



2025. Номер 11, С 57 – 65

Отримано: 09.04.2025 Прийнято: 24.04.2025 Опубліковано: 29.05.2025

DOI: 10.31890/vttp.2025.11.05

UDC 619:616-98:578.828

INFLUENCE OF MYCOPLASMA CONTAMINATION ON THE ANTIGEN-PRODUCING ABILITY OF FLK-BLV CELL CULTURES

Ye.V. Vashchuk¹, V.V. Kosheliev¹, P.S. Yurko¹, O.V. Ladogubets², K.A. Duchenko²

¹National Scientific Center “Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine”,
Kharkiv, Ukraine

²State Biotechnology University, Kharkiv, Ukraine

E-mail: yevgeniavashik@gmail.com

Annotation. The World Organization for Animal Health (WOAH) has classified enzootic bovine leukemia (EBL) as a disease that significantly affects international trade. The zoonotic potential of BLV is an open question for science today. In Ukraine, for this purpose, RID is mainly used. One of the main problems in the field of cell cultures is mycoplasma infection. The aim of the research was to study the influence of mycoplasma contamination on the antigen-producing ability of FLK-BLV cell cultures. PCR method was used to indicate mycoplasma contamination of FLK-BLV cell cultures. For decontamination, the antibiotic tiamulin was used at a concentration of 30µg/mL in the culture medium, the treatment duration was 21 days. Contamination of FLK-BLV cell cultures with mycoplasma contributed to the inhibition of cell proliferation and a decrease in monolayer formation by 30% for contaminated cultures and by 20% for decontaminated cultures. Decontamination from mycoplasma improves the growth properties of FLK-BLV cell cultures. Mitotic activity with mycoplasma contamination decreased on average by 34.5% compared to primary pure cultures. After decontamination with the antibiotic tiamulin, the mitotic activity of cell cultures increased by 17.25% compared to the contaminated culture, but at the same time was lower by 24.25% compared to primary pure cultures. Analysis of the antigen-producing biological activity of sublines of cells contaminated with mycoplasma, decontaminated from mycoplasma and primary pure cultures indicates an increase in antigen-producing properties and antigen titer due to decontamination of cell cultures. The absence of a working antigen titer (at +++) from the contaminated FLK-BLV-U subline was established in comparison with the working antigen titer of the titer in the native antigen solution from the decontaminated FLK-BLV-U culture and titers from 1:0.5 to 1:1 from the initially pure uncontaminated cell cultures FLK-BLV-P 1, FLK-BLV-P 2.

Key words: leukemia, diagnostic antigen, RID, serological diagnostics, antibiotic, tiamulin, mycoplasma decontamination of cell cultures

ВПЛИВ МІКОПЛАЗМЕННОЇ КОНТАМІНАЦІЇ НА АНТИГЕНПРОДУКУЮЧУ ЗДАТНІСТЬ ПЕРЕЩЕПЛЮВАНИХ КУЛЬТУР КЛІТИН FLK-BLV

Є.В. Вашик¹, В.В. Кошелєв¹, П.С. Юрко¹, О.В. Ладогубець², К.А. Дученко²

¹Національний науковий центр «Інститут експериментальної та клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, Україна,

²Державний біотехнологічний університет, м. Харків, Україна

E-mail: yevgeniavashik@gmail.com

Анотація. Всесвітня організація охорони здоров'я тварин (WOAH) класифікувала ензоотичний лейкоз великої рогатої худоби (EBL) як хворобу, яка значно впливає на міжнародну торгівлю. Зоонозний потенціал BLV є відкритим питанням для науки сьогодні. Тому моніторингові серологічні дослідження на лейкоз ВРХ є вкрай важливими; в Україні для цього переважно застосовується РІД. Однією з головних проблем у галузі клітинних культур є їх інфікування мікоплазмою. Метою досліджень було вивчення впливу мікоплазменної контамінації на антигенпродукуючу здатність перещеплюваних культур клітин FLK-BLV. Для індикації мікоплазменної контамінації перещеплюваних культур клітин FLK-BLV був використаний метод ПІР. Для деконтамінації застосовували антибіотик тіамулін в концентрації 30 µg/mL у середовищі культури, тривалість обробки 21 день. Контамінація культури клітин FLK-BLV мікоплазмою сприяла пригнічуванню проліферації клітин та зниженню утворення моношару на 30% для контамінованих культур та на 20 % для деконтамінованої культури. Звільнення від мікоплазми покращує ростові властивості культур клітин FLK-BLV. Мітотична активність за мікоплазменної контамінації знижувалась в середньому на 34,5% порівняно до первинно чистих культур. За умов деконтамінації антибіотком тіамулін мітотична активність зростала на 17,25 % у порівнянні до контамінованої культури, але водночас була нижчою на 24,25% порівняно до первинно чистих культур. Аналіз антигенпродукуючої біологічної активності субліній клітин, контамінованих мікоплазмою, деконтамінованих від мікоплазми та первинно чистих культур свідчить про підвищення антигенпродукуючих властивостей та титру антигену внаслідок деконтамінації культур клітин. Встановлено відсутність робочого титру антигену (на ++++) від контамінованої сублінії FLK-BLV-У у порівнянні до робочого титру антигену титру в нативному розчині антигену від деконтамінованої культури FLK-BLV-У та титрів від 1:0,5 до 1:1 від первинно чистих неконтамінованих культур клітин FLK-BLV-П 1, FLK-BLV-П 2.

