

Nghiên cứu áp dụng bộ kit Mycoflour để phát hiện *Mycoplasma* trong các dòng tế bào tại Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế

Apply Mycoflour kit for detection of *Mycoplasma* in cell lines at National Institute for Control of Vaccines and Biologicals

Nguyễn Thị Vân Quỳnh*, Nguyễn Thị Mai Hương, Nguyễn Thu Quỳnh, Nguyễn Thị Thu Thủy, Nguyễn Khánh Ly
Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế

Nguyen Thi Van Quynh*, Nguyen Thi Mai Huong, Nguyen Thu Quynh, Nguyen Thi Thu Thuy, Nguyen Khanh Ly.
National Institute for Control of Vaccines and Biologicals

TÓM TẮT

Việc kiểm soát *Mycoplasma* trong nuôi cấy tế bào dùng trong kiểm định là cần thiết để đảm bảo tính chính xác trong kiểm định chất lượng và xuất xưởng lô vắc xin. Nghiên cứu quy trình nhuộm huỳnh quang sử dụng chỉ thị tế bào phát hiện *Mycoplasma* nhằm xây dựng quy trình chuẩn trước khi sử dụng thường quy tại Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế (NICVB). Kết quả cho thấy các thông số của quy trình phát hiện *Mycoplasma* bằng phương pháp chỉ thị tế bào Vero sử dụng bộ kit MycoFlour™ tại NICVB đã được tối ưu nồng độ tế bào Vero chỉ thị khi cấy vào lá kính 10×10^4 TB/ml; rửa tế bào trên lá kính 2 lần bằng PBS (-)1X và đạt yêu cầu về độ đặc hiệu trong đánh giá chất lượng tế bào.

Từ khóa: *Mycoplasma*, phương pháp chỉ thị tế bào, nhuộm huỳnh quang.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiễm *Mycoplasma* trong quá trình nuôi cấy tế bào đã được biết đến trong nhiều thập kỷ và ngày càng phổ biến, đe dọa các phòng thí nghiệm cũng như các cơ sở sản xuất chế

ABSTRACT

Control of *Mycoplasma* in cell culture used in testing is necessary to ensure the accuracy of quality control and vaccine release. Research on fluorescent dyeing process using *Mycoplasma* detection cell indicators to develop standard operating procedures before routinely used at National Institute for Control of Vaccines and Biologicals (NICVB). Outcome showed that the parameters of the *Mycoplasma* detection procedure by the Vero cell indicator method using the MycoFlour™ kit at NICVB were optimized for the concentration of Vero cells inoculated into coverslip 10×10^4 TB/ml; Wash cells twice with PBS (-)1X and meet the requirements for specificity in cell quality assessment.

Key words: *Mycoplasma*, cell indicator method, fluorescence stain.

I. INTRODUCTION

Mycoplasma infection in cell culture has been known for decades of its widespread, threatening laboratories as well as probiotic production facilities [9], [12], [17]. In fact, it is estimated that 15% to 70% of cell lines

*Tác giả: Nguyễn Thị Vân Quỳnh
ĐC: Số 1 Nghiêm Xuân Yên, Đại Kim, Hoàng Mai, Hà Nội
Điện thoại: 0963856265
Email: vanquynh1074@gmail.com

*Corresponding author: Nguyen Thi Van Quynh
Address: 1 Nghiem Xuan Yen, Dai Kim Ward,
Hoang Mai District, Ha Noi
Phone: 0963856265

phẩm sinh học [9], [12], [17]. Trên thực tế, ước tính có 15% đến 70% các dòng tế bào ở các phòng thí nghiệm có thể bị nhiễm *Mycoplasma* [1],[11]. *Mycoplasma* có thể làm thay đổi đáng kể các tế bào nuôi cấy, làm sai lệch kết quả nghiên cứu, kết quả kiểm định chất lượng vắc xin. Khi đã phát hiện ra *Mycoplasma*, giải pháp tốt nhất để loại bỏ và ngăn chúng lây lan là loại bỏ dòng tế bào bị nhiễm [12]. Để thực hiện điều đó, trước hết cần thường xuyên kiểm tra các tế bào nuôi cấy để đảm bảo không có *Mycoplasma* và luôn sử dụng kỹ thuật vô trùng thích hợp trong phòng thí nghiệm. Một phương pháp phát hiện *Mycoplasma* cho kết quả nhanh, dễ sử dụng là dùng chỉ thị tế bào Vero sử dụng bộ kit MycoFlour™ dựa trên việc khai thác chất nhuộm huỳnh quang có khả năng gắn vào nucleic acid của *Mycoplasma* đã được sử dụng tại các phòng thí nghiệm trên thế giới [7],[10], [14], [18] và nghiên cứu này nhằm tối ưu hóa, kiểm tra độ đặc hiệu của quy trình phát hiện *Mycoplasma* cho các dòng tế bào kiểm định tại NICVB bằng chỉ thị tế bào Vero.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Đối tượng, thời gian và địa điểm nghiên cứu:

- Đối tượng nghiên cứu là quy trình phát hiện *Mycoplasma* sử dụng chỉ thị tế bào Vero bằng kit MycoFlour™.

- Nghiên cứu được tiến hành từ tháng 04 đến tháng 12 năm 2020 tại khoa Môi trường Thực nghiệm - NICVB

2.2. Vật liệu

Mẫu thử được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm các tế bào BHK21, MRC5, RK13, HEp2, Vero. Mẫu chứng dương *Mycoplasma Morfs*, chủng *M. orale* nồng độ $10,43 \times 10^4$ CFU/10 μ l (ATCC 23714 đời cấy F1). Mẫu chứng âm: PBS (-)1X không chứa ADN và ARN. Tế bào chỉ thị được sử dụng là tế bào Vero, loạt NICVB/WCB 01-19 (đã được kiểm định chất lượng đầy đủ và không chứa *Mycoplasma*). Dung dịch

in laboratories may be contaminated with *Mycoplasma* [1], [11]. *Mycoplasma* can cause significant changes in cultured spermatozoa, falsifying research results and quality control results. Once *Mycoplasma* is detected, the best solution to eliminate and prevent them from spreading is to remove the contaminated cell culture [12]. To do this, it is necessary to regularly check cultured cells in advance for the absence of *Mycoplasma* and always use aseptic laboratory technique. A fast, easy-to-use method of *Mycoplasma* detection is the use of the Vero cell indicator using the MycoFlour™ kit, which is based on the extraction of the optical quality of *Mycoplasma*'s nucleic acid binding ability, which has been used at laboratories around the world [7], [10], [14], [18] and this study aims to optimize and test the characteristics of the developed *Mycoplasma* program for test cell lines. at NICVB using the Vero cell directive.

II. RESEARCH METHODS

2.1. Subjects, time and place of the study:

- The subject of the study is the process of detecting *Mycoplasma* using the Vero cell indicator using the MycoFlour™ kit.

