

Identificación *in silico* de regiones repetidas en tándem en el genoma de *Ureaplasma diversum*: Implicancias en el desarrollo de un esquema MLVA para la tipificación del agente

Sofía Gutierrez¹, Jimena Seitz¹, Fernando Ibañez^{2,3}, José Ángel Giraudo¹, Pablo Tamiozzo^{1*}

1- Departamento de Patología Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto.

2- Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físicoquímicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto.

3-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Palabras clave

Ureaplasma diversum
tipificación genética
MLVA
repeticiones en tándem

Resumen. *Ureaplasma diversum* es un microorganismo patógeno que ha sido detectado en bovinos y en cerdos. Diferentes tipologías genéticas del agente han sido identificadas con anterioridad mediante técnicas pocos reproducibles o que conducen a resultados poco concluyentes. El objetivo del presente trabajo fue identificar *in silico* regiones repetidas en tándem (TR) en el genoma de *U. diversum*. Se analizó el genoma de la cepa *U. diversum* ATCC 49782, identificando las TR. Una vez identificadas las TR se diseñaron cebadores específicos, se realizó una PCR *in silico* y los productos fueron alineados contra la base de datos BLAST para determinar la especificidad de los mismos. De las 51 TR especie-específicas identificadas, el 54,9% (28) codificarían para proteínas hipotéticas, las restantes estarían ubicadas en regiones intergénicas. El tamaño de las TR identificadas varió entre 2 y 102 pares de bases, repetidas entre 1,8 y 21,5 veces, lo que permitiría discriminarlas por electroforesis o secuenciación. La identificación de un amplio repertorio de TR es el primer paso para la genotipificación del agente mediante un Análisis de Múltiples Locus de Regiones Repetidas en Tándem (MLVA), que constituiría un método más rápido, práctico y reproducible que otros métodos de tipificación previamente informados.

Citar como: Gutiérrez, S., Seitz, J., Ibañez, F., Giraudo, J., Tamiozzo, P. (2019) Identificación *in silico* de regiones repetidas en tándem en el genoma de *Ureaplasma diversum*: Implicancias en el desarrollo de un esquema MLVA para la tipificación del agente. Revista Científica FAV-UNRC *Ab Intus* 4 (2): 93-102

Recibido: 10/10/19 Aceptado: 03/12/19

***Autor para correspondencia:** Pablo Tamiozzo. E-mail: ptamiozzo@ayv.unrc.edu.ar, Ruta Nac. 36 Km 601, Río Cuarto, Córdoba, República Argentina, CP 5800, Tel. +54 358 4676215

Financiamiento: El estudio fue financiado por los proyectos PICT 2018-02148 FONCyT-ANPCyT, MinCyT, República Argentina y PPI 2016-2018, 188/2016-UNRC.

***In silico* identification of tandem repeats in *Ureaplasma diversum* genome: potential application to develop a MLVA scheme for typing of the agent**

Keywords

Ureaplasma diversum

genetic typing

MLVA

Tandem repeats

Abstract. *Ureaplasma diversum* is a pathogenic microorganism detected in cattle and pigs. Different genetic types of the agent have previously been identified with techniques producing poor reproducible or inconclusive results. The objective of the present study was to identify *in silico* tandem (TR) repeated regions in the genome of *U. diversum*. The genome of the strain ATCC 49782 was analyzed, identifying tandem repeated regions (TR). For each of the identified TR, specific primers were designed, an *in silico* PCR was performed and the products were aligned against BLAST database to determine their specificity. Of the 51 species-specific TR identified, 54.9% (28) encoding hypothetical proteins, and the rest is located in intergenic regions. The size of the identified TR varied from 2 to 102 base pairs (bp), repeated between 1.8 and 21.5 times, which would allow to discriminate them by electrophoresis or sequencing. The identification of a wide repertoire of TR is the first step for the genotyping of the agent by a Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA), which would constitute a faster, more practical and reproducible method than other typing methods previously reported.

