

ОЦЕНКА МЕТОДОВ ДЕТЕКЦИИ МИКОПЛАЗМЕННОЙ КОНТАМИНАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР И ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВОМИКОПЛАЗМЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

А.К. Наханов^{ID}, А.А. Терейбай*^{ID}, Л.Г. Мараховская^{ID}, С.К. Коканов^{ID},
Б.А. Сейдахметова^{ID}

ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»
пгт. Гвардейский, Казахстан
*a.terebay@biosafety.kz

Аннотация. В данной статье представлены результаты исследования по обнаружению микоплазменной инфекции в различных клеточных линиях и оценке эффективности противомикоплазменных препаратов. Для обнаружения микоплазм в культурах клеток использовали методы окрашивания ДНК флюорохромами (DAPI, Apollo Scientific) наборы Plasmotest™ (Invivogen, France), MycoStrip (Invivogen, France) и EZ-PCR™ (Biological Industries, Israel) рекомендуемые при выявлении микоплазм в культуре клеток. На основании полученных результатов исследований, было установлено, что, противомикоплазменные препараты MycoZap (Lonza Bioscience), Plasmocin (Invivogen, France), MRA (BIO-RAD) и BM-Cyclin (Roche) эффективны в борьбе с микоплазменной контаминацией культур клеток. Метод детекции микоплазм ДНК-флюорохромами определение наличия микоплазмы может быть субъективным, так как его чувствительность к микоплазмам низкая. В свою очередь набор MycoStrip может давать ложноотрицательный результат ввиду наличия микоплазм не входящих в список обнаруживаемых видов этого набора. Положительные и отрицательные результаты Plasmotest™ точно коррелировали с результатами EZ-PCR™. При подозрении на наличие микоплазменной контаминации для предварительного анализа можно использовать метод окрашивания ДНК и набор MycoStrip, а для окончательного подтверждения Plasmotest™ и EZ-PCR.

Ключевые слова: клеточные культуры; MDCK; MDBK; BHK-21 C-13; Vero; микоплазмы; детекция микоплазм; элиминация.

Введение

Микоплазмы известны как случайные микробные контаминанты клеточных культур и представляют собой серьезную проблему в отношении риска заражения для исследовательских лабораторий и коммерческих предприятий, разрабатывающих и производящих биологические и биофармацевтические продукты клеточного происхождения. Чтобы свести к минимуму эти риски, во время производства биологических препаратов, производимых на субстратах клеточных культур, проводится мониторинг посторонних агентов, таких как вирусы и микоплазмы. «Золотым стандартом» обнаружения микоплазм является микробиологический анализ, рекомендованный в настоящее время USP, EP, JP и FDA США, включает культивирование жизнеспособных микоплазм в бульоне, агаре и индикаторных клетках. Хотя эта процедура обеспечивает высокоэффективное обнаружение микоплазм в клеточных субстратах и продуктах клеточного происхождения, общая стратегия

тестирования требует много времени (минимум 28 дней) и высококвалифицированной интерпретации результатов. Длительный период времени, необходимый для этих традиционных анализов, не позволяет использовать их для продуктов с коротким сроком хранения или для своевременного принятия решений во время рутинных внутрипроизводственных испытаний. Кроме того, некоторые микоплазмы в особенности гемотропные микоплазмы не растут на питательных средах.

Существенной проблемой, при выявлении контаминации микоплазмами, является их устойчивость к традиционным антибиотикам по причине отсутствия клеточной стенки. Контаминация микоплазмами культур клеток млекопитающих может достигать до 70% [1]. Загрязнение может привести к катастрофическим последствиям, поскольку имеет тенденцию изменять клетки на молекулярном уровне и ставит под угрозу ценность клеточных линий для получения точных данных при медико-биологических исследованиях. Микоплазменная контаминация может вызывать изменения в клеточных параметрах (хромосомные aberrации, изменения в метаболизме и росте клеток и т.д.), что приводит к ненадежным экспериментальным данным и потенциально опасным биологическим продуктам [2, 3]. В лабораториях заражение обычно происходит одними и теми же видами микоплазм и это доказывает, что микоплазменные инфекции часто передаются из одной культуры в другую [4, 5]. Несмотря на наличие множества современных диагностических методов, микоплазменные контаминации до сих пор являются серьезной проблемой для большинства лабораторий. Во многих исследованиях были обнародованы результаты проверки на наличие микоплазменной контаминации коллекций клеточных культур в лабораториях ряда стран. Оказалось, что в США более 15% культур инфицировано микоплазмами, в Японии – 80%, в Аргентине – 65%, в Израиле – 32%. Истинная распространенность микоплазменной инфекции клеточных культур может быть выше, чем публикуемые данные, так как чувствительность методов, используемых для тестирования, различна [6].

Оптимальным вариантом решения проблемы для культур клеток, инфицированных микоплазмами, является утилизация инфицированных культур и замена их свежими чистыми запасами [7]. Такой подход не всегда может быть осуществим, в связи с чем был разработан широкий спектр различных методов элиминации [8, 9]. Технически простой альтернативой и в целом наиболее практичным способом решения этой проблемы является обработка специализированными антибиотиками.

В данной статье представлен опыт успешной детекции и обработки клеток с микоплазменной инфекцией в различных клеточных линиях.