- The study was conducted from April to December 2020 at the Department of Experimental Environment - NICVB

2.2. Material

Samples used in the study included BHK21, MRC5, RK13, HEp2, Vero cells. The positive control sample *Mycoplasma Morfs*, strain *M. orale* concentration 10.43×10^4 CFU/10 μ l (ATCC 23714 F1 generation). Negative control: PBS (-)1X does not contain DNA and RNA. The indicator cells used were Vero cells, NICVB/WCB series 01-19 (fully validated and free of *Mycoplasma*). MycoFlour Staining Solution for *Mycoplasma* detection (Thermo Fisher, Cat No. M7006). Anti-phase microscope for cytology and fluorescence staining (EVOS5000).

nhuộm Kít MycoFlour phát hiện *Mycoplasma* (Thermo Fisher, Cat No. M7006). Kính hiển vi phản pha soi tế bào và soi nhuộm huỳnh quang (EVOS5000).

2.3. Phương pháp nghiên cứu: Phương pháp thực nghiệm trong phòng thí nghiệm

Tối ưu hóa quy trình kiểm tra *Mycoplasma* bằng phương pháp chỉ thị tế bào sử dụng kít MycoFlour™: Tối ưu hóa nồng độ tế bào Vero chỉ thị khi cấy vào lá kính; Bổ sung thêm chứng dương là chủng *M. orale* – so với quy trình của kít chứng dương là hạt Morfs; Tối ưu quy trình rửa nhuộm lá kính tế bào. Xác định độ đặc hiệu.

2.4. Thiết kế nghiên cứu

2.4.1. Tối ưu hóa nồng độ tế bào Vero chỉ thị khi cấy vào lá kính

Nghiên cứu 3 nồng độ tế bào Vero chỉ thị, mỗi nồng độ lặp lại 3 lần. Chọn nồng độ tối ưu cho thử nghiệm sau khi đánh giá kết quả: Độ pha 1: 5×10^4 tế bào/1ml; Độ pha 2: 10×10^4 tế bào/1ml; Độ pha 3: 15×10^4 tế bào/1ml. Lựa chọn nồng độ tối ưu cho hình ảnh rõ nét khi đọc kết quả.

2.4.2. Tối ưu hóa nồng độ chứng dương *Mycoplasma*

Sử dụng chủng *M. orale* làm chứng dương song song với chứng dương nhân tạo (hạt Morfs) có sẵn trong quá trình thực hiện thử nghiệm. Chủng *M. orale* ATCC 23714 có nồng độ $10,43 \times 10^4$ CFU/10 μ l được pha loãng theo các độ pha $10^{-2,5}$, 10^{-3} , $10^{-3,5}$ bằng môi trường canh thang PPLO LM II, gây nhiễm vào tế bào chỉ thị Vero. Mỗi nồng độ thực hiện lặp lại 3 lần. Chọn lựa nồng độ tối ưu (≤ 100 CFU) để đánh giá độ đặc hiệu.

2.4.3. Tối ưu hóa quy trình nhuộm đọc kết quả

Theo hướng dẫn trong được điển và hướng dẫn sử dụng của bộ Kít MycoFluor™ tế bào chỉ thị sau khi được gây nhiễm với mẫu thử (các tế bào) trong 3 ngày sẽ được cấy chuyển vào lá kính và nhuộm đọc kết quả sau 72 giờ. Với mong muốn thu được hình ảnh rõ nét, tăng độ tin cậy khi đánh giá kết quả nên việc tối ưu quy trình nhuộm là cần thiết.

2.3. Research method: Experiment in the laboratory

Optimizing the testing process of *Mycoplasma* by cell indicator using the MycoFlour™ kit: Optimizing the concentration of Vero indicator cells when inoculated on the slide; Adding a positive control is the strain *M. orale* – compared with the procedure of the positive control kit, which is Morfs seeds; Optimizing the process of washing and staining the cytoskeleton. Determine specificity.

2.4. Research design

2.4.1. Optimizing the concentration of Vero indicator cells when inoculating on the cover slip

Studying 3 concentrations of Vero indicator cells, each concentration repeated 3 times. Select the optimal concentration for the test after evaluating the results: Phase 1: 5×10^4 cells/1ml; Phase 2: 10×10^4 cells/1ml; Phase 3: 15×10^4 cells/1ml. Select the optimal concentration for a clear image when reading results.

2.4.2. Optimization of concentration of positive control *Mycoplasma*

Use the *M. orale* as a positive control in parallel with the artificial positive control (Morfs seed) available during the test. *M. orale* ATCC 23714 strain with a concentration of 10.43×10^4 CFU/10 μ l was diluted in phases $10^{-2,5}$, 10^{-3} , $10^{-3,5}$ with PPLO LM II environment, infecting cells. Vero indicator cell. Each concentration was repeated 3 times. Select the optimal concentration (≤ 100 CFU) for specificity assessment.

2.4.3. Optimizing the dye reading process

According to the instructions in the pharmacopoeia and the instructions for use of the MycoFlour™ Kit, the indicator cells after being infected with the test sample (cells) for 3 days will be transplanted into the glass leaf and stained to read the results after 72 hours. . With the desire to obtain a clear image and increase the reliability of the results, it is necessary to optimize the dyeing process.

Prepare study samples with different

Chuẩn bị các mẫu nghiên cứu với quy trình thực hiện khác nhau như sau: Mẫu thử 1- Thực hiện theo đúng hướng dẫn của bộ Kít MycoFlour, nhuộm trực tiếp lá kính không rửa; Mẫu thử 2- Rửa lá kính 2 lần bằng PBS (-) 1X sau đó nhuộm đọc kết quả; Mẫu thử 3 - Rửa lá kính 3 lần bằng PBS (-) 1X và lắc nhẹ nhàng phiến, sau đó nhuộm đọc kết quả. Mỗi mẫu nghiên cứu thực hiện lặp lại 3 lần.

2.4.4. Xác định độ đặc hiệu

Thực hiện thử nghiệm 6 lần độc lập với các mẫu thử:

Mẫu thử 1: Nước nổi tế bào mẫu thử trên tế bào chỉ thị Vero (mẫu trắng)

Mẫu thử 2: Nước nổi tế bào mẫu thử + chủng *M. orale* trên tế bào chỉ thị Vero.

Mẫu chứng âm: PBS (-) 1X trên tế bào chỉ thị Vero.

Mẫu chứng dương: chủng *M. orale* trên tế bào chỉ thị Vero; dung dịch *Mycoplasma Morfs* của bộ kít Mycoflour.

Tiêu chuẩn chấp thuận: sau khi nhuộm có hạt *M. orale* phát quang và có kích thước tương đương với hạt Morfs trên các lá kính tế bào Vero chỉ thị - trong cả 6 lần thực hiện. Không có tín hiệu *M. orale* phát quang trong mẫu chứng âm và mẫu trắng.

III. KẾT QUẢ

3.1. Tối ưu quy trình

3.1.1. Kết quả tối ưu hóa nồng độ tế bào Vero chỉ thị trên lá kính

procedures as follows: Sample 1- Follow the instructions of the MycoFlour Kit, dye the unwashed glass leaves directly; Sample 2- Wash the glass foil twice with PBS (-) 1X, then stain to read the results; Sample 3 - Wash the slide 3 times with 1X PBS (-) and gently shake the slide, then stain to read the results. Each study sample was repeated 3 times.

