

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

“SUBTIPIFICACIÓN MOLECULAR DE *Salmonella* spp., AISLADAS DE PRODUCTOS AGRÍCOLAS FRESCOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE PFGE”

P R E S E N T A

María Felipa López Durán

DIRECTOR

Dr. Francisco Fierro Fierro

CO-DIRECTOR

MC Abraham Itzcoatl Acatzi Silva

abril de 2018

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA



“SUBTIPIFICACIÓN MOLECULAR DE *Salmonella* spp., AISLADAS DE PRODUCTOS AGRÍCOLAS FRESCOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE PFGE”

TESIS

Para obtener el grado de
Especialista en Biotecnología

PRESENTA

María Felipa López Durán

DIRECTOR

Dr. Francisco Fierro Fierro

CO-DIRECTOR

M.C. Abraham Itzcoatl Acatzi Silva

Abril de 2018

“La Especialización en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001467”

México D.F. a 28 de marzo del 2017

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la
idónea comunicación de resultados

**“SUBTIPIFICACIÓN MOLECULAR DE *Salmonella* spp., AISLADAS DE
PRODUCTOS AGRÍCOLAS FRESCOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE PFGE”**

Que presentó

María Felipa López Durán

Comité Tutorial:

Director: Dr. Francisco Fierro Fierro

Co-Director: M.C. Abraham Itzcoatl Acatzi Silva

Jurado:

Lector: Dr. Jaime Amadeo Bustos Martínez

RESUMEN

El consumo de alimentos contaminados ha ocasionado la aparición de enfermedades gastrointestinales en todo el mundo, generando alertas y/o notificaciones de contaminación microbiológica en productos vegetales frescos, limitando su comercialización nacional e internacional. La Red Pulse Net creada por el Centro para el Control y la Prevención de las Enfermedades (CDC) tiene como uno de sus propósitos la identificación del agente causal, su relación con los aislamientos clínicos, su transmisión, su reservorio y las fuentes de contaminación, mediante la subtipificación molecular de patógenos bacterianos, a través de la técnica de Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE). En el presente trabajo se estandarizó y verificó la correcta aplicación de la técnica de PFGE en el Laboratorio de Diagnóstico para la Detección de Organismos Patógenos (LDDOP), del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), y se subtipificaron cepas del género *Salmonella* provenientes de aislamientos de productos agrícolas frescos y de cepas donadas al laboratorio.

SUMMARY

The consumption of contaminated food has caused the appearance of gastrointestinal diseases worldwide, generating alerts and / or notifications of microbiological contamination in fresh vegetable products, limiting their national and international commercialization. The Pulse Net Network created by the Center for the Control and Prevention of Diseases (CDC) has as one of its purposes the identification of the causal agent, its relationship with clinical isolates, its transmission, its reservoir and the sources of contamination, by subtyping of bacterial pathogens, through the technique of Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). In the present work, the correct application of the PFGE technique was standardized and verified in the Laboratorio de Diagnóstico para la Detección de Organismos Patógenos (LDDOP), of the Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), and strains were subtyped. *Salmonella* genus from isolates of fresh agricultural products and from strains donated to the laboratory.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1 IDENTIFICACIÓN POR TÉCNICAS MOLECULARES	7
2. JUSTIFICACIÓN	9
3. OBJETIVOS	10
4. MÉTODOLÓGÍA	11
4.1 SIEMBRA DEL PATÓGENO.....	11
4.2 ELABORACIÓN DE <i>PLUGS</i>	12
4.3 DIGESTIÓN DEL ADN EN LOS BLOQUES DE AGAROSA.....	15
4.4 ELECTROFORESIS	16
4.5 TINCIÓN DEL GEL (RIBOTT, E. M. <i>ET AL.</i> , 2006)	19
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
5.1 ANÁLISIS DE PATRONES DE BANDEO POR BIONUMERICS 6.6	29
6. CONCLUSIONES.....	32
7. PERSPECTIVAS.....	32
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

1. INTRODUCCIÓN

Derivado del incremento del comercio internacional, ha sido constante en todo el mundo la aparición de brotes de enfermedades gastrointestinales asociadas con el consumo de frutas y hortalizas frescas contaminadas, situación que ha traído como consecuencia que los gobiernos requieran de la implementación de estrategias legales y técnicas que contribuyan al aseguramiento de la inocuidad de los productos alimentarios (definiéndose el término inocuidad como “la característica que tiene un alimento de no causar daño a la salud del consumidor por efectos de algún contaminante” (Beuchat, 1996)).

En ese sentido, actualmente los países que exportan alimentos para consumo humano requieren de una certificación sanitaria, mediante la cual se verifique el establecimiento de controles y actividades para disminuir los riesgos de contaminación física, química y microbiológica durante la producción de alimentos, que les permita colocarse y participar en el mercado internacional. De la misma manera, se ha generado un compromiso mutuo entre países para lograr una reducción significativa en la incidencia de enfermedades transmitidas por alimentos, en el cual nuestro país participa de manera activa.

La estratégica situación geográfica de México favorece la producción, durante prácticamente todo el año, de vegetales, frutas y hortalizas (tomates, chiles, aguacates, melones, guayabas, berries o frutillas, col repollo, uvas, plátanos, cebollas, lechugas, brócoli, limones, naranjas, piñas, papaya, peras, arándanos, kiwis, hierbas aromáticas, etc.), lo que permite su comercialización con varios países y genera divisas al país (SIAVI, 2011). Sin embargo, a lo largo de este intercambio comercial, también se han generado alertas y/o notificaciones de contaminación en ciertos productos agropecuarios mexicanos, limitando su exportación (<http://www.fda.gov/Food/RecallsOutbreaksEmergencies>). Este ha sido el caso, por ejemplo, del melón Cantaloupe, chile, tomate, papaya, pepino, cebollín, cilantro y recientemente, mango. Cultivos de importancia económica y social para nuestro país, a los que se asociaron brotes de salmonelosis en consumidores de EUA y Canadá (SENASICA, 2012).

Una herramienta creada por el Centro para el Control y la Prevención de las Enfermedades (*Center for Disease Control and Prevention “CDC”*) para la vigilancia de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA, acrónimo) es la Red Pulse Net, cuyo propósito es la subtipificación molecular de patógenos bacterianos, basado en la Epidemiología Molecular mediante la técnica de Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (*Pulse Field Gel Electrophoresis*) a fin de detectar y relacionar aislamientos clínicos en humanos y la identificación de las probables fuentes de contaminación, hasta llegar, en lo posible, a su reservorio y las vías de transmisión.

El presente trabajo tiene como objetivo subtipificar cepas del género *Salmonella* provenientes de aislamientos de productos agrícolas frescos, adquisiciones y donaciones con las que cuenta el cepario del Laboratorio de Diagnóstico para la Detección de Organismos Patógenos, del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (LDDOP, SENASICA).

1.1 Identificación por técnicas moleculares

En la actualidad hay una gran variedad de métodos para detectar cualquier organismo entre los miembros de una misma familia, entre éstos se encuentran las técnicas basadas en la biología molecular (Tenover, *et al*, 1995). Las técnicas de la Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR), Ensayo de Fluorescencia Ligado a Enzimas (ELFA) y microarreglos son algunas técnicas moleculares utilizadas por el LDDOP. En la primera se amplifican de manera exponencial fragmentos específicos de la cadena ADN del patógeno, la metodología ELFA se fundamenta en la reacción antígeno-anticuerpo determinado por la intensidad de fluorescencia de la reacción, y los microarreglos de ADN permiten detectar a los patógenos mediante la impresión de un conjunto ordenado de genes en una pequeña superficie (10,000 muestras por cm²) (Ramírez et al., 2003). Estas son consideradas pruebas presuntivas, que permiten filtrar o tamizar aquellas muestras de alimentos por posible contaminación microbiológica, al obtener resultados en 36 horas (característica deseable en una prueba rápida, pues reducir los tiempos del análisis permite evitar el rechazo e inclusive la destrucción de las mercancías agropecuarias, además de posibles pérdidas por maduración de los productos durante el comercio internacional y nacional).

La técnica de PFGE, que no pretende ser una técnica rápida de detección, permite establecer las relaciones entre las bacterias aisladas y determinar el grado de identidad genética entre ellas, con el objeto de identificar el agente infeccioso causal de la patología, la zona y el periodo en que se producen las infecciones y la fuente común de infección, (Tenover, *et al.*,1995). Esta metodología se denomina genéricamente subtipificación molecular (caracterización genética basadas en macrorrestricción, Leotta, G. A. et al., 2006), y es la base de una de las nuevas disciplinas: la “epidemiología molecular”. La PFGE es una técnica de electroforesis basada en la migración de fragmentos de ADN de gran tamaño a través de un gel de agarosa, como consecuencia de un cambio alterno de orientación del campo eléctrico durante la electroforesis, obteniéndose perfiles de fragmentos de ADN altamente discriminatorios, estables y reproducibles. Por esto se considera a la PFGE el método de elección para la epidemiología molecular de bacterias patógenas, y el CDC de Estados Unidos ha desarrollado la Red Internacional “PulseNet” de Sub-tipificación Molecular para la vigilancia de las ETA (Olea, 2004), la cual permite comparar las cepas circulantes en distintas áreas o países y establecer mapas de vigilancia de aquellos patógenos

constantemente recurrentes, como *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Campylobacter* (Bonifaz, V. B., 2008).

Para desarrollar esta técnica se utilizan enzimas de restricción que cortan el ADN bacteriano en secuencias específicas conocidas como sitios de restricción. Estas enzimas se seleccionan entre aquellas que reconocen una secuencia relativamente larga de ADN, generalmente 8 nucleótidos, de manera que su frecuencia de corte en el genoma es baja, lo que permite generar un pequeño número de fragmentos de restricción, los cuales se pueden separar con base en su tamaño mediante la técnica de PFGE. El patrón de bandas obtenido es lo que se denomina "huella dactilar" (*fingerprint*) de ADN. Por lo general, estos fragmentos de restricción son grandes y por lo tanto muy susceptibles de sufrir rotura física, por lo que necesitan tener un tratamiento especial, diferente a otros métodos de extracción y manipulación del ADN. En primer lugar, se parte de un aislamiento bacteriano puro, las bacterias se mezclan con una solución de agarosa a una temperatura en que ésta permanece líquida, y al dejarla enfriar la agarosa se gelifica y las células bacterianas quedan embebidas dentro de la matriz de agarosa, formándose un bloque o "plug". Se realiza entonces un tratamiento que produce la rotura de las células bacterianas para liberar el ADN. Este ADN, al estar embebido en la matriz de agarosa, se encuentra inmóvil, y se evita de esta forma la rotura física que se produciría en una solución líquida por el rozamiento de las cadenas de ADN. Los "plugs" se tratan a continuación con enzimas de restricción que cortan el ADN en sitios específicos. Los plugs tratados se cargan en un gel de agarosa y los fragmentos de restricción se separan de acuerdo a su tamaño de pares de bases (bp) mediante la técnica PFGE. En este tipo de electroforesis los campos eléctricos cambian periódicamente de dirección e intensidad, permitiendo la separación de fragmentos de ADN de elevado tamaño, y generándose de esta forma una "huella dactilar" del ADN de la bacteria (<http://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html>).