Ureaplasma diversum es un ureaplasma primeramente descrito como un agente no patógeno en bovinos, sin embargo luego ha sido asociado con diversos trastornos reproductivos (Miller et al., 1994; Seitz et al., 2018). Además, el agente ha sido identificado en porcinos con y sin neumonía (Burgher et al., 2014), pero su papel dentro del complejo respiratorio de los cerdos es desconocido. Respecto al diagnóstico, el aislamiento del microorganismo es difícil, puesto que necesita medios de cultivo especializados, por lo que las pruebas moleculares constituyen una buena opción para su detección. Diferentes tipologías genéticas del agente han sido identificadas mediante electroforesis de campo pulsado (Buzinhani et al., 2007) y secuenciación de un fragmento del gen ARNr 16S (Marques et al., 2011). Sin embargo, para la electroforesis de campo pulsado, es necesario el aislamiento del agente, lo que debido a la dificultad en el mismo, torna esta técnica poco práctica, mientras que con el análisis del gen ARNr 16S los resultados no fueron concluyentes. Esto resalta la necesidad de encontrar una técnica de tipificación adecuada del organismo, con el fin de poder asociar una determinada tipología

genética con los diferentes cuadros patológicos que produce en bovinos, para determinar si produce patologías en porcinos, y para evaluar diferencias entre cepas aisladas de distintos hospedadores. Para la tipificación genética de agentes difíciles de aislar, el Análisis de Múltiples Locus de Regiones Repetidas en Tándem (MLVA) representa ciertas ventajas frente a otras técnicas ya que no se necesita el aislamiento del agente, es rápido y reproducible. Sin embargo no existe hasta el momento un esquema MLVA para la tipificación genética de *U. diversum*. Considerando esta carencia y aprovechando la disponibilidad de la secuencia del genoma completo de una cepa de *U. diversum* el objetivo del presente trabajo fue identificar *in silico* regiones repetidas en tándem (TR) en el genoma de *U. diversum*.

El desarrollo del trabajo fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Nacional de Río Cuarto, de acuerdo a las normas internacionales de las ciencias biomédicas (CIOMS).

El estudio se realizó con el genoma de la cepa *U. diversum* ATCC 49782 (Marques et al., 2015) disponible en GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Para

la identificación de las TR el genoma completo fue analizado utilizando el programa Tandem Repeat Finder (tandem.bu.edu/trf/trf.html). Una vez obtenidos los datos de posición, motivo de repetición, tamaño y número de repeticiones, estos datos fueron corroborados en el genoma. Para cada una de las TR se diseñaron cebadores complementarios a las regiones flanqueantes, lo más cerca posible del motivo de repetición, utilizando el programa primers3 Input versión 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primers3-0.4.0/>). Una vez obtenidos los cebadores para cada región, se realizó una PCR *in silico* utilizando el programa iPCR Server (embnet.vital-it.ch/software/iPCR_form.html). Una vez obtenido el producto de la iPCR, el mismo fue alineado en BLAST para determinar la especificidad del mismo.

Un total de 51 TR especie-específicas fueron identificadas y correctamente amplificadas *in silico*. A cada una de ellas se les asignó aleatoriamente un número y fueron nombradas con las siglas UDTR (de *Ureaplasma diversum* TR), seguida por el número asignado (Tabla 1). De las 51 TR identificadas, el 54,9% (28/51) codificarían para proteínas hipotéticas, las restantes regiones TR estarían ubicadas en regiones intergénicas (Tabla 1). En tres *locus* se identificaron dos TR. El tamaño de las TR identificadas varió entre 2 y 102 pares de bases (pb), repetidas entre 1,8 y 21,5 veces (Tabla 1).

En el presente estudio se logró identificar 51 TR en el genoma de *U. diversum*, lo que constituye un primer paso para el desarrollo de un esquema MLVA para la tipificación del agente. En este sentido, el análisis MLVA constituye un método más rápido, práctico y reproducible que otros métodos de tipificación previamente informados, como la electroforesis de campo pulsado y la secuenciación de un fragmento del gen ARNr 16S (Buzinhani et al., 2007; Marques et al., 2011). Es importante destacar que el MLVA ha mostrado un poder altamente discriminatorio para la tipificación genética de otros *Mollicutes* que afectan a bovinos y porcinos como *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma californicum*, *Mycoplasma hyorhinis* y *Mycoplasma hyopneumoniae* (Dos Santos et al., 2015; Hata et al., 2014; Pinho et al., 2012; Vranckx et al., 2011) así como también para otras bacterias patógenas (Lindstedt, 2005).