2.4.4. Determination of specificity

Carry out the test 6 times independently:

Test sample 1: Cell supernatant on Vero indicator cell (blank sample)

Test sample 2: Supernatant of sample cells + *M. orale* strain on Vero indicator cells.

Negative control: PBS (-) 1X on Vero indicator cells.

Positive control : *M. orale* strain on Vero indicator cells; *Mycoplasma Morfs* solution of the Mycofour kit.

Approval criteria: after staining, *M. orale* granules were luminescent and comparable in size to Morfs beads on the vitreous cells of Vero indicator cells - in all 6 times. There was no luminescent *M. orale* signal in negative controls and blanks.

III. RESULTS

3.1. Test optimization

3.1.1. The results of optimizing the concentration of Vero cells indicated on the foil

Transplanted Vero cells achieved a stable proliferation rate before being put into the study.

BẢNG 1. KẾT QUẢ QUAN SÁT NỒNG ĐỘ TẾ BÀO VERO CHỈ THỊ TRÊN LÁ KÍNH CỦA 3 NỒNG ĐỘ TẾ BÀO VERO

TABLE 1. RESULTS OF OBSERVING THE CONCENTRATION OF VERO CELLS INDICATED ON THE COVER SLIP OF 3 CONCENTRATIONS OF VERO CELLS

Nồng độ tế bào	Kết quả (% tế bào kín sau nuôi cấy)
Độ pha 1 5x10 ⁴ TB/ml	(60± 5) %
Độ pha 2 10x10 ⁴ TB/ml	(75±5) %
Độ pha 3 15x10 ⁴ TB/ml	(95±5) %

Cell concentration	Results (% of closed cells after culture)
Phase 1 5x10 ⁴ cells/ml	(60± 5) %
Phase 2 10x10 ⁴ cells/ml	(75±5) %
Phase 3 15x10 ⁴ cells/ml	(95±5) %

Tế bào Vero được cấy chuyển đạt tỉ lệ tăng sinh ổn định trước khi đưa vào thực hiện nghiên cứu.

Theo kết quả trên bảng 1 cho thấy nồng độ cấy tế bào chỉ thị Vero trên lá kính ở các độ pha cho hình ảnh quan sát mật độ tế bào sống trên lá kính sau 72 giờ nuôi cấy đạt tỉ lệ tương ứng $(60 \pm 5) \%$ ở độ pha 1, $(75 \pm 5) \%$ ở độ pha 2 và $(95 \pm 5) \%$ ở độ pha 3. Để đảm bảo mật độ tế bào trên lá kính khi đọc kết quả nằm trong khoảng giới hạn 70-80% theo như hướng dẫn sử dụng của bộ kit và được diễn chúng tôi chọn lựa độ pha 2 để tiếp tục thực hiện các bước nghiên cứu tiếp theo.

3.1.2. Kết quả tối ưu hóa chứng dương *Mycoplasma*

Chủng *M. orale* được sử dụng làm chứng dương song song với chứng dương nhân tạo (hạt Morfs) có sẵn trong quá trình thực hiện thử nghiệm. Pha loãng chủng *M. orale* các nồng độ tương ứng $10^{-2.5}$, 10^{-3} , $10^{-3.5}$ gây nhiễm vào tế bào chỉ thị Vero. Mỗi nồng độ thực hiện lặp lại 3 lần.

BẢNG 2. KẾT QUẢ TỐI ƯU HÓA CHỨNG DƯƠNG MYCOPLASMA
TABLE 2. OPTIMIZATION RESULTS OF MYCOPLASMA POSITIVE CONTROL

Các độ pha Mẫu thử	Phases Test specimen	$10^{-2.5}$	10^{-3}	$10^{-3.5}$
Chủng <i>Mycoplasma orale</i>		++	++	+
Hạt Morfs	Morfs County		+	

Các nồng độ gây nhiễm trên tế bào đều cho hình ảnh dương tính khi có phát quang của *Mycoplasma*, kích thước các hạt phát quang tương đương và giống với hình ảnh của chứng dương *Mycoplasma* Morfs của kit. Mật độ phát quang ở nồng độ $10^{-3.5}$ (30-38 CFU) cho hình ảnh tương đương với mật độ hạt *Mycoplasma* Morfs theo hướng dẫn của kit. Chúng tôi chọn $10^{-3.5}$ cho nghiên cứu độ đặc hiệu tiếp theo.

3.1.3. Tối ưu quy trình nhuộm đọc kết quả

Thực hiện trên phiên nuôi cấy tế bào chỉ thị Vero, các mẫu thử được thực hiện song song cùng với nhau.

The results in Table 1 shows that the concentration of Vero indicator cells inoculated on the cover slip at the phases for observing the density of live cells on the cover slip after 72 hours of culture reached the corresponding ratio $(60 \pm 5) \%$ in phase 1, $(75 \pm 5) \%$ in phase 2 and $(95 \pm 5) \%$ in phase 3. To ensure cell density on the foil when reading results are within the range of 70-80 % according to the instructions for use of the kit and pharmacopoeia, we selected phase 2 to continue to carry out the next research steps.

3.1.2. Optimizing results for positive control *Mycoplasma*

The *M. orale* strain was used as a positive control in tandem with the artificial positive control (Morfs seed) available during the trial. Diluting the *M. orale* strain with concentrations of $10^{-2.5}$, 10^{-3} , $10^{-3.5}$, respectively, infects Vero indicator cells. Each concentration was repeated 3 times.

Infectious concentrations on cells all showed a positive image in the presence of *Mycoplasma* luminescence, the size of luminescent particles was

similar and similar to the image of the kit's positive control *Mycoplasma* Morfs. The luminescence density at the concentration of $10^{-3.5}$ (30-38 CFU) gives the image equivalent to the density of *Mycoplasma* Morfs particles according to the kit instructions. We chose $10^{-3.5}$ for the follow-up specificity study.

3.1.3. Optimizing the dyeing process to read the results

Performed on the Vero indicator cell culture plate, the test samples are performed in parallel with each other.

The results on table 3 show that after staining, the sample 1 has a blurry image, with dead cells;

BẢNG 3. KẾT QUẢ TỐI ƯU QUY TRÌNH NHUỘM HUỖNH QUANG
TABLE 3. OPTIMAL RESULTS OF THE FLUORESCENT STAINING PROCESS

	Mẫu Thử 1 Sample 1	Mẫu thử 2 Sample 2	Mẫu thử 3 Sample 3
Thực hiện Performance	Không rửa trước khi nhuộm (theo hướng dẫn của kit) No wash before staining (follow kit instructions)	Rửa 2 lần bằng PBS (-) 1X trước khi nhuộm Wash 2 times with PBS (-) 1X before staining	Rửa 3 lần bằng PBS (-) 1X (có lắc nhẹ nhàng phiến trong lúc rửa). Wash 3 times with PBS (-) 1X (with gentle shaking of the plate during washing)
Kết quả Result	Hình ảnh mờ, lẫn tế bào chết. Blurry image,	Hình ảnh rõ nét, không thấy tế bào chết. Clear image, No have dead cells	Tế bào bị bong, rách. Cells are peeled, torn

Kết quả trên bảng 3 cho thấy sau khi nhuộm, mẫu thử 1 hình ảnh mờ, có lẫn tế bào chết; mẫu thử 2 hình ảnh rõ nét, không thấy tế bào chết; mẫu thử 3 tế bào bị bong, rách. Việc rửa tế bào trước khi nhuộm huỳnh quang sẽ đem lại hình ảnh sắc nét hơn. Chúng tôi chọn bước thực hiện rửa tế bào 2 lần như mẫu thử 2.

3.1.4 Tóm tắt quy trình phát hiện *Mycoplasma* trong tế bào

Nuôi cấy tế bào chỉ thị Vero theo quy trình thường quy tại phòng thí nghiệm trong chai 25cm². Cấy chuyển tế bào chỉ thị Vero với mật độ 5x10⁵ tế bào/ml vào chai 25cm², nuôi cấy tế bào bằng DMEM1X 10% FBS không chứa kháng sinh. Sau 48 giờ tế bào phát triển 1 lớp, cấy 1 ml nước nổi tế bào (mẫu thử) vào mỗi chai tế bào Vero, cấy 2 chai; Chứng âm cấy 1 ml PBS (-)1X vào 1 chai tế bào Vero. Ủ các chai tế bào Vero trên ở nhiệt độ (36±1)°C/5% CO₂ trong 3 ngày. Cấy chuyển tế bào Vero với mật độ 10x10⁴ tế bào/ml lên phiến 06 giếng có chứa các lá kính: 02 lá kính (dùng cho mẫu thử); 01 lá kính cho chứng âm và 01 lá kính cho chứng dương. Các lá kính tế bào Vero đặt trong phiến 06 giếng nuôi trong tủ (36±1) °C/5% CO₂ sau 3 ngày lấy ra tiến hành đọc kết quả thử nghiệm *Mycoplasma*. Hút bỏ môi trường nuôi cấy tế bào và rửa tế bào 2 lần với PBS(-) 1X. Thêm PBS(-) 1X và MycoFluor 20X vào mỗi giếng tế bào theo tỉ lệ 1:19. Ủ tế bào với MycoFluor ở 37°C trong 10 phút. Lấy ra, đặt lá kính lên lam kính sạch và

sample 2 has clear images, no dead cells; 3 cell samples were peeled, torn. Washing cells before fluorescence staining results in sharper images. We choose the step of performing cell washing twice as sample 2.

3.1.4 Summary of the process of detecting *Mycoplasma* in cell culture

Culture of Vero indicator cells according to routine laboratory procedures in 25cm² bottles. Inoculation of Vero indicator cells at a density of 5x 10⁵ cells/ml into a 25cm² bottle, cultured with antibiotic-free DMEM1X 10% FBS. After 48 hours of cell growth in 1 layer, inoculate 1ml of cell supernatant (test sample) into each bottle of Vero cells, inoculate 2 bottles; Negative controls inoculate 1ml of PBS (-)1X into 1 bottle of Vero cells. Incubate the above Vero cell bottles at (36±1) °C/5% CO₂ for 3 days. Inoculation of Vero cells at a density of 10x10⁴ cells/ml onto a 06-well plate containing plates: 02 plates (for samples); 01 glass leaf for negative control and 01 glass leaf for positive control. The leaves of Vero cells were placed in 6-well plates and cultured in a cabinet (36±1) °C/5% CO₂ after 3 days of taking out to read the test results of *Mycoplasma*. Remove cell culture medium and wash cells twice with PBS(-) 1X. Add PBS(-) 1X and MycoFluor 20X to each cell well in the ratio 1:19. Incubate cells with MycoFluor at 37°C for 10 min. Remove, place the slide on a clean slide and fix. Positive controls: add 5 µl

cố định. Mẫu chứng dương: bổ sung 5μl dung dịch *Mycoplasma Morfs* (Microscopic Optical Replicas for Fluorescence assayS) lên lam kính trước khi cố định lá kính. Soi tiêu bản nhuộm ở vật kính 100X, nguồn sáng huỳnh quang DAPI. Nhân tế bào sẽ được nhuộm màu xanh trên nền đen, độ sáng vừa, kích thước lớn. Tín hiệu huỳnh quang của *Mycoplasma* thu được sẽ có màu xanh trắng (whitish blue), có kích thước rất nhỏ, hình dạng, độ sáng đồng đều nhau.

Mẫu âm: Có hình ảnh huỳnh quang của nhân tế bào, không có hình ảnh huỳnh quang của *Mycoplasma*.

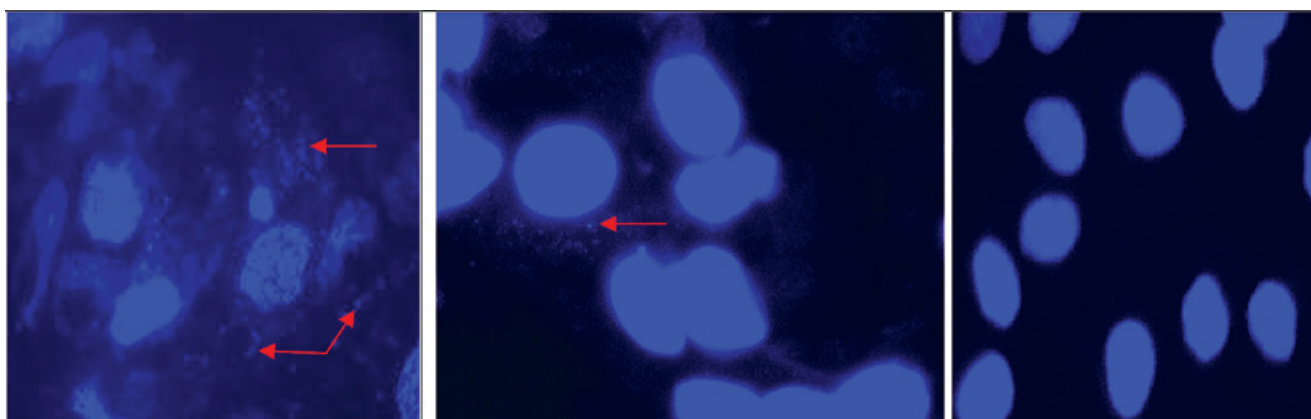
Mẫu dương: Có hình ảnh huỳnh quang của nhân tế bào lẫn hình ảnh huỳnh quang của *Mycoplasma*.

of *Mycoplasma Morfs* (Microscopic Optical Replicas for Fluorescence assayS) solution to the slide before fixing the slides. Examine the stain at a 100X objective with a DAPI fluorescent light source. Cell nucleus will be stained blue on black background, medium brightness, large size. The obtained fluorescence signal of *Mycoplasma* will be white blue, very small in size, uniform in shape and brightness.

Negative sample: There is fluorescence image of cell nucleus, no fluorescence image of *Mycoplasma*.

Positive sample: There is fluorescence image of cell nucleus and fluorescence image of *Mycoplasma*.

3.2. Specificity



Hình 1. Hình ảnh nhuộm kết quả của các mẫu chứng dương và chứng âm

Figure 1. Results staining images of positive and negative controls

3.2. Độ đặc hiệu

Kết quả đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp được thực hiện trên mẫu nước nổi của các dòng tế bào. Mỗi mẫu được thực hiện lặp lại 6 lần. Mẫu chứng dương là mẫu gây nhiễm *Mycoplasma* trên tế bào chỉ thị Vero; hạt *Mycoplasma Morfs* và mẫu chứng âm là mẫu PBS(-) 1X trên tế bào chỉ thị Vero.

“+” có hình ảnh *Mycoplasma* phát quang trên tiêu bản nhuộm

“-” Không có hình ảnh *Mycoplasma* phát quang trên tiêu bản nhuộm

“*”: Chứng dương *M. orale* & *Mycoplasma Morfs*.

The results of method specificity evaluation were performed on supernatant samples of cell lines. Each sample was repeated 6 times. The positive control sample is the sample infecting *Mycoplasma* on Vero indicator cells; *Mycoplasma Morfs* particles and negative control were 1X PBS(-) samples on Vero indicator cells.

“+” has an image of luminescent *Mycoplasma* on the staining slide

“-” There is no image of *Mycoplasma* luminescent on the staining slide

“*”: Positive control *M. orale* & *Mycoplasma Morfs*.

Table 4 shows that the study results on the

BẢNG 4. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ TRÊN MẪU NƯỚC NỔI TẾ BÀO
TABLE 4. EVALUATION RESULTS ON CELL SUPERNATANT

Lần thử nghiệm Test times		BHK21	MRC5	RK13	HEp2	Vero	Chứng dương (+)* Positive test (+)*	Chứng âm (-) Negative test (-)
Mẫu thử 1 Sample 1	1	-	-	-	-	-	+	-
	2	-	-	-	-	-	+	-
	3	-	-	-	-	-	+	-
	4	-	-	-	-	-	+	-
	5	-	-	-	-	-	+	-
	6	-	-	-	-	-	+	-
Kết luận Conclusion		Không có hình ảnh huỳnh quang của <i>Mycoplasma</i> trên mẫu thử ở 6 lần thử nghiệm. There was no fluorescence image of <i>Mycoplasma</i> on the sample at 6 tests.				Có hình ảnh phát quang của <i>Mycoplasma</i> trên các mẫu chứng dương There are luminescence images of <i>Mycoplasma</i> on positive controls		Không có hình ảnh huỳnh quang của <i>Mycoplasma</i> . No fluorescence images of <i>Mycoplasma</i> .

Bảng 4 cho thấy kết quả nghiên cứu trên mẫu nước nổi tế bào ở cả 6 lần thực hiện đều cho hình ảnh huỳnh quang của nhân tế bào và không có hình ảnh huỳnh quang của *Mycoplasma*. Các hình ảnh đều cho kết quả tương đồng với cả mẫu chứng âm. Mẫu chứng dương cho hình ảnh huỳnh quang của cả tế bào lẫn *Mycoplasma*.

supernatant water sample at all 6 times gave fluorescence images of the cell nucleus and no fluorescence images of *Mycoplasma*. The images showed similar results with both negative controls. Positive controls show fluorescence of both cells and *Mycoplasma*.

“+” has an image of luminescent *Mycoplasma*

BẢNG 5. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ TRÊN MẪU NƯỚC NỔI TẾ BÀO+ MYCOPLASMA
TABLE 5. EVALUATION RESULTS ON SUPERNATANT WATER SAMPLES + MYCOPLASMA

Lần thử nghiệm Test times		BHK21	MRC5	RK13	HEp2	Vero	Chứng dương (+)* Positive test (+)*	Chứng âm (-) Negative test (-)
Mẫu thử 2 Sample 2	1	+	+	+	+	+	+	-
	2	+	+	+	+	+	+	-
	3	+	+	+	+	+	+	-
	4	+	+	+	+	+	+	-
	5	+	+	+	+	+	+	-
	6	+	+	+	+	+	+	-
Kết luận Conclusion		Có hình ảnh phát quang của <i>Mycoplasma</i> ở tất cả các mẫu thử There is a luminescence image of <i>Mycoplasma</i> in all samples.				Có hình ảnh phát quang của <i>Mycoplasma</i> trên 2 mẫu chứng (+). There is a luminescence image of <i>Mycoplasma</i> on 2 controls (+)		Không có hình ảnh phát quang của <i>Mycoplasma</i> . There is no photoluminescence of <i>Mycoplasma</i> .

“+” có hình ảnh *Mycoplasma* phát quang trên tiêu bản nhuộm;

“-” Không có hình ảnh *Mycoplasma* phát quang trên tiêu bản nhuộm.

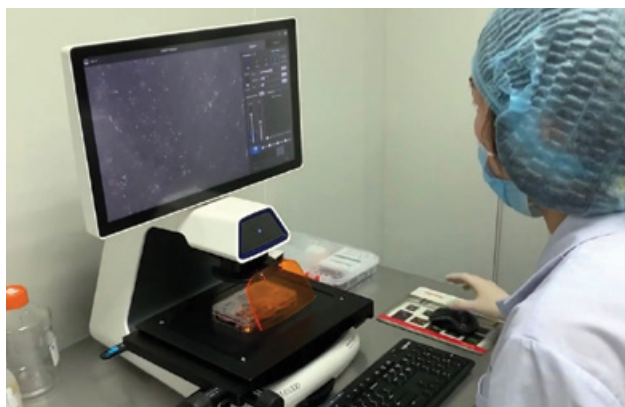
on the staining slide;

“-” There is no photoluminescent *Mycoplasma* on the staining slide.

“*” Positive control *M. orale* & *Mycoplasma*

“*” Chứng dương *M. orale* & *Mycoplasma Morfs*.

Kết quả hiển thị trên bảng 5. cho thấy mẫu nước nuôi tế bào gây nhiễm với *Mycoplasma* ở cả 6 lần thực hiện đều cho hình ảnh huỳnh quang của nhân tế bào cùng với hình ảnh huỳnh quang của *Mycoplasma*. Các hình ảnh đều cho kết quả tương đồng với các mẫu chứng dương. Mẫu chứng âm cho hình ảnh huỳnh quang của nhân tế bào chỉ thị, không có hình ảnh của hạt *Mycoplasma*.



Hình 2. Kiểm tra hình ảnh tế bào trước khi nhuộm
Figure 2. Visual inspection the cell culture before staining

IV. BÀN LUẬN

Các phương pháp phát hiện *Mycoplasma* như phương pháp nuôi cấy, phương pháp nhuộm chỉ thị tế bào và phương pháp PCR [2], [4], [5], [6], [15], [16]. Trong đó 2 phương pháp nuôi cấy và phương pháp dùng chỉ thị tế bào là phương pháp chính thức được sử dụng để kiểm tra *Mycoplasma* trong tế bào gốc giống, tế bào sản xuất, chủng virus gốc giống, chủng virus sản xuất, tế bào sử dụng trong sản xuất, lô gặt virus [3]. Phương pháp dùng chỉ thị tế bào nhuộm huỳnh quang cho kết quả nhanh, chính xác, trong việc kiểm tra phát hiện *Mycoplasma*. Phương pháp dùng chỉ thị tế bào kiểm tra *Mycoplasma* cũng được khuyến cáo trong dược điển Việt Nam, dược điển Châu Âu, dược điển Mỹ [2], [6], [15].

Mycoplasma không có khả năng di động, không có thành tế bào, có màng tế bào giống như màng của động vật có vú. Tế bào *Mycoplasma* có cả ADN và ARN nhưng tỷ lệ ADN/ARN nhỏ hơn 1.

Morfs.

The results shown in table 5. Show that the supernatant samples infected with *Mycoplasma* at all 6 times gave fluorescence images of cell nucleus along with fluorescence images of *Mycoplasma*. The images showed similar results to the positive controls. Negative controls showed fluorescence of indicator cell nuclei, no images of *Mycoplasma* particles.

IV. DISCUSSION



Hình 3. Kết quả nhuộm huỳnh quang trên kính hiển vi
Figure 3. Staining results in fluorescent microscope

There are several *Mycoplasma* detection methods such as culture method, cell marker staining method and PCR method [2],[4],[5], [6], [15], [16]. In which 2 culture methods and cell indicator method are the official methods used to test *Mycoplasma* in stem cells, producer cells, seed virus strains, producer virus strains, and cells. used in production, batch harvest virus [3]. The method using fluorescent staining cell indicator gives fast and accurate results in testing and detecting *Mycoplasma*. The method of using the *Mycoplasma* cell indicator is also recommended in the Vietnamese pharmacopoeia, European pharmacopoeia, American pharmacopoeia [2], [6], [15].

Mycoplasma is non-motile, has no cell wall, has a cell membrane similar to that of mammals. *Mycoplasma* cells have both DNA and RNA but the ratio of DNA/RNA is less than 1. *Mycoplasma* is small in size 0.2-0.8 μm [8],[13].

The principle of this method is that the indicator cells are stained with a fluorescent dye. If infected with *Mycoplasma*, the cell surface will have

Mycoplasma kích thước nhỏ 0.2-0.8 μm [8],[13].

Nguyên lý của phương pháp này là tế bào chỉ thị được nhuộm bằng thuốc nhuộm huỳnh quang. Nếu bị nhiễm *Mycoplasma*, trên bề mặt tế bào sẽ có các hạt phát huỳnh quang. Tế bào sử dụng làm chỉ thị là Vero hoặc tế bào khác có hiệu quả tương đương trong việc xác định *Mycoplasma* [3], [4], [5], [6], [15].

4.1 Tối ưu hóa nồng độ tế bào Vero chỉ thị trên coverslip

Tế bào được lựa chọn dùng làm tế bào chỉ thị là dòng tế bào có đặc điểm hình thái đồng đều, tốc độ sinh trưởng ổn định, điều kiện nuôi cấy dễ dàng. Do đó tế bào Vero là dòng tế bào thường được sử dụng rộng rãi trong nhiều nghiên cứu và được chọn lựa làm tế bào chỉ thị trong thử nghiệm xác định *Mycoplasma* bằng phương pháp nhuộm huỳnh quang. Kết quả trên bảng 1 cho thấy nồng độ cấy tế bào chỉ thị Vero trên lá kính ở các độ pha cho hình ảnh quan sát mật độ tế bào kín trên lá kính sau 72 giờ nuôi cấy đạt tỉ lệ tương ứng $(60 \pm 5)\%$ ở độ pha 1 với hình thái tế bào đồng đều, khoảng cách giữa các tế bào rất thưa, $(75 \pm 5)\%$ tế bào kín ở độ pha 2 cũng cho hình ảnh tương đồng về hình thái, khoảng cách giữa các tế bào vừa phải, còn hình ảnh của độ pha 3 thì các tế bào gần phủ kín hết bề mặt lá kính, có tế bào chết với mật độ là $(95 \pm 5)\%$. Chúng tôi chọn lựa độ pha 2 có mật độ 10×10^4 tế bào/ml làm nồng độ tối ưu để cấy chuyển tế bào lên lá kính. Ở mật độ này các hình ảnh huỳnh quang sau khi nhuộm thu được rõ ràng và sắc nét, đảm bảo độ tin cậy trong đánh giá kết quả của thử nghiệm. Mặt khác, mật độ cấy chuyển này cũng phù hợp với nồng độ tế bào khi đưa vào đọc kết quả 70-80% theo hướng dẫn của bộ kit và được diễn.

4.2 Tối ưu hóa chứng dương *Mycoplasma*

Bộ Kit MycoFlour phát hiện *Mycoplasma* (Thermo Fisher, Cat M7006) có chứa chứng dương nhân tạo (hạt Morfs), có kích thước, hình thái và hình ảnh phát quang tương đồng với *Mycoplasma*. Để đánh giá một cách khách quan hình ảnh tế bào bị nhiễm *Mycoplasma* sau đó nhuộm theo hướng dẫn của bộ kit và so sánh với chứng dương nhân

fluorescent particles. Cells used as markers were Vero or other cells that were equally effective in the determination of *Mycoplasma* [3], [4], [5], [6], [15].

4.1 Optimization of the concentration of Vero indicator cells on cover slip

Selected cells used as indicator cells are cell lines with uniform morphological characteristics, stable growth rate, and easy culture conditions. Therefore, Vero cells are a commonly used cell line in many studies and were selected as an indicator cell in the test to identify *Mycoplasma* by fluorescence staining. The results in Table 1 show that the concentration of Vero indicator cells on the glass leaf at the phases for observing the density of closed cells on the glass leaf after 72 hours of culture reached the corresponding ratio $(60 \pm 5)\%$ in phase 1 with uniform cell morphology, the distance between cells is very sparse, $(75 \pm 5)\%$ of closed cells in phase 2 also give similar images in morphology, distance between cells. The cells are moderate, while the image of phase 3, the cells almost completely cover the surface of the glass leaf, there are dead cells with a density of $(95 \pm 5)\%$. We selected phase 2 with a density of 10×10^4 cells/ml as the optimal concentration to inoculate cells onto the leaf plate. At this density, the fluorescence images obtained after staining are clear and sharp, ensuring the reliability of the test results. On the other hand, this inoculum density is also consistent with the cell concentration when put into reading 70-80% according to the instructions of the kit and pharmacopoeia.

4.2 Optimization of the positive control *Mycoplasma*

The MycoFlour Kit for detecting *Mycoplasma* (Thermo Fisher, Cat M7006) contains an artificial positive control (Morfs particle), which is similar in size, morphology and luminescence image to *Mycoplasma*. To objectively evaluate the image of cells infected with *Mycoplasma* then stained according to the instructions of the kit and compared with the artificial positive control of *Mycoplasma* Morfs particles to verify the similarity in morphology, size, and images. For luminescence, we conducted

tạo là hạt *Mycoplasma* Morfs để kiểm chứng sự giống nhau về hình thái, kích thước, hình ảnh phát quang chúng tôi tiến hành đánh giá song song cả 2 mẫu chứng dương từ chủng *M. orale* và hạt *Mycoplasma* Morfs từ bộ kit.