Ключові слова: лейкоз, діагностичний антиген, РІД, серологічна діагностика, антибіотик, тіамулін, мікоплазменна деконтамінація культур клітин

Вступ. *Актуальність теми.* Вірус лейкозу великої рогатої худоби (BLV) є ретровірусом, який, як відомо, викликає ензоотичний лейкоз великої рогатої худоби (EBL). EBL було успішно ліквідовано в більшості європейських країн. Однак нещодавні дослідження показали збільшення рівня інфікування в кількох країнах, включаючи Аргентину, Бразилію, Канаду, Японію та США. В Україні ситуація з лейкозом ВРХ теж є напруженою. У США, де рівень інфікування BLV перевищує 40 %, щорічні втрати через зниження виробництва молока перевищили 500 мільйонів доларів США. Крім того, деякі країни та регіони запровадили суворі правила імпорту та експорту тварин, інфікованих BLV, що призвело до різних непрямих економічних втрат (Lv et al., 2024). У результаті Всесвітня організація охорони здоров'я тварин (WOAH) класифікувала ензоотичний лейкоз великої рогатої худоби (EBL) як хворобу, яка значно впливає на міжнародну торгівлю. Тому питання діагностичних моніторингових досліджень є актуальними.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Зоонозний потенціал BLV вже давно обговорюється, але розуміння біології ретровірусу, розроблене для епідемії СНІДу/ВІЛ, призвело до недавніх відкриттів щодо ретровірусу BLV. Повідомлялося, що приблизно 70 % людей мають антитіла проти BLV, а 25 % мають виявлений провірус BLV у крові (Bartlett et al., 2020). Очевидно, що для визначення всіх можливих наслідків впливу BLV на здоров'я людини потрібна додаткова робота. Але ці факти підкреслюють необхідність своєчасного моніторингу в стадах ВРХ щодо лейкозу та оздоровлення стад.

На сьогодні дослідниками у всьому світі розроблено різні методи виявлення BLV, які можна розділити на два типи: серологічні тести на основі антитіл BLV і тести полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) на основі провірусної ДНК BLV. Серологічні тести зазвичай ідентифікують антитіла проти капсидного білка p24, кодованого геном gag і мембранного білка gp51, кодованого геном env (Kuczewski et al., 2018; Bai et al., 2019; Lv et al., 2024). Загальні серологічні методи дослідження включають імунодифузію в агаровому гелі (реакція імунодифузії в гелі, РІД, Agar Gel Immunodiffusion, AGID), аналіз пасивної гемаглютинації (Passive Hemagglutination, ПНА), імуноферментний аналіз (ELISA) і радіоімунологічний аналіз (RIA) (Buzala & Dereń, 2003; Heinecke et al., 2017). Ці методи придатні для виявлення антитіл у сироватці ВРХ, молоці та супернатантах BLV-інфікованих культур клітин. Відповідно до WОАН, AGID та ELISA є рекомендованими тестами для серологічної діагностики інфекції, викликані вірусом лейкозу великої рогатої худоби (BLV) (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. World Organisation for Animal Health; Paris, France: 2018). В Україні по причині обмеження в фінансуванні використовується для масових досліджень РІД як більш дешевий метод діагностики порівняно до ІФА.

Для виробництва лейкозного антигену застосовуються культури клітин FLK-BLV, які продукують вірус лейкозу. Однією з головних проблем у галузі клітинних культур є інфікування їх мікоплазмою, яка була відома з початку технології культивування культур клітин. Було підраховано, що від 5 до 35 % клітинних культур заражені мікоплазмою. Мікоплазми – це найменші прокаріотичні організми, які не мають клітинної стінки, що робить їх стійкими до багатьох антибіотиків і дозволяє їм легко проникати в клітинні культури. Їх присутність може змінювати метаболізм клітин, впливати на експресію генів та модифікувати антигенний профіль, що, в свою чергу, знижує якість та специфічність діагностичних антигенів, отриманих з таких культур.

Мета роботи. Метою досліджень було вивчення впливу мікоплазменної контамінації на антигенпродукуючу здатність перещеплених культур клітин FLK-BLV.

