. W., Paulson, J. N., Parkhill, J., Omere, R., Faruque, A. S. G., Das, S. K., Ikumapayi, U. N., Adeyemi, M., Sanogo, D., Saha, D., Sow, S., Farag, T. H., Nasrin, D., Li, S., ... Stine, O. C. (2015). Microbiota That Affect Risk for Shigellosis in Children in Low-Income Countries. *Emerging Infectious Diseases*, *21*(2), 242–250. <https://doi.org/10.3201/eid2101.140795>
- Ling, Z., Liu, X., Jia, X., Cheng, Y., Luo, Y., Yuan, L., Wang, Y., Zhao, C., Guo, S., Li, L., Xu, X., & Xiang, C. (2014). Impacts of infection with different toxigenic *Clostridium difficile* strains on faecal microbiota in children. *Scientific Reports*, *4*, 7485. <https://doi.org/10.1038/srep07485>
- Litvak, Y., Byndloss, M. X., & Bäumlér, A. J. (2018). Colonocyte metabolism shapes the gut microbiota. *Science (New York, N.Y.)*, *362*(6418). <https://doi.org/10.1126/science.aat9076>
- Liu, J., Platts-Mills, J. A., Juma, J., Kabir, F., Nkeze, J., Okoi, C., Operario, D. J., Uddin, J., Ahmed, S., Alonso, P. L., Antonio, M., Becker, S. M., Blackwelder, W. C., Breiman, R. F., G Faruque, A. S., Fields, B., Gratz, J., Haque, R., Hossain, A., ... Houpt, E. R. (2016). Use of quantitative molecular diagnostic methods to identify causes of diarrhoea in children: a reanalysis of the GEMS case-control study. In *www.thelancet.com* (Vol. 388). www.thelancet.com
- Lu, J., Mao, D., Li, X., Ma, Y., Luan, Y., Cao, Y., & Luan, Y. (2020). Changes of intestinal microflora diversity in diarrhea model of KM mice and effects of *Psidium guajava* L. as the treatment agent for diarrhea. *Journal of Infection and Public Health*, *13*(1), 16–26. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.04.015>
- Lu, R., Herrera, B. B., Eshleman, H. D., Fu, Y., Bloom, A., Li, Z., Sacks, D. B., & Goldberg, M. B. (2015). Shigella Effector OspB Activates mTORC1 in a Manner That Depends on IQGAP1 and Promotes Cell Proliferation. *PLOS Pathogens*, *11*(10), e1005200. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005200>
- Lupp, C., Robertson, M. L., Wickham, M. E., Sekirov, I., Champion, O. L., Gaynor, E. C., & Finlay, B. B. (2007). Host-Mediated Inflammation Disrupts the Intestinal Microbiota and Promotes the Overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell Host and Microbe*, *2*(2), 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.06.010>
- Ma, J., Li, Z., Zhang, W., Zhang, C., Zhang, Y., Mei, H., Zhuo, N., Wang, H., Wang, L., & Wu, D. (2020). Comparison of gut microbiota in exclusively breast-fed and formula-fed babies: a study of 91 term infants. *Scientific Reports*, *10*(1), 15792. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72635-x>
- Magurran, A. E. (2004). *Measuring biological diversity*. Blackwell Publishing.
- Mai, S.-N. T., Bodhidatta, L., Turner, P., Wangchuk, S., Ha Thanh, T., Voong Vinh, P., Pham, D. T., Rabaa, M. A., Thwaites, G. E., Thomson, N. R., Baker, S., & Chung The, H. (2021). The evolutionary history of *Shigella flexneri* serotype 6 in Asia. *Microbial Genomics*, *7*(12). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000736>
- Markle, J. G. M., Frank, D. N., Mortin-Toth, S., Robertson, C. E., Feazel, L. M., Rolle-Kampczyk, U., von Bergen, M., McCoy, K. D., Macpherson, A. J., & Danska, J. S. (2013). Sex Differences in the Gut Microbiome Drive Hormone-Dependent Regulation of Autoimmunity. *Science*, *339*(6123), 1084–1088. <https://doi.org/10.1126/science.1233521>
- Marsh, P. D. (2006). Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. *BMC Oral Health*, *6*(S1), S14. <https://doi.org/10.1186/1472-6831-6-S1-S14>
- Marteyn, B., West, N. P., Browning, D. F., Cole, J. A., Shaw, J. G., Palm, F., Mounier, J., Prévost, M.-C., Sansonetti, P., & Tang, C. M. (2010). Modulation of *Shigella* virulence in response to available oxygen in vivo. *Nature*, *465*(7296), 355–358. <https://doi.org/10.1038/nature08970>

- Martín, R., Jiménez, E., Heilig, H., Fernández, L., Marín, M. L., Zoetendal, E. G., & Rodríguez, J. M. (2009). Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(4), 965–969. <https://doi.org/10.1128/AEM.02063-08>
- Martinez-Guryn, K., Leone, V., & Chang, E. B. (2019). Regional Diversity of the Gastrointestinal Microbiome. *Cell Host & Microbe*, 26(3), 314–324. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.08.011>
- Martyn, J. E., Pilla, G., Hollingshead, S., Winther, K. S., Lea, S., McVicker, G., & Tang, C. M. (2022). Maintenance of the *Shigella sonnei* Virulence Plasmid Is Dependent on Its Repertoire and Amino Acid Sequence of Toxin-Antitoxin Systems. *Journal of Bacteriology*, 204(3), e0051921. <https://doi.org/10.1128/JB.00519-21>
- Massey, L. K., Sokatch, J. R., & Conrad, R. S. (1976). Branched-Chain Amino Acid Catabolism in Bacteria. In *BACTERIOLOGICAL REVIEWS*. <https://journals.asm.org/journal/br>
- Matanza, X. M., & Clements, A. (2023). Pathogenicity and virulence of *Shigella sonnei* : A highly drug-resistant pathogen of increasing prevalence. *Virulence*, 14(1). <https://doi.org/10.1080/21505594.2023.2280838>
- Mattock, E., & Blocker, A. J. (2017). How do the virulence factors of shigella work together to cause disease? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(MAR). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00064>
- Maurelli, A. T. (2007). Black holes, antivirulence genes, and gene inactivation in the evolution of bacterial pathogens. In *FEMS Microbiology Letters* (Vol. 267, Issue 1, pp. 1–8). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00526.x>
- May, M., & Abrams, J. A. (2018). Emerging Insights into the Esophageal Microbiome. *Current Treatment Options in Gastroenterology*, 16(1), 72–85. <https://doi.org/10.1007/s11938-018-0171-5>
- Mayo, L. D., & Donner, D. B. (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20), 11598–11603. <https://doi.org/10.1073/pnas.181181198>
- Mazurkiewicz, P., Thomas, J., Thompson, J. A., Liu, M., Arbibe, L., Sansonetti, P., & Holden, D. W. (2008). SpvC is a *Salmonella* effector with phosphothreonine lyase activity on host mitogen-activated protein kinases. *Molecular Microbiology*, 67(6), 1371–1383. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06134.x>
- McNally, M. A., & Hartman, A. L. (2012). Ketone bodies in epilepsy. *Journal of Neurochemistry*, 121(1), 28–35. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07670.x>
- Ménard, R., Prévost, M. C., Gounon, P., Sansonetti, P., & Dehio, C. (1996). The secreted Ipa complex of *Shigella flexneri* promotes entry into mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(3), 1254–1258. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.3.1254>
- Menard, R., Sansonetti, P., & Parsot, C. (1994). The secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins is activated by epithelial cells and controlled by IpaB and IpaD. In *The EMBO Journal* (Vol. 13, Issue 22).
- Mey, A. R., Gómez-Garzón, C., & Payne, S. M. (2021). Iron Transport and Metabolism in *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. *EcoSal Plus*, 9(2), eESP00342020. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0034-2020>
- Meza Segura, M. A. (2017). *Caracterización de los factores asociados a la severidad de la diarrea causada por los patogrupos de Escherichia coli*. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