Chủng *Mycoplasma orale* (là F1 nuôi từ chủng gốc của ATCC) được pha loãng ra các nồng độ tương ứng: $10^{-2.5}$, 10^{-3} , $10^{-3.5}$ gây nhiễm vào tế bào chỉ thị Vero. Mỗi nồng độ thực hiện lặp lại 3 lần song song với chứng dương nhân tạo (hạt *Mycoplasma* Morfs). Với kết quả thu nhận được ở các độ pha và các lần lặp lại cho 2 mẫu thử trên bảng 2 cho thấy không có sự khác biệt về kích thước, hình thái, hình ảnh phát quang giữa mẫu hạt *Mycoplasma* Morfs với chủng *M. orale* ở độ pha $10^{-3.5}$, còn ở độ pha $10^{-2.5}$ và 10^{-3} tín hiệu huỳnh quang sáng hơn do mật độ chủng cao hơn. Do đó chúng tôi chọn độ pha $10^{-3.5}$ ($30-38 \text{ CFU} < 100 \text{ CFU}$) cho các lần thử nghiệm đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp ở bước tiếp theo của nghiên cứu.

4.3 Độ đặc hiệu của quy trình

Sau khi đã tối ưu hóa được quy trình kiểm tra *Mycoplasma* bằng phương pháp chỉ thị tế bào tại phòng thí nghiệm của Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế, chúng tôi kiểm tra độ đặc hiệu để đánh giá giá trị sử dụng, độ tin cậy của quy trình này.

Thiết kế đánh giá độ đặc hiệu được thực hiện 6 lần với các mẫu thử: mẫu thử 1 (mẫu trắng là các nước nổi tế bào mẫu thử trên tế bào chỉ thị Vero), mẫu thử 2 (nước nổi tế bào mẫu thử + chủng *M. orale* trên tế bào chỉ thị Vero), mẫu chứng âm (PBS(-) 1X) và mẫu chứng dương (chủng *M. orale* trên tế bào chỉ thị Vero, hạt *Mycoplasma* Morfs). Trong các mẫu nghiên cứu, đối với mẫu chứng dương và mẫu thử nghiệm có mặt của *Mycoplasma*, kết quả đều cho thấy là quy trình đã cho kết quả dương tính *Mycoplasma* trong các mẫu này khi tiến hành thử nghiệm. Và ngược lại, đối với các mẫu chứng âm và mẫu trắng cho kết quả âm tính tức là không có *Mycoplasma*. Căn cứ vào kết quả thực hiện 06 lần độc lập, cho thấy quy trình kiểm tra *Mycoplasma* bằng phương pháp nhuộm huỳnh quang chỉ thị tế bào Vero đạt yêu cầu về độ đặc hiệu.

parallel evaluation of both positive control samples from *M. orale* strain and *Mycoplasma* Morfs seeds from the kit.

Mycoplasma orale strain (which is F1 cultured from ATCC's original strain) was diluted to the corresponding concentrations: $10^{-2.5}$, 10^{-3} , $10^{-3.5}$ to infect Vero indicator cells. Each concentration was repeated 3 times in parallel with an artificial positive control (*Mycoplasma* Morfs particles). With the results obtained at the phases and repeats for the 2 samples in Table 2, there was no difference in size, morphology, luminescence image between *Mycoplasma* Morfs and *M. orale* strains. at $10^{-3.5}$ phase, and at $10^{-2.5}$ and 10^{-3} phase the fluorescence signal is brighter due to higher strain density. Therefore, we chose a phase $10^{-3.5}$ ($30-38 \text{ CFU} < 100 \text{ CFU}$) for the tests to evaluate the specificity of the method in the next step of the study.

4.3 Test specificity

After optimizing the process of testing *Mycoplasma* by cell indicator method at the laboratory of The National Institute for Control of Vaccines and Biologicals, we tested the specificity to evaluate the use value. use and reliability of this procedure.

The specificity assessment design was performed 6 times with test samples: sample 1 (sample cell supernatants sample on Vero indicator cells), test sample 2 (sample cell supernatant+ *M. orale* strain on Vero indicator cells), negative controls (PBS(-) 1X) and positive controls (*M. orale* strains on Vero indicator cells, *Mycoplasma* Morfs particles). with the positive control and the test sample in the presence of *Mycoplasma*, the results both showed that the procedure gave a positive result for *Mycoplasma* in these samples when conducting the test. And conversely, for negative controls and blank samples, negative results mean that there is no *Mycoplasma*. Based on the results of 06 independent times, it shows that the *Mycoplasma* test procedure by fluorescence staining method of Vero cell indicator meets the requirements for specificity.

This technique makes the test to detect

Kỹ thuật này thực hiện giúp cho việc kiểm tra phát hiện *Mycoplasma* được chính xác, chủ động, tiết kiệm không đòi hỏi nhiều loại hóa chất, nguyên vật liệu đặc thù so với phương pháp khác, bên cạnh đó việc thao tác trong phòng thí nghiệm đối với phương pháp chỉ thị tế bào với chứng dương là hạt Morfs được cho là an toàn hơn với chủng *Mycoplasma*. Nghiên cứu đã được tiến hành đánh giá một cách khách quan hình ảnh tế bào bị nhiễm chủng *Mycoplasma* sau đó nhuộm theo hướng dẫn của bộ kit và so sánh với chứng dương nhân tạo là hạt *Mycoplasma* Morfs (*Mycoplasma* Morfs -Microscopic Optical Replicas for Fluorescence assay) được làm từ các vật liệu không có nguồn gốc sinh học, được dùng làm mẫu chứng dương do có các đặc tính tương đồng với các chủng *Mycoplasma* về kích thước, hình dạng và cường độ huỳnh quang khi được nhuộm bởi hóa chất MycoFluor và quan sát trên kính hiển vi huỳnh quang) để kiểm chứng độ đặc hiệu. Khi có kết quả nghiên cứu, đưa ra tóm tắt quy trình thực hiện như mục 3.1.4.

Quy trình kiểm tra *Mycoplasma* trong nuôi cấy tế bào bằng phương pháp chỉ thị tế bào có độ đặc hiệu, thời gian thực hiện được rút ngắn chỉ khoảng 6 ngày so với phương pháp nuôi cấy (28 ngày)[6], [2]. Hơn nữa vật chủ chính của *Mycoplasma* là tế bào sống do đó *Mycoplasma* nếu có trong mẫu thử dễ dàng nhân lên trong tế bào và cho kết quả chính xác khi nhuộm tế bào và soi kính hiển vi huỳnh quang. Các dữ liệu gần đây cho thấy rằng một số chủng *Mycoplasma* khó nuôi cấy đặc biệt là *M.hyorhinis* thì việc sử dụng phương pháp chỉ thị tế bào sẽ phù hợp hơn [4]. Khi so sánh phương pháp chỉ thị tế bào với phương pháp PCR cũng cho thấy có độ tin cậy hơn khi bắt được các chủng *Mycoplasma* sống, còn phương pháp PCR có thể cho kết quả dương tính giả khi bắt được gen đặc hiệu của *Mycoplasma* (đôi khi chỉ là *Mycoplasma* đã chết không còn khả năng ảnh hưởng đến tế bào nuôi cấy). Hơn nữa chi phí cho thực hiện thử nghiệm phát hiện *Mycoplasma* bằng phương pháp PCR tốn kém hơn và vẫn nên cân nhắc định lại bằng phương pháp nuôi cấy nếu bắt gặp mẫu thử dương tính. Việc nghiên cứu áp dụng phương pháp chỉ thị tế bào sử dụng bộ

Mycoplasma accurate, active and economical without requiring many specific chemicals and materials compared to other methods, besides the manipulation in the laboratory. Tests for cell markers with positive controls were that Morfs beads were found to be safer against *Mycoplasma* strains. The study was conducted to objectively evaluate the images of cells infected with *Mycoplasma* strain then stained according to the kit instructions and compared with the artificial positive control of *Mycoplasma* Morfs (*Mycoplasma* Morfs -Microscopic Optical Replicas for Fluorescence) assays made from non-biological materials, was used as a positive control because of similar properties to *Mycoplasma* strains in terms of size, shape and fluorescence intensity when stained with MycoFluor and fluorescence microscopy) to verify specificity. When the research results are available, give a summary of the implementation process as in Section 3.1.4.

The procedure for testing *Mycoplasma* in cell culture by cell indicator method has specificity, the execution time is shortened by only about 6 days compared with the culture method (28 days)[6], [2]. Moreover, the main host of *Mycoplasma* is living cells, so if *Mycoplasma* is present in the sample, it easily replicates in the cell and gives accurate results when staining cells and fluorescence microscopy. Recent data show that some strains of *Mycoplasma* are difficult to culture, especially *M.hyorhinis*, it is more appropriate to use cell markers [4]. When comparing the cell marker method with the PCR method, it is also shown to be more reliable when capturing live strains of *Mycoplasma*, while the PCR method can give false positive results when capturing specific *Mycoplasma* genes (sometimes just dead *Mycoplasma* no longer able to affect cultured cells). Furthermore, testing for *Mycoplasma* detection by PCR is more expensive and still needs to be confirmed by culture if a positive sample is found. The study and application of the cell indicator method using the MycoFlour kit to test *Mycoplasma* in cell lines at the Institute has specificity, cost savings, shortened implementation time, and avoids passivity in the

kít MycoFlour trong việc kiểm tra *Mycoplasma* trong các dòng tế bào tại Viện có độ đặc hiệu, tiết kiệm được chi phí, thời gian thực hiện rút ngắn, tránh bị động trong những tình huống phải làm nhiều mẫu và kiểm tra *Mycoplasma* thường xuyên các dòng tế bào nuôi cấy phục vụ kiểm định công hiệu vắc xin, sinh phẩm được chính xác là đóng góp của nghiên cứu này.

V. KẾT LUẬN

Quy trình kiểm tra *Mycoplasma* bằng phương pháp chỉ thị tế bào Vero sử dụng bộ kit Mycofluor™ tại Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế đã được tối ưu nồng độ tế bào Vero chỉ thị khi cấy vào lá kính 10 x 10⁴ TB/ml; rửa tế bào trên lá kính 2 lần bằng PBS (-)1X, nồng độ chứng dương chủng *M. orale* 10^{-3.5} và đạt yêu cầu về độ đặc hiệu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

REFERENCE

1. Armstrong SE. et al., Mariano, J.A, Lundin, D.J. 2010. The scope of *Mycoplasma* contamination within the biopharmaceutical industry. *Biologicals*. 38(2):211-3
2. Council of Europe European, European Direction for the Quality of Medicine (COE-EDQM) (2010), “2.6.7. *Mycoplasma*- indicator cell culture method”, European pharmacopoeia 7.0, pp.71-72.
3. Elke F, Han G (1996), “Elimination of *Mycoplasma* contamination in cell cultures”, *Biochemical No1*, pp.48-51.
4. FDA (2010) “Characterization and qualification of cell substrates and other biological materials used in the production of viral vaccines for infectious disease indication”, *Mycoplasma/spiroplasma*, Guidance for industry, USA, pp.29-32.
5. Helena W., (2010), “Guidance on *Mycoplasma* contamination for everyone using cultured cells for their research or production”
6. Hội đồng dược điển Việt Nam (2017), “Phụ lục 15.47. Kiểm tra *Mycoplasma* trong vắc xin sinh phẩm”, Dược điển Việt Nam V, NXB Y học, Hà Nội, tr.PL411-413.
7. Kim, B.-C., Kim, S. Y., Kwon, Y.-D., Choe, S. C., Han, D.-W., & Hwang, Y.-S. (2015). *Mycoplasma* detection and elimination are necessary for the application of stem cell from human dental apical papilla to tissue engineering and regenerative medicine.
8. Lansing M, John P, Donald A, “The *Mycoplasmas*”, *Microbiology*, chapter 23, pp.490-491.
9. Miller CJ. et al., 2003. *Mycoplasma* infection

test. Situations where multiple samples are required and regular *Mycoplasma* testing of cultured cell lines for testing efficacy *Mycoplasma* of vaccines and biological products is precisely the contribution of this study.

V. CONCLUSION

The procedure for testing *Mycoplasma* by Vero cell indicator method using the Mycofluor™ kit at National Institute for Control of Vaccines and Biologicals was optimized for the concentration of Vero indicator cells when inoculated into 10 x 10⁴ TB/ml; Wash cells on the glass leaf twice with PBS (-)1X, positive control concentration of *M. orale* strain 10^{-3.5} and meet the requirements for specificity.

significantly alters microarray gene expression profiles. *Biotechniques*. 35(4):812-4

10. Nagar, S., Smith, L. E., and Morgan, W. F. (2003). Characterization of a novel epigenetic effect of ionizing radiation: the death-inducing effect. *Cancer Res*. 63, 324–328.
11. Olarerin-George AO. and Hogenesch JB., 2015, Assessing the prevalence of mycoplasma contamination in cell culture via a survey of NCBI’s RNA-seq archive, *Nucleic Acids Research*, (5):2535-42
12. Robinson LB. et al., 1956. Contamination of human cell cultures by pleuropneumonia like organisms. *Science*. 124(3232):1147-8
13. Rottem S, et.al (2012), “Contamination of tissue cultures by *Mycoplasmas*, Licensee InTech, pp.35-58.
14. Thai, H. (2003). Angiotensin Subtype 1 Receptor (AT1) Blockade Improves Vasorelaxation in Heart Failure by Up-Regulation of Endothelial Nitric-Oxide Synthase via Activation of the AT2 Receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 307(3), 1171–1178.
15. The United States Pharmacopeial Convention (2014), “*Mycoplasma* tests”, USP37, pp.67-71.
16. WHO (1998), “General requirements for the sterility of biological substances”, WHO technical Report Series, No.872, pp.69- 73.
17. Zakharova E. et al., 2010. *Mycoplasma* suppression of THP-1 Cell TLR responses is corrected with antibiotics. *PLoS One*. 5(3): e9900
18. Nagar, S. (2003). Mechanisms of cell death associated with death-inducing factors from genomically unstable cell lines. *Mutagenesis*, 18(6), 549–560.