



FUNKČNÍ VZOREK

**Multiplexní systém TaqMan qPCR pro stanovení
a kvantifikaci potenciálně patogenních mikrořas
rodu *Prototheca* ve vzorcích mléka**

**Ing. Romana Bačová, Ph.D.
Mgr. Monika Morávková, Ph.D.
Mgr. Petr Králík, Ph.D.**

1056
2021

Funkční vzorek 2021/1056

**Multiplexní systém TaqMan qPCR pro stanovení a
kvantifikaci potenciálně patogenních mikrořas rodu
Prototheca ve vzorcích mléka**

Ing. Romana Bačová, Ph.D.

Mgr. Monika Morávková, Ph.D.

Mgr. Petr Králík, Ph.D.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Ministerstva zemědělství QK1910092

a MZE-RO0518.

ISBN 978-80-7672-007-7

Obsah

1. Úvod.....	3
2. Cíl metodiky funkčního vzorku	4
3. Vlastní popis metodiky funkčního vzorku	4
3.1 Předmluva.....	4
3.2 Metodika.....	5
3.2.1 Příprava vzorků mléka a izolace DNA.....	5
3.2.2 Návrh primerů a fluorescenčních sond.....	5
3.2.3 Postup provedení qPCR	6
3.2.3 Absolutní kvantifikace	7
3.3 Vyhodnocení funkčnosti systému	8
3.4 Limit detekce (LOD).....	9
4. Srovnání „novostí postupů“	9
5. Uplatnění funkčního vzorku.....	10
6. Ekonomické aspekty	10
7. Dedikace	10
8. Seznam použité literatury.....	11

1 Úvod

Prototéka je rod eukaryotických mikroorganismů, patřící do čeledi *Chlorellaceae*. Jedná se o achlorofylní mikrořasy, které mohou způsobovat zánětlivá onemocnění lidí, mléčného skotu, koček, psů či divokých zvířat (Kessell et al., 2017; Lass-Florl & Mayr, 2007; Roesler, Scholz, & Hensel, 2001; Shahid et al., 2017; Vince, Pinard, Ogilvie, Tan, & Abrams-Ogg, 2014). Kulaté či ovoidní řasy (2 až 15 μm v diametru) vyhledávají vlhké a teplé prostředí. Běžně se vyskytují v prostředí, vodě, půdě či podestýlce zvířat ve stájích, ale mohou být izolovány i z tkání zvířat a lidí s oslabenou imunitou. U mléčného skotu prototéka napadá mléčnou žlázu, kde mitoticky tvoří endospory (Divers & Peek, 2007). Vzniklé endospory mohou poškozovat žlázový parenchym vemene, což může vést až ke vzniku chronických zánětů a jiných lézí (Moroni et al., 2018) a rozvoji mastitidy. Toto onemocnění se projevuje vodnatým mlékem, zvýšeným množstvím somatických buněk v mléce, a sníženou produkcí mléka, což vede i k ekonomickým ztrátám chovatelů.

Na rozdíl od bakteriálních infekcí na prototéku neúčinkuje antibiotická léčba. Mastitida způsobená prototékami se vyskytuje s mnohem nižší frekvencí, než mastitida způsobena bakteriálními původci. Také proto se testy na výskyt prototéky často opomíjí a nedagnostikované prototékové mastitidy se tak často léčí neúčinnými antibiotiky, což může způsobovat nárůst antibiotických rezistencí. K léčbě lidské prototékózy se nejčastěji používají antifungální látky, jako jsou azoly a amfotericin B (Todd et al., 2012; Lass-Florl & Mayr, 2007), nicméně účinek této léčby není garantovaný a je popisována variabilní efektivita léčby. Podobně i u prototékózy mléčného skotu zatím neexistuje efektivní léčba a farmáři jsou často nuceni nakažené kusy ze stáda izolovat a porážet, aby zabránili dalšímu šíření tohoto onemocnění.

