

VALIDATING THE PROCEDURE FOR DETECTING MYCOPLASMA IN CULTURE OF CELL LINES AT THE NATIONAL INSTITUTE OF DRUG QUALITY CONTROL USING THE MYCOALERT™ PLUS KIT

LE VAN DAT¹, NGUYEN THI LIEN^{1,✉}

¹Pharmacology Laboratory, National Institute of Drug Quality Control

✉Corresponding author: nguyenlien.pharm@gmail.com

Received February 15th, 2024

Accepted May 28th, 2024

Abstract: Validation of the MycoAlert™ PLUS kit for detecting Mycoplasma contamination in Vero 76 and L929 cell cultures was conducted at the National Institute of Drug Quality Control. The study assessed system suitability, specificity, and repeatability of the method, demonstrating its effectiveness in detecting Mycoplasma in these cell lines. Results confirmed the kit's reliability and suitability for routine monitoring of cell cultures. These findings support the integration of the MycoAlert™ PLUS kit into quality control protocols, ensuring contamination-free cell culture processes.

Keywords: Mycoplasma, MycoAlert™ PLUS kit, Vero 76 cell line, L929 cell line

THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH PHÁT HIỆN MYCOPLASMA TRONG QUÁ TRÌNH NUÔI CẤY CÁC DÒNG TẾ BÀO TẠI VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TRUNG ƯƠNG BẰNG BỘ KIT MYCOALERT™ PLUS

LÊ VĂN ĐẠT¹, NGUYỄN THỊ LIÊN^{1,✉}

¹Khoa Dược lý, Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương

✉Tác giả liên hệ: nguyenlien.pharm@gmail.com

Nhận bài ngày 15 tháng 2 năm 2024
Chấp nhận đăng ngày 28 tháng 5 năm 2024

Tóm tắt: Thẩm định việc sử dụng bộ kit MycoAlert™ PLUS để phát hiện nhiễm Mycoplasma trong tế bào nuôi cấy Vero 76 và L929 đã được tiến hành tại Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương. Các chỉ tiêu được thẩm định bao gồm độ tính hợp hệ thống, độ đặc hiệu và độ lặp lại nhằm chứng minh hiệu quả của phương pháp trong việc phát hiện Mycoplasma ở các dòng tế bào trên. Kết quả thẩm định đã xác nhận sự phù hợp và độ tin cậy của bộ kit trong việc theo dõi thường quy quá trình nuôi cấy tế bào. Từ các kết quả nghiên cứu cho thấy có thể đưa kit MycoAlert™ PLUS vào các quy trình kiểm soát chất lượng nhằm đảm bảo quá trình nuôi cấy tế bào không bị nhiễm Mycoplasma.

Từ khóa: Mycoplasma, bộ kit MycoAlert™ PLUS, Vero 76, L929

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Mycoplasma là một nhóm vi khuẩn có đặc điểm chung là không có thành tế bào. Chúng là những sinh vật nhân sơ tự sao chép nhỏ nhất ($< 0,3 \mu\text{m}$) [7]. Từ những đặc điểm trên *Mycoplasma* có thể nhiễm vào tế bào nuôi do dễ dàng lọt qua màng lọc vô khuẩn cũng như né được kháng sinh ức chế tổng hợp vách thông thường hay sử dụng trong nuôi cấy tế bào là penicillin. Nhiễm *Mycoplasma* có thể diễn tiến âm thầm trong thời gian dài mà không hề có biểu hiện gây tổn thương cho tế bào ra bên ngoài [1]. Tuy nhiên *Mycoplasma* có thể làm thay đổi đáng kể các tế bào nuôi cấy, những tế bào bị nhiễm *Mycoplasma* có thể dẫn đến những thay đổi về trao đổi chất, về miễn dịch và những đặc tính sinh học khác làm sai lệch kết quả kiểm tra độc tính, thử hoạt tính trên tế bào [6]. Một khi đã phát hiện ra nhiễm *Mycoplasma*, không có giải pháp nào hữu hiệu có thể loại trừ được chúng ra khỏi tế bào nuôi [4]. Giải pháp duy nhất là phải hủy bỏ tế bào. Vì thế với *Mycoplasma*, việc phát hiện sớm ngăn chặn triệt để các nguồn lây nhiễm là hết sức quan trọng. Để thực hiện điều đó, trước hết cần định kỳ kiểm tra các tế bào nuôi cấy để đảm bảo không nhiễm *Mycoplasma* và luôn sử dụng kỹ thuật vô trùng thích hợp trong phòng thí nghiệm.