- Miranda, M. J., Turner, Z., & Magrath, G. (2012). Alternative diets to the classical ketogenic diet— Can we be more liberal? *Epilepsy Research*, 100(3), 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2012.06.007>
- Mithieux, G. (2009). A novel function of intestinal gluconeogenesis: central signaling in glucose and energy homeostasis. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 25(9), 881–884. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.06.010>
- Monack, D. M., & Theriot, J. A. (2001). Actin-based motility is sufficient for bacterial membrane protrusion formation and host cell uptake. *Cellular Microbiology*, 3(9), 633–647. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2001.00143.x>
- Moore, A. M., Patel, S., Forsberg, K. J., Wang, B., Bentley, G., Razia, Y., Qin, X., Tarr, P. I., & Dantas, G. (2013). Pediatric fecal microbiota harbor diverse and novel antibiotic resistance genes. *PLoS ONE*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078822>
- Moosavian, M., Ghaderiyan, G. H., Shahin, M., & Navidifar, T. (2019). <p>First investigation of the presence of SPATE genes in Shigella species isolated from children with diarrhea infection in Ahvaz, southwest Iran</p>. *Infection and Drug Resistance*, Volume 12, 795–804. <https://doi.org/10.2147/IDR.S194740>
- Muthuirulandi Sethuvel, D. P., Mutreja, A., Pragasam, A. K., Vasudevan, K., Murugan, D., Anandan, S., Michael, J. S., Walia, K., & Veeraraghavan, B. (2020). Phylogenetic and Evolutionary Analysis Reveals the Recent Dominance of Ciprofloxacin-Resistant *Shigella sonnei* and Local Persistence of *S. flexneri* Clones in India. *mSphere*, 5(5). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00569-20>
- Mwape, K., Bosomprah, S., Chibesa, K., Silwamba, S., Luchen, C. C., Sukwa, N., Mubanga, C., Phiri, B., Chibuye, M., Liswaniso, F., Somwe, P., Chilyabanyama, O., Chisenga, C. C., Muyoyeta, M., Simuyandi, M., Barnard, T. G., & Chilengi, R. (2023). Prevalence of Diarrhoeagenic *Escherichia coli* among Children Aged between 0–36 Months in Peri-Urban Areas of Lusaka. *Microorganisms*, 11(11), 2790. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112790>
- Nadler, C., Baruch, K., Kobi, S., Mills, E., Haviv, G., Farago, M., Alkalay, I., Bartfeld, S., Meyer, T. F., Ben-Neriah, Y., & Rosenshine, I. (2010). The Type III Secretion Effector NleE Inhibits NF- κ B Activation. *PLoS Pathogens*, 6(1), e1000743. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000743>
- Nakata, N., Tobe, T., Fukuda, I., Suzuki, T., Komatsu, K., Yoshikawa, M., & Sasakawa, C. (1993). The absence of a surface protease, OmpT, determines the intercellular spreading ability of *Shigella*: the relationship between the *ompT* and *kcpA* loci. *Molecular Microbiology*, 9(3), 459–468. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01707.x>
- Nakayama, S., & Watanabe, H. (1995). Involvement of *cpxA*, a sensor of a two-component regulatory system, in the pH-dependent regulation of expression of *Shigella sonnei* *virF* gene. *Journal of Bacteriology*, 177(17), 5062–5069. <https://doi.org/10.1128/jb.177.17.5062-5069.1995>
- Nardone, G., & Compare, D. (2015). The human gastric microbiota: Is it time to rethink the pathogenesis of stomach diseases? In *United European Gastroenterology Journal* (Vol. 3, Issue 3, pp. 255–260). SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/2050640614566846>
- Nardone, R., Brigo, F., & Trinka, E. (2016). Acute Symptomatic Seizures Caused by Electrolyte Disturbances. *Journal of Clinical Neurology*, 12(1), 21. <https://doi.org/10.3988/jcn.2016.12.1.21>
- Natale, P., Brüser, T., & Driessen, A. J. M. (2008). Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane—Distinct translocases and mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(9), 1735–1756. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.015>

- Natividad, J. M., Lamas, B., Pham, H. P., Michel, M.-L., Rainteau, D., Bridonneau, C., da Costa, G., van Hylckama Vlieg, J., Sovran, B., Chamignon, C., Planchais, J., Richard, M. L., Langella, P., Veiga, P., & Sokol, H. (2018). Bilophila wadsworthia aggravates high fat diet induced metabolic dysfunctions in mice. *Nature Communications*, *9*(1), 2802. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05249-7>
- Ndungo, E., Holm, J. B., Gama, S., Buchwald, A. G., Tennant, S. M., Laufer, M. K., Pasetti, M. F., & Rasko, D. A. (2022). Dynamics of the Gut Microbiome in *Shigella* -Infected Children during the First Two Years of Life. *mSystems*, *7*(5). <https://doi.org/10.1128/msystems.00442-22>
- Neff, C. P., Rhodes, M. E., Arnolds, K. L., Collins, C. B., Donnelly, J., Nusbacher, N., Jedlicka, P., Schneider, J. M., McCarter, M. D., Shaffer, M., Mazmanian, S. K., Palmer, B. E., & Lozupone, C. A. (2016). Diverse Intestinal Bacteria Contain Putative Zwitterionic Capsular Polysaccharides with Anti-inflammatory Properties. *Cell Host & Microbe*, *20*(4), 535–547. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.09.002>
- Newton, H. J., Pearson, J. S., Badea, L., Kelly, M., Lucas, M., Holloway, G., Wagstaff, K. M., Dunstone, M. A., Sloan, J., Whisstock, J. C., Kaper, J. B., Robins-Browne, R. M., Jans, D. A., Frankel, G., Phillips, A. D., Coulson, B. S., & Hartland, E. L. (2010a). The Type III Effectors NleE and NleB from Enteropathogenic *E. coli* and OspZ from *Shigella* Block Nuclear Translocation of NF- κ B p65. *PLoS Pathogens*, *6*(5), e1000898. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000898>
- Newton, H. J., Pearson, J. S., Badea, L., Kelly, M., Lucas, M., Holloway, G., Wagstaff, K. M., Dunstone, M. A., Sloan, J., Whisstock, J. C., Kaper, J. B., Robins-Browne, R. M., Jans, D. A., Frankel, G., Phillips, A. D., Coulson, B. S., & Hartland, E. L. (2010b). The Type III Effectors NleE and NleB from Enteropathogenic *E. coli* and OspZ from *Shigella* Block Nuclear Translocation of NF- κ B p65. *PLoS Pathogens*, *6*(5), e1000898. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000898>
- Niebuhr, K., Giuriato, S., Pedron, T., Philpott, D. J., Gaits, F., Sable, J., Sheetz, M. P., Parsot, C., Sansonetti, P. J., & Payrastre, B. (2002). Conversion of PtdIns(4,5)P₂ into PtdIns(5)P by the *S. flexneri* effector IpgD reorganizes host cell morphology. *The EMBO Journal*, *21*(19), 5069–5078. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf522>
- Niebuhr, K., Jouihri, N., Allaoui, A., Gounon, P., Sansonetti, P. J., & Parsot, C. (2000). IpgD, a protein secreted by the type III secretion machinery of *Shigella flexneri*, is chaperoned by IpgE and implicated in entry focus formation. *Molecular Microbiology*, *38*(1), 8–19. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02041.x>
- Nikfar, R., Shamsizadeh, A., Darbor, M., Khaghani, S., & Moghaddam, M. (2017). A Study of prevalence of *Shigella* species and antimicrobial resistance patterns in paediatric medical center, Ahvaz, Iran. *Iranian Journal of Microbiology*, *9*(5), 277–283.
- Nishide, A., Kim, M., Takagi, K., Himeno, A., Sanada, T., Sasakawa, C., & Mizushima, T. (2013). Structural Basis for the Recognition of Ubc13 by the *Shigella flexneri* Effector OspI. *Journal of Molecular Biology*, *425*(15), 2623–2631. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.02.037>
- Nothelfer, K., Arena, E. T., Pinaud, L., Neunlist, M., Mozeleski, B., Belotserkovsky, I., Parsot, C., Dinadayala, P., Burger-Kentischer, A., Raqib, R., Sansonetti, P. J., & Phalipon, A. (2014). B lymphocytes undergo TLR2-dependent apoptosis upon *Shigella* infection. *Journal of Experimental Medicine*, *211*(6), 1215–1229. <https://doi.org/10.1084/jem.20130914>
- Oaks, E. V., Wingfield, M. E., & Formal, S. B. (1985). Plaque formation by virulent *Shigella flexneri*. *Infection and Immunity*, *48*(1), 124–129. <https://doi.org/10.1128/iai.48.1.124-129.1985>
- Ochman, H., & Davalos, L. M. (2006). The Nature and Dynamics of Bacterial Genomes. *Science*, *311*(5768), 1730–1733. <https://doi.org/10.1126/science.1119966>