Aunque el programa utilizado para encontrar las TR puede presentar problemas de redundancia, ya que si una TR determinada contiene muchas co-

pias, puede detectar la misma, pero con diferentes tamaños del motivo de repetición (Benson, 1999), esto fue corroborado al alinear los motivos de repetición con la secuencia del genoma. Además, no tendría implicancias inmediatas en el análisis *in vitro*, ya que los cebadores fueron diseñados en zonas flanqueantes a los TR, que generalmente son regiones muy conservadas, especialmente en TR cortas (Joukhadar y Jighly, 2012).

Debido a los diferentes tamaños de las TR identificadas, aquellos mayores a 40 pb (TR6, TR23, TR30, TR34, TR39, TR44, TR45, TR48) podrían ser fácilmente identificados mediante una corrida electroforética en gel de agarosa, lo que redundaría en un menor costo de la técnica, mientras que el resto, menores a 40 pb podrían ser identificadas mediante una corrida electroforética en gel de poliacrilamida o secuenciación de diferentes tipos (Sanger, electroforesis capilar o genotipificación de alta resolución).

De todas las TR identificadas, merecen especial atención aquellas que codificarían para proteínas, ya que ha sido demostrado que las TR son más abundantes en aquellos genes que codifican moléculas expuestas en la superficie celular de las bacterias o involucrados en la biogénesis de dichas estructuras, como por ejemplo lipopolisacáridos, adhesinas y capsulas, entre otros (Zhou et al., 2014). Esto es importante ya que modificaciones en esas regiones del genoma explicarían diferencias fenotípicas entre cepas del agente. Respecto a las zonas intergénicas, pueden no reflejar tales diferencias pero ser altamente polimórficas, por lo que futuros estudios *in vitro* deben ser realizados.

Lamentablemente, el genoma de una sola cepa de *U. diversum* está disponible en las bases de datos (Marques et al., 2015), por lo que el polimorfismo de las TR identificadas no pudo ser testada *in silico*. Futuros estudios *in vitro* con cepas de *U. diversum* de diferentes orígenes deben ser realizados para determinar cuál de las TR identificadas en el presente estudio son más polimórficas y permite una mejor tipificación del agente. También son necesarios ensayos de laboratorio para estandarizar las PCR y determinar el desempeño de las mismas, con el fin de evaluar la tipificación del agente a partir de muestras clínicas dado su difícil aislamiento y cultivo.

Tabla 1. Regiones repetidas en tándem (TR) identificadas en el genoma de *U. diversum* mediante análisis in silico. Para cada TR se muestran también los cebadores (Forward y Reverse) con sus respectivas Temperaturas de melting (Tm) y el tamaños del amplicón.

ID	Posición*	Región	(TR) Motivo de repetición	Tamaño	N° Repeticiones	Cebadores Forward 3'-5' Reverse 3'-5'	Tm °C	Tamaño del amplicón
UD TR1	12448- 12498	Proteína Hipotética JM47_00065	CGAAATG- CAGAAAAAGAAGCAAAA	24	2,1	CAAAGTGATGAAGCAATCAAGTT	49,9	399
						GAGTTCAGCAAGGGCTTCAG	53,8	
UD TR2	21173- 21210	Intergénica	TGAACAATTAGCTTA	15	2,5	TGCTTGATGGATTAAATATCTTTG	48,8	250
						GATTGTTCATAAGCTAGTTGTTCAAT	51,7	
UD TR3	28270- 28307	Intergénica	TTTATAATAATAGACAATA	19	2	TGGAATTGAAGCAGAAATAATGG	49,9	236
						TCCTTCAAGCTCGATTGTGT	49,7	
UD TR4	32691- 32736	Intergénica	GTTAG	5	9,2	TCGTGGTGAATGGTAGACA	51,8	396
						TTGAAGAGGGTGACAGCTAGAAA	54	
UD TR5	32866- 32899	Intergénica	ATAG	4	8,5	GGTTAGGAAAAGTTGGTTGATGTT	52,3	248
						TGGTCAAACACAACCTAGAGATCA	52,3	
UD TR6	67270- 67350	Intergénica	TGAACCTAATTTAAGTCCAC- CAACTTTAGAACAAGAA- CATGT	42	1,9	TCGTAACAGCAAGCGTTTCTT	50,5	275
						TTTGTCTTCAGCTTGAGTTTGA	49,9	
UD TR7	71191- 71216	Intergénica	AATCCAGCC	9	2,9	AAAACCAGAACACCAATTTGC	48,5	240
						CTGTGAACATGGTCTTGACG	51,8	
UD TR8	120806- 120840	Intergénica	TTTTTTAAAGTTTAGA	15	2,3	TTGAACTGAATTTGAAACAGC	48,1	296
						AATCCAACCCAGTTACTACTATGC	54	
UD TR9	131817- 131875	Intergénica	AAGAAAATAAA- CAAGAAAATAAAG	24	2,5	CACTCAGGATGAATTTATAGTGTGTA	53,7	298
						TTTCTTGCTCTTCTTGGTTTG	49,2	
UD TR10	131833- 131879	Intergénica	AAATAAAGAAGA	12	3,9	ATGAGCTTTGGGGGAGTGAT	51,8	397
						CCACTTCGTTTGAAGTGA	49,7	
UD TR11	136631- 136672	Intergénica	CAA	3	14	GCAGCTACTCGCTTGCTTT	51,8	500
						TTGATAAATCTCTGCAACCA	47,4	
UD TR12	153008- 153054	Proteína Hipotética JM47_00640	GATAAGAAAAAAGAAG- GATCT	21	2,2	AAGAAGGAGAAACACCATCAGA	51,1	250
						TGAGTTGTGTTGTGGAGATG	51,1	

UD TR13	168491- 168531	Proteína Hipotética JM47_00680	ATATTGATTTTATAATAAAT	20	2	TGATTTTATTTTGGTCCGTCTG	49,9	319
						AGCTGAGTTGATTGATTCAAAGT	49,9	
UD TR14	170837- 170875	Intergénica	GTTAG	5	9,2	TGCTAATTAACCTGCGTTTGTAA	49,5	577
						AAAAGAAACGCTTAAAGTAGTGCAA	51,1	
UD TR15	170876- 170909	Intergénica	TTA	3	11,3	CGTAAAGGTGCTTGCTCGAT	51,8	294
						AAAGGGTCAAACCGAATTAAA	46,5	
UD TR16	185664- 185690	Proteína Hipotética JM47-00750	CAAA	4	6,8	CACCTAATCCATCAAAGAACAAA	49,9	294
						CAGGTGGGTTAGCATTTTGC	51,8	
UD TR17	187309- 187350	Proteína Hipotética JM47_00760	GAAGAAAAGCCAAAG	15	2,8	GCTTTTGAGCAACTGGTTT	49,9	365
						TTTGGAGGTTCAATCGGTGT	49,7	
UD TR18	191934- 191968	Intergénica	CAT	3	11,7	ATCCAAATAGTAATATGAAAACAGCTT	50,6	249
						TTCCTTGATTTTATAAAGCGATTAAG	50,1	
UD TR19	196087- 196112	Proteína Hipotética JM47_00775	TTATCTTTT	9	2,9	TGGGGTTGTTTGGTTTTTGT	47,7	244
						CAAAGTGATAGAGTTACAATCATTCAT	52,1	
UD TR20	196125- 196160	JM47_00775	GTT	3	11,7	TGGGGTTGTTTGGTTTTTGT	47,7	391
						TGCATTCATTAAACTTCTACAGCA	50,6	
UD TR21	206533- 206576	Proteína Hipotética JM47_00830	CAGCTAAAGAAGAAAAAG	18	2,4	AACATCGAAGTTTCTGATGAAGA	49,9	248
						GGTTTAGCAGCGCTTTTTT	48,9	
UD TR22	213884- 213914	Proteína Hipotética JM47_00850	AAT	3	10,3	GCCCTATCTCAAAAGAACAACC	53	217
						TTTGTTGTGAATTCTCTGTTTT	49,9	
UD TR23	223265- 223430	Intergénica	TTCCTCAGCTTCAAGTCT- TAATCGCTCTGCTTCTTCTT- GAGCTCTCTTAGC	51	3,3	TTCTGATTTTACTAAGACTTGTTGCT	51,7	300
						CAACGCCTTGAAGAAGAAAGA	50,5	
UD TR24	277415- 277468	Intergénica	TTATTAAATATCAATTTAATAA	22	2,4	GCCTTTGGCAACTTGTTAGG	51,8	250
						GAAACTGTTGCTTAACCCCACT	53	

UD TR25	303146- 303199	Proteína Hipotética	AAATCTATT	9	6	GCAACCATACCTAATGATAATAAAACA	52,1	400
						AAACAAGCATTAAAGAAAACACTTCTC	51,7	
UD TR26	306127- 306161	JM47_01230	TAT	3	11,7	GCTTAAAGCTATTGTTTGTGGTT	50,6	261
						AAGATCAAACATCTGATCCATCTAAG	53,2	
UD TR27	312309- 312350	Proteína Hipotética JM47_01265	TAAAATTACTAATAA	15	2,9	AAATGTAGTAACAAACAAGACTGCAT	51,7	298
						AACCCAACAAGCTGAATGAA	47,7	
UD TR28	319750- 319784	Proteína Hipotética JM47_01280	TTGTTTCAGATTCACAAG	18	2	TGGTCTTGTTTTTCATCTTCTTG	50,6	247
						AAAATCATGTGACTCTTCACAACC	52,3	
UD TR29	349502- 349534	Intergénica	ACATTTTTTAGT	12	2,8	TCTTCCACTTAACCTTCTCATTCTTT	53,2	393
						AAAAGGTAAATGGGCATATTTAGTAGT	52,1	
UD TR30	351870- 352029	Intergénica	AAATCTTGGGTTGAAAAT- CAGCAAACGATC- TATTTAGAAATCTAAACAAT- CAGCTTCAATTAATTA- AATATAGTTATA	79	2	AAAAATCGGGTTCACATACATTAGA	50,6	587
						TGTTTTAAATCAAGCAACTCAAGAA	49,5	
UD TR31	369470- 369521	Proteína Hipotética JM47_01440	TTC	3	17,3	TGATGAGCTAGAAGATGCGTTA	51,1	243
						CCTCTTCTGGTGGGTTTCC	53,8	
UD TR32	386083- 386120	Proteína Hipotética JM47_01520	ATTGATCTTAGATTAGATAC	20	1,9	TGTTCTTAAGCTGTTACGACGA	53	383
						CCAAAACAAAGTTATTATTGATGC	48,8	
UD TR33	408552- 408588	Proteína Hipotética JM47_1625	GATCAAAATCAATTT	15	2,5	CCATCCTTGTTGTTTTCTTCTC	51,7	348
						TCTTTATACAGACAAGCTGGTAACTCA	55,2	
UD TR34	415270- 415493	Intergénica	AACGGCGATAAATCAGAA- GAGTGCGGATAAACTCCTA- AAAATAATAAATTAGTGG- CAATAAATCAGAAGAACGGC- GATAAATT	84	2,7	TAGAAATGAATTAGAGCCTGAGTTT	51,1	560
						GAATGGTTTCGATTCTTTTGAA	48,1	
UD TR35	470029- 470060	Proteína Hipotética JM47_01905	AGTTTGAGCTTG	12	2,7	TGAGCTTGAGTTTGAGCTTGA	50,5	193
						CATGGCGTAAGAGAATGAACT	51,1	
UD TR36	477241- 477281	Proteína Hipotética JM47_01915	TAA	3	13,7	GCAACATTTTTATGTGTTTTATT	47,1	152
						TTGATATTAAAGCTTCAGAAAGAGTGA	52,1	

UD TR37	497930- 497957	Proteína Hipotética JM47_02005	AG	2	14	GATATCGATCAATTTTGGAGAGAGAG	53,2	174
						CCTGACAAGGGAATGAGTAGG	54,4	
UD TR38	542642- 542684	Proteína Hipotética JM47_02185	TC	2	21,5	TTGGGTAATCCTGCTGTTCC	51,8	170
						TGGGGTATTTTAAGATGGAGAA	49,2	
UD TR39	576024- 576211	Intergénica	TCTGGTTGTGCTTTTC- CAGTTCCTGTTTGACTAT- TACCTTCATCAGCTTTCT- TACCAGCTTGTGAGTCAG- GTTGTGGATTTTCTGTACCAC- CAGTTTGAGGG	102	1,8	TCAAACGTTGCTTTAGATGTTCTT	50,6	499
						AAGGATCTGGCTCACAACCTAA	53	
UD TR40	576144- 576277	Intergénica	GTTCTGCTTGACTAT- TACCTTCATCAGCTTTCTTAC- CAGCTTGTGATTAGGTTGT- GGATTTTCT	66	2	TTGTTTCTCAGATTCGCTAGTATCA	52,8	300
						AGGATCTGGCTCACAACCTAA	52,4	
UD TR41	576389- 576474	Proteína Hipotética JM47_02295	GTTGGATTAGTTGTCCAC- CATTATTTGAACCTTGACCA	39	2,2	GCTTCTTGTTAGGTTGTGAGC	53	236
						CCAACAGGTGGTTCATCAA	49,7	
UD TR42	633005- 633044	Proteína Hipotética JM47_02485	TCTTGGTTTGTTAATAACTAT	21	1,9	TCACCATACTCTGGGTTTGC	51,8	240
						TTGATTACAATAGTTTAACACCGAAC	51,7	
UD TR43	649256- 649285	Proteína Hipotética JM47_02530	TTAGT	5	6	TGCTTGTGAAAGTGAATTTGAT	47,4	214
						TTCAGCTCTAAATCAAGATGGGTA	52,3	
UD TR44	666695- 666851	Intergénica	GTTTTTCAACCTCAA- CAACTTTTTCAACATAAA- CAGGTTTCTCAACTTCAACAC	54	2,9	TCACGATTTGATTTAACTCATGCT	50,6	397
						CAAGAACCACCAGCTCCAGT	53,8	
UD TR45	667001- 667125	Proteína Hipotética JM47_02585	GGTTTCTCTACTTCTACAC- GTTTTTCAACCTCTAC- TACTTTTTCAACATAGACA	54	2,3	TTTTTCAACCAGCTTCACTCA	48,5	462
						TCGAACACAAGCAATGATGT	47,7	
UD TR46	681554- 681579	Proteína Hipotética JM47_02640	GCTTCTTTT	9	2,9	TTGTTGCCACTTCATCACTTG	50,5	181
						AAAGCAATGATCGGAATCAA	46,5	

UD TR47	883923- 883947		TCTTTAGTATTA	12	2,1	AAACCAGATTTTCTAATGCTTTTT	47,1	240
						AAGACAGGGAAGTGGAACC	52,4	
UD TR48	885130- 885262	Proteína Hipotética JM47_03325	ACTAATGTTATAT- TCAGCATCTCAAT- GCTTGAATAGTTTA- CATATAGTTTGTTCAT- CAATTGA	69	2	AAAGGATAAGTCCCGCCATA	49,7	289
						TTTCAATAAGGCTTTTATGGTGAT	49,5	
UD TR49	898687- 898719	Proteína Hipotética JM47_03385	CCGAATTACGGT	12	2,8	TTCCTGTAGTGTCTGGTGGTATAAA	54,4	248
						TGGTATTCCAGCTCCCTTTT	50,5	
UD TR50	929352- 929393	Proteína Hipotética JM47_03510	TTATTAGAACAAGTTCAAT- TAA	19	2	TTGTTGAAACAACCATTACATTG	48,8	213
						CCACTAAATGGTTTGTGATGTTGA	49,9	
UD TR51	966562- 966592	Proteína Hipotética JM47_03755	TTCTTCCTC	9	3,4	TCAATGTCAAGTTGAGAGATTGAT	50,6	240
						GCATTAGCTGCAGGTTATTCATC	53,5	

ID: Identificación de la región repetida en tándem (TR)

*Posición: Dentro del genoma de la cepa de *U. diversum* ATCC 49782 (Marques et al., 2015) según el programa Tandem Repeat Finder

Motivo de repetición

Tamaño: en pares de bases (pb)

Nº Repeticiones: Número de repeticiones

Cebadores (Forward; Reverse 3'-5') identificados con el programa primer3. Para cada región, el cebador que se indica primero corresponde al forward y el que se indica en segundo lugar al reverse

Tm °C

Tamaño del amplímero de acuerdo al programa iPCR.