Hiện nay có nhiều phương pháp phát hiện *Mycoplasma* như phương pháp nuôi cấy, phương pháp dùng chỉ thị tế bào, phương pháp PCR, phương pháp nhuộm huỳnh quang, ... [1,5,6]. Tuy nhiên những phương pháp trên là những phương pháp tốn kém, phức tạp, mất nhiều thời gian thực hiện và đòi hỏi điều kiện thử nghiệm đặc biệt. Gần đây, một phương pháp phát hiện *Mycoplasma* cho kết quả nhanh, dễ sử dụng, không yêu cầu điều kiện phòng thử nghiệm đặc biệt và không gây nhiễm chéo đã được giới thiệu đó là dùng sử dụng bộ kit MycoAlert™ PLUS của hãng Lonza (Mỹ). Phương pháp này dựa trên phản ứng với cơ chất của một số enzym đặc hiệu cho *Mycoplasma*. Khi *Mycoplasma* có mặt trong mẫu thử, các enzym đặc hiệu của nó xúc tác cho quá trình cho phản ứng ADP và cơ chất thành ATP. Sau đó ATP được chuyển thành tín hiệu ánh sáng nhờ enzym luciferase trong thuốc thử của bộ kit. Bằng cách dựa vào tỷ lệ tín hiệu của phản ứng quang sinh học (bioluminescent reaction) của ATP trước và sau khi thêm cơ chất giúp phát hiện sự có mặt của *Mycoplasma* [2]. Tuy nhiên để có thể áp dụng được bộ kit này thì việc thẩm định quy trình của bộ kit là yêu cầu tiên quyết.

Hiện nay, Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương đang nuôi cấy và bảo quản dòng tế bào Vero 76 và L929. Vì vậy, việc kiểm soát *Mycoplasma* trong nuôi cấy 2 dòng tế bào này dùng trong các thử nghiệm đánh giá chất lượng thuốc, vật tư y tế hoặc đánh giá chất lượng tế bào trước khi

đưa vào bảo quản trong ngân hàng tế bào là yêu cầu cần thiết để đảm bảo tính chính xác trong kiểm tra chất lượng thuốc và trang thiết bị y tế [5]. Chính vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành thẩm định quy trình phát hiện *Mycoplasma* trong quá trình nuôi cấy tế bào tại Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương bằng bộ kit MycoAlert™ PLUS.

2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết bị, hóa chất, chất chuẩn

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Đã được hiệu chuẩn theo ISO/IEC 17025 và GLP.

STT	Tên thiết bị, dụng cụ	Nơi sản xuất
1	Buồng thổi khí sạch Sanyo MCV-B131F	Sanyo, Nhật Bản
2	Máy đọc khay vi thể đa chức năng VARIOSKAN LUX	Thermo, Mỹ
3	Máy ly tâm để bàn Eppendorf 5702	Eppendorf, Đức
4	Micropipet Eppendorf 100-1000 μl	Eppendorf, Đức
5	Micropipet Eppendorf 10-100 μl	Eppendorf, Đức
6	Khay 96 giếng đọc luminescence	Thermo, Mỹ

2.1.2. Hóa chất, dung môi, chất chuẩn

STT	Tên dung môi/hóa chất	Nơi sản xuất
1	Thuốc thử (MycoAlert™ PLUS Reagent)	Lonza, Mỹ
2	Cơ chất (MycoAlert™ PLUS Substrate)	Lonza, Mỹ
3	Đệm (MycoAlert™ Assay Buffer)	Lonza, Mỹ
4	Đối chứng dương (MycoAlert™ Assay Control)	Lonza, Mỹ
5	Môi trường MEM	Gibco, Mỹ
6	FBS	Gibco, Mỹ
7	Dung dịch Trypsin/EDTA	Gibco, Mỹ

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

* Dòng tế bào

- Tế bào Vero 76 nguồn gốc Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế (NICB), số lô NICB/MCB01-18.

- Tế bào L929 nguồn gốc ngân hàng tế bào JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank), Nhật Bản, số lô 08042016.

* Chủng *Mycoplasma*:

- *M. orale* nguồn gốc Trung tâm Nghiên cứu Sản xuất Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (Polyvac), số lô 0121-P5

- *M. pneumonia* nguồn gốc Trung tâm Nghiên cứu Sản xuất Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (Polyvac), số lô 0121-P3

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Chuẩn bị thuốc thử

- Hoàn nguyên thuốc thử (MycoAlert™ PLUS Reagent) và cơ chất (MycoAlert™ PLUS Substrate) bằng 1,2 ml đệm (MycoAlert™ Assay Buffer) [2].

- Trước khi hoàn nguyên để về nhiệt độ phòng trong 15 phút, sau khi hoàn nguyên lắc nhẹ để yên ở nhiệt độ phòng 15 phút.

2.2.2.2. Phương pháp xử lý mẫu

Chuẩn bị mẫu đối chứng âm: Sử dụng dung dịch đệm (MycoAlert™ PLUS Assay Buffer) trong bộ kit làm đối chứng âm.

Chuẩn bị mẫu đối chứng dương:

- Hoàn nguyên đối chứng dương (MycoAlert™ Assay Control) bằng dung dịch đệm (MycoAlert™ Assay Buffer). Để cân bằng nhiệt độ phòng 15 min [3] thu được mẫu Đối chứng dương 1 (ĐC 1).

- Chuẩn bị dãy nồng độ đối chứng dương theo Bảng 1:

Bảng 1. Chuẩn bị dãy đối chứng dương

Tên mẫu	Đối chứng dương	Đệm (MycoAlert™ Assay Buffer) (μl)
Đối chứng dương 1 (ĐC 1)	300 μl ĐC1	-
Đối chứng dương 2 (ĐC 1:10)	36 μl ĐC 1	324
Đối chứng dương 3 (ĐC 1:100)	36 ul ĐC 1:10	324
Đối chứng dương 4 (ĐC 1:1000)	36 uL ĐC 1:100	324
Đối chứng dương 5 (ĐC 1:10 000)	36 uL ĐC 1:1000	324

Chuẩn bị mẫu thử

- **Mẫu thử tế bào Vero 76:** Tế bào Vero 76 được rửa đông từ nitơ lỏng nuôi và cấy chuyển 3 lần trong môi trường MEM bổ sung 10 % FBS, không chứa kháng sinh. Ở lần nuôi cấy cuối cùng hút 1 ml dịch nổi (nồng độ $1,0 \times 10^4$ tế bào/ml), ly tâm 1500 vòng/phút thu dịch nổi.

- **Mẫu thử tế bào L929:** Tế bào L929 được rửa đông từ nitơ lỏng nuôi và cấy chuyển 3 lần trong môi trường MEM bổ sung 10 % FBS, không chứa kháng sinh. Ở lần nuôi cấy cuối cùng hút 1 ml dịch nổi (nồng độ $1,0 \times 10^4$ tế bào/ml), ly tâm 1500 vòng/phút thu dịch nổi.

- **Mẫu thử chứa tế bào Vero 76 và *Mycoplasma*:** Hút 10 μl hỗn dịch *Mycoplasma* (*M. pneumonia* hoặc *M. orale*) vào bình nuôi cấy chứa 10 ml hỗn dịch tế bào Vero 76 nồng độ $1,0 \times 10^4$ tế bào/ml. Nuôi và cấy chuyển 3 lần trong môi trường MEM bổ sung 10 % FBS, không chứa kháng sinh. Ở lần nuôi cấy cuối cùng hút 1 ml dịch nổi, ly tâm 1500 vòng/phút thu dịch nổi.

- **Mẫu thử chứa tế bào L929 và *Mycoplasma*:** Hút 10 μl hỗn dịch *Mycoplasma* (*M. pneumonia* hoặc *M. orale*) vào bình nuôi cấy chứa 10 ml hỗn dịch tế bào L929 nồng độ $1,2 \times 10^4$ tế bào/ml. Nuôi và cấy chuyển 3 lần trong môi trường MEM bổ sung 10 % FBS, không chứa kháng sinh. Ở lần nuôi cấy cuối cùng hút 1 ml dịch nổi, ly tâm 1500 vòng/phút thu dịch nổi.

2.2.2.3. Quy trình phân tích

- Hút 90 μl mẫu thử, mẫu đối chứng dương, mẫu đối chứng âm vào từng giếng của đĩa 96 giếng.

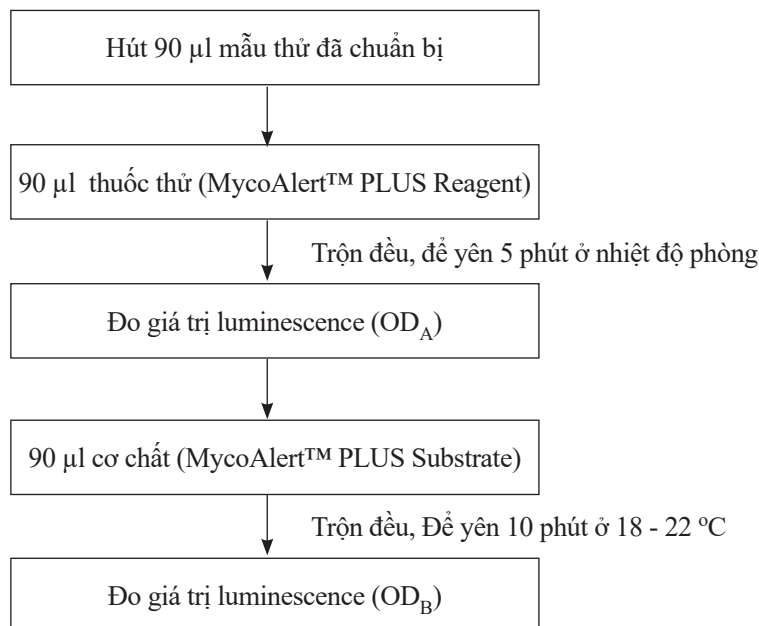
- Thêm 90 μl thuốc thử (MycoAlert™ PLUS Reagent) vào các giếng. Trộn đều, để yên 15 phút ở nhiệt độ phòng.

- Đặt đĩa 96 giếng vào máy đọc đĩa đa năng, đọc kết quả (chương trình đo luminescence, kiểu đo: trực tiếp, hướng từ trên xuống, thời gian đọc: 1 giây). Thu được giá trị OD_A .

- Lấy đĩa ra khỏi máy thêm 90 μl cơ chất (MycoAlert™ PLUS Substrate) vào các giếng, trộn đều. Để yên 10 phút. Tiến hành ở nhiệt độ từ 18 - 22 °C.

- Đặt đĩa 96 giếng vào máy đọc đĩa đa năng, đọc kết quả (chương trình đo luminescence kiểu đo: trực tiếp, hướng từ trên xuống, thời gian đọc: 1 giây). Thu được giá trị OD_B.

Các bước tiến hành theo sơ đồ sau:



2.2.2.4. Tính kết quả

Tính tỷ số B/A theo công thức [2]:

$$\text{Tỷ số B/A} = \frac{\text{OD}_B}{\text{OD}_A}$$

Trong đó:

OD_A: Giá trị đo luminescence trước khi thêm cơ chất

OD_B: Giá trị đo luminescence sau khi thêm cơ chất

2.2.2.5. Đánh giá kết quả

* Phép thử có hiệu lực khi:

- Mẫu đối chứng dương: tỷ số B/A > 1,2.

- Mẫu đối chứng âm: tỷ số B/A < 1,0.

* Nhận định kết quả

Căn cứ vào tỷ số B/A của mẫu thử để nhận định theo Bảng 2.

Bảng 2. Nhận định kết quả theo tỷ số B/A của mẫu thử

STT	Tỷ số B/A của mẫu thử	Nhận định kết quả
1	< 1,0	Mẫu thử không nhiễm <i>Mycoplasma</i>
2	1,0 – 1,2	Nghi ngờ
3	> 1,2	Mẫu thử nhiễm <i>Mycoplasma</i>

Lưu ý: Trong trường hợp nghi ngờ có thể tiến hành 1 trong 2 cách sau:

a. Cách ly tế bào và tiến lại y nguyên quy trình phân tích sau 24 - 48h.

b. Lặp lại ngay quy trình phân tích với các thay đổi như sau: Sử dụng mẫu thử pha loãng 10 lần với đệm (MycoAlert™ Assay Buffer), thời gian ủ thuốc thử (MycoAlert™ PLUS Reagent) tăng từ 5 min lên 20 min và thời gian ủ cơ chất (MycoAlert™ PLUS Substrate) từ 10 min lên 30 min.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đánh giá độ thích hợp của hệ thống và giới hạn phát hiện

- Sử dụng các mẫu đối chứng dương đã được chuẩn bị theo Bảng 1, đối chứng âm là dung dịch đệm (MycoAlert™

PLUS Assay Buffer).