2. JUSTIFICACIÓN

La técnica de PFGE ha sido aplicada con muy buenos resultados para la subtipificación de muchas bacterias patógenas. Esta técnica, convenientemente estandarizada y con controles adecuados de calidad, tiene la gran ventaja de poder ser reproducible en diferentes laboratorios. Las fotografías de los fragmentos de ADN obtenidos pueden ser analizadas mediante el software BioNumerics Applied Maths, y enviadas electrónicamente a la base de datos de PulseNet CDC habilitada para comparar los perfiles de las cepas aisladas en diferentes países y regiones en tiempo real.

Por lo anterior, es de gran relevancia para el LDDOP como Laboratorio de Referencia en el diagnóstico de organismos patógenos, estandarizar, verificar e implementar la subtipificación mediante la técnica de PFGE de las bacterias aisladas e identificadas. La finalidad es utilizar esta herramienta molecular como soporte y complemento técnico-científico ante controversias sanitarias internacionales en casos de contaminación microbiológica en los alimentos, y posibilitar al laboratorio la detección temprana del brote, en particular en el caso de brotes dispersos, y la respuesta rápida y oportuna a las infecciones por patógenos bacterianos transmitidos por alimentos.

3. OBJETIVOS

Objetivo general

- Subtipificar a través de la técnica de PFGE los organismos patógenos pertenecientes al género *Salmonella* spp. aislados en el Laboratorio de Diagnóstico para la Detección de Organismos Patógenos del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA).

Objetivos Particulares

- Estandarizar, verificar e implementar la subtipificación de *Salmonella* spp. mediante la técnica de PFGE.
- Subtipificar cepas aisladas en el LDDOP
- Utilizar esta herramienta molecular como soporte y complemento técnico-científico adicional a las técnicas analíticas implementadas por el LDDOP.

4. MÉTODOLÓGÍA

La técnica se puso a punto en el Laboratorio de Diagnóstico para la detección de Organismos, y consta de seis etapas:

Cuadro 1. Etapas de proceso para la aplicación de la técnica de PFGE.

Etapas	Actividad
Siembra del patógeno	Siembra en placa con TSA (Agar Soya Trypticosa)
Elaboración de <i>plugs</i>	Suspensión bacteriana Formación de los <i>plugs</i> de agarosa Lisis celular Lavado de <i>plugs</i>
Digestión con enzimas de restricción	Corte de los <i>plugs</i> Pre-restricción Digestión con enzimas de restricción
Electroforesis	Colocación de los <i>plugs</i> en el gel de agarosa Programar las condiciones de la PFGE Realización de la electroforesis
Obtención de la imagen	Teñir, observar y guardar la imagen
Análisis bioinformático	Procesamiento y análisis de imágenes (patrones de bandeo)

4.1 Siembra del patógeno.

Se realizó la siembra en placa en medio sólido TSA (Agar Soya Trypticosa) de 44 cepas del género *Salmonella*, algunas de las cuales fueron aisladas e identificadas a partir de productos vegetales y agua por el LDDOP, y otras fueron donadas por la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAYAC) y el CDC, para subtipificarlas. Se incubaron durante 18 horas a 37 °C. Se realizó prioritariamente la subtipificación de estas cepas (ver cuadro) debido al trabajo de colaboración entre LDDOP y CCAYAC, para la implementación de esta técnica por ambos laboratorios.

Cuadro 2. Relación de cepas de *Salmonella* spp. subtipificadas.

No.	Cepa	No.	Cepa
1	<i>Salmonella</i> ser. Newport	23	<i>Salmonella</i> ser. Montevideo
2	<i>Salmonella</i> ser. Agona	24	<i>Salmonella</i> ser. Poona
3	<i>Salmonella</i> ser. Anatum	25	<i>Salmonella</i> ser. Javiana
4	<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis	26	<i>Salmonella</i> ser. Senftenberg
5	<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium	27	<i>Salmonella</i> ser. Meleagridis

6	<i>Salmonella</i> ser. Derby	28	<i>Salmonella</i> spp.
7	<i>Salmonella</i> ser. Weltevreden	29	<i>Salmonella</i> spp.
8	<i>Salmonella</i> ser. Senftenberg	30	<i>Salmonella</i> ser. Java
9	<i>Salmonella</i> ser. Kentucky	31	<i>Salmonella</i> ser. Infantis
10	<i>Salmonella</i> ser. Agona	32	<i>Salmonella</i> ser. Infantis
11	<i>Salmonella</i> ser. Albany	33	<i>Salmonella</i> ser. Give
12	<i>Salmonella</i> ser. Infantis	34	<i>Salmonella</i> ser. Pomona
13	<i>Salmonella</i> ser. Newport	35	<i>Salmonella</i> ser. Anatum
14	<i>Salmonella</i> ser. Javiana	36	<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis
15	<i>Salmonella</i> ser. Poona	37	<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium
16	<i>Salmonella</i> ser. Poona	38	<i>Salmonella</i> ser. Weltevreden
17	<i>Salmonella</i> ser. Senftenberg	39	<i>Salmonella</i> ser. Braenderup
18	<i>Salmonella</i> ser. Meleagridis	40	<i>Salmonella</i> ser. Poona
19	<i>Salmonella</i> ser. Kentucky	41	<i>Salmonella</i> 98
20	<i>Salmonella</i> ser. Hadar	42	<i>Salmonella</i> 87
21	<i>Salmonella</i> ser. Poona	43	<i>Salmonella</i> 61
22	<i>Salmonella</i> ser. Poona	44	<i>Salmonella</i> 78

4.2 Elaboración de *plugs*

4.2.1 Suspensión bacteriana.

- Se etiquetaron y colocaron 3 mL de buffer de suspensión celular (10 mL de Tris 1 M, pH 8.0, 20 mL de EDTA 0.5 M, pH 8.0, aforar a 100 mL de agua destilada estéril), en tubos estériles de 3 o 5 mL.
- Se tomaron de una a cinco colonias aisladas con un hisopo de algodón estéril y se suspendieron en los tubos con buffer.
- Se ajustó la suspensión a una densidad de 3.45 a 3.65 McF (unidades McFarland) en el nefelómetro Densicheck (Biomerieux); equivalente a una densidad óptica de 0.8-1.0 a 610 nm en un espectrofotómetro.

4.2.2 Elaboración de los *plugs* de agarosa con bacterias

- Se transfirieron 400 µL de suspensión bacteriana a tubos estériles de 1.5 mL, previamente etiquetados.
- Se añadieron 20 µL de proteinasa K (20 mg/mL) a cada tubo y se homogenizó suavemente mediante pipeteo.
- Se añadieron 400 µL de la Agarosa para *plugs* SeakemGold “SKG” al 1 % (la cual se mantuvo en el termobañó a 54-55 °C) y se homogenizó de 2 a 3 veces por pipeteo.

- Antes de su llenado, se etiquetaron los moldes para *plugs* desechables o reusables con cinta adhesiva.
- Se tomaron 400 μL de la mezcla anterior, y se llenaron tres pozos de los moldes para *plugs*, evitando la formación de burbujas.
- Se dejó solidificar los *plugs* por 15 min a temperatura ambiente.

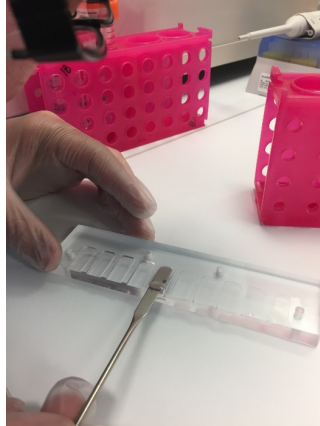


Figura 1. Desmolde de *plugs* solidificados

4.2.3 Lisis celular

- Se etiquetaron tubos Falcon de 50 mL, cada uno con 5 mL de buffer de lisis celular [25 mL de Tris 1 M, pH 8.0; 50 mL de EDTA 0.5 M, pH 8.0; 50 mL de Sarcocyl (N-lauroilsarcosina, sal de sodio) al 10%, aforar a 500 mL con agua grado biología molecular].
- A continuación se adicionaron 25 μL de proteinasa K (20 mg/mL) a cada tubo.
- Se eliminó el exceso de agarosa de los *plugs* con una navaja, se retiró el parafilm y se introdujeron los 3 *plugs* de agarosa (de la misma cepa) con la espátula en cada uno de los tubos Falcon (Fig. 1), asegurándose que estuvieran inmersos en el buffer de lisis y no pegados en las paredes del tubo (Fig. 2).
- Se colocaron los tubos en una incubadora orbital “Shaker”, a 54-55 °C durante 2 horas con agitación (150-175 rpm).