Referencias bibliográficas

- Benson G. (1999). Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 27 (2): 573-580.
- Burgher Y., Miranda L., Rodriguez-Roche R., de Almeida Campos A.C., Lobo E., Neves T., Martínez O., Timenetsky J. (2014). *Ureaplasma diversum* in pneumonic lungs of swine. *Infect Genet Evol.* 21:486-488. doi: 10.1016/j.meegid.2013.07.003.
- Buzinhani M., Buim M.R., Yamaguti M., Oliveira R.C., Mettifofo E. y Timenetsky, J. (2007) Genotyping of *Ureaplasma diversum* isolates using pulsed-field electrophoresis. *Vet J.* 73(3): 688–690. S1090-0233(06)00039-6 [pii] doi: 10.1016/j.tvjl.2006.02.001
- Dos Santos L.F., Clavijo M.J., Sreevatsan S., Rovira A., Moreira M.A. y Pieters M. (2015) Genotyping of *Mycoplasma hyorhinis* using multiple-locus variable number tandem repeat analysis. *J Microbiol Methods.* 111:87-92. doi: 10.1016/j.mimet.2015.02.003.
- Hata E., Suzuki K., Hanyu H., Itoh M., Higuchi H. y Kobayashi H. (2014). Molecular epidemiology of cases of *Mycoplasma californicum* infection in Japan. *Appl Environ Microbiol.* 80 (24): 7717-7724. doi: 10.1128/AEM.02488-14.
- Joukhadar, R. y Jighly, A. (2012). Microsatellites grant more stable flanking genes. *BMC Res Notes* 5:556. doi: 10.1186/1756-0500-5-556.
- Lindstedt, B.A. (2005). Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis.* 26 (13): 2567-2582.
- Marques L.M., Buzinhani M., Guimaraes A.M., Marques, R.C., Farias S.T., Neto R.L., Yamaguti M., Oliveira R.C. y Timenetsky J. (2011). Intraspecific sequence variation in 16S rRNA gene of *Ureaplasma diversum* isolates. *Vet microbiol* 152(1–2): 205–211. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.04.007
- Marques L.M., Guimarães A.M., Martins H.B., Rezende I.S., Barbosa M.S., Campos G.B., do Nascimento N.C., Dos Santos A.P., Amorim A.T., Santos V.M., Messick J.B. y Timenetsky J. (2015). Genome Sequence of *Ureaplasma diversum* Strain ATCC 49782. *Genom Announc.* 3(2). pii: e00314-15. doi: 10.1128/genomeA.00314-15.
- Miller R., Chelmonska-Soyta A., Smits B., Foster R., Rosendal S. (1994). *Ureaplasma diversum* as a cause of reproductive disease in cattle. *Vet Clin North Am: Food Anim Pract.* 10, 479-490.
- Pinho L., Thompson G., Rosenbusch R., Carvalheira J. (2012). Genotyping of *Mycoplasma bovis* isolates using multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis. *J Microbiol Methods.* 88 (3):377-385. doi: 10.1016/j.mimet.2012.01.003.
- Seitz J., Sticotti E., Giruado J., Tamiozzo P. (2018). [Detection of *Ureaplasma diversum* in cows with and without granular vulvovaginitis from Argentina]. *Ab Intus.* 1, 89-92.
- Vranckx K., Maes D., Calus D., Villarreal I., Pasmans F., Haesebrouck, F. (2011). Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis is a suitable tool for differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains without cultivation. *J Clin Microbiol.* 49 (5): 2020-2023. doi: 10.1128/JCM.00125-11.
- Zhou K., Aertsen A., Michiels C.W. (2014). The role of variable DNA tandem repeats in bacterial adaptation. *FEMS Microbiol Rev.* 38 (1): 119-141. doi: 10.1111/1574-6976.12036.