Материалы и методы

В данной работе были использованы культуры клеток MDCK, MDBK, ВНК-21 и Vero. Данные клеточные линии были получены в 1970-1998 гг. и хранятся отдельно в банке культур клеток. MDCK – культура клеток почки собаки, MDBK – культура клеток почки молодого бычка, ВНК-21 – культура клеток почки новорожденного сирийского хомячка, Vero – культура клеток почки африканской зеленой мартышки.

Культуры клеток MDCK, MDBK, ВНК-21 и VERO размораживали в культуральные матрасы площадью 75 см² в питательной среде DMEM (НИИПББ) с добавлением 10% фетальной сыворотки (Serpicorn). Культивировали в стандартных условиях при 37°C, с 5% CO₂ и при 90% влажности. После образования клеточного монослоя, отбирали пробы для выявления микоплазменной контаминации.

Детекция микоплазм

Для выявления микоплазм использовали: ПЦР-анализ, окрашивание ДНК-флуорохромом, наборы Plasmotest™ (Invivogen) и MycoStrip (Invivogen).

Для проведения ПЦР использовали коммерческий набор EZ-PCR™ Mycoplasma Detection Kit (Biological Industries) и определение состояло из 3 этапов:

- подготовка проб культур клеток к постановке ПЦР. Пробный образец готовили путем осаждения микоплазм при 15000-20000 g в течение 10 мин. Нагревали до 95°C в течение 3 мин;

- амплификация микоплазменного консервативного участка гена 16S с использованием готовых компонентов набора;

- обнаружение амплифицированного ПЦР продукта в агарозном геле с помощью электрофорезной детекции [10].

Для окрашивания ДНК-флуорохромами использовали красители Hoechst 33258, который окрашивает структуру ДНК. При этом клетки выращивали на покровных стеклах в течение 48 час. Препарат фиксировали в смеси этанола и ледяной уксусной кислоты (3:1), добавляя 3-4 капли фиксатора в культуральную среду на 2-3 мин. Затем среду удаляли и добавляли свежий фиксатор и фиксировали еще 5 мин. После удаления фиксатора препарат высушивали на воздухе и наносили на 10-15 мин раствор красителя Hoechst 33258. Затем дважды промывали дистиллированной водой и высушивали. Анализ препаратов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа AxioScope A1 (ZEISS) с ПО Zen при 400-1000-кратном увеличении с масляной иммерсией [11].

Детекцию микоплазм в культуре клеток с использованием набора MycoStrip проводили согласно инструкции производителя. Вкратце, для подготовки проб в микропробирку объемом 2 см³ помещали 1000 мкл супернатанта клеточной культуры, центрифугировали при 16000 g в течение 5 мин для осаждения микоплазм, удаляли надосадочную жидкость и оставляли 50 мкл к которому добавляли 500 мкл стерильного PBS. Для проведения реакции в пробирку объемом 2 см³ добавляли 5 мкл Реакционного буфера и пробы или контроля. Инкубировали при 65⁰C в течение 40 мин и затем добавляли 200 мкл Миграционного буфера из набора. Смесь тщательно перемешивали и 100 мкл капали на лунку тест полоски. Оценку результатов теста проводили в течение последующих 5 мин. При этом на тестовой полоске, промаркированной буквами «С» и «Т» проявляется различная по интенсивности красная полоса.

Выявление микоплазм набором Plasmotest™ также проводили согласно инструкции производителя. При этом, отбирали 500 мкл супернатантов клеточных культур для проверки и переносили в микропробирку. Нагревали образцы при 100°C в течение 15 мин. Готовили НЕК-Blue™ Detection растворив порошок в 50 см³ НЕК-Blue™ воды. Добавляли по 50 мкл каждого нагретого образца в лунку 96-луночного планшета и добавляли 50 мкл каждого поставляемого контроля в лунку 96-луночного планшета. Готовили клеточную суспензию НЕК-Blue™-2, используя предварительно подогретую среду НЕК-Blue™ Detection. Добавляли 200 мкл (~50 000 клеток) клеточной суспензии в каждую лунку, содержащую образцы. Инкубировали планшет при 37°C в инкубаторе с CO₂ в течение 16-24 часов. Лунки содержащие образцы с микоплазмами окрашиваются в пурпурно синий цвет.

Элиминация микоплазм

Для элиминации культур клеток от микоплазм использовали препараты MycoZap, Plasmocin, Mycoplasma Removal Agent и BM Cyclin.

Реагент MycoZap™ представляет собой комбинацию антибиотиков и антиметаболических средств, предназначенных для устранения микоплазменной контаминации культур клеток. Обработка первым реагентом (MycoZap-1) проводилась в среде, содержащей не более 5% сыворотки. Последующая обработка проводилась вторым реагентом (MycoZap-2) в среде, содержащей нормальное количество сыворотки. Для наиболее эффективной элиминации использовали суспензию отдельных клеток. К 2 см³ среды добавляли 200 мкл MycoZap-1 и отдельно к 4 см³ среды добавляли 200 мкл MycoZap-2. Разливали по 0,3 см³ в лунки MycoZap-1 и инкубировали 6 сут. В дальнейшем добавляли в среду по 0,3 см³ в лунки MycoZap-2 и также инкубировали 6 сут. Снимали клетки с сосудов и в среду добавляли MycoZap-2 по 0,3 см³ в лунки. После окончания третьей обработки реагентом MycoZap-2 отбирали пробы для проведения анализов на наличие микоплазм.