V nedávné době Jagielski et al., 2019, navrhl re-klasifikaci celého rodu a v současné době je podle NCBI databáze popsáno 13 různých druhů prototék. S mastitidami dojných krav je

nejčastěji spojována *P. bovis* (dříve uváděná jako *P. zopfii* genotyp 2) a v menší míře se setkáváme také s *P. blushkeae* či *P. wickerhamii* (Capra et al., 2014; Jagielski et al., 2019). V prostředí se jako nepatogenní druh vyskytuje *P. ciferrii* (dříve *P. zopfii* genotyp 1) (Zeng, Kudinha, Kong, & Zhang, 2019).

Ačkoli jsou prototéky v chovech často přehlížené, jejich výskyt je v posledních letech zaznamenáván a zájem o tuto problematiku celosvětově roste (Zeng, Kudinha, Kong, & Zhang, 2019). Mezi hlavní kontrolní opatření patří jak dodržování správné hygienické praxe, tak včasná diagnostika nákazy v chovu a identifikace zdrojů kontaminace. Dodnes je však včasná detekce a kvantifikace prototéky velkou výzvou. Současné metody se nejčastěji opírají o kultivace, případně histopatologické vyšetření tkání (Lass-Florl & Mayr, 2007). Další metody, založené na PCR (Abdelhameed, 2016), Elisa či komerční kity, jsou často limitované svou, citlivostí, přesností, detekčním limitem, dostupností, časovou náročností a v neposlední řadě cenou. Pro epidemiologické účely pak je nepostradatelná přesná identifikace či typizace získaných izolátů. Kvantitativní PCR s TaqMan sondami nabízí citlivou a dobře dostupnou techniku široce využívanou v diagnostických laboratořích pro analýzy klinických, veterinárních či potravinářských vzorků.

1. Cíl metodiky funkčního vzorku

Cílem funkčního vzorku bylo navrhnout specifické sekvence DNA pro identifikaci nejčastěji se vyskytujících druhů prototék v matrici kravského mléka, a tyto sekvence použít pro vytvoření nového detekčního multiplexního systému na bázi qPCR.

2. Vlastní popis metodiky funkčního vzorku

3.1 Předmluva

Pro vývoj detekčního systému byly vybrány nejčastěji se vyskytující druhy prototéky v prostředí mléčných farem: *P. bovis*, *P. blushkeae*, *P. ciferrii* a lidský patogen *P. wickerhamii*.

Následně byl vypracován návrh detekčního systému, který se skládá ze dvou multiplexů. Multiplex I detekuje *Prototheca* sp. na základě univerzálních primerů konzervovaného úseku velké ribozomální podjednotky, dále *P. bovis*, jakožto nejčastějšího původce mastitid dojeného skotu a interní amplifikační kontrolu (IAC). Multiplex II je použit v případě, že byla pomocí multiplexu I detekována prototéka a nejedná se o *P. bovis*. Multiplex II detekuje *P. blashkeae*, *P. wickerhamii* a *P. ciferrii*.

3.2 Metodika

3.2.1 Příprava vzorků mléka a izolace DNA

Vzorky kravského mléka byly po nadojení (případně po odběru z tankových nádrží) uchovávány v chladničkové teplotě a zpracovány následující den. Vzorky (10 ml či 50 ml) byly centrifugovány 45 min/4 100 × g při teplotě 12 °C. Po odebrání smetany a supernatantu byly pelety rozmíchány ve zbytku supernatantu a takto přepipetovány do 2 ml zkumavek. Tyto zkumavky byly centrifugovány 10 min/8 000 × g a poté se opět odebral supernatant. Takto připravené mléčné pelety byly uchovány při teplotě -70 °C do dalšího použití.

Extrakce DNA z mléčných pelet byla provedena za použití Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Microprep kit (Zymo Research, USA) podle návodu výrobce. DNA byla eluována MiliQ vodou z důvodu zabránění inhibice PCR reakce solemi (v případě použití elučních pufrů).