Figura 2. Verificar la inmersión de los *plugs* en el buffer de lisis celular

4.2.4 Lavado de *plugs*

- Transcurrido el tiempo de incubación, se eliminó el buffer de lisis con ayuda de las tapas Screened, para retener los 3 *plugs* contenidos en cada tubo Falcon (Fig. 3).
- Se realizaron dos lavados de los *plugs*, utilizando 15 mL de agua destilada estéril (previamente calentada a 54-55 °C) por cada tubo; cada lavado se realizó en la incubadora orbital con agitación a una temperatura de 54-55 °C, a 150-175 rpm por 15 minutos.
- Posteriormente se realizaron cuatro lavados más de los *plugs*, utilizando 15 mL/tubo de buffer TE estéril (10 mL de Tris 1 M, pH 8.0; 2 mL de EDTA 0.5 M, pH 8.0; aforar a 1000 mL con agua destilada), previamente calentado a 54-55 °C; cada lavado se realizó en la incubadora orbital con agitación a una temperatura de 54-55 °C, a 150-175 rpm por 15 minutos.
- Se decantó el buffer del último lavado, y se añadieron 5 mL de buffer TE 1X estéril. Los *plugs* se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

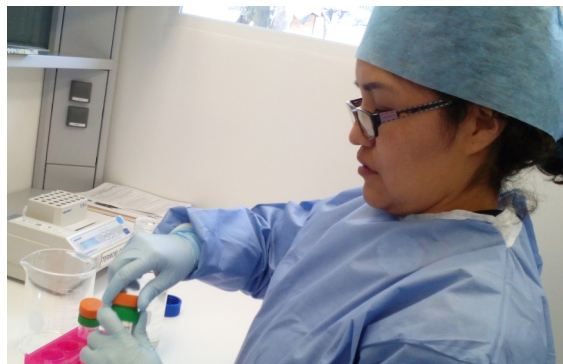


Figura 3. Uso de tapas Screened para retener los *plugs* en los tubos durante los lavados.

4.3 Digestión del ADN en los bloques de agarosa

4.3.1 Corte de los *plugs*

- Se realizó el corte de los *plugs* a un ancho de aproximadamente 2-3 mm, utilizando navajas de afeitar estériles, una caja de Petri y una hoja milimétrica (Fig. 4).
- Cada corte de *plug* se colocó en un microtubo de 1.5 mL, previamente identificado.

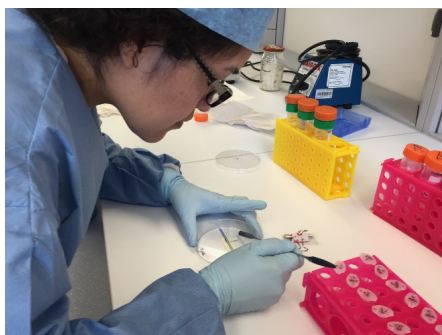


Figura 4. Corte de los *plugs*.

4.3.2 Pre-restricción

- La mezcla de Pre-restricción se preparó en un bloque frío, considerando el número de *plugs*/microtubo a procesar, de acuerdo al cuadro 3 siguiente:

Cuadro 3. Mezcla de reactivos para la Pre-restricción

Reactivo	1 corte de <i>plug</i>	10 cortes de <i>plug</i>	15 cortes de <i>plug</i>
Agua grado biología molecular estéril	180 μ L	1800 μ L	2700 μ L
Buffer de restricción 10X Roche	20 μ L	200 μ L	300 μ L
Volumen total	200 μ L	2000 μ L	3000 μ L

(Ref. <http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>).

- Se colocaron 200 μ L de la mezcla de Pre-restricción descrita en el Cuadro 3 en cada microtubo, asegurándose que el *plug* se encuentre inmerso en la mezcla.
- Se incubaron los *plugs* en un termobloque a 37 ± 1 °C durante 10 min (Fig. 5).
- Posteriormente se eliminó la mezcla usando una micropipeta de 200 μ L, teniendo cuidado de no dañar o eliminar el *plug* con la punta.



Figura 5. Incubación de los *plugs* con la mezcla de pre-restricción.

4.3.3 Digestión de los *plugs* con la enzima de restricción

- La mezcla de Restricción se preparó en un bloque frío, considerando el número de *plugs*/microtubo a procesar, de acuerdo al cuadro 4 siguiente:

Cuadro 4. Mezcla de reactivos para la Restricción

Reactivo	1 corte de <i>plug</i>	10 cortes de <i>plug</i>	15 cortes de <i>plug</i>
Agua grado biología molecular estéril	173 μ L	1730 μ L	2595 μ L
Buffer de restricción (10X) Roche	20 μ L	200 μ L	300 μ L
BSA (10 mg/mL)	2 μ L	20 μ L	30 μ L
Enzima <i>Xba</i> I (10 U/ μ L)	5 μ L	50 μ L	75 μ L
Volumen total	200 μ L	2000 μ L	3000 μ L

(Ref. <http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>)

- Se colocaron 200 μ L de la mezcla de Restricción descrita en el Cuadro 4 en cada microtubo, asegurándose que el *plug* se encuentre inmerso en la misma.
- Se incubaron los *plugs* en un termobloque a 37 ± 1 °C durante 2 h.
- Posteriormente se eliminó la mezcla de restricción usando una micropipeta de 200 μ L, teniendo cuidado de no dañar o eliminar el *plug* con la punta.
- Se agregaron 200 μ L de TBE 0.5X a cada microtubo, manteniéndolo durante 5 minutos a temperatura ambiente.

4.4 Electroforesis

4.4.1 Colocación de los *plugs* en el gel de agarosa.

- Se realizó un lavado del molde con agua destilada y se limpió con etanol al 70 % antes de su uso.
- Se preparó la agarosa para hacer el gel al 1 % durante el tiempo de incubación con la enzima de restricción.
- Terminada la incubación, se pescaron los *plugs* con ayuda de una espátula y se colocaron en la parte inferior de los dientes del peine, retirando el exceso de agua con toallas Kimwipes (Fig. 6). Los *plugs* de la cepa de referencia *Salmonella* Braenderup H9812 se colocan en los carriles 1, 5, 10 y 15 para un gel de 15 pozos, y en los carriles 1, 5 y 10 para un gel de 10 pozos, como marcador de peso, para comparar los fragmentos obtenidos de acuerdo a su tamaño en pb y las cepas a subtipificar en los pocillos restantes.
- Se niveló la cámara del gel con el nivel de burbuja circular, y se aseguró que los *plugs* estuvieran en contacto con la superficie negra de la cámara del gel.

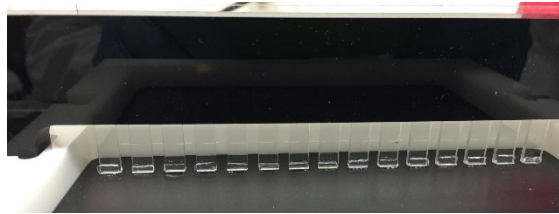


Figura 6. Colocación de los *plugs* en el peine.

- Se adicionó con cuidado la agarosa al 1% atemperada a 50-54 °C al molde, evitando la formación de burbujas y que se muevan los *plugs* del peine (Fig. 7). Se dejó solidificar durante 30 min a temperatura ambiente y después a 4°C en el refrigerador.

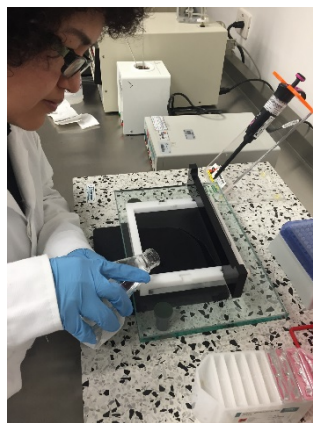


Figura 7. Adición de agarosa en el molde del gel.

- Se retiró el peine y las paredes laterales del molde, y se eliminó el exceso de agarosa de los lados y de la parte inferior de la plataforma con Kimwipes.

4.4.2 Preparación de la cámara de PFGE

- Se realizó un lavado de la cubeta de PFGE con agua destilada y se limpió con etanol al 70 %, se niveló con el nivel de burbuja circular antes de su uso y se colocó el marco negro del gel en la cámara de electroforesis.
- Se agregaron 2.5 L de Buffer TBE 0.5X (45 mM Tris-ácido bórico, 1 mM EDTA pH 8) a la cámara, se conectó la fuente de poder, seguido de la bomba (con una velocidad de 70 para un flujo aproximado de 1 L/min) y el refrigerante (programado a 14 °C).
- Se dejó circular el buffer TBE 0.5X por 15 minutos, y se acomodaron las mangueras para evitar la formación de burbujas.
- Finalmente se colocó el gel de agarosa, con los *plugs* dentro de los pocillos del gel, en el marco negro de la cámara de electroforesis (Fig. 8).



Figura 8. Colocación del gel de agarosa en la cámara de electroforesis.

4.4.3 Programación de las condiciones de electroforesis (Fig.9).



Figura 9. Componentes del sistema de electroforesis de campos pulsados

Programa *Salmonella spp.* Xbal (Ribott, E. M. *et al.*, 2006)

- Condiciones de electroforesis de campos pulsados.
 - Se utilizó el Autoalgoritmo diseñado para un rango de tamaños de los fragmentos de ADN entre 30 y 700 kb.

- Valor de Tiempo de pulsos (*Switch time*) inicial: 2.16 segundos
- Valor de Tiempo de pulsos (*Switch time*) final: 63.8 segundos
- Ángulo de 120°
- Voltaje de 6 V/cm,.
- Tiempo de la corrida de 18 a 19 horas

4.5 Tinción del gel (Ribott, E. M. et al., 2006)

- Se tiñó el gel de agarosa con solución de bromuro de etidio (10 mg/mL) durante 30 min en agitación constante.
- Se enjuagó el gel dos veces con ± 400 mL de agua destilada durante 20 min.
- Se observó y guardó la imagen del gel en el fotodocumentador BioRad Gel Doc XR+, en formato TIF con un tamaño de 310 Kb.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En base a la metodología antes mencionada, se realizaron 8 geles de agarosa en las instalaciones del Laboratorio de Diagnóstico para la Detección de Organismos Patógenos, los cuales se muestran a continuación.

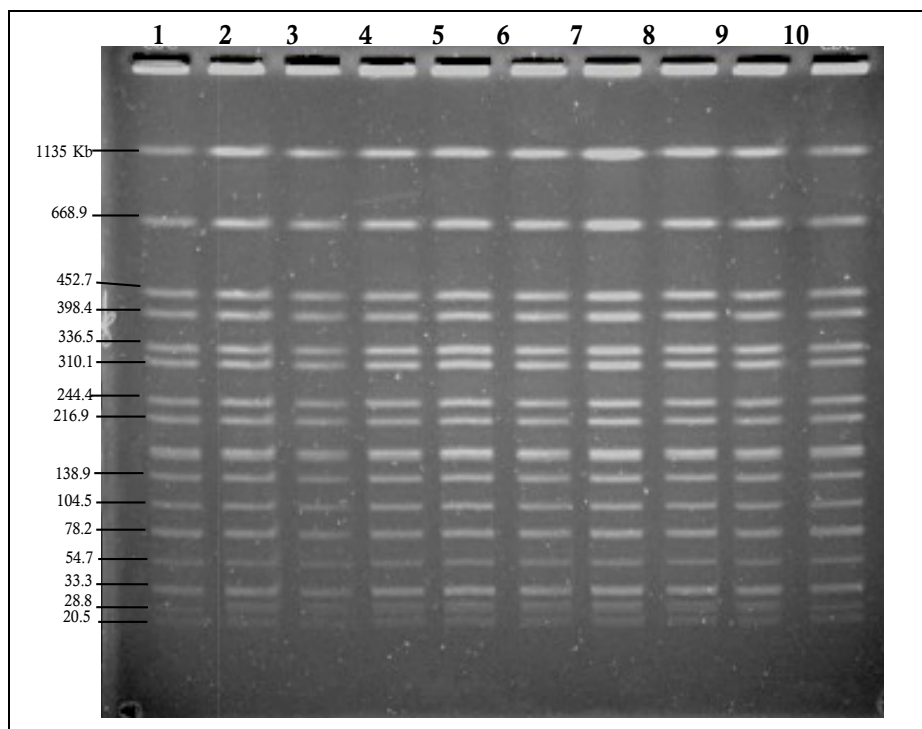


Figura 10. Gel de agarosa con cepas de referencia de *Salmonella* ser. Braenderup. Junto al primer carril se observa el tamaño de los fragmentos de ADN en kilobases (Kb) generados por este patrón de referencia.

Se realizó un primer gel con muestras de la cepa de referencia *Salmonella* ser. Braenderup para poner a punto el método de preparación de muestras y la electroforesis (Figura 10). Derivado de este primer paso de estandarización, se identificaron puntos críticos en la aplicación de la técnica, principalmente al ajustar las densidades ópticas de la suspensión celular; en los carriles 1 a 3 la suspensión bacteriana alcanzó una absorbancia de 0.8, y en los carriles 4 a 10 se tuvo una absorbancia de 1.0, a una longitud de onda de 610 nm en un espectrofotómetro. Una mayor cantidad de células en la suspensión ocasiona una alta concentración de ADN originando la presencia de fantasmas en las bandas (BioRad, Bulletin 6225/2014). Adicionalmente, es importante considerar que la suspensión bacteriana debe provenir de cultivos jóvenes de 18 a 24 horas, para lograr una adecuada diferenciación entre bandas y evitar un lisado celular (Bulletin 6224, de BioRad, 2014).

De la misma manera, en algunos casos se puede observar en el gel bandas con una apariencia distorsionada, debido al tamaño y la forma en que se realiza el corte de los *plugs*: gruesos, delgados, anchos, angostos o con bordes irregulares en los lados (Fig. 11, 12 y 13), al utilizar navajas con poco filo, o por no ensamblar perfectamente los moldes para *plugs* durante su elaboración, provocando que no se permita una correcta distinción de las bandas inferiores. Por lo que es necesario utilizar solo los *plugs* que tengan un tamaño consistente de 2 mm aproximadamente y parejos.

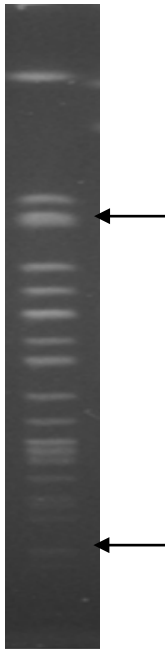


Figura 11. Patrón de *S.* ser. Agona, con bandas inferiores angostas e indistinguibles, debido al corte pequeño del *plug*.

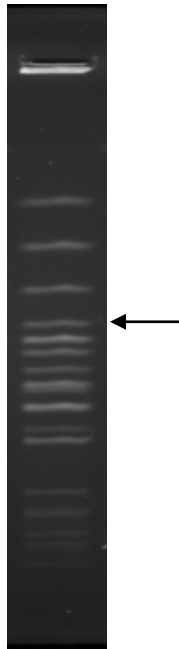


Figura 12. Patrón de *S.* ser. Pomona, con bandas irregulares debido a un mal corte del *plug*.

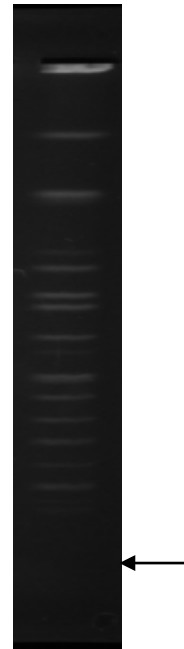


Figura 13. Patrón de *S.* ser. Braenderup H9812, donde no son distinguibles las bandas inferiores.

Para la elaboración de los siguientes geles se utilizaron otras cepas, en donde se incluyó a *S.* ser. Saint-Paul, obteniéndose barridos completos en sus carriles 2 y 3 (Fig. 14); sin embargo, debido al intercambio de experiencias de la aplicación de esta técnica con el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), se requiere agregar 1 gr de Tiourea en 100 mL de agua estéril grado PCR, para después agregar 2 mL de la solución a los 2.25 L de buffer TBE 0.5X, justo antes de iniciar la electroforesis, en las cepas *Salmonella* ser. Saint-Paul.

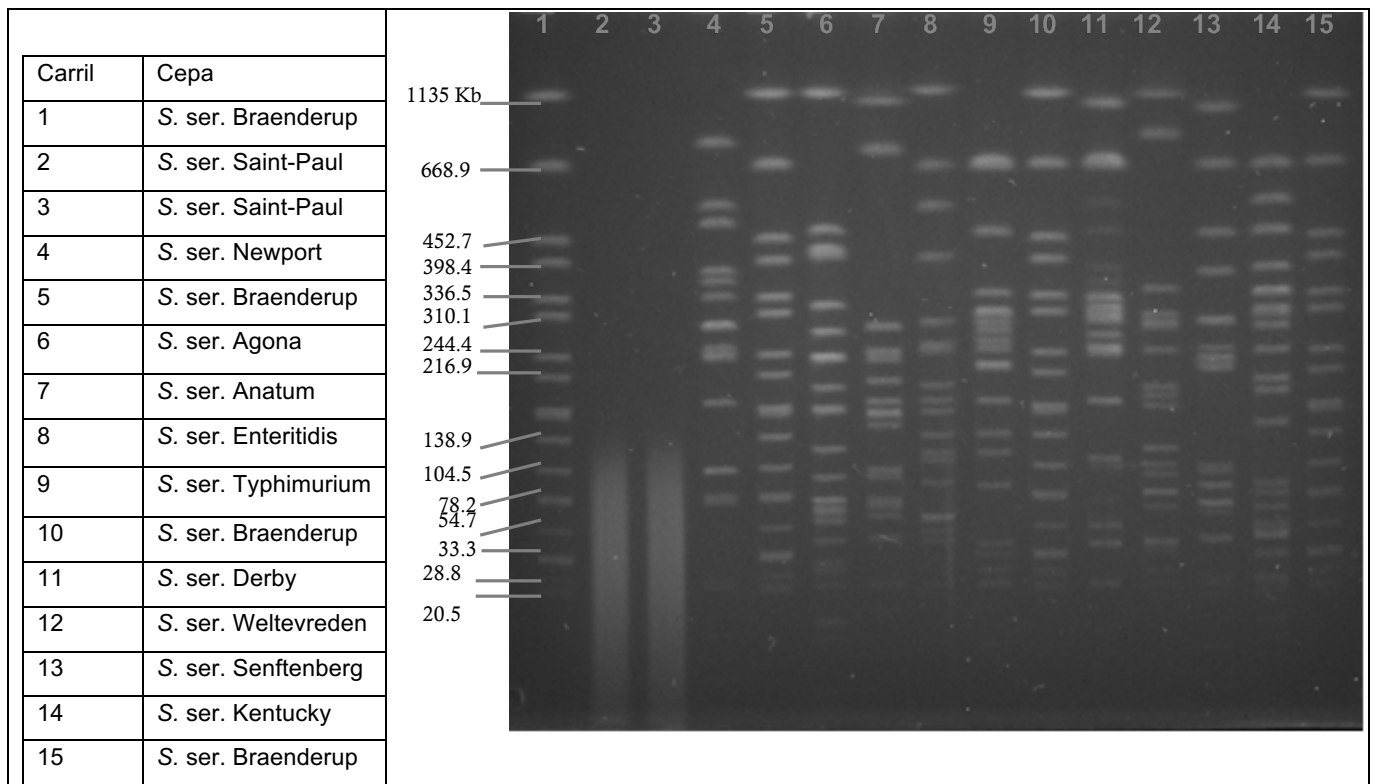


Figura 14. Gel de agarosa con barrido en los carriles 2 y 3 con *Salmonella* ser. Saint- Paul.

La tiourea se utiliza para cepas que no producen un patrón, actúa como un agente reductor y neutraliza los agentes oxidantes que se generan cuando se ejecuta la corriente eléctrica a través del buffer, evitando la degradación del ADN durante la electroforesis; sin embargo, la adición de tiourea no ayuda a obtener un bandeo, cuando los *plugs* están deteriorados por una deficiente digestión o contaminación con DNAsas (BioRad, Bulletin 6225/2014).

Es importante cumplir con los tiempos y las temperaturas establecidos al realizar los lavados, su finalidad es eliminar la proteinasa K en los *plugs* (Fig. 15). También es necesario respetar las condiciones de incubación durante la restricción de los *plugs*, la cantidad y la calidad de la enzima y del buffer utilizado (Fig. 16), para que no se produzcan digestiones parciales generándose fragmentos diferentes a los esperados, para que no se degrade el ADN, y para evitar que aparezcan manchas o pocas bandas (Fig. 17), tal y como se menciona en el BioRad Bulletin 6225/2014. Igualmente se debe cuidar la integridad del gel, sin fisuras, limpio de pelusas, y/o burbujas de agua, para evitar la presencia de fantasmas, barridos o distorsiones en las bandas (Fig. 18 y 19).