Завдання дослідження:

1. Провести порівняльний аналіз мітотичної активності та динаміки формування моношару контамінованих, деконтамінованих («пролікованих») та первинно вільних від контамінації *Mycoplasma spp* культур клітин FLK-BLV;
2. Вивчити активність антигену, отриманого від контамінованих, деконтамінованих («пролікованих») та первинно вільних від контамінації *Mycoplasma spp* культур клітин FLK-BLV.

Матеріал і методи дослідження. Дослідження були проведені в лабораторії вірусології та лабораторії молекулярної діагностики ННЦІЕКВМ (м. Харків). Для індикації мікоплазменної контамінації перещеплених культур клітин FLK-BLV був використаний ПЛР метод.

Деконтамінацію від мікоплазм проводили методом використання антибіотиків, а саме тіаmulін в концентрації 30 µg/mL у середовищі культури, тривалість обробки: 21 день, із регулярною заміною середовища кожні 2–3 дні. Деконтамінацію ліній культур клітин проводили в момент пересіву культур клітин або в період формування моношару, шляхом внесення безпосередньо у культуральне середовище розчину антибіотику тіаmulін. Проводили 6 пасажів до стабілізації культурально-морфологічних властивостей культур клітин, після чого проводили клонування в культуральних планшетах. Знімали культури

клітин зі культурального посуду із застосуванням 0,02% розчину Версену з подальшим обліком збережених клітин та послідовним розведенням клітин до концентрації $5,0 \times 10^4 - 2,5 \times 10^4 - 5,0 \times 10^3$ клітин/см³. Далі виконували висів клітин за низької (клоногенної) щільності у 24 лункові планшети та культивували у CO²-інкубаторі за температури 37 °С терміном від доби до тижня. Інкубування планшетів з клітинами проводили до моменту утворення ними колоній шляхом щоденного спостереження під контролем світлової мікроскопії.

Проводили порівняння динаміки формування на 2 добу моношару клітинними культурами в розведенні 1:2 та мітотичної активності протягом 4 діб культур, контамінованих мікоплазмою, звільнених (деконтамінованих) від мікоплазми та здорових (таких, які не були контаміновані мікоплазмою). Мітотичну активність визначали шляхом встановлення індексу мітозу як відсоток клітин, що зазнають мітозу, у даній популяції клітин. Для цього кількість клітин у стадії мітозу (профаза, метафаза, анафаза, телофаза) ділили на загальну кількість клітин та виражали у відсотках (множили на 100).

Проводили напрацювання біомаси клітин культур FLK – BLV шляхом її багаторазових послідовних пасажів (до 20). Зі збірної після пасажів культуральної рідини здійснювали очистку та концентрування вірусу лейкозу на ультрафільтраційних модулях з порожнистими волокнами. Сконцентрований антиген піддавали ресуспендуванню у фосфатно-сольовому фізіологічному розчині з рН 7,0-7,2. Визначення активності антигену проводили за серологічним методом граничних розведень в реакції імунодифузії (РІД) з використанням контрольної позитивної діагностичної сироватки з «Набору компонентів сухих для серологічної діагностики лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії (РІД)» за ТУУ 24.4. – 00497087-647-2002. Позитивним титром антигену вважали розведення, за якого в РІД виявлено чітку лінійну преципітацію з позитивною контрольною сироваткою на два ++. Терміном «робочий титр антигену» позначали таке розведення антигену, за якого позитивна реакція з позитивною сироваткою була на ++++. Постановку реакції і облік результатів проводили згідно «Листівки-вкладки до набору компонентів для серологічної діагностики лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії».

Результати досліджень та їх обговорення. За результатами випробувань встановлено, що лінії культур клітин FLK-BLV-П 1, FLK-BLV-П 2 не містили генетичного матеріалу *Mycoplasma spp.* та BVDV, натомість містили генетичний матеріал вірусу лейкозу ВРХ (*Bovine leukemia virus*). Щодо результатів дослідження перещеплюваної лінії клітин FLK-BLV-У, визначено, що за наявності генетичного матеріалу вірусу лейкозу ВРХ (BLV) встановлено також і контамінацію означеної культури клітин *Mycoplasma spp.* Контамінації вірусом діареї BVDV у культурі клітин FLK-BLV-У не було виявлено.

Вивчення динаміки формування моношару клітинними культурами. Порівняльні дослідження стосовно впливу мікоплазменної контамінації та деконтамінації перещеплюваних культур клітин FLK-BLV на проліферацію субліній перещеплюваних культур показали повне формування моношару на середовищах виробництва ДП «Ветеринарна медицина» на другу добу росту у чистих культур (FLK-BLV-П 1, FLK-BLV-П 2) та 70% формування моношару культури, контамінованої мікоплазмою FLK-BLV-У, а також 80% формування моношару культури, деконтамінованої від мікоплазми FLK-BLV-У.

Перещеплювані вільні від мікоплазми культури FLK-BLV-П 1, FLK-BLV-П 2 показали 100% формування моношару на другу добу росту (рис. 1).