3.2.2 Návrh primerů a fluorescenčních sond

Pro detekci prototék byly zvoleny originální sekvence na základě porovnání sekvencí referenčních a dalších dostupných kmenů v databázi NCBI. Pro konkrétní druhy byly vybrány geny se specifickými, unikátními sekvencemi, ve kterých byly navrženy primery a sondy. Pro identifikaci *P. bovis* byl vybrán gen *accD*, kódující acetyl CoA reduktázu. Pro *P. blashkeae* byl vybrán gen *cytB*, kódující cytochrom B. Pro *P. ciferrii* byl vybrán gen *atp6* kódující 6 podjednotku transportní ATPázy F0. Pro *P. wickerhamii* byl vybrán gen *cox1* kódující 1 podjednotku cytochrom C oxidázy. Rovněž byl vybrán vysoce konzervovaný úsek genu,

kódující velkou ribosomální podjednotku, pro detekci rodu *Prototheca*, jelikož využití dvou cílů výrazně zvyšuje pravděpodobnost úspěšné detekce (Tabulka 1). Specifické sekvence oligonukleotidů byly navrženy online v programu Primer3Plus (dostupný na <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Specifická pramerů a sond byla zpětně ověřena v databázi Blast NCBI.

3.2.3 Postup provedení qPCR

K vytvoření obou reakčních směsí pro deekci prototék (Multiplex I a II) pomocí qPCR byla použita souprava LightCycler 480 Probes Master dle návodu výrobce. Složení reakčních směsí bylo optimalizováno, viz Tabulka 2. Součástí multiplexního systému I je i vnitřní kontrola izolace (IAC), která byla převzata z publikace (Vojkovska, Kubikova, & Kralik, 2015). Program pro LightCycler byl navržen takto: úvodní denaturace 5 min při 95 °C, následovalo 47 cyklů denaturace po dobu 10 s při 95 °C a extenze 30 s při 60 °C. Na závěr bylo nastaveno chlazení 10 s při 40 °C.

Tabulka 1 Seznam sekvencí pramerů a sond použitých pro qPCR detekci prototék

Organismus	Název sekvence	Sekvence (5'-3')	Florofofor/ zhášec
<i>Prototheca</i> ssp.	ProtothecaUniF	AGTCGGGTTGYTTGGAATG	-
	ProtothecaUniS	CGGTGGTAAATCCCATCGAAGGCTAAATA	HEX/BHQ1
	ProtothecaUniR	TCCCTCACGGTACTTGTTTCG	-
<i>P. ciferrii</i>	G13F	GTCAAACGTAAGTCAAGTCAA	-
	SG13	TGAGAGGATTATGTTACGAAGTATCAAGA	FAM/BHQ1
	G13R	GCCTACCCCTCTCATATAC	-
<i>P. bovis</i>	PZg2F	GACGATGATCCTAGTTATGGTGTAC	-
	SPZg2	TGGTAGAAGACAAATAATGTACCAAAACCA	FAM/BHQ1
	PZg2R	TATAAAAGCAAGTCCAGTTACAGCAC	-
<i>P. wickerhamii</i>	PW2F	TGTTTCGCTATTTTCAGGTCTT	-
	SPW2	TAGCTTCATGACTTGCGTAAAACCATACC	HEX/BHQ1
	PW2R	AACCCGGAGGTTAAGAGTTA	-
<i>P. blaschkeae</i>	PB3F	CTGCATTCATTGGTTACGTT	-
	PB3Sa	AGCTAGTGCTATTCCTGTAGTTGGTAA	AT425/DAB
	PB3R	ACCTCCCCATAACCAAGTT	-

Tabulka 2 Složení qPCR reakčních směsí multiplex I a II

Multiplex I			Multiplex II		
Složka	Objem pro 1 reakci (μl)	Výsledná koncentrace	Složka	Objem pro 1 reakci (μl)	Výsledná koncentrace
MM LightCycler® 480	10.0	1x	MM LightCycler® 480	10.0	1x
Probes Master 2x			Probes Master 2x		
ProtothecaUniF (100 μM)	0.1	0.5 μM	G13F (100 μM)	0.25	1.25 μM
ProtothecaUniR (100 μM)	0.1	0.5 μM	G13R (100 μM)	0.25	1.25 μM
ProtothecaUniS (20 μM)	0.05	0.05 μM	SG13 (20 μM)	0.08	0.08 μM
PZg2F (100 μM)	0.1	0.5 μM	PW2F (100 μM)	0.25	1.25 μM
PZg2R (100 μM)	0.1	0.5 μM	PW2R (100 μM)	0.25	1.25 μM
SPZg2 (20 μM)	0.05	0.05 μM	SPW2 (20 μM)	0.08	0.08 μM
IAC F (100 μM)	0.1	0.5 μM	PB3F (100 μM)	0.1	0.5 μM
IAC R (100 μM)	0.1	0.5 μM	PB3R (100 μM)	0.1	0.5 μM
IAC S (20 μM)	0.2	0.2 μM	PB3Sa (5 μM)	0.08	0.02 μM
IAC plasmid 10 ⁴ /μl	0.1	10 ³	UNG	0.2	0.2U
UNG	0.2	0.2 U	H ₂ O	3.36	-
H ₂ O	3.8	-			