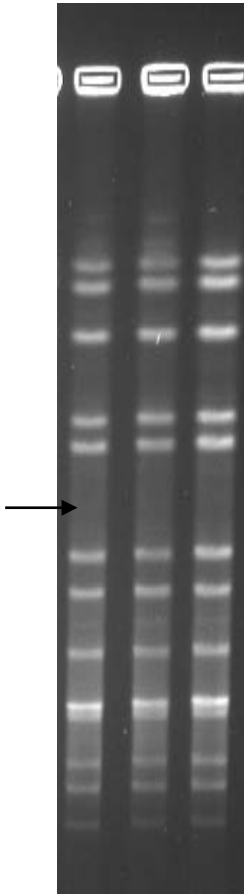


Figura 15. Patrón de bandeo con barridos ocasionados por un deficiente lavado de *plugs* y/o desteñimiento del BrEt.

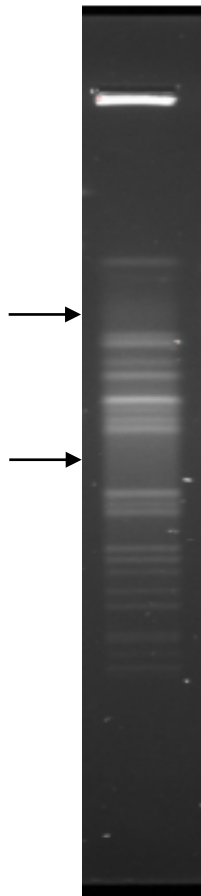


Figura 16. Patrón de bandeo de *S. ser. Javiana*, ocasionado por una deficiente restricción (enzima caducada, buffer de mala calidad)

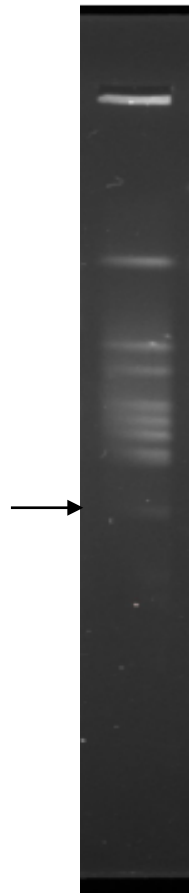


Figura 17. Patrón de bandeo de *S. ser. Poona* en donde se observa una incompleta restricción, la degradación del ADN y pocas bandas.

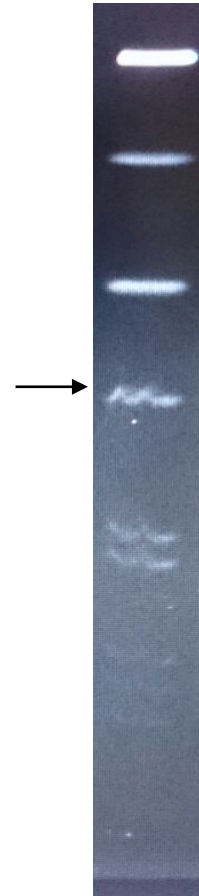


Figura 18. Patrón de bandeo de *Salmonella 87*, ocasionado por la presencia de pelusas en el molde del gel durante el vaciado de la agarosa.

De acuerdo al Bulletin 6225 de BioRad, para obtener una completa restricción del ADN se utiliza BSA, que mantiene la estabilidad de la enzima, minimiza su inactivación por inhibidores y evita que se adhiera a la pared de los tubos de reacción durante la etapa de restricción.

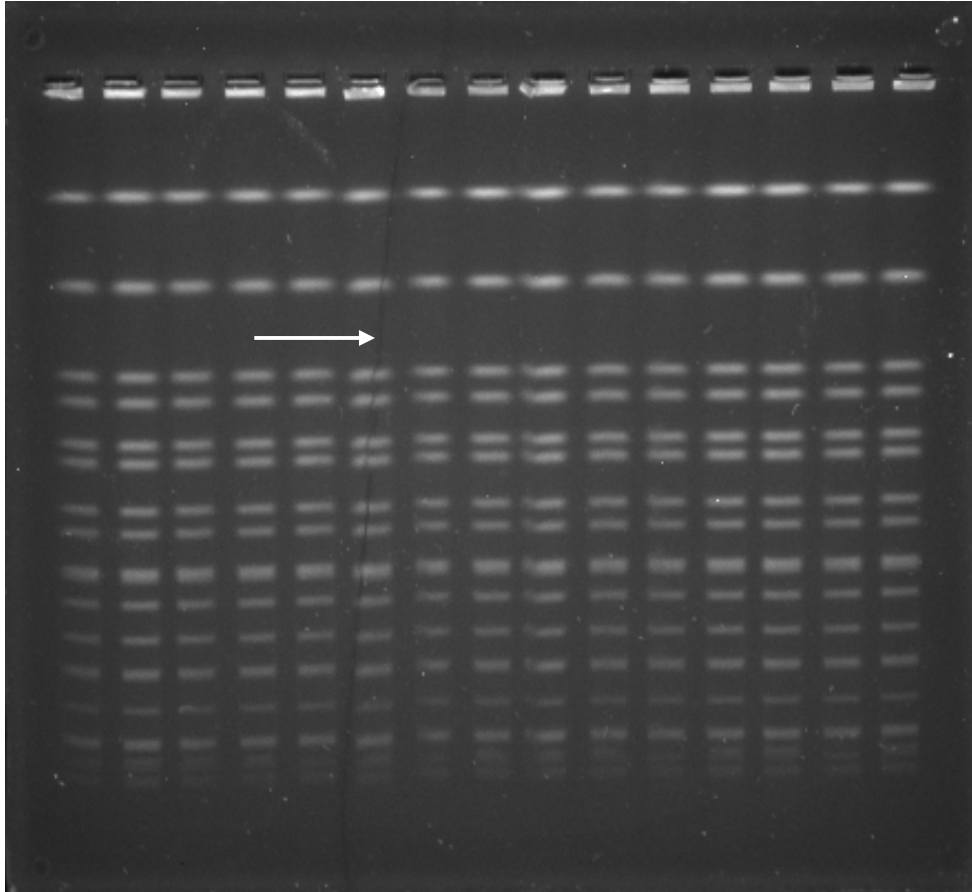


Figura 19. Gel de prueba con *S. ser. Braenderup* en los 15 carriles, realizado para verificar el correcto funcionamiento de la cámara de electroforesis después del mantenimiento correctivo a uno de sus electrodos, y en el cual se puede observar la fisura del gel en el carril 6.

Conforme se fue estandarizando la técnica, se fueron considerando los puntos críticos antes mencionados. Se elaboraron cinco geles que muestran como se fueron mejorando aquellas habilidades y destrezas en la aplicación de la técnica, visualizándose una mejor imagen de los geles realizados.

En la figura 20 se muestra un gel de 10 pozos con *plugs* elaborados en molde reusable (los cuales permiten obtener *plugs* más anchos y largos). En la imagen obtenida pueden visualizarse los diferentes patrones de bandeo obtenidos por las siete cepas de *Salmonella* spp. utilizando la enzima *Xba*I, en donde a excepción de los controles de *S. ser. Braenderup* (1, 5 y 10), ningún carril comparte un mismo patrón de bandeo, es decir son cepas diferentes (≥ 7 diferencias en los fragmentos obtenidos, de acuerdo a los criterios de Tenover, *et al.*, 1995). Sin embargo, como se puede observar en los carriles 8 y 9, las cepas identificadas como *S. ser. Poona* presentan un patrón de bandeo muy diferente a lo esperado (≥ 7 diferencias en los fragmentos) generando incertidumbre en el resultado ya que, como se dijo anteriormente, si bien no siempre es posible

serotipificar la cepas, la serotipificación complementa y fortalece el resultado, ya que no todas las cepas (serovarietades) pueden codificar toxinas u otros factores de virulencia, debido a la presencia de plásmidos y/o alteraciones en su secuencia genética, que les dan esa característica de patogenicidad

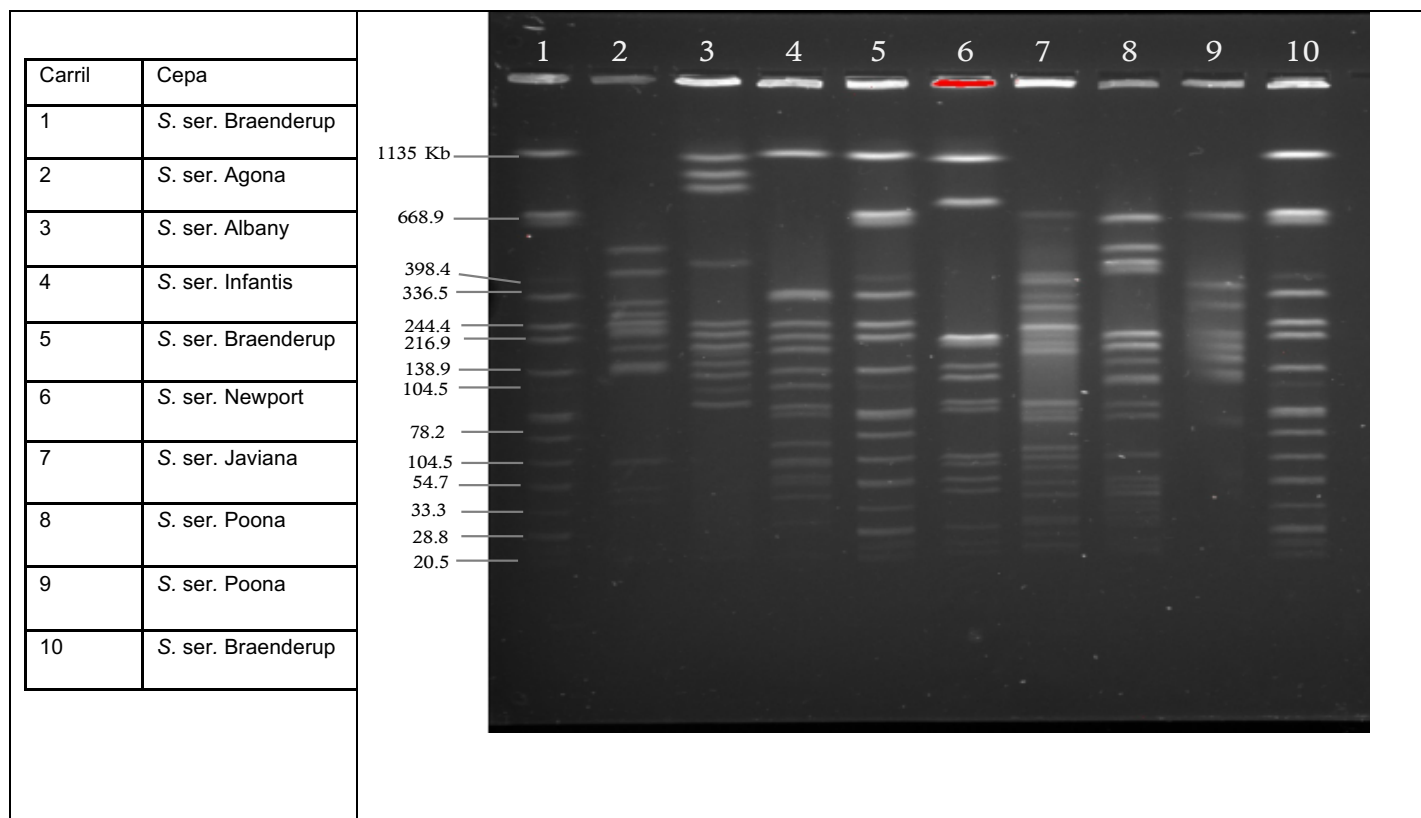


Figura 20. Gel de electroforesis de 10 pozos, en donde se observan siete patrones de bandeo diferentes a partir de cepas de *Salmonella* spp. con la enzima *XbaI*.

En la figura 21 se realizó un gel de 15 pozos, con *plugs* elaborados en molde desechables (con este tipo de molde se obtienen *plugs* más pequeños). Los carriles 1, 5, 10 y 15 corresponden a *S. ser. Braenderup*. En los 11 carriles restantes se utilizaron cepas diferentes y de diferente procedencia. En los carriles 3 y 14 se puede observar un mismo patrón de bandeo generado por *S. ser. Meleagridis* (aislados indistinguibles, de acuerdo a los criterios de Tenover, *et al.*, 1995). En los carriles 2 y 13, con *S. ser. Senftenberg*, se puede observar mucha semejanza en el patrón de bandeo (también corresponderían a aislados indistinguibles), a pesar de que en la parte inferior no son muy distinguibles las últimas bandas del carril 2, lo cual podría ser debido a la diferencia en la concentración de células en la suspensión bacteriana. Y finalmente en los carriles 7 y 8, con *S. ser. Poona*, se observan algunas ausencias de bandas de aproximadamente 500, 310 y 250 Kb (aislados cercanamente relacionados al tener de 2–3 diferencias de fragmentos entre ambos, de

acuerdo con Tenover, *et al.*, 1995), mientras que en el carril 11, también con *S. ser. Poona*, el patrón generado es muy diferente a los obtenidos en el 7 y 8 (lo cual correspondería a un aislado completamente diferente al tener ≥ 7 fragmentos diferentes).

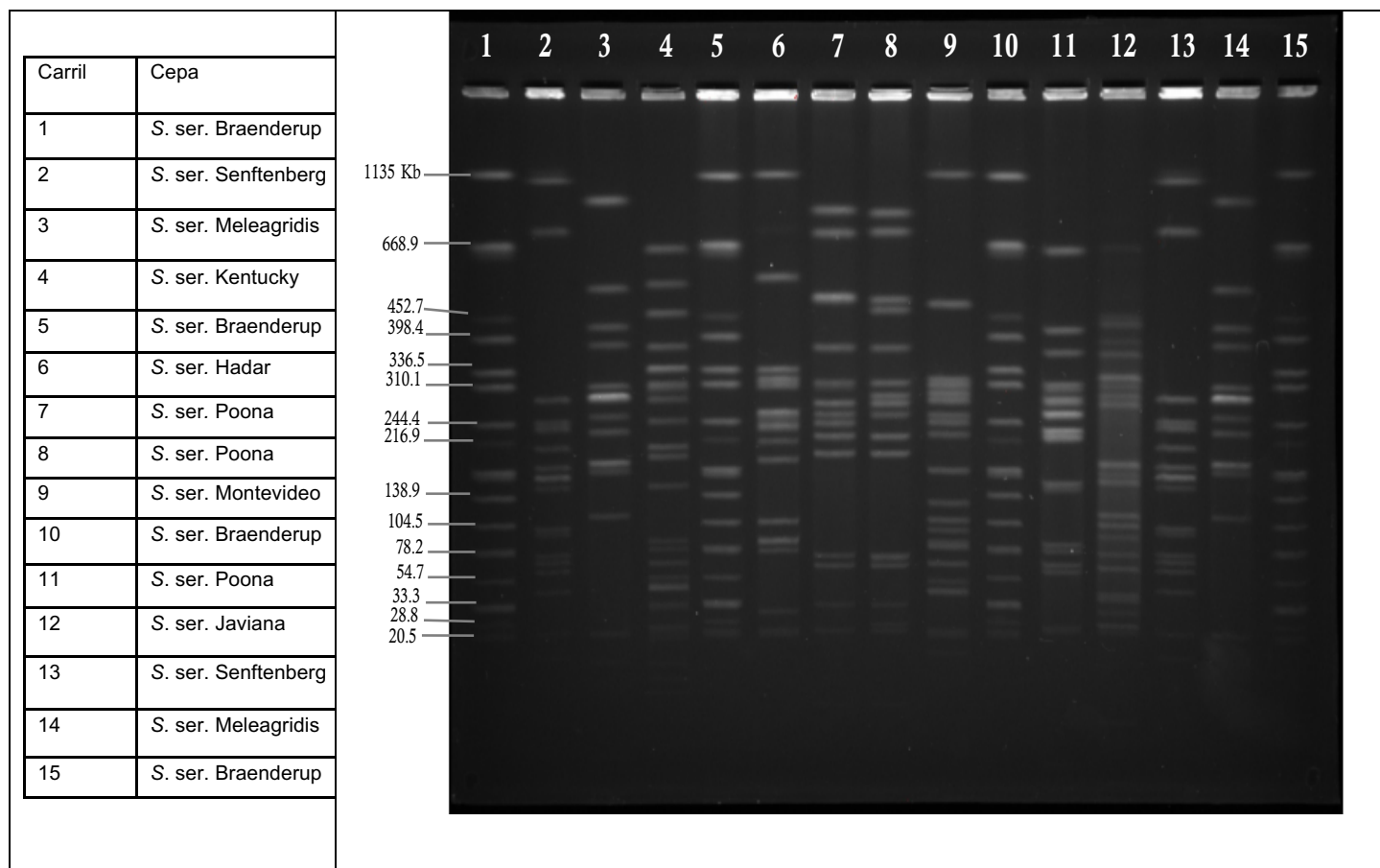


Figura 21. Gel de electroforesis de 15 pozos, con 11 cepas de *Salmonella* spp. utilizando la enzima de restricción *XbaI*.

En la figura 22 se observa un gel de 15 pozos con *plugs* elaborados en molde reusables. En los carriles 1, 5, 10 y 15 hay controles de *S. ser. Braenderup*. Los carriles 6 y 7, con *S. ser. Infantis*, muestran un mismo patrón de bandas, así como también los carriles 2 y 3 con *Salmonella* spp., que no está identificada o serotipificada. En ambos casos, se puede presumir que son aislados indistinguibles aunque no tengan el mismo origen.

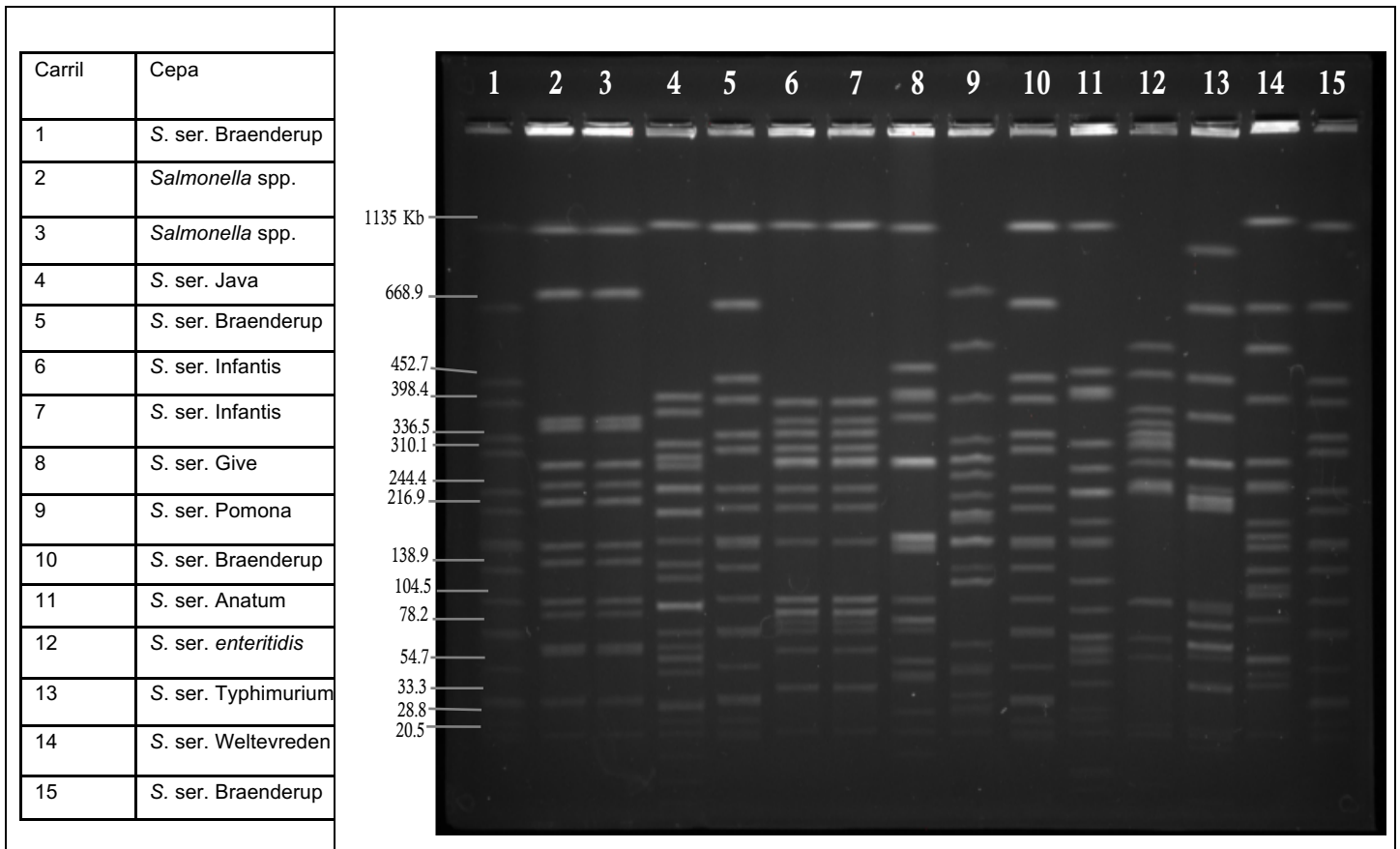


Figura 22. Gel de electroforesis de 15 pozos, en los que se observa un patrón de bandeo de 11 cepas de *Salmonella* spp.

La figura 23 muestra un gel de 10 pozos con *plugs* elaborados en molde reusables. En los carriles 1, 5 y 10 hay controles de S. ser. Braenderup. En el resto de los carriles están cepas de *Salmonella* spp. sin una serovariedad asignada, utilizadas en el proceso de evaluación para la obtención de la certificación ante la Red de PulseNet. En los carriles 1, 2, 3, 4, 5, 9 y 10 se observa una restricción con la enzima *Xba*I y en los carriles 6, 7 y 8 con la enzima *Bln*I.

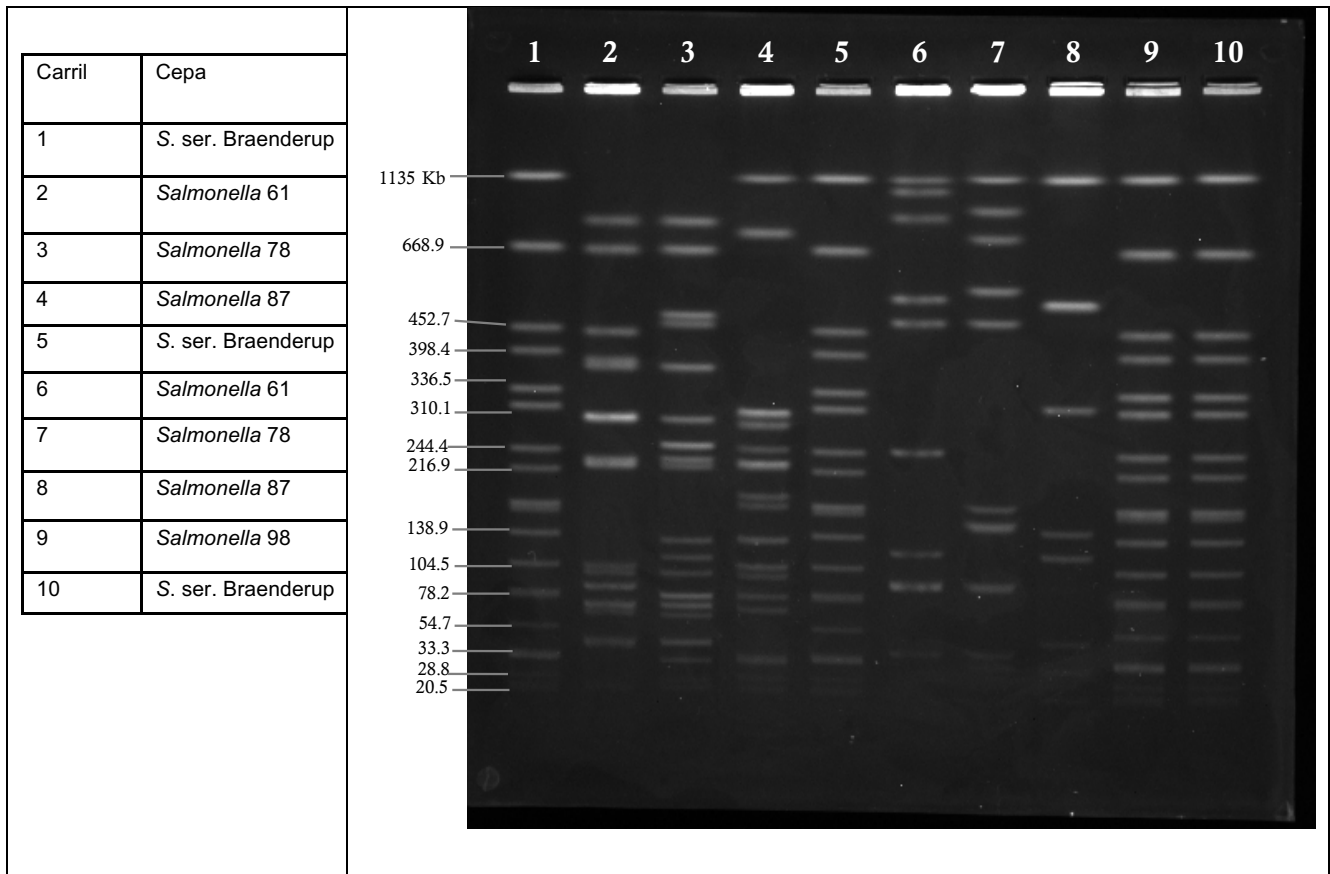


Figura 23. Gel de electroforesis de 10 pozos, con cepas de *Salmonella* spp., en donde se observa una adecuada restricción y consecuentemente una buena definición y separación de bandas.

Finalmente, en la figura 24 se muestra un gel de 10 pozos (en los carriles 1, 5 y 10 con S. ser. Braenderup). A excepción del carril 7, con *Pseudomonas* spp., el resto de los carriles contienen S. ser. Poona, las cuales generaron un patrón de bandeo completamente idéntico y perfectamente distinguible con la enzima *Xba*I (aislados indistinguibles que provienen de un mismo brote, de conforme a los criterios de Tenover, *et al.*, 1995).

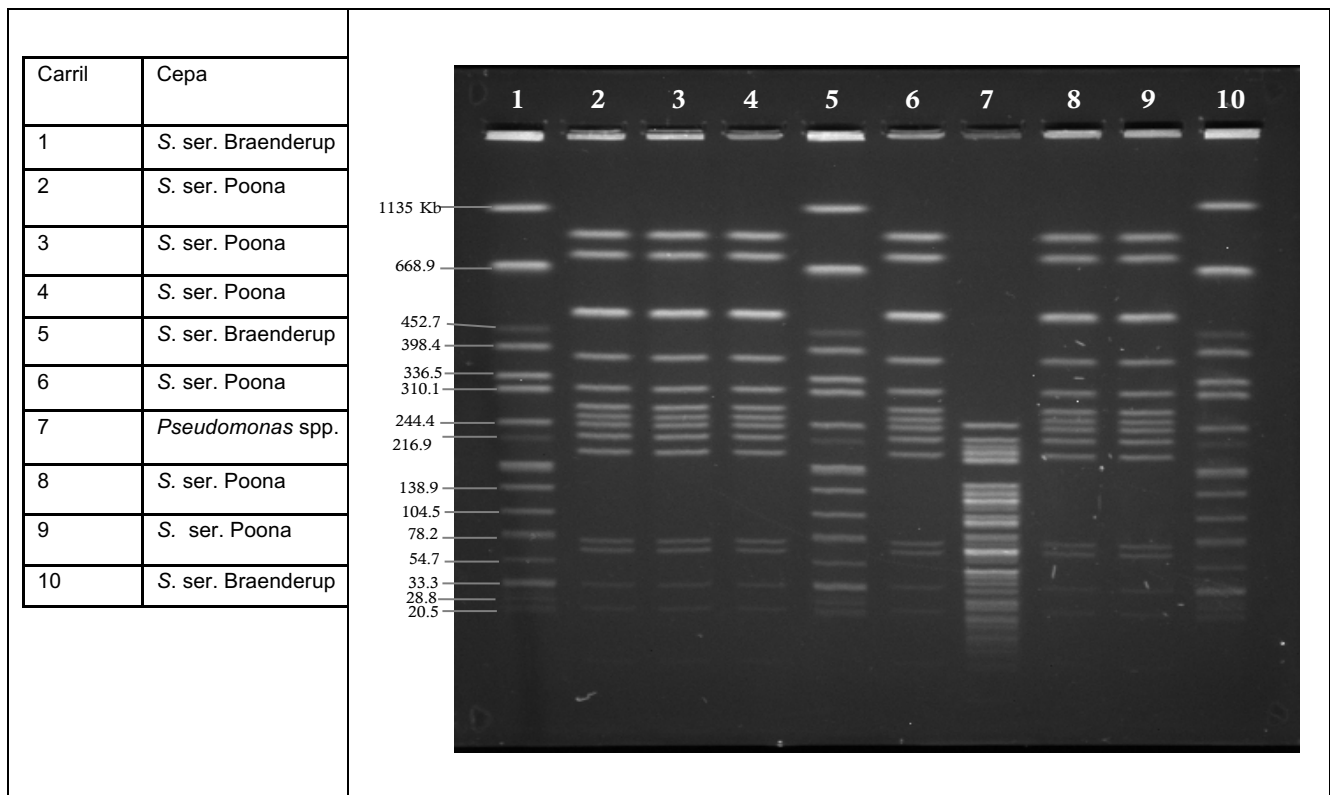


Figura 24. Gel de electroforesis de 10 pozos, con cepas de *Salmonella* spp., en donde se observa una adecuada restricción con enzima *Xba*I, reflejada en una buena definición y separación de bandas.

5.1 Análisis de patrones de bandeo por BioNumerics 6.6

El análisis bioinformático se realizó con el software BioNumerics versión 6.6 de Applied Maths, haciendo uso de las herramientas incluidas en el mismo, para obtener los ajustes óptimos para lograr una normalización correcta de las bandas patrón, la resolución, la sustracción del fondo, el suavizado/intensificado y hallazgo de las bandas (Fig. 25).



Figura 25. Pantalla obtenida a partir de la normalización de la imagen del gel, con el software BioNumerics 6.6., las coloraciones tenues de amarillo y azul indican una adecuada normalización de la imagen, para su comparación con los patrones de bandeo contenidos en la base de datos PulseNet.

Adicionalmente al uso de *Salmonella* Braenderup como patrón de referencia en cada experimento, el software contiene un sistema de referencia que permite asignar de forma automática y fiable experimentos llevados a cabo en diferentes condiciones, para intercambiar y comparar datos de imágenes obtenidas.

Una vez realizado el marcado de las bandas, es necesario crear comparaciones de similitud y generar dendrogramas entre los patrones obtenidos. La comparación se realizó con el coeficiente de similitud DICE, una optimización de 1.5% y una tolerancia de 1.5%, y el análisis de las ramificaciones mediante el método UPGMA (Agrupamiento pareado no ponderado por media aritmética), herramientas estadísticas incluidas en el software BioNumerics (Fig. 26).

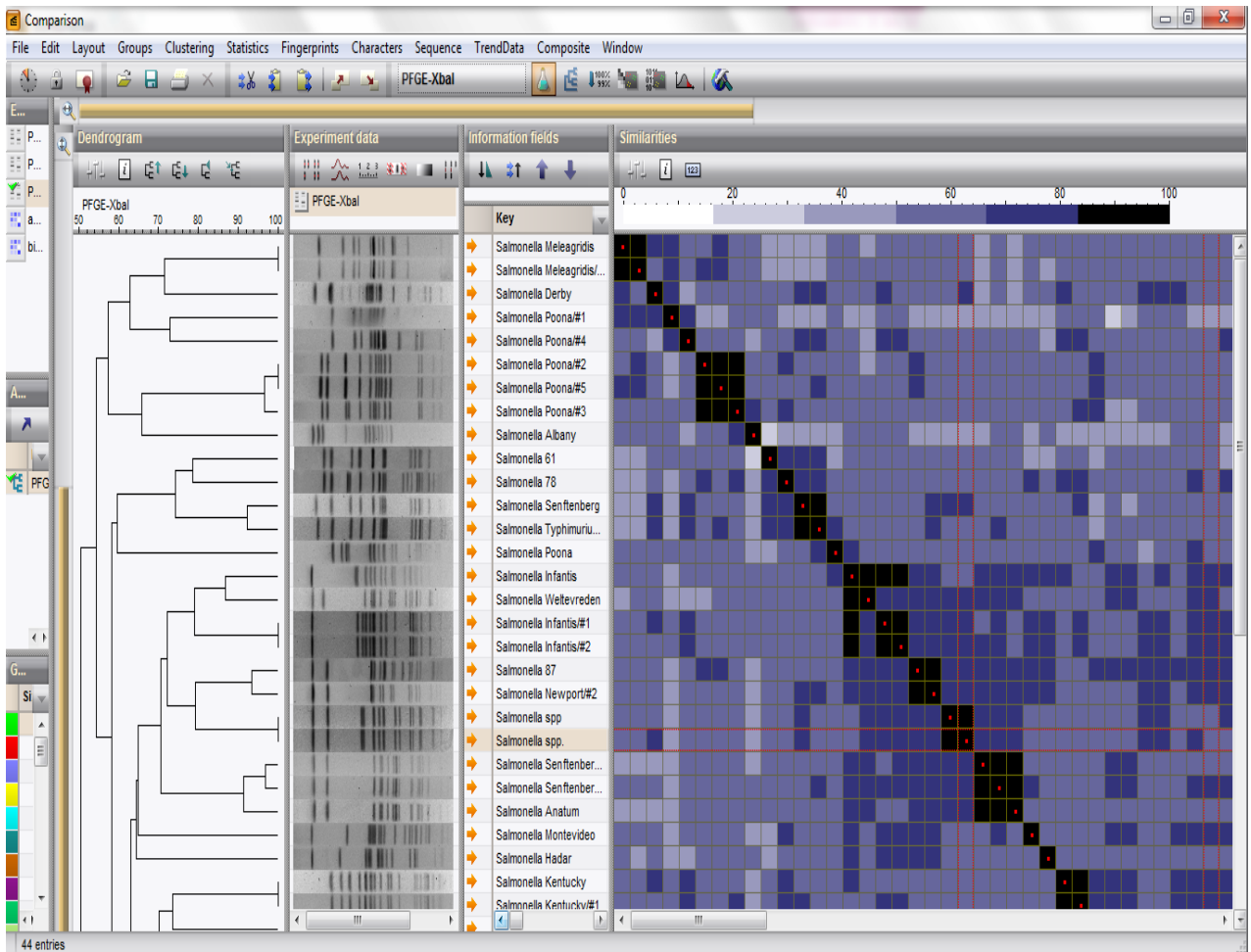


Figura 26. Pantalla de comparación de patrones de bandeo, en la primera pestaña se observa el dendrograma obtenido de la comparación de las 44 cepas subtipificadas del LDDOP, en la segunda pestaña se muestran los patrones normalizados con BioNumerics (datos del experimento) y los datos de información correspondiente a las cepas (tercer pestaña), en la última pestaña se observa el porcentaje de similitud, el color negro indican una similitud del 100%, tonalidades claras indican un porcentaje bajo de similitud.

De manera general, para lograr la optimización de la técnica de PFGE se requirió ajustar la densidad óptica de la suspensión bacteriana, estandarizar el corte de los *plugs*, verificar las condiciones de lavado, restricción y de electroforesis y desarrollar habilidades y destrezas para la manipulación de los *plugs*. Siempre que se pueda es conveniente partir de cepas previamente serotipificadas para inferir en qué casos será necesario el uso de otras enzimas de restricción o si se requiere de un tratamiento adicional para la subtipificación, y por otra parte, es importante alinear los criterios para la asignación correcta de las bandas, cuando son indistinguibles unas de otras y que pueden alterar los patrones (Tenover, *et al.*, 1995).

Finalmente, la técnica estandarizada de PFGE actualmente se aplica en el LDDOP, como una herramienta complementaria a los demás métodos aplicados (moleculares y convencionales), en

los casos de controversias sanitarias por la presencia de contaminantes microbiológicos (principalmente por *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*) en aquellos productos agrícolas frescos que se importan y exportan.

6. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha puesto a punto y estandarizado la técnica de PFGE para su utilización en las condiciones de operación del Laboratorio de Diagnóstico para la Detección de Organismos Patógenos (LDDOP), para la subtipificación de bacterias del género *Salmonella* spp.

La técnica demostró ser altamente discriminatoria, estable y reproducible para el fin propuesto de subtipificación de bacterias. Así mismo, el análisis bioinformático con el software BioNumerics 6.6. resultó una herramienta óptima y sencilla de utilizar al poder realizar comparaciones entre diferentes experimentos.

7. PERSPECTIVAS

La técnica de PFGE será una herramienta molecular base en la operación de la Red PulseNet México, conformada por la Secretaría de Salud a través del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) y la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAYAC), con la SAGARPA a través del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), que dentro del ámbito de sus atribuciones y competencias, permitirá dar trazabilidad a brotes epidemiológicos ocasionados por las Enfermedades Transmitidas por los Alimentos en el país, desde el aislamiento del patógeno encontrado en las personas hasta la producción de los alimentos, con la finalidad de determinar las posibles fuentes de contaminación y fortalecer la vigilancia epidemiológica a favor de la procuración de la salud pública.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beuchat, L.R. 1996. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *Journal of Food Protection*. 59:204-216.
- BioRad, 2014. Pulse Field Gel Electrophoresis. Bulletin 6224.
- BioRad, 2014. Pulse Field Gel Electrophoresis. Bulletin 6225.
- Bonifaz, V. B. 2008. Aplicaciones de la Epidemiología Molecular en la detección de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. *Avances en Latinoamérica, BIOFARBO*. 16: 92 - 97.
- Díaz-Tejeda Yakelin, A. Beltrán-Castillo, O. Coto-Arbelo, G. García-García. 2013. Métodos empleados para determinar relaciones filogenéticas. *Aplicaciones en ácaros de importancia agrícola. CitriFrut* 30(1) ene-jun:12-18.
- Leotta, G. A., I. Chinen, G.B. Vigo, J. Gugliada, M. Rivas. 2006. Evaluación de dos técnicas de subtipificación molecular para el estudio de *Pasteurella multocida*. *Revista Argentina de Microbiología*. 38: 190-196.
- Olea, N. A. M. 2004. Red PULSE NET en America Latina para Vigilancia de Enfermedades Transmitidas por Alimentos. *Boletín de Vigilancia en Salud Pública. Unidad de Vigilancia, Departamento de Epidemiología, División de Rectoría y Regulación Sanitaria. Ministerio de Salud*.
- Ramírez, J., L. Chávez, J. L. Santillán, S. Guzmán, 2003, MICROARREGLOS DE DNA, Mensaje Bioquímico, Vol XXVII. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO.
- Ribot, E.M., M.A. Fair, R. Gautom, D.N. Cameron, S.B. Hunter, B. Swaminathan, y T.J. Barrett. 2006. Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathogens and Disease*. 3(1): 59-82.
- Standard operating procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-o157 (STEC), *Salmonella serotypes*, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. <http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>.
- SIAVI, 2011. Sistema de Información Arancelaria Vía Internet (SIAVI) de la Secretaría de Economía. <http://200.77.231.38>
- SENASICA, 2012. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. <http://www.senasica.gob.mx/?id=5157>
- Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing and B. Swaminathan. 1995. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *Journal of Clinical Microbiology* , Sept. 1995, p. 2233–2239



ACTA DE IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

Subtipificación molecular de *Salmonella* spp. aisladas de productos agrícolas frescos mediante la técnica de PFGE.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 28 del mes de marzo del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. FRANCISCO FIERRO FIERRO
- DR. JAIME AMADEO BUSTOS MARTINEZ
- DR. ABRAHAM IZCOATL ACATZI SILVA

siendo los dos primeros asesores de la alumna y lector el tercero, de la Idónea Comunicación de Resultados, se reunieron a evaluar la presentación cuya denominación aparece al margen, para la obtención del diploma de:

ESPECIALIZACION EN BIOTECNOLOGIA

DE: MARIA FELIPA LOPEZ DURAN

y de acuerdo con el artículo 79 fracción II del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar


Acto continuo, se comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA





MARIA FELIPA LOPEZ DURAN
ALUMNA

REVISÓ




LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS




DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

ASESOR



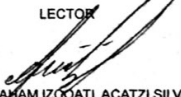
DR. FRANCISCO FIERRO FIERRO

ASESOR



DR. JAIME AMADEO BUSTOS MARTINEZ

LECTOR



DR. ABRAHAM IZCOATL ACATZI SILVA