Mycoplasma Removal Agent (MRA) представляет собой антибиотик широкого спектра действия, содержащий производное 4-оксохиолин-3-карбоновой кислоты. Готовили 20 см³ среды и добавляли 20 мкл MRA в дозе 1 мкг/см³. Разливали по 0,5 см³ в лунки и инкубировали 3 суток. После этого проводили смену среды и разливали по 0,5 см³ среды MRA в лунки и инкубировали 4 суток. Данный цикл повторяли дважды, затем отбирали пробы на наличие микоплазм.

BM-Cyclin представляет собой комбинацию двух антибиотиков тиамулин (BM-Cyclin-1) и миноциклин (BM-Cyclin-2), оба из которых предотвращают синтез белка. Оба реагента растворяли в 10 см³ стерильного PBS. Готовили 50 см³ среды и добавляли 400 мкл BM-Cyclin-1 и культивировали в течение 3 дней. Затем удаляли среду и добавляли BM-Cyclin-2, и культивировали в течение 4 дней. Данный цикл повторяли 2 раза. В общей сложности культивировали в течение 14 дней, затем отбирали пробы на анализ.

Plasmocin содержит смесь двух антибиотиков: первый блокирует синтез белка, а второй останавливает репликацию ДНК. Наименование антибиотиков производителем не указывается. Для обработки клеток препаратом Plasmocin производителем рекомендуется подбирать дозу в пределах 0,5-1,5 мкл/см³. В связи с этим обработку клеток проводили дозами 12.5, 25.0 и 37.5 мкг/см³. Обработку клеток указанными дозами проводили согласно инструкции к препарату.

Результаты и обсуждение

Анализ проб на выявления микоплазм проводили двукратно (до очистки и после) 4 методами: ПЦР-анализ, окрашивание ДНК-флуорохромом, Plasmotest™ (Invivogen) и MycoStrip (Invivogen). Результаты по выявлению микоплазм представлены на рисунках 1-3.

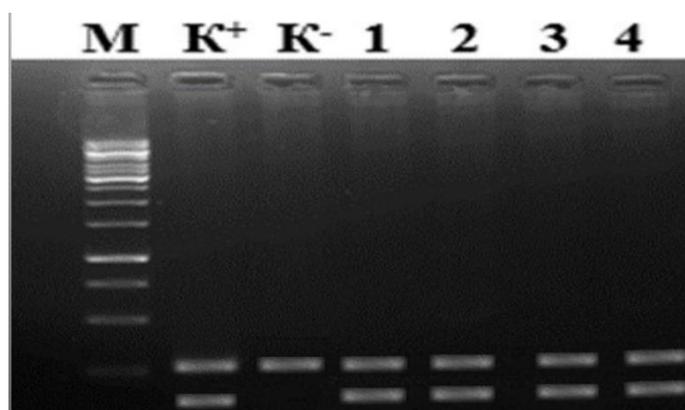
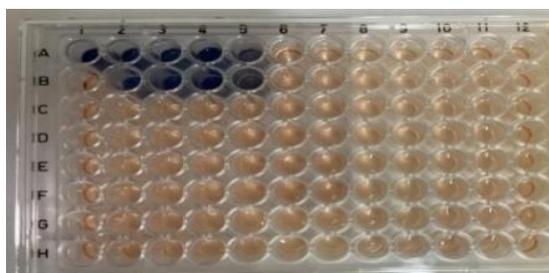


Рисунок 1 – Результаты ПЦР на наличие микоплазм

ПЦР анализ с помощью набора EZ-PCR показал наличие микоплазм во всех исследуемых пробах (1 полоса – Vero, 2 – MDBK, 3 – MDCK, 4 - ВНК-21). Это видно по размеру наработанного продукта в испытуемых образцах, около 270 п.о. Свечение на линии 357 п.о. показывает внутренний контроль набора.

При использовании тест полоски MycoStrip и Plasmotest™ (рис. 2) также было выявлено, что культуры клеток контаминированы микоплазмами.



Plasmotest™

A1 – положительный контроль

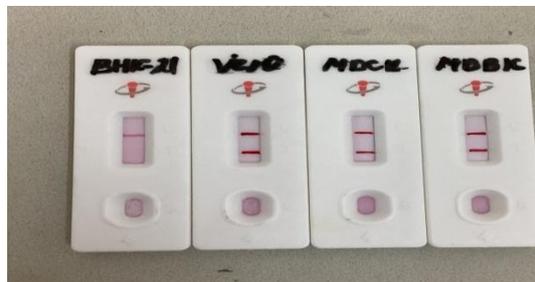
B1 – отрицательный контроль

A2 – B2 - ВНК-21

A3 - B3 - MDCK

A4 - B4 - MDBK

A5 - B5 - Vero



MycoStrip

- одна полоска на «С» отрицательный результат

= две полоски на «С» и «Т»
положительный результат

Рисунок 2 – Результаты выявления микоплазм с использованием наборов MycoStrip и Plasmotest™

Как видно из рисунка 2, в наборе Plasmotest™ при контаминации микоплазмами питательная среда окрашивалась в синий цвет в отличие от отрицательного контроля (лунка B2), которая не окрашивалась. Сомнительные результаты были получены при использовании набора MycoStrip. Так, результаты исследований с этим набором показали наличие двух полос в пробах Vero, MDBK и MDCK, что означало наличие в этих пробах контаминации микоплазмами, тогда как в пробе ВНК-21 показало отсутствие микоплазм. Эти результаты не согласовывались с данными полученными в анализе ПЦР и набором Plasmotest™.

Исследования с использованием ДНК-флюорохромирования показало наличие светящихся точек и нитей на препаратах культур клеток, отличающихся от округлого ядра клеток. Однако, как показано на рис. 3 четкое наличие инородного ДНК можно увидеть в пробах MDBK, MDCK и Vero, тогда как в пробах ВНК-21 не было выявлено явного наличия нитевидных и точечных структур, характеризующих наличие контаминации чужеродным ДНК.

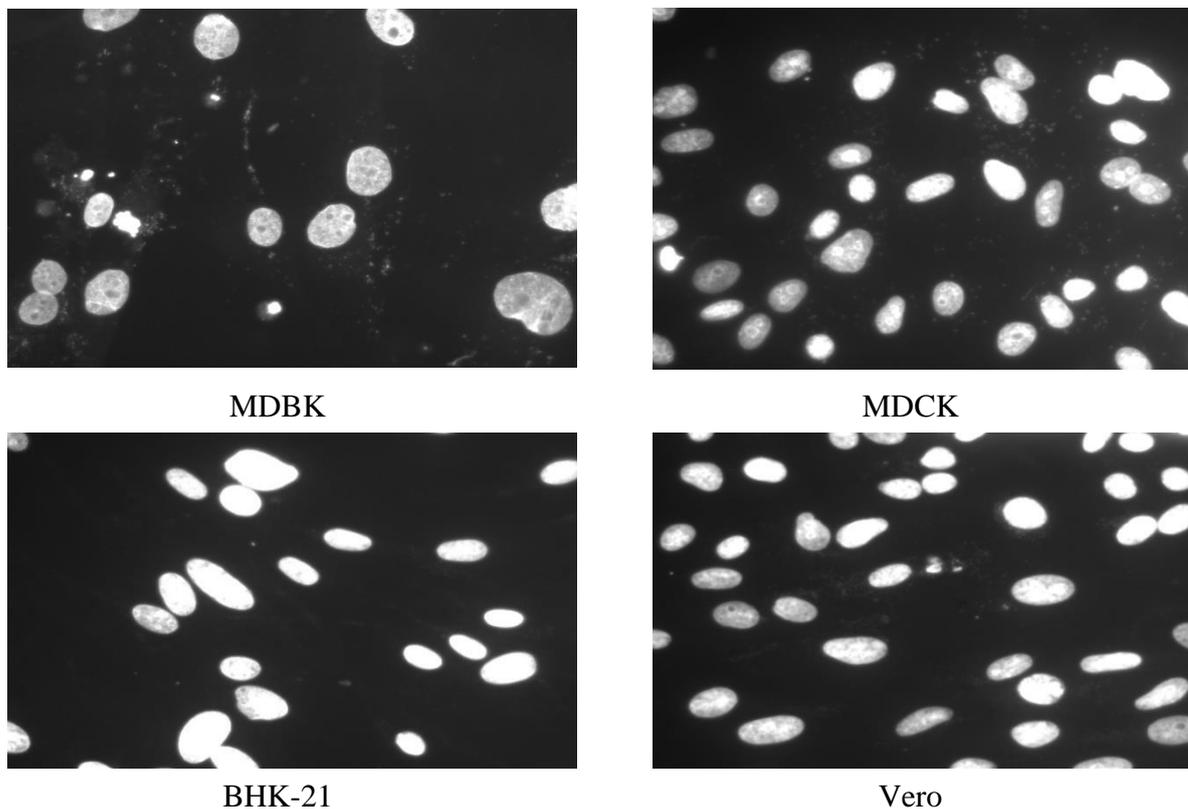


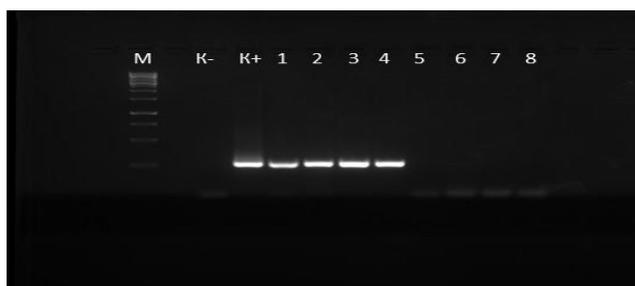
Рисунок 3 – Результаты окрашивания проб методом ДНК-флюорохромирования

Исходя, из вышеизложенного можно констатировать, что исследуемые культуры клеток контаминированы микоплазмами. Основанием для данного заключения является то, что всеми методами было выявлено наличие микоплазм в пробах MDBK, MDCK и Vero, тогда как методом окраски ДНК и набором MycoStrip получены сомнительные результаты отсутствия микоплазм в культуре клеток ВНК-21. Сомнительный результат окраски ДНК можно объяснить тем, что данный метод выявляет наличие только очень сильной контаминации культур клеток и результаты зависят от многих факторов: качества обработки стекол, реагентов и навыков окраски препаратов. Кроме того, интерпретация результатов данного метода может быть очень сложной и легко привести к неправильным выводам, особенно если культура находится в плохом состоянии [12,13]. Что касается метода выявления микоплазм набором MycoStrip возможной причиной может быть ограниченный перечень обнаруживаемых видов микоплазм [14].

Следующим этапом после выявления наличия контаминации микоплазмами было проведение очистки культур клеток с использованием препаратами, предназначенными удаление микоплазм. В наших исследованиях мы использовали препараты MycoZap, Plasmocin^R, Mycoplasma Removal Agent (MRA) и BM-Cyclin. Зараженные культуры клеток культивировали добавляя препараты по методике, указанной в разделе «Методы исследований». При обработке препаратами на первом пассаже наблюдались многочисленные частицы разрушенных клеток, и снижение роста клеток, на втором пассаже изменений не отмечено. На 3-4 пассажах клетки восстанавливали свои ростовые свойства в соответствии с паспортными данными.

После полного цикла обработки препаратами, клетки культивировали 3-кратным пассированием без добавления препаратов чтобы удостовериться в элиминации микоплазм.

С этой целью выявления микоплазм проводили теми же методами, что и до обработки. Результаты детекции микоплазм методом ПЦР приведены на рисунках 4-6.



№1 ВНК-21 С-13

№2 MDCK

№3MDBK

№4Vero

№5 ВНК-21 С-13

№6 MDCK

№7 MDBK

№8 Vero

Рисунок 4 – Результаты ПЦР на наличие микоплазм

При проведении ПЦР в качестве положительных образцов использовали первоначальные контаминированные пробы. Из данных электрофореграммы (рис. 4) видно, что пробы №1, №2, №3 и №4 положительны на наличие микоплазм, а пробы №5, №6, №7, №8, которые были обработаны противомикоплазменными препаратами показали отрицательный результат. Аналогичные результаты были получены и при использовании набора Plasmotest™, где в обработанных препаратами культурах клеток отсутствовали микоплазмы (рис. 5).



A1 – положительный контроль

B1 – отрицательный контроль.

A2-B2 – ВНК-21.

A3-B3 – MDCK.

A4-B4 – MDBK

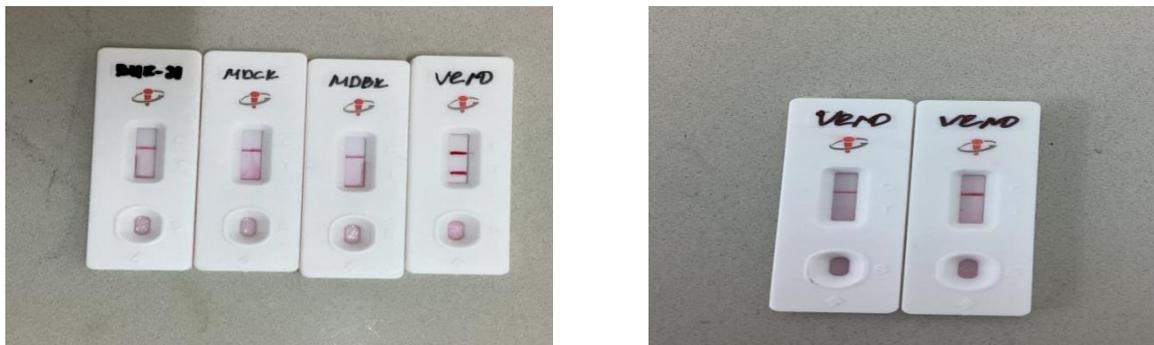
A5-B5 – Vero.

Рисунок 5 – Результаты выявления микоплазм набором Plasmotest™

При детекции микоплазм с использованием набора MycoStrip был получен неоднозначный результат, где культура клеток Vero показало ложноположительный результат после обработки препаратами (рис. 6). Однако для уточнения этого, не

согласующего с другими методами результата, было повторно проведено детекция данным набором. При этом 2-кратная проверка данной культуры показала отрицательный результат наличия микоплазм.

MycoStrip



- одна полоска отрицательный результат
= две полоски положительный результат

Рисунок 6 – Результаты применения наборов MycoStrip и Plasmotest™

Окрашивание культур клеток красителем Hoechst 33258, окрашивающим структуры ДНК, не показало наличие в культуре клеток признаков поражения микоплазмами (рис. 7). Как видно из рисунка 7, препараты содержат округлые ядра клеток без наличия нитевидных или точечных свечений, характерных для чужеродной ДНК.

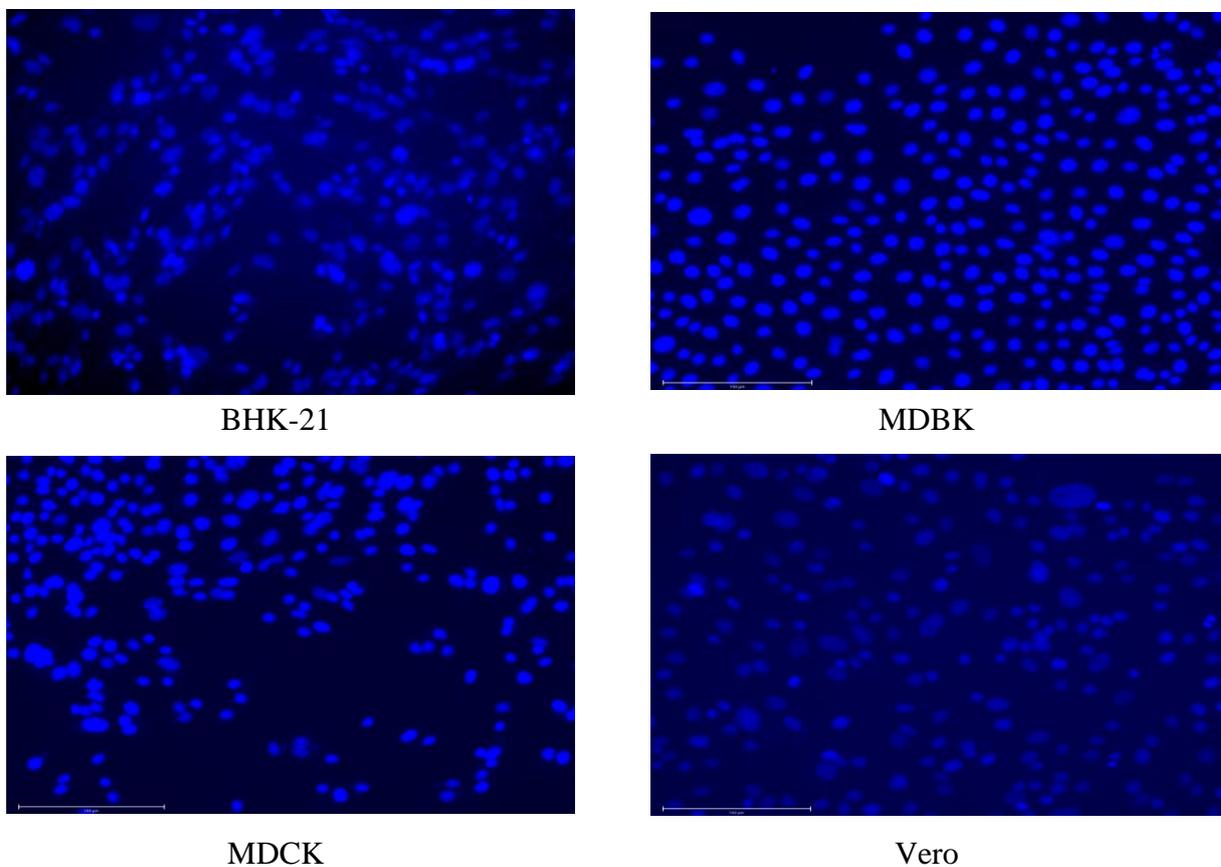


Рисунок 7 – Результаты теста на окрашивание ДНК-флуорохромами

Индикация микоплазм разными методами показало, что метод детекции микоплазм ДНК-флюорохромами прост в исполнении, быстр и недорог. Однако его чувствительность низкая, и определение наличия микоплазм может быть субъективным. Бактериальное загрязнение и деградированные фрагменты ДНК мертвых клеток в культуре клеток можно спутать с микоплазмой. Кроме того, низкие уровни загрязнения может быть трудно обнаружить с помощью флуоресцентного окрашивания ДНК, что ограничивает чувствительность этого анализа [12, 13]. В свою очередь набор MycoStrip может давать ложноотрицательный результат ввиду наличия микоплазм не входящих в список обнаруживаемых видов этого набора [14]. Положительные и отрицательные результаты Plasmotest™ точно коррелировали с результатами ПЦР. Таким образом, Plasmotest™ и EZ-PCR™ являются эффективными методами обнаружения микоплазм.

По результатам проведенных экспериментов все противомикоплазменные препараты оказались очень эффективны в борьбе с микоплазмами. Опираясь на литературные данные [4-9] и результаты экспериментов, для предварительного анализа проб на наличие микоплазменной контаминации можно использовать методы окрашивания клеток ДНК-флюорохромами и набор MycoStrip, а для окончательного подтверждения набор Plasmotest™ и EZ-PCR.

Контаминация культур клеток микоплазмами признана одной из наиболее серьезных и устойчивых проблем в клеточной биотехнологии, что приводит к большому количеству ложных и невоспроизводимых научных результатов. Различные клетки могут подавать различные морфологические и физиологические сигналы при заражении микоплазмами [15]. Поэтому необходимо проводить постоянный мониторинг культур клеток на наличие микоплазменной контаминации на системной основе.

Выводы

В результате проведенных работ было установлено, что обработка противомикоплазменными препаратами MycoZap, Plasmocin, Mycoplasma Removal Agent и VM-Cuclin является трудоемким, но, тем не менее, очень эффективным вариантом. При этом обработка вышеизложенными препаратами не влияет на жизнеспособность клеток и на их культуральные свойства.

При подозрении на наличие микоплазменной контаминации для предварительного анализа можно использовать метод окрашивания ДНК и набор MycoStrip, а для окончательного подтверждения Plasmotest™ и EZ-PCR ПЦР.

Конфликт интересов

Все авторы ознакомлены с содержанием статьи и не имеют конфликтов интересов.

Литература

1. Degeling MH, Maguire CA, Bovenberg MS, Tannous BA. Sensitive assay for mycoplasma detection in mammalian cell culture. *Anal Chem.* 2012; 84(9):4227–4232. doi: 10.1021/ac2033112. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
2. Dvorakova H, Valicek L, Reichelova M. Detection of mycoplasma contamination in cell cultures and bovine sera. *J Vet Med.* 2005;50(6):262–268. doi: 10.17221/5622-VETMED. [CrossRef] [Google Scholar]

3. Dobrovolny PL, Bess D. Optimized PCR-based detection of mycoplasma. *J Vis Exp*. 2011(52). [PMC free article] [PubMed]
4. Uphoff CC, Drexler HG. Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol*. 2002; 38(2):79–85. doi: 10.1290/1071-2690(2002)038<0079:CPAFDO>2.0.CO;2. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
5. Uphoff CC, Drexler HG. Detecting mycoplasma contamination in cell cultures by polymerase chain reaction. *Methods Mol Med*. 2004; 88:319–326. [PubMed] [Google Scholar]
6. Drexler HG, Uphoff CC. Contamination of cell cultures Mycoplasma. *The Encyclopedia of Cell Technology*. New York: Wiley; 2000. – P. 609-27
7. Freshney RI. *Culture of Animal Cells*. 6th edition. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons; 2010. [Google Scholar]
8. Uphoff CC, Drexler HG. Mycoplasma contamination of cell cultures. In: Flickinger MC, editor. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. New York, NY, USA: John Wiley & Sons; 2010. pp. 3611–3630. [Google Scholar]
9. Drexler HG, Uphoff CC. Mycoplasma contamination of cell cultures: incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology*. 2002; 39(2):75–90. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
10. СОП-GMP-НИИПББ-ПР-265-2020. ПЦР анализ по входному контролю культуры клеток на наличие микоплазмы с помощью набора EZ-PCR™ Mycoplasma Detection Kit.
11. Исмагамбетова Д.Ж., Наханов А.К., Жаппарова Г.А. Оценка влияния фармазина на элиминацию микоплазм в культурах клеток // Инновационные развитие науки в обеспечении биологической безопасности. – Гвардейский, 2014. – 109 с.
12. Ligasová, A., Vyržalová, M., Buriánová, R., Brůčková, L., Večeřová, R., Janošťáková, A., & Koberna, K. (2019). A New Sensitive Method for the Detection of Mycoplasmas Using Fluorescence Microscopy. *Cells*, 8(12), 1510. <https://doi.org/10.3390/cells8121510>
13. Young, L., Sung, J., Stacey, G. et al. Detection of Mycoplasma in cell cultures. *Nat Protoc* 5, 929–934 (2010). <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.43>
14. <https://www.invivogen.com/sites/default/files/pictures/japanese-cell%20bank-study-mycoplasma-detection-methods.pdf>
15. RMSTRONG, S.E., MARIANO, J.A. and LUNDIN, D.J., 2010. The scope of mycoplasma contamination within the biopharmaceutical industry. *Biologicals*, vol. 38, no. 2, pp. 211-213. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2010.03.002>.

References

1. Degeling, M. H., Maguire, C. A., Bovenberg, M. S., & Tannous, B. A. (2012). Sensitive assay for mycoplasma detection in mammalian cell culture. *Analytical Chemistry*, 84(9), 4227–4232. <https://doi.org/10.1021/ac2033112>.
2. Dvorakova, H., Valicek, L., & Reichelova, M. (2005). Detection of mycoplasma contamination in cell cultures and bovine sera. *Journal of Veterinary Medicine*, 50(6), 262–268. <https://doi.org/10.17221/5622-VETMED>.
3. Dobrovolny, P. L., & Bess, D. (2011). Optimized PCR-based detection of mycoplasma. *Journal of Visualized Experiments*, (52). <https://doi.org/10.3791/2772>.

4. Uphoff, C. C., & Drexler, H. G. (2002). Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. *In Vitro Cell Developmental Biology*, 38(2), 79–85. [https://doi.org/10.1290/1071-2690\(2002\)038<0079:CPAFDO>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1290/1071-2690(2002)038<0079:CPAFDO>2.0.CO;2).
5. Uphoff, C. C., & Drexler, H. G. (2004). Detecting mycoplasma contamination in cell cultures by polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Medicine*, 88, 319–326.
6. Drexler, H. G., & Uphoff, C. C. (2000). Contamination of cell cultures Mycoplasma. In *The Encyclopedia of Cell Technology* (pp. 609–627). New York: Wiley.
7. Freshney, R. I. (2010). *Culture of Animal Cells* (6th ed.). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons.
8. Uphoff, C. C., & Drexler, H. G. (2010). Mycoplasma contamination of cell cultures. In M. C. Flickinger (Ed.), *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology* (pp. 3611–3630). New York, NY, USA: John Wiley & Sons.
9. Drexler, H. G., & Uphoff, C. C. (2002). Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology*, 39(2), 75–90.
10. СОП-GMP-НИИПББ-ПР-265-2020. ПЦР анализ по входному контролю культуры клеток на наличие микоплазмы с помощью набора EZ-PCR™ Mycoplasma Detection Kit.
11. Исмагамбетова, Д. Ж., Наханов, А. К., & Жаппарова, Г. А. (2014). Оценка влияния фармазина на элиминацию микоплазм в культурах клеток. В *Инновационное развитие науки в обеспечении биологической безопасности* (pp. 109). Гвардейский.
12. Ligasová, A., Vyržalová, M., Buriánová, R., Brůčková, L., Večeřová, R., Janošťáková, A., & Koberna, K. (2019). A new sensitive method for the detection of mycoplasmas using fluorescence microscopy. *Cells*, 8(12), 1510. <https://doi.org/10.3390/cells8121510>.
13. Young, L., Sung, J., Stacey, G., et al. (2010). Detection of mycoplasma in cell cultures. *Nature Protocols*, 5(7), 929–934. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.43>.
14. InvivoGen. (n.d.). *Japanese cell bank study: Mycoplasma detection methods*. Retrieved from <https://www.invivogen.com/sites/default/files/pictures/japanese-cell%20bank-study-mycoplasma-detection-methods.pdf>.
15. Armstrong, S. E., Mariano, J. A., & Lundin, D. J. (2010). The scope of mycoplasma contamination within the biopharmaceutical industry. *Biologicals*, 38(2), 211–213. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2010.03.002>.
- 16.

ЖАСУША ӨСІНДІЛЕРІНІҢ МИКОПЛАЗМАЛЫҚ ЛАСТАНУЫН АНЫҚТАУ ӘДІСТЕРІН ЖӘНЕ МИКОПЛАЗМАҒА ҚАРСЫ ПРЕПАРАТТАРДЫҢ ТИІМДІЛІГІН БАҒАЛАУ

А.К. Наханов , А.А. Терейбай* , Л.Г. Мараховская , С.К. Коканов ,
Б.А. Сейдахметова 

«Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» ЖШС,
Гвардейский қтк, Қазақстан
*a.terebay@biosafety.kz

Аннотация. Бұл мақалада антимиоплазмалық препараттардың тиімділігін бағалау бойынша зерттеу нәтижелері келтірілген. Микоплазмаларды анықтау үшін жасуша өсімділерін ДНҚ флюорохроммен (DAPI, Apollo Scientific) бояу әдістері, Plasmotest™

(Invivogen, France), MycoStrip (Invivogen, France) және тәжірибеде кеңінен ұсынылған EZ-PCR™ (Biological Industries, Israel) әдістерін қолданылды. Нәтижелерге сүйене отырып, микоплазмаға қарсы препараттар MycoZap (Lonza Bioscience), Plasmocin (Invivogen, France), MRA (BIO-RAD) и BM-Cyclin (Roche) микоплазмалық ластанумен күресуде тиімді екендігі анықталды. ДНҚ флюорохромдарымен анықтау әдісі микоплазманың болуын анықтауы субъективті болуы мүмкін, өйткені оның микоплазмаға сезімталдығы төмен. Өз кезегінде, MycoStrip жиынтығы осы жиынтықтың анықталатын түрлерінің тізіміне кірмейтін микоплазмалардың болуына байланысты жалған теріс нәтиже бере алады. Plasmotest™ оң және теріс нәтижелері EZ-PCR™ нәтижелерімен дәл сәйкес келді. Егер микоплазмалық ластануға күдік болса, алдын-ала талдау үшін ДНҚ-ны бояу әдісі мен MycoStrip жиынтығын, ал Plasmotest™ және EZ-PCR түпкілікті растау үшін қолдануға болады.

Түйін сөздер: жасуша өсінділері; MDCK; MDBK; BHK-21; Vero; микоплазмалар; микоплазмаларды анықтау; жою.

EVALUATION OF METHODS FOR THE DETECTION OF MYCOPLASMA CONTAMINATION OF CELL CULTURES AND THE EFFECTIVENESS OF ANTIMYCOPLASMA PREPARATIONS

A.K. Nakhanov , A.A. Terebay* , L.G. Marakhovskaya , S.K. Kokanov ,
B.A. Seydakhmetova 

«Research Institute of Biological Safety Problems» LLP
Gvardeysky, Kazakhstan
*a.terebay@biosafety.kz

Annotation. This article presents the results of a study on the detection of mycoplasma infection in various cell lines and the evaluation of the effectiveness of antimycoplasma drugs. To detect mycoplasmas in cell cultures, DNA fluorochrome (DAPI, Apollo Scientific) staining methods, Plasmotest™ (Invivogen, France), MycoStrip (Invivogen, France) and EZ-PCR™ (Biological Industries, Israel) kits were used, which are widely recommended for detecting mycoplasmas in cell culture. Based on the obtained research results, it was found that the antimycoplasma drugs MycoZap (Lonza Bioscience), Plasmocin (Invivogen, France), MRA (BIO-RAD) and BM-Cyclin (Roche) are effective in combating mycoplasma contamination of cell cultures. The method of detecting mycoplasmas with DNA fluorochromes, determining the presence of mycoplasma may be subjective, since its sensitivity to mycoplasmas is low. In turn, the MycoStrip set can give a false negative result due to the presence of mycoplasmas not included in the list of detectable species of this set. The positive and negative results of Plasmotest were precisely correlated with the results of EZ-PCR. If mycoplasma contamination is suspected, DNA staining and the MycoStrip kit can be used for preliminary analysis, and Plasmotest™ and EZ-PCR final confirmation.

Keywords: cell cultures; MDCK; MDBK; BHK-21; Vero; mycoplasmas; mycoplasma detection; elimination.