3.2.3 Absolutní kvantifikace

Jednotlivé specifické sekvence prototék byly amplifikovány pomocí konvenčního PCR kitu EliZyme™ HS Robust kit (Elisabeth Pharmacon, Česká republika). Sekvence byly přečištěny pomocí QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Německo) a klonovány v *E. coli* Tn10 pomocí QIAGEN PCR Cloning kit (Qiagen, Německo). Plazmidová DNA byla izolovaná pomocí QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Německo). Byla změřena koncentrace DNA pomocí BioPhotometer (Eppendorf, Německo) a přepočítána na počet kopií genů:

$$\text{počet kopií genů (ng)} = \frac{10^{-10} \times 6,023 \times 10^{23}}{\text{velikost inzertu (bp)} \times \text{velikost plazmidu (bp)} \times 650}$$

Takto připravená DNA byla dále ředěna v Crick roztoku (DNA sperma lososa, 50 ng/μl; Serva, Heidelberg, Německo). Desítkovým ředěním byla vytvořena kalibrační křivka pro oba systémy, která se používá při každé analýze, a která umožňuje kvantifikaci analyzovaného vzorku. Takto připravené standardní plazmidové DNA byly alikvotovány a skladovány při -20 °C do dalšího použití.

3.3 Vyhodnocení funkčnosti systému

U navržených primerů a sond pro detekci *Prototheca* ssp., *P. bovis*, *P. blashkeae*, *P. ciferrii* a *P. wickerhamii* jsme testovali a potvrdili specificitu v rámci referenčních kmenů prototék a izolátů prototék, získaných z mastitidních chovů (n = 96). Tyto sekvence naopak neamplifikují kvasinky (testováno na mastitidních izolátech, n = 6) a zelené mikrořasy (testováno na rozličných druzích, které jsou taxonomicky nejbližší prototéce, n = 12).

Multiplex I a multiplex II byl testován na souboru vzorků kravského mléka (n = 96), současně testovaného referenční kultivační metodou. Výsledky qPCR byly v kontingenční tabulce 2x2 porovnány s referenční kultivační metodou. Diagnostická senzitivita byla spočítána dle $TP / (TP + FN)$. Diagnostická specificita byla definována dle $TN / (TN + FP)$, (Kralik & Ricchi, 2017). Diagnostická senzitivita qPCR multiplexu I testovaná na vzorcích kravského mléka byla 100 % a ukazuje na spolehlivou schopnost qPCR správně určit vzorky podle referenční kultivační metody. Diagnostická specificita metody je 70,5 % a ukazuje schopnost qPCR určit pozitivní vzorky, které jsou kultivačně hodnoceny jako negativní vzhledem k nižšímu limitu detekce qPCR metody (Kralik & Ricchi, 2017).