- Ochoa, T. J., Acosta, G. J., Riveros, M., Arango, S., Vigo, N. I., Durand, D., & Zambruni, M. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*: Prevalence and Pathotype Distribution in Children from Peruvian Rural Communities. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *95*(3), 574–579. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0220>
- Ogasawara, N., Kojima, T., Go, M., Ohkuni, T., Koizumi, J., Kamekura, R., Masaki, T., Murata, M., Tanaka, S., Fuchimoto, J., Himi, T., & Sawada, N. (2010). PPAR γ agonists upregulate the barrier function of tight junctions via a PKC pathway in human nasal epithelial cells. *Pharmacological Research*, *61*(6), 489–498. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.03.002>
- Ogawa, M., Suzuki, T., Tatsuno, I., Abe, H., & Sasakawa, C. (2003). IcsB, secreted via the type III secretion system, is chaperoned by IpgA and required at the post-invasion stage of *Shigella* pathogenicity. *Molecular Microbiology*, *48*(4), 913–931. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03489.x>
- Ogawa, M., Yoshimori, T., Suzuki, T., Sagara, H., Mizushima, N., & Sasakawa, C. (2005). Escape of Intracellular *Shigella* from Autophagy. *Science*, *307*(5710), 727–731. <https://doi.org/10.1126/science.1106036>
- O'Hara, A. M., & Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports*, *7*(7), 688–693. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400731>
- Ohya, K., Handa, Y., Ogawa, M., Suzuki, M., & Sasakawa, C. (2005). IpgB1 Is a Novel *Shigella* Effector Protein Involved in Bacterial Invasion of Host Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(25), 24022–24034. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502509200>
- Okuda, J., Toyotome, T., Kataoka, N., Ohno, M., Abe, H., Shimura, Y., Seyedarabi, A., Pickersgill, R., & Sasakawa, C. (2005). *Shigella* effector IpaH9.8 binds to a splicing factor U2AF35 to modulate host immune responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *333*(2), 531–539. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.05.145>
- Olivart, M., Galera, E., & Falguera, M. (2017). Acute gastroenteritis and *Haemophilus parainfluenzae*: An unreported but predictable association. *Gastroenterologia y Hepatologia*, *40*(1), 23–24. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2015.10.010>
- Olson, C. A., Vuong, H. E., Yano, J. M., Liang, Q. Y., Nusbaum, D. J., & Hsiao, E. Y. (2018). The Gut Microbiota Mediates the Anti-Seizure Effects of the Ketogenic Diet. *Cell*, *173*(7), 1728–1741.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.04.027>
- Osiecki, J. C., Barker, J., Picking, W. L., Serfis, A. B., Berring, E., Shah, S., Harrington, A., & Picking, W. D. (2001). IpaC from *Shigella* and SipC from *Salmonella* possess similar biochemical properties but are functionally distinct. *Molecular Microbiology*, *42*(2), 469–481. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02654.x>
- Othman, D. S. M. P., Schirra, H., McEwan, A. G., & Kappler, U. (2014). Metabolic versatility in *Haemophilus influenzae*: a metabolomic and genomic analysis. *Frontiers in Microbiology*, *5*, 69. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00069>
- Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N. K., Valdez, P. A., & Hymowitz, S. G. (2011). Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annual Review of Immunology*, *29*, 71–109. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101312>
- Paetzold, S., Lourido, S., Raupach, B., & Zychlinsky, A. (2007). *Shigella flexneri* Phagosomal Escape Is Independent of Invasion. *Infection and Immunity*, *75*(10), 4826–4830. <https://doi.org/10.1128/IAI.00454-07>
- Page, A.-L., Ohayon, H., Sansonetti, P. J., & Parsot, C. (1999). The secreted IpaB and IpaC invasins and their cytoplasmic chaperone IpgC are required for intercellular dissemination of *Shigella flexneri*. *Cellular Microbiology*, *1*(2), 183–193. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.1999.00019.x>

- Palmer, C., Bik, E. M., Digiulio, D. B., Relman, D. A., & Brown, P. O. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*, 5(7), 177. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio>
- Paoli, A. (2014). Ketogenic Diet for Obesity: Friend or Foe? *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(2), 2092–2107. <https://doi.org/10.3390/ijerph110202092>
- Paoli, A., Mancin, L., Bianco, A., Thomas, E., Mota, J. F., & Piccini, F. (2019). Ketogenic Diet and Microbiota: Friends or Enemies? *Genes*, 10(7), 534. <https://doi.org/10.3390/genes10070534>
- Parsot, C., Ageron, E., Penno, C., Mavris, M., Jamoussi, K., d’Hauteville, H., Sansonetti, P., & Demers, B. (2005). A secreted anti-activator, OspD1, and its chaperone, Spa15, are involved in the control of transcription by the type III secretion apparatus activity in *Shigella flexneri*. *Molecular Microbiology*, 56(6), 1627–1635. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04645.x>
- Patzi-Vargas, S., Zaidi, M. B., Perez-Martinez, I., León-Cen, M., Michel-Ayala, A., Chaussabel, D., & Estrada-Garcia, T. (2015). Diarrheagenic *Escherichia coli* Carrying Supplementary Virulence Genes Are an Important Cause of Moderate to Severe Diarrhoeal Disease in Mexico. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(3), e0003510. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003510>
- Peck, S. C., Denger, K., Burrichter, A., Irwin, S. M., Balskus, E. P., & Schleheck, D. (2019). A glycyl radical enzyme enables hydrogen sulfide production by the human intestinal bacterium *Bilophila wadsworthia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(8), 3171–3176. <https://doi.org/10.1073/pnas.1815661116>
- Pedersen, A. M. L., & Belstrøm, D. (2019). The role of natural salivary defences in maintaining a healthy oral microbiota. *Journal of Dentistry*, 80(Suppl 1).
- Peng, J., Zhang, X., Yang, J., Wang, J., Yang, E., Bin, W., Wei, C., Sun, M., & Jin, Q. (2006). The use of comparative genomic hybridization to characterize genome dynamics and diversity among the serotypes of *Shigella*. *BMC Genomics*, 7(1), 218. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-218>
- Perdomo, J. J., Gounon, P., & Sansonetti, P. J. (1994). Polymorphonuclear leukocyte transmigration promotes invasion of colonic epithelial monolayer by *Shigella flexneri*. *Journal of Clinical Investigation*, 93(2), 633–643. <https://doi.org/10.1172/JCI117015>
- Perez Schael, I., O’Ryan, M., Sáez-Llorens, X., Linhares, A. C., Velázquez, F. R., Colindres, R. E., Breuer, T., & Ortega-Barria, E. (2012). Clinical development, registration, and introduction of human rotavirus vaccine: The Latin American experience. *Trials in Vaccinology*, 1, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.trivac.2012.01.001>
- Perkins-Balding, D., Ratliff-Griffin, M., & Stojiljkovic, I. (2004). Iron transport systems in *Neisseria meningitidis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 68(1), 154–171. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.1.154-171.2004>
- Peterson, L. W., & Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, 14(3), 141–153. <https://doi.org/10.1038/nri3608>
- Philpott, D. J., Yamaoka, S., Israël, A., & Sansonetti, P. J. (2000). Invasive *Shigella flexneri* Activates NF- κ B Through a Lipopolysaccharide-Dependent Innate Intracellular Response and Leads to IL-8 Expression in Epithelial Cells 1. In *The Journal of Immunology* (Vol. 165). <http://www.jimmunol.org/>
- Picker, M. A., & Wing, H. J. (2016). H-NS, Its Family Members and Their Regulation of Virulence Genes in *Shigella* Species. *Genes*, 7(12). <https://doi.org/10.3390/genes7120112>