- Tiến hành phân tích các mẫu đối chứng dương và đối chứng âm theo qui trình phân tích mục 2.2.2.3. Kết quả đánh giá độ thích hợp của hệ thống và giới hạn phát hiện của phương pháp được thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ thích hợp của hệ thống và giới hạn phát hiện

Mẫu thử	Tỷ số B/A				Yêu cầu Tỷ số B/A:
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB	
Đối chứng âm	0,18	0,17	0,12	0,16	Đối chứng âm < 1,0. Đối chứng dương > 1,0
Đối chứng dương 1	474,88	457,01	444,32	458,74	
Đối chứng dương 2	81,13	113,18	93,96	96,09	
Đối chứng dương 3	10,09	10,21	10,86	10,39	
Đối chứng dương 4	1,58	1,44	1,55	1,52	
Đối chứng dương 5	0,19	0,33	0,22	0,25	

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy:

- Hệ thống thử nghiệm (bao gồm các thiết bị, dụng cụ, hóa chất, dung môi) của Khoa Dược lý, Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương phù hợp để thử nghiệm phát hiện *Mycoplasma* theo phương pháp đo luminescence trên bộ kit MycoAlert™ PLUS do hãng Lonza sản xuất.

- Giới hạn phát hiện của phương pháp tại nồng độ mẫu đối chứng dương 4 (ĐC 1:1000) phù hợp với yêu cầu của bộ kit MycoAlert™ PLUS.

3.2. Độ đặc hiệu

- *Đối chứng âm*: Dung dịch đệm (MycoAlert™ PLUS Assay Buffer).

- *Đối chứng dương*: Mẫu đối chứng dương 1 (ĐC 1)

- *Mẫu thử*: Mẫu thử tế bào Vero 76, mẫu thử tế bào L929, mẫu thử chứa tế bào Vero 76 và *Mycoplasma* và mẫu thử chứa tế bào L929 và *Mycoplasma*

Tiến hành phân tích các mẫu đối chứng dương, đối chứng âm và mẫu thử theo qui trình phân tích mục 2.2.2.3. Kết quả đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp được thể hiện ở Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả độ đặc hiệu

Mẫu thử	Tỷ số B/A	Kết luận
Đối chứng âm	0,16	(-)
Đối chứng dương	458,74	(+)
Mẫu thử tế bào Vero 76	0,89	(-)
Mẫu thử tế bào L929	0,16	(-)
Mẫu thử tế bào Vero 76 và <i>M. pneumonia</i>	23,51	(+)
Mẫu thử tế bào Vero 76 và <i>M. orale</i>	48,48	(+)
Mẫu thử tế bào L929 và <i>M. pneumonia</i>	4,79	(+)
Mẫu thử tế bào L929 và <i>M. orale</i>	14,00	(+)

Kết quả cho thấy mẫu đối chứng âm, mẫu thử tế bào Vero 76 và L929 không nhiễm *Mycoplasma* (tỷ số B/A < 1,0), mẫu thử chứa tế bào (tế bào Vero 76 hoặc L929) và *Mycoplasma* (*M. pneumonia* hoặc *M. orale*) đều phát hiện nhiễm *Mycoplasma* (tỷ số B/A > 1,2). Như vậy, bộ kit MycoAlert™ PLUS dùng để phát hiện *Mycoplasma* đạt yêu cầu về độ đặc hiệu khi áp dụng tại Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương.