TP – skutečně pozitivní – vzorky určené jako pozitivní metodami kultivace i qPCR

TN – skutečně negativní - vzorky určené jako negativní metodami kultivace i qPCR

FP – falešně pozitivní – vzorky určené kultivačně jako negativní a pomocí qPCR jako pozitivní

FN – falešně negativní - vzorky určené kultivačně jako pozitivní a pomocí qPCR jako negativní

Tabulka 3 Kontingenční tabulka srovnání detekce *P. bovis* v kravském mléce pomocí qPCR multiplexu I s metodou kultivace

		Kultivace	
		Pozitivní	Negativní
qPCR multiplex I	Pozitivní	35	18
	Negativní	0	43

3.4 Limit detekce (LOD)

Referenční kmeny byly 48 h kultivovány na SAB médiu a poté byla vytvořena suspenze buněk ve fyziologickém roztoku (0,85% NaCl). Vstupní koncentrace buněk byla stanovena optickou densitou 0.4 (OD 600 nm), což mikroskopicky odpovídalo $8,4 \times 10^5$ KTJ/ml pro *P. ciferrii*, $1,1 \times 10^6$ KTJ/ml pro *P. bovis* and $3,4 \times 10^5$ KTJ/ml pro *P. blashkeae*. Přesná kvantifikace vstupní suspenze byla zjištěna pomocí qPCR.

Mléčné pelety byly naočkovány ředěnými suspenzemi buněk (řádově 10^4 , 10^3 , 10^2 a 10^1) v 10 opakováních. DNA z uměle kontaminovaných pelet byla izolována a limit detekce byl stanoven jako nejnižší naočkované množství prototéky v ml mléka, a to v takovém ředění, kde byla detekována sledovaná specifická sekvence ve všech deseti opakováních. Výsledný LOD byl stanoven jako $2,02 \times 10^2$ buněk/ml pro *P. bovis*, $4,00 \times 10^3$ buněk/ml pro *P. ciferrii* a pro *P. blashkeae* $7,48 \times 10^2$ buněk/ml.

3. Srovnání „novostí postupů“

Prototéka je v současné době tématem, u kterého roste pozornost odborné veřejnosti a farmářů. Tyto oportunisticky patogenní řasy sice patří ve srovnání s bakteriemi k minoritním původcům mastitid u dojného skotu, nicméně výskyt prototék na farmách je podstatně závažnější, a to kvůli chybějícím informacím o efektivním léčivu, jež na trhu stále chybí. Navíc prototéka obvykle není v laboratořích cíleně testována. Běžným postupem identifikace prototék je kultivace čerstvého mléka na SAB agarových miskách s následnou mikroskopickou

identifikací, a to až po překročení limitu CPM či přetrvávajících potížích skotu po dlouhodobém podávání antibiotických přípravků.

Vývoj postupů, opírajících se o molekulárně-biologické metody, je v dnešní době nutností. Nově vyvinutá TaqMan qPCR multiplexní metoda, testovaná na vzorcích mléka z českých farem přináší nový diagnostický nástroj, opírající se o současné molekulárně-biologické metody s vysokou citlivostí a specifitou, který nejenom umí ve vzorku, sledované agens detekovat ale i kvantifikovat.

4. Uplatnění funkčního vzorku

Funkční vzorek představuje metodu TaqMan qPCR, vhodnou pro určení prototéky (*Prototheca* spp., *P. bovis*, *P. blashkeae*, *P. ciferrii* a *P. wickerhamii*) ve vzorcích mléka. Usnadňuje a urychluje určení nemocných kusů ve stádě, které je následně možné rychleji izolovat od zdravých kusů a podniknout další opatření proti šíření nákazy v chovu. Nová metoda qPCR je využita pro rutinní analýzu kravského mléka v rámci laboratoří Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v.v.i. V současné době podobná metoda na trhu chybí. Vzhledem k dobré dostupnosti qPCR techniky v různých diagnostických laboratořích, může být tato nová metoda nabídnuta také dalším podobným odborným pracovištím.

5. Ekonomické aspekty

Pro diagnosticky vybavenou laboratoř spočívají náklady v pořízení spotřebního materiálu, chemikálií, syntézu oligonukleotidů, soupravy pro izolaci DNA a kitu pro qPCR. Cena materiálu na vyšetření jednoho vzorku v duplikátu se pohybuje kolem 780 Kč (bez DPH), a to včetně použití standardů a kontrol.

6. Dedikace

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu a podpory Ministerstva zemědělství QK1910092 a MZE-RO0518.