- Pilla, G., & Tang, C. M. (2018). Going around in circles: virulence plasmids in enteric pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(8), 484–495. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0031-2>
- Platts-Mills, J. A., Babji, S., Bodhidatta, L., Gratz, J., Haque, R., Havt, A., McCormick, B. J., McGrath, M., Olortegui, M. P., Samie, A., Shakoob, S., Mondal, D., Lima, I. F., Hariraju, D., Rayamajhi, B. B., Qureshi, S., Kabir, F., Yori, P. P., Mufamadi, B., ... MAL-ED Network Investigators. (2015). Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). *The Lancet. Global Health*, *3*(9), e564-75. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(15\)00151-5](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(15)00151-5)
- Plottel, C. S., & Blaser, M. J. (2011). Microbiome and Malignancy. *Cell Host & Microbe*, *10*(4), 324–335. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.10.003>
- Pruneda, J. N., Smith, F. D., Daurie, A., Swaney, D. L., Villén, J., Scott, J. D., Stadnyk, A. W., Le Trong, I., Stenkamp, R. E., Kleivit, R. E., Rohde, J. R., & Brzovic, P. S. (2014). E2~Ub conjugates regulate the kinase activity of *Shigella* effector OspG during pathogenesis. *The EMBO Journal*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/embj.201386386>
- Pupo, G. M., Lan, R., & Reeves, P. R. (2000). Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(19), 10567–10572. <https://doi.org/10.1073/pnas.180094797>
- Qin, J., Doyle, M. T., Tran, E. N. H., & Morona, R. (2020). The virulence domain of *Shigella* IcsA contains a subregion with specific host cell adhesion function. *PLOS ONE*, *15*(1), e0227425. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227425>
- Reddel, S., Putignani, L., & Del Chierico, F. (2019). The Impact of Low-FODMAPs, Gluten-Free, and Ketogenic Diets on Gut Microbiota Modulation in Pathological Conditions. *Nutrients*, *11*(2), 373. <https://doi.org/10.3390/nu11020373>
- Réhel, N., & Szatmari, G. (1996). Characterization of the Stable Maintenance of the *Shigella flexneri* Plasmid pHS-2. *Plasmid*, *36*(3), 183–190. <https://doi.org/10.1006/plas.1996.0045>
- Reidl, J., Schlör, S., Kraiss, A., Schmidt-Brauns, J., Kemmer, G., & Soleva, E. (2000). NADP and NAD utilization in *Haemophilus influenzae*. *Molecular Microbiology*, *35*(6), 1573–1581. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01829.x>
- Remes Troche, J. M. (2016). Reflexiones sobre la resistencia a antibióticos y qué hacer al respecto. In *Revista de Gastroenterología de México* (Vol. 81, Issue 1, pp. 1–2). Asociación Mexicana de Gastroenterología. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2016.01.001>
- Remes Troche, J. M., Gómez Escudero, O., Bielsa Fernández, M. V., Garrido Palma, J., Méndez Gutiérrez, T., & Vázquez Ávila, I. (2010). Guía de diagnóstico y tratamiento de la diarrea crónica. Epidemiología, etiología y clasificación. *Revista de Gastroenterología de México*, *75*(2), 223–225. <http://www.revistagastroenterologiamexico.org/es-guia-diagnostico-tratamiento-diarrea-cronica--articulo-X0375090610534268>
- Rew, L., Harris, M. D., & Goldie, J. (2022). The ketogenic diet: its impact on human gut microbiota and potential consequent health outcomes: a systematic literature review. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, *15*(4), 326–342. <https://doi.org/10.22037/ghfbb.v15i4.2600>
- Rey, C., Chang, Y. Y., Latour-Lambert, P., Varet, H., Proux, C., Legendre, R., Coppée, J. Y., & Enninga, J. (2020). Transcytosis subversion by M cell-to-enterocyte spread promotes *Shigella flexneri* and *Listeria monocytogenes* intracellular bacterial dissemination. *PLoS Pathogens*, *16*(4), e1008446. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008446>
- Rho, J. M., Anderson, G. D., Donevan, S. D., & White, H. S. (2002). Acetoacetate, Acetone, and Dibenzylamine (a Contaminant in β -Hydroxybutyrate) Exhibit Direct

- Anticonvulsant Actions in Vivo. *Epilepsia*, 43(4), 358–361. <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2002.47901.x>
- Rich, A. J. (1990). Ketone bodies as substrates. *Proceedings of the Nutrition Society*, 49(3), 361–373. <https://doi.org/10.1079/PNS19900042>
- Richardson, V., Hernandez-Pichardo, J., Quintanar-Solares, M., Esparza-Aguilar, M., Johnson, B., Gomez-Altamirano, C. M., Parashar, U., & Patel, M. (2010). Effect of Rotavirus Vaccination on Death from Childhood Diarrhea in Mexico. *New England Journal of Medicine*, 362(4), 299–305. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0905211>
- Richardson, V., Parashar, U., & Patel, M. (2011). Childhood Diarrhea Deaths after Rotavirus Vaccination in Mexico. *New England Journal of Medicine*, 365(8), 772–773. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1100062>
- Rivera-Chávez, F., Zhang, L. F., Faber, F., Lopez, C. A., Byndloss, M. X., Olsan, E. E., Xu, G., Velazquez, E. M., Lebrilla, C. B., Winter, S. E., & Bäumlner, A. J. (2016). Depletion of Butyrate-Producing Clostridia from the Gut Microbiota Drives an Aerobic Luminal Expansion of Salmonella. *Cell Host & Microbe*, 19(4), 443–454. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.03.004>
- Rivière, A., Selak, M., Lantin, D., Leroy, F., & De Vuyst, L. (2016). Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. *Frontiers in Microbiology*, 7, 979. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00979>
- Rodríguez-Castaño, G. P., Rey, F. E., Caro-Quintero, A., & Acosta-González, A. (2020). Gut-derived Flavonifractor species variants are differentially enriched during in vitro incubation with quercetin. *PLoS One*, 15(12), e0227724. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227724>
- Roehrich, A. D., Guilloussou, E., Blocker, A. J., & Martínez-Argudo, I. (2013). *ScpS* has a dual role: signal transduction from the type III secretion system needle tip and intracellular secretion regulation. *Molecular Microbiology*, 87(3), 690–706. <https://doi.org/10.1111/mmi.12124>
- Roelofs, K. G., Coyne, M. J., Gentyala, R. R., Chatzidakis-Livanis, M., & Comstock, L. E. (2016). Bacteroidales Secreted Antimicrobial Proteins Target Surface Molecules Necessary for Gut Colonization and Mediate Competition In Vivo. *mBio*, 7(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.01055-16>
- Roth, G. A., Abate, D., Abate, K. H., Abay, S. M., Abbafati, C., Abbasi, N., Abastabar, H., Abd-Allah, F., Abdela, J., Abdelalim, A., Abdollahpour, I., Abdulkader, R. S., Abebe, H. T., Abebe, M., Abebe, Z., Abejie, A. N., Abera, S. F., Abil, O. Z., Abraha, H. N., ... Murray, C. J. L. (2018). Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*, 392(10159), 1736–1788. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32203-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32203-7)
- Rouhani, S., Griffin, N. W., Yori, P. P., Gehrig, J. L., Olortegui, M. P., Salas, M. S., Trigoso, D. R., Moulton, L. H., Houpt, E. R., Barratt, M. J., Kosek, M. N., & Gordon, J. I. (2020). Diarrhea as a Potential Cause and Consequence of Reduced Gut Microbial Diversity Among Undernourished Children in Peru. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 71(4), 989–999. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz905>
- Sachs, J. L., Skophammer, R. G., & Regus, J. U. (2011). Evolutionary transitions in bacterial symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(supplement_2), 10800–10807. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100304108>
- Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology*, 14(3), 225–IN6. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(67\)90079-3](https://doi.org/10.1016/0022-5193(67)90079-3)

- Sahl, J. W., Morris, C. R., Emberger, J., Fraser, C. M., Ochieng, J. B., Juma, J., Fields, B., Breiman, R. F., Gilmour, M., Nataro, J. P., & Rasko, D. A. (2015). Defining the phylogenomics of *Shigella* species: a pathway to diagnostics. *Journal of Clinical Microbiology*, *53*(3), 951–960. <https://doi.org/10.1128/JCM.03527-14>
- Saka, H. K., Dabo, N. T., Muhammad, B., García-Soto, S., Ugarte-Ruiz, M., & Alvarez, J. (2019). Diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes From Children Younger Than 5 Years in Kano State, Nigeria. *Frontiers in Public Health*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00348>
- Sakaguchi, T., Köhler, H., Gu, X., McCormick, B. A., & Reinecke Hans-Christian. (2002). *Shigella flexneri* regulates tight junction-associated proteins in human intestinal epithelial cells. *Cellular Microbiology*, *4*(6).
- Salgado-Pabón, W., Celli, S., Arena, E. T., Nothelfer, K., Roux, P., Sellge, G., Frigimelica, E., Bousso, P., Sansonetti, P. J., & Phalipon, A. (2013). *Shigella* impairs T lymphocyte dynamics in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(12), 4458–4463. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300981110>
- Sanada, T., Kim, M., Mimuro, H., Suzuki, M., Ogawa, M., Oyama, A., Ashida, H., Kobayashi, T., Koyama, T., Nagai, S., Shibata, Y., Gohda, J., Inoue, J., Mizushima, T., & Sasakawa, C. (2012). The *Shigella flexneri* effector OspI deamidates UBC13 to dampen the inflammatory response. *Nature*, *483*(7391), 623–626. <https://doi.org/10.1038/nature10894>
- Sánchez-Uribe, E., Esparza-Aguilar, M., Parashar, U. D., & Richardson, V. (2016). Sustained Reduction of Childhood Diarrhea-Related Mortality and Hospitalizations in Mexico After Rotavirus Vaccine Universalization. *Clinical Infectious Diseases*, *62*(suppl 2), S133–S139. <https://doi.org/10.1093/cid/civ1205>
- Sansonetti, P. J., Hale, T. L., Dammin, G. J., Kapfer, C., Collins, H. H., & Formal, S. B. (1983). Alterations in the Pathogenicity of *Escherichia coli* K-12 After Transfer of Plasmid and Chromosomal Genes from *Shigella flexneri*. In *INFECTION AND IMMUNITY* (Vol. 39, Issue 3). <http://iai.asm.org/>
- Sansonetti, P. J., Kopecko, D. J., & Formal, S. B. (1981). *Shigella sonnei* plasmids: evidence that a large plasmid is necessary for virulence. *Infection and Immunity*, *34*(1), 75–83. <https://doi.org/10.1128/iai.34.1.75-83.1981>
- Sansonetti, P. J., Ryter, A., Clerc, P., Maurelli, A. T., & Mounier, J. (1986). Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa Cells: Lysis of the Phagocytic Vacuole and Plasmid-Mediated Contact Hemolysis. In *INFECTION AND IMMUNITY* (Vol. 51, Issue 2). <http://iai.asm.org/>
- Sayin, S. I., Wahlström, A., Felin, J., Jäntti, S., Marschall, H.-U., Bamberg, K., Angelin, B., Hyötyläinen, T., Orešič, M., & Bäckhed, F. (2013). Gut Microbiota Regulates Bile Acid Metabolism by Reducing the Levels of Tauro-beta-muricholic Acid, a Naturally Occurring FXR Antagonist. *Cell Metabolism*, *17*(2).
- Schmidt, H., & Hensel, M. (2004). Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 17, Issue 1, pp. 14–56). <https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.14-56.2004>
- Schoen, C., Kischkies, L., Elias, J., & Ampattu, B. J. (2014). Metabolism and virulence in *Neisseria meningitidis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *4*, 114. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00114>
- Schroeder, G. N., & Hilbi, H. (2008). Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 21, Issue 1, pp. 134–156). <https://doi.org/10.1128/CMR.00032-07>
- Schuch, R., & Maurelli, A. T. (1997). Virulence plasmid instability in *Shigella flexneri* 2a is induced by virulence gene expression. *Infection and Immunity*, *65*(9), 3686–3692. <https://doi.org/10.1128/iai.65.9.3686-3692.1997>

- SEYMOUR, K., BLUML, S., SUTHERLING, J., SUTHERLING, W., & ROSS, B. (1999). Identification of cerebral acetone by H-MRS in patients with epilepsy controlled by ketogenic diet. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine*, 8(1), 33–42. [https://doi.org/10.1016/S1352-8661\(99\)00006-X](https://doi.org/10.1016/S1352-8661(99)00006-X)
- Shang, L., Deng, D., Buskermolen, J. K., Janus, M. M., Krom, B. P., Roffel, S., Waaijman, T., van Loveren, C., Crielaard, W., & Gibbs, S. (2018). Multi-species oral biofilm promotes reconstructed human gingiva epithelial barrier function. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34390-y>
- Sharma, A., & Puhar, A. (2019). Plaque Assay to Determine Invasion and Intercellular Dissemination of *Shigella flexneri* in TC7 Human Intestinal Epithelial Cells. *Bio-Protocol*, 9(13), e3293. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3293>
- Shepherd, J. G., Wang, L., & Reeves, P. R. (2000). Comparison of O-Antigen Gene Clusters of *Escherichia coli* (*Shigella*) Sonnei and *Plesiomonas shigelloides* O17: Sonnei Gained Its Current Plasmid-Borne O-Antigen Genes from *P. shigelloides* in a Recent Event. *Infection and Immunity*, 68(10), 6056–6061. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.10.6056-6061.2000>
- Shibata, T., Takeshima, F., Chen, F., Alt, F. W., & Snapper, S. B. (2002). Cdc42 Facilitates Invasion but Not the Actin-Based Motility of *Shigella*. *Current Biology*, 12(4), 341–345. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00689-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00689-9)
- Siguier, P., Gourbeyre, E., & Chandler, M. (2014). Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(5), 865–891. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12067>
- Skoudy, A., Mounier, J., Aruffo, A., Ohayon, H., Gounon, P., Sansonetti, P., & Tran Van Nhieu, G. (2000). CD44 binds to the *Shigella* IpaB protein and participates in bacterial invasion of epithelial cells. *Cellular Microbiology*, 2(1), 19–33. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2000.00028.x>
- Spiga, L., Winter, M. G., Furtado de Carvalho, T., Zhu, W., Hughes, E. R., Gillis, C. C., Behrendt, C. L., Kim, J., Chessa, D., Andrews-Polymenis, H. L., Beiting, D. P., Santos, R. L., Hooper, L. V., & Winter, S. E. (2017). An Oxidative Central Metabolism Enables *Salmonella* to Utilize Microbiota-Derived Succinate. *Cell Host & Microbe*, 22(3), 291-301.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.07.018>
- Stevens, J. M., Galyov, E. E., & Stevens, M. P. (2006). Actin-dependent movement of bacterial pathogens. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 4, Issue 2, pp. 91–101). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1320>
- Stinson, L. F., Payne, M. S., & Keelan, J. A. (2017). Planting the seed: Origins, composition, and postnatal health significance of the fetal gastrointestinal microbiota. In *Critical Reviews in Microbiology* (Vol. 43, Issue 3, pp. 352–369). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1211088>
- Suzuki, S., Mimuro, H., Kim, M., Ogawa, M., Ashida, H., Toyotome, T., Franchi, L., Suzuki, M., Sanada, T., Suzuki, T., Tsutsui, H., Núñez, G., & Sasakawa, C. (2014). *Shigella* IpaH7.8 E3 ubiquitin ligase targets glomulin and activates inflammasomes to demolish macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(40). <https://doi.org/10.1073/pnas.1324021111>
- Suzuki, T., Lett, M.-C., & Sasakawa, C. (1995). Extracellular Transport of VirG Protein in *Shigella*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(52), 30874–30880. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.52.30874>
- Swidsinski, A., Weber, J., Loening-Baucke, V., Hale, L. P., & Lochs, H. (2005). Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *Journal*

- of Clinical Microbiology*, 43(7), 3380–3389. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.7.3380-3389.2005>
- Szarka, L. A., & Camilleri, M. (2012). Methods for the assessment of small bowel and colonic transit. *Seminars in Nuclear Medicine*, 42(2).
- Terry, C. M., Picking, W. L., Birket, S. E., Flentie, K., Hoffman, B. M., Barker, J. R., & Picking, W. D. (2008). The C-terminus of IpaC is required for effector activities related to *Shigella* invasion of host cells. *Microbial Pathogenesis*, 45(4), 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2008.06.003>
- Thaiss, C. A., Zmora, N., Levy, M., & Elinav, E. (2016). The microbiome and innate immunity. In *Nature* (Vol. 535, Issue 7610, pp. 65–74). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature18847>
- The, H. C., Thanh, D. P., Holt, K. E., Thomson, N. R., & Baker, S. (2016). The genomic signatures of *Shigella* evolution, adaptation and geographical spread. *Nature Reviews. Microbiology*, 14(4), 235–250. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.10>
- Thirumalai, K., Kim, K. S., & Zychlinsky, A. (1997). IpaB, a *Shigella flexneri* invasin, colocalizes with interleukin-1 beta-converting enzyme in the cytoplasm of macrophages. *Infection and Immunity*, 65(2), 787–793. <https://doi.org/10.1128/iai.65.2.787-793.1997>
- Thompson, C. N., Anders, K. L., Nhi, L. T. Q., Tuyen, H. T., Van Minh, P., Tu, L. T. P., Nhu, T. D. H., Nhan, N. T. T., Ly, T. T. T., Duong, V. T., Vi, L. L., Van Thuy, N. T., Hieu, N. T., Van Chau, N. V., Campbell, J. I., Thwaites, G., Simmons, C., & Baker, S. (2014). A cohort study to define the age-specific incidence and risk factors of *Shigella* diarrhoeal infections in Vietnamese children: a study protocol. *BMC Public Health*, 14(1), 1289. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-14-1289>
- Thomson, P., Medina, D. A., & Garrido, D. (2018). Human milk oligosaccharides and infant gut bifidobacteria: Molecular strategies for their utilization. *Food Microbiology*, 75, 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.09.001>
- Tojo, R., Suárez, A., Clemente, M. G., de los Reyes-Gavilán, C. G., Margolles, A., Gueimonde, M., & Ruas-Madiedo, P. (2014). Intestinal microbiota in health and disease: role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World Journal of Gastroenterology*, 20(41), 15163–15176. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i41.15163>
- Tominaga, A., Lan, R., & Reeves, P. R. (2005). Evolutionary Changes of the *flhDC* Flagellar Master Operon in *Shigella* Strains. *Journal of Bacteriology*, 187(12), 4295–4302. <https://doi.org/10.1128/JB.187.12.4295-4302.2005>
- Torraca, V., Holt, K., & Mostowy, S. (2020). *Shigella sonnei*. *Trends in Microbiology*, 28(8), 696–697. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.02.011>
- Touchon, M., Hoede, C., Tenailon, O., Barbe, V., Baeriswyl, S., Bidet, P., Bingen, E., Bonacorsi, S., Bouchier, C., Bouvet, O., Calteau, A., Chiapello, H., Clermont, O., Cruveiller, S., Danchin, A., Diard, M., Dossat, C., Karoui, M. El, Frapy, E., ... Denamur, E. (2009). Organised Genome Dynamics in the *Escherichia coli* Species Results in Highly Diverse Adaptive Paths. *PLoS Genetics*, 5(1), e1000344. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000344>
- Troeger, C., Blacker, B. F., Khalil, I. A., Rao, P. C., Cao, S., Zimsen, S. R., Albertson, S. B., Stanaway, J. D., Deshpande, A., Abebe, Z., Alvis-Guzman, N., Amare, A. T., Asgedom, S. W., Anteneh, Z. A., Antonio, C. A. T., Aremu, O., Asfaw, E. T., Atey, T. M., Atique, S., ... Reiner, R. C. (2018). Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(11), 1211–1228. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30362-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30362-1)

- Tropini, C., Earle, K. A., Huang, K. C., & Sonnenburg, J. L. (2017). The Gut Microbiome: Connecting Spatial Organization to Function. *Cell Host & Microbe*, 21(4), 433–442. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.03.010>
- Troxell, B., & Hassan, H. M. (2013). Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 59. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00059>
- Turnbaugh, P. J., & Gordon, J. I. (2009). The core gut microbiome, energy balance and obesity. *Journal of Physiology*, 587(17), 4153–4158. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.174136>
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., & Gordon, J. I. (2007). The Human Microbiome Project. *Nature*, 449(7164), 804–810. <https://doi.org/10.1038/nature06244>
- Turroni, F., Milani, C., Duranti, S., Mahony, J., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2018). Glycan Utilization and Cross-Feeding Activities by Bifidobacteria. *Trends in Microbiology*, 26(4), 339–350. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.10.001>
- Turroni, F., Milani, C., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2011). Genetic strategies for mucin metabolism in *Bifidobacterium bifidum* PRL2010: an example of possible human-microbe co-evolution. *Gut Microbes*, 2(3), 183–189. <https://doi.org/10.4161/gmic.2.3.16105>
- Uhlemann, E. R., & Neims, A. H. (1972). ANTICONVULSANT PROPERTIES OF THE KETOGENIC DIET IN MICE. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 180(2), 231. <http://jpet.aspetjournals.org/content/180/2/231.abstract>
- Ursell, L. K., Metcalf, J. L., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012). Defining the human microbiome. *Nutrition Reviews*, 70, S38–S44. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00493.x>
- Van Nhieu, G. T. (1997). Modulation of bacterial entry into epithelial cells by association between vinculin and the *Shigella* IpaA invasin. *The EMBO Journal*, 16(10), 2717–2729. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.10.2717>
- Vargas, M., Gascon, J., De Anta, M. T. J., & Vila, J. (1999). Prevalence of *Shigella* Enterotoxins 1 and 2 among *Shigella* Strains Isolated from Patients with Traveler's Diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(11), 3608–3611. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.11.3608-3611.1999>
- Veenendaal, A. K. J., Hodgkinson, J. L., Schwarzer, L., Stabat, D., Zenk, S. F., & Blocker, A. J. (2007). The type III secretion system needle tip complex mediates host cell sensing and translocon insertion. *Molecular Microbiology*, 63(6), 1719–1730. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05620.x>
- Wagner, A., & de la Chaux, N. (2008). Distant horizontal gene transfer is rare for multiple families of prokaryotic insertion sequences. *Molecular Genetics and Genomics*, 280(5), 397–408. <https://doi.org/10.1007/s00438-008-0373-y>
- Wang, K., Liao, M., Zhou, N., Bao, L., Ma, K., Zheng, Z., Wang, Y., Liu, C., Wang, W., Wang, J., Liu, S.-J., & Liu, H. (2019). Parabacteroides distasonis Alleviates Obesity and Metabolic Dysfunctions via Production of Succinate and Secondary Bile Acids. *Cell Reports*, 26(1), 222–235.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.028>
- Wegner, K., Just, S., Gau, L., Mueller, H., Gérard, P., Lepage, P., Clavel, T., & Rohn, S. (2017). Rapid analysis of bile acids in different biological matrices using LC-ESI-MS/MS for the investigation of bile acid transformation by mammalian gut bacteria. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(5), 1231–1245. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-0048-1>
- Welch, J. L. M., Rossetti, B. J., Rieken, C. W., Dewhirst, F. E., & Borisy, G. G. (2016). Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(6), E791–E800. <https://doi.org/10.1073/pnas.1522149113>

- Wheless, J. W. (2008). History of the ketogenic diet. *Epilepsia*, *49*(s8), 3–5. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01821.x>
- Winter, S. E., Thiennimitr, P., Winter, M. G., Butler, B. P., Huseby, D. L., Crawford, R. W., Russell, J. M., Bevins, C. L., Adams, L. G., Tsolis, R. M., Roth, J. R., & Bäumler, A. J. (2010). Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for Salmonella. *Nature*, *467*(7314), 426–429. <https://doi.org/10.1038/nature09415>
- Winter, S. E., Winter, M. G., Xavier, M. N., Thiennimitr, P., Poon, V., Keestra, A. M., Laughlin, R. C., Gomez, G., Wu, J., Lawhon, S. D., Popova, I. E., Parikh, S. J., Adams, L. G., Tsolis, R. M., Stewart, V. J., & Bäumler, A. J. (2013). Host-derived nitrate boosts growth of *E. coli* in the inflamed gut. *Science (New York, N.Y.)*, *339*(6120), 708–711. <https://doi.org/10.1126/science.1232467>
- Woodward, D. L. (2005). Identification and characterization of *Shigella boydii* 20 serovar nov., a new and emerging *Shigella* serotype. *Journal of Medical Microbiology*, *54*(8), 741–748. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46095-0>
- Woodward, D. L., Clark, C. G., Caldeira, R. A., Ahmed, R., Soule, G., Bryden, L., Tabor, H., Melito, P., Foster, R., Walsh, J., Ng, L.-K., Malcolm, G. B., Strockbine, N., Rodgers, F. G., & And The Canadian Public Health Laboratory Network. (2005). Identification and characterization of *Shigella boydii* 20 serovar nov., a new and emerging *Shigella* serotype. *Journal of Medical Microbiology*, *54*(Pt 8), 741–748. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46095-0>
- Wu, B.-C., Olivia, N. A., Tembo, J. M., He, Y.-X., Zhang, Y.-M., Xue, Y., Ye, C.-L., Lv, Y., Li, W.-J., Jiang, L.-Y., Huo, X.-X., Sun, Z.-Y., Chen, Z.-J., Qin, J.-C., Li, A.-Y., Park, C. G., Klena, J. D., Ding, H.-H., & Chen, T. (2021). Loss of the virulence plasmid by *Shigella sonnei* promotes its interactions with CD207 and CD209 receptors. *Journal of Medical Microbiology*, *70*(3). <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001297>
- Yang, C., Huang, T.-W., Wen, S.-Y., Chang, C.-Y., Tsai, S.-F., Wu, W.-F., & Chang, C.-H. (2012). Genome-wide PhoB binding and gene expression profiles reveal the hierarchical gene regulatory network of phosphate starvation in *Escherichia coli*. *PloS One*, *7*(10), e47314. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047314>
- Yang, F. (2005). Genome dynamics and diversity of *Shigella* species, the etiologic agents of bacillary dysentery. *Nucleic Acids Research*, *33*(19), 6445–6458. <https://doi.org/10.1093/nar/gki954>
- Yang, F., Yang, J., Zhang, X., Chen, L., Jiang, Y., Yan, Y., Tang, X., Wang, J., Xiong, Z., Dong, J., Xue, Y., Zhu, Y., Xu, X., Sun, L., Chen, S., Nie, H., Peng, J., Xu, J., Wang, Y., ... Jin, Q. (2005). Genome dynamics and diversity of *Shigella* species, the etiologic agents of bacillary dysentery. *Nucleic Acids Research*, *33*(19), 6445–6458. <https://doi.org/10.1093/nar/gki954>
- Yang, J., Nie, H., Chen, L., Zhang, X., Yang, F., Xu, X., Zhu, Y., Yu, J., & Jin, Q. (2007). Revisiting the Molecular Evolutionary History of *Shigella* spp. *Journal of Molecular Evolution*, *64*(1), 71–79. <https://doi.org/10.1007/s00239-006-0052-8>
- Yano, J. M., Yu, K., Donaldson, G. P., Ismagilov, R. F., Mazmanian, S. K., & Hsiao, E. Y. (2015). Indigenous Bacteria from the Gut Microbiota Regulate Host Serotonin Biosynthesis. *Cell*, *161*(2).
- Yatsunenkov, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., J., Kuczynski, J., Caporaso, J. G., Lozupone, C. A., Lauber, C., Clemente, J. C., Knights, D., ... Gordon, J. I. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. In *Nature* (Vol. 486, Issue 7402, pp. 222–227). <https://doi.org/10.1038/nature11053>
- Yavzori, M., Cohen, D., Orr, N. (2002). Prevalence of the genes for shigella enterotoxins 1 and 2 among clinical isolates of shigella in Israel. *Epidemiology and Infection*, *128*(3), 533–535. <https://doi.org/10.1017/S0950268802006866>

- Young, V. B., Schmidt, T. (2008). Overview of the Gastrointestinal Microbiota. *GI Microbiota and Regulation of the Immune System*, 29–40. https://doi.org/10.1007/978-0-387-09550-9_3
- Yudkoff, M., Daikhin, Y., Horyn, O., Nissim, I., & Nissim, I. (2008). Ketosis and brain handling of glutamate, glutamine, and GABA. *Epilepsia*, 49(s8), 73–75. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01841.x>
- Zafar, H., & Saier, M. H. (2021). Gut Bacteroides species in health and disease. *Gut Microbes*, 13(1), 1–20. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1848158>
- Zaidi, M. B., Estrada-García, T., Campos, F. D., Chim, R., Arjona, F., Leon, M., Michell, A., & Chaussabel, D. (2013). Incidence, clinical presentation, and antimicrobial resistance trends in Salmonella and Shigella infections from children in Yucatan, Mexico. *Frontiers in Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00288>
- Zaylaa, M., Al Kassaa, I., Alard, J., Peucelle, V., Boutillier, D., Desramaut, J., Dabbous & Grangette, C. (2018). Probiotics in IBD: Combining in vitro and in vivo models for selecting strains with both anti-inflammatory potential as well as a capacity to restore the gut epithelial barrier. *Journal of Functional Foods*, 47, 304–315. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.05.029>
- Zhang, J., Zhang, Y., Wang, Q., Li, C., Deng, H., Si, C., & Xiong, H. (2019). Interleukin-35 in immune-related diseases: protection or destruction. *Immunology*, 157(1), 13–20. <https://doi.org/10.1111/imm.13044>
- Zhang, Y., & Lin, K. (2012). A phylogenomic analysis of Escherichia coli / Shigella group: implications of genomic features associated with pathogenicity and ecological adaptation. *BMC Evolutionary Biology*, 12(1), 174. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-174>
- Zhang, Z., Jin, L., Champion, G., Seydel, K. B., & Stanley, J. (2001). Shigella infection in a SCID mouse-human intestinal xenograft model: Role for neutrophils in containing bacterial dissemination in human intestine. *Infection and Immunity*, 69(5), 3240–3247. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.5.3240-3247.2001>
- Zhou, Y., Zhu, X., Hou, H., Lu, Y., Yu, J., Mao, L., Mao, L., & Sun, Z. (2018). Characteristics of diarrheagenic Escherichia coli among children under 5 years of age with acute diarrhea: a hospital based study. *BMC Infectious Diseases*, 18(1), 63. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2936-1>
- Zoetendal, E. G., Raes, J., Van Den Bogert, B., Arumugam, M., Booijink, C. C., Troost, F. J., Bork, P., Wels, M., De Vos, W. M., & Kleerebezem, M. (2012). The human small intestinal microbiota is driven by rapid uptake and conversion of simple carbohydrates. *ISME Journal*, 6(7), 1415–1426. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.212>
- Zou, Y., Zhao, P., & Axmacher, J. C. (2023). Estimating total species richness: Fitting rarefaction by asymptotic approximation. *Ecosphere*, 14(1). <https://doi.org/10.1002/ecs2.4363>
- Zúñiga, M., Monedero, V., & Yebra, M. J. (2018). Utilization of Host-Derived Glycans by Intestinal Lactobacillus and Bifidobacterium Species. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1917. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01917>
- Zurawski, D. V., Mummy, K. L., Badea, L., Prentice, J. A., Hartland, E. L., McCormick, B. A., & Maurelli, A. T. (2008). The NleE/OspZ Family of Effector Proteins Is Required for Polymorphonuclear Transepithelial Migration, a Characteristic Shared by Enteropathogenic Escherichia coli and Shigella flexneri Infections. *Infection and Immunity*, 76(1), 369–379. <https://doi.org/10.1128/IAI.00684-07>
- Zychlinsky, A., Thirumalai, K., Arondel, J., Cantey, J., Aliprantis, A., & Sansonetti, P. (1996). In Vivo Apoptosis in Shigella flexneri Infections. In *INFECTION AND IMMUNITY* (Vol. 64, Issue 12).

ANEXOS

GENOMAS DE REFERENCIA USADOS						
Clave	Organismo	Cepa	Código del ensamble	Código del NCBI RefSeq	Tamaño del genoma	# de contigs
Ref1	<i>Shigella flexneri</i> 2a	301	ASM692v2	GCF_000006925.2	4.8 Mb	2
Ref2	<i>Shigella flexneri</i> 2a	2457T	ASM740v1	GCF_000007405.1	4.6 Mb	1
Ref3	<i>Shigella flexneri</i> 1 ^a	670	ASM224013v1	GCF_002240135.1	4.9 Mb	3
Ref4	<i>Shigella flexneri</i> 2 ^a	ATCC 29903	ASM295021v1	GCF_002950215.1	4.9 Mb	3
Ref5	<i>Shigella flexneri</i> 5a	M90T	ASM479958v1	GCF_004799585.1	4.8 Mb	2
Ref6	<i>Shigella boydii</i>	ESBL-W3-2	ASM229048v1	GCF_002290485.1	4.8 Mb	154
Ref7	<i>Shigella boydii</i>	600080	ASM1339449v1	GCF_013394495.1	4.6 Mb	2
Ref8	<i>Shigella boydii</i>	600690	ASM1339451v1	GCF_013394515.1	5 Mb	3
Ref9	<i>Shigella boydii</i>	600657	ASM1339453v1	GCF_013394535.1	4.8 Mb	4
Ref10	<i>Shigella boydii</i>	602068	ASM1339455v1	GCF_013394555.1	4.8 Mb	2
Ref11	<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 29930	ASM295039v1	GCF_002950395.1	5 Mb	2
Ref12	<i>Shigella sonnei</i>	AR_0030	ASM360642v1	GCF_003606425.1	5.1 Mb	3
Ref13	<i>Shigella sonnei</i>	AR-0426	ASM872721v1	GCF_008727215.1	5 Mb	1
Ref14	<i>Shigella sonnei</i>	SE6-1	ASM1337481v1	GCF_013374815.1	4.8 Mb	1
Ref15	<i>Shigella sonnei</i>	UKMCC_1015	ASM1421793v1	GCF_014217935.1	4.9 Mb	3
Ref16	<i>Shigella dysenteriae</i>	E670/74	ASM294385v1	GCF_002943855.1	5.2 Mb	2
Ref17	<i>Shigella dysenteriae</i>	ATCC 13313	ASM294967v1	GCF_002949675.1	4.6 Mb	2
Ref18	<i>Shigella dysenteriae</i>	CFSAN029786	ASM966213v1	GCF_009662135.1	4.9 Mb	5
Ref19	<i>Shigella dysenteriae</i>	SWHEFF_49	ASM2235408v1	GCF_022354085.1	5.2 Mb	2
Ref20	<i>Shigella dysenteriae</i>	NCDC 599-52	ASM3236349v1	GCF_032363495.1	4.9 Mb	6

Tabla suplementaria 1. Genomas de referencia descargados del NCBI. Códigos de acceso del NCBI y características de los 20 genomas descargados del NCBI y usados como genomas de referencia en el análisis filogenético de las cepas de *Shigella*.

GENES BUSCADOS EN LOS GENOMAS SECUENCIADOS			
Gen	Organismo	ID del Gen	Longitud del gen
<i>sepA</i>	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301	1238005	4,095 nt
<i>pic</i>	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301	1026598	4,119 nt
<i>sigA</i>	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301	1026065	3,858 nt
<i>sat</i>	<i>Shigella dysenteriae</i> str. BCW_4872	58463041	3,888 nt
<i>pet</i>	<i>Escherichia coli</i> 042	12703439	3,888 nt
<i>icsA/virG</i>	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301	1238021	3,309 nt
<i>icsB</i>	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301	1238057	1,485 nt
<i>ipgB1</i>	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301	1238045	627 nt
<i>ipgB2</i>	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301	1238044	567 nt
<i>ipgD</i>	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301	1238042	1,617 nt
<i>ipgA</i>	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301	1238046	390 nt
<i>ipaA</i>	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301	1238056	1,902 nt
<i>ipaB</i>	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301	1238055	1,743 nt
<i>ipaC</i>	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301	1238054	1,092 nt
<i>ipaD</i>	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301	1238053	999 nt
<i>ipaJ</i>	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301	3170828	780 nt
<i>ospB</i>	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301	1238026	867 nt
<i>ospC1</i>	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301	1238025	1,413 nt
<i>ospC3</i>	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301	1238024	1,455 nt
<i>ospE1</i>	<i>Shigella flexneri</i> 5	13917185	267 nt
<i>ospE2</i>	<i>Shigella flexneri</i> 5	13917074	267 nt
<i>ospF</i>	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301	1238011	720 nt
<i>ospG</i>	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301	1238010	591 nt
<i>ospl</i>	<i>Shigella boydii</i> SB2:H45 str. DMB SH136	61647667	639 nt
<i>ospZ</i>	<i>Shigella flexneri</i> 6 str. 64-5500	39655727	693 nt
<i>virA</i>	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301	1237992	1,203 nt
<i>set1A</i>	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301	3200635	186 nt
<i>set1B</i>	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301	3200634	534 nt
<i>ospD3</i>	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301	1238012	1,698 nt

Tabla suplementaria 2. Genes del NCBI que se buscaron en los genomas. Características e identificador del NCBI de los 29 genes asociados al proceso de infección de *Shigella* spp. que se buscaron en los 20 genomas ensamblados.