3.3. Độ lặp lại

Mẫu thử: Sử dụng mẫu thử tế bào Vero 76 và tế bào L929. Mỗi mẫu thử lặp lại 6 lần. Kết quả đánh giá độ lặp lại thể hiện ở Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả độ lặp lại

STT	Mẫu Thử	Tỷ số B/A	
		Tế bào Vero 76	Tế bào L929
1	Thử 1	0,95	0,18
2	Thử 2	0,96	0,17
3	Thử 3	0,89	0,14
4	Thử 4	0,89	0,16
5	Thử 5	0,81	0,15
6	Thử 6	0,86	0,17
TB		0,89	0,16
RSD (%)		6,59	9,10

Từ kết quả trên cho thấy phương pháp xác định *Mycoplasma* bằng bộ kit MycoAlert™ PLUS trên tế bào Vero 76 và L929 đạt yêu cầu về độ lặp lại, phù hợp với phép thử sinh học.

4. BÀN LUẬN

Các phương pháp phát hiện *Mycoplasma* truyền thống như phương pháp nuôi cấy và dùng chỉ thị tế bào là các phương pháp tiêu chuẩn được nêu trong các dược điển [1,5,6]. Tuy nhiên cả hai phương pháp đều yêu cầu kỹ thuật vô khuẩn, đòi hỏi cao về điều kiện cơ sở vật chất, sử dụng nhiều trang thiết bị, dụng cụ, nhân sự phải được đào tạo và đánh giá, tiến hành qua nhiều bước phức tạp, tốn rất nhiều thời gian và công sức, lượng mẫu sử dụng lớn.

Phương pháp khuếch đại acid nucleic (NAT) và phương pháp dựa trên hoạt động của enzym là các phương pháp được nhắc tới trong dược điển như là phương pháp tham khảo có thể áp dụng để kiểm tra *Mycoplasma* trong Vắc xin/sinh phẩm [1,5,6]. Phương pháp NAT là phương pháp có độ nhạy rất cao, thời gian phân tích nhanh, lượng mẫu sử dụng ít. Tuy nhiên phương pháp này yêu cầu trang thiết bị hiện đại, hóa chất đắt tiền, có nguy cơ âm tính giả hoặc dương tính giả khi thiết kế các cặp mồi chưa tối ưu. Nhược điểm lớn nhất của phương pháp NAT là không phân biệt được *Mycoplasma* sống và chết (đều cho kết quả dương tính). Bộ kit MycoAlert™ PLUS của Lonza dựa trên hoạt động của enzym đặc trưng để phát hiện *Mycoplasma* sống trong nuôi cấy tế bào bằng cách sử dụng máy đọc hóa phát quang có ưu điểm đơn giản, dễ thực hiện, cho kết quả nhanh, có độ tin cậy cao, phân biệt được *Mycoplasma* sống và chết, lượng mẫu sử dụng ít. Mặc dù nhược điểm của bộ kit là giá thành cao hơn so với các phương pháp truyền thống khác nhưng với các ưu điểm đã nêu bộ kit phù hợp với việc xác định *Mycoplasma* trong lượng mẫu nhỏ như việc đánh giá khi tiếp nhận, đánh giá định kỳ tế bào nuôi cấy của phòng thí nghiệm. Do đó, việc sử dụng bộ kit MycoAlert™ PLUS là phù hợp để xác định *Mycoplasma* trong quá trình nuôi cấy tế bào tại khoa Dược lý, Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương.

5. KẾT LUẬN

Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp xác định *Mycoplasma* bằng bộ kit MycoAlert™ PLUS đạt yêu cầu về độ thích hợp của hệ thống, độ đặc hiệu và độ lặp lại, do đó phù hợp để xác định sự có mặt của *Mycoplasma* trong quá trình nuôi cấy 2 dòng tế bào tại Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương là tế bào Vero 76 và tế bào L929.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam*, Lần tái bản thứ năm, Nhà xuất bản Y học. Tr. PL 394- PL 395.
2. Lonza (2012), *MycoAlert™ PLUS Mycoplasma Detection Kit*, Instructions for Use.
3. Lonza (2012), *MycoAlert™ Assay Control Set*, Instructions for Use.
4. Rottem S., Nechama S. K., et al. (2012), *Contamination of tissue cultures by Mycoplasmas*, Licensee InTech, pp.35-58
5. The British Pharmacopoeial Convention (2024), *British Pharmacopoeial 2024*, Appendix XVIB, Test for Absence of Mycoplasmas.
6. The United States Pharmacopoeial convention (2025), *United States Pharmacopoeial 2025*, General Chapters: (63) Mycoplasma Tests.
7. <https://www.thermofisher.com/blog/cellculture/mycoplasma-tiny-bacteria-big-risk-2/>