7. Seznam použité literatury

- Abdelhameed, K. G. (2016). Detection of *Prototheca zopfii* in raw milk and cheese with special reference to their antibiogram. *Journal of Food Safety*, 36, 214-219.
- Capra, E., Cremonesi, P., Cortimiglia, C., Bignoli, G., Ricchi, M., Moroni, P., . . . Castiglioni, B. (2014). Simultaneous identification by multiplex PCR of major *Prototheca* spp. isolated from bovine and buffalo intramammary infection and bulk tank. *Lett Appl Microbiol*, 59(6), 642-647. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25196253>. doi:10.1111/lam.12326
- Divers, T. J., & Peek, S. F. (2007). Diseases of the Teats and Udder. In *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle* (pp. 200-294).
- Jagielski, T., Roeske, K., Bakula, Z., Piech, T., Wlazlo, L., Bochniarz, M., . . . Krukowski, H. (2019). A survey on the incidence of *Prototheca* mastitis in dairy herds in Lublin province, Poland. *J Dairy Sci*, 102(1), 619-628. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30447976>. doi:10.3168/jds.2018-15495
- Jagielski, T., Bakula, Z., Gawor, J., Maciszewski, K., Kusber, W. H., Dyla, M., ... & Karnkowska, A. (2019). The genus *Prototheca* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) revisited: Implications from molecular taxonomic studies. *Algal Research*, 43, 101639.
- Kessell, A. E., McNair, D., Munday, J. S., Savory, R., Halliday, C., & Malik, R. (2017). Successful treatment of multifocal pedal *Prototheca wickerhamii* infection in a feline immunodeficiency virus-positive cat with multiple Bowenoid in situ carcinomas containing papillomaviral DNA sequences. *JFMS Open Rep*, 3(1), 2055116916688590. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28491447>. doi:10.1177/2055116916688590
- Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Front Microbiol*, 8, 108. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28210243>. doi:10.3389/fmicb.2017.00108
- Lass-Flörl, C., & Mayr, A. (2007). Human protothecosis. *Clin Microbiol Rev*, 20(2), 230-242. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17428884>. doi:10.1128/CMR.00032-06
- Moroni, P., Nydam, D., Ospina, P., Scillieri-Smith, J., Virkler, P., Watters, R., . . . Yeager, A. (2018). Diseases of the Teats and Udder. In *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle* (pp. 389-465). doi:10.1016/b978-0-323-39055-2.00008-5

- Roesler, U., Scholz, H., & Hensel, A. (2001). Immunodiagnostic identification of dairy cows infected with *Prototheca zopfii* at various clinical stages and discrimination between infected and uninfected cows. *J Clin Microbiol*, 39(2), 539-543. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11158103>. doi:10.1128/JCM.39.2.539-543.2001
- Shahid, M., Wang, J., Gu, X., Chen, W., Ali, T., Gao, J., . . . Han, B. (2017). *Prototheca zopfii* Induced Ultrastructural Features Associated with Apoptosis in Bovine Mammary Epithelial Cells. *Front Cell Infect Microbiol*, 7, 299. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28752077>. doi:10.3389/fcimb.2017.00299
- Todd, J. R., King, J. W., Oberle, A., Matsumoto, T., Odaka, Y., Fowler, M., ... & Sanusi, I. D. (2012). Protothecosis: report of a case with 20-year follow-up, and review of previously published cases. *Medical Mycology*, 50(7), 673-689.
- Vince, A. R., Pinard, C., Ogilvie, A. T., Tan, E. O., & Abrams-Ogg, A. C. (2014). Protothecosis in a dog. *Can Vet J*, 55(10), 950-954. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25320382>.
- Vojkowska, H., Kubikova, I., & Kralik, P. (2015). Evaluation of DNA extraction methods for PCR-based detection of *Listeria monocytogenes* from vegetables. *Letters in Applied Microbiology*, 60(3), 265-272. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000349623000010. doi:10.1111/lam.12367
- Zeng, X., Kudinha, T., Kong, F., & Zhang, Q. Q. (2019). Comparative Genome and Transcriptome Study of the Gene Expression Difference Between Pathogenic and Environmental Strains of *Prototheca zopfii*. *Front Microbiol*, 10, 443. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30899253>. doi:10.3389/fmicb.2019.00443

VÚVeL 

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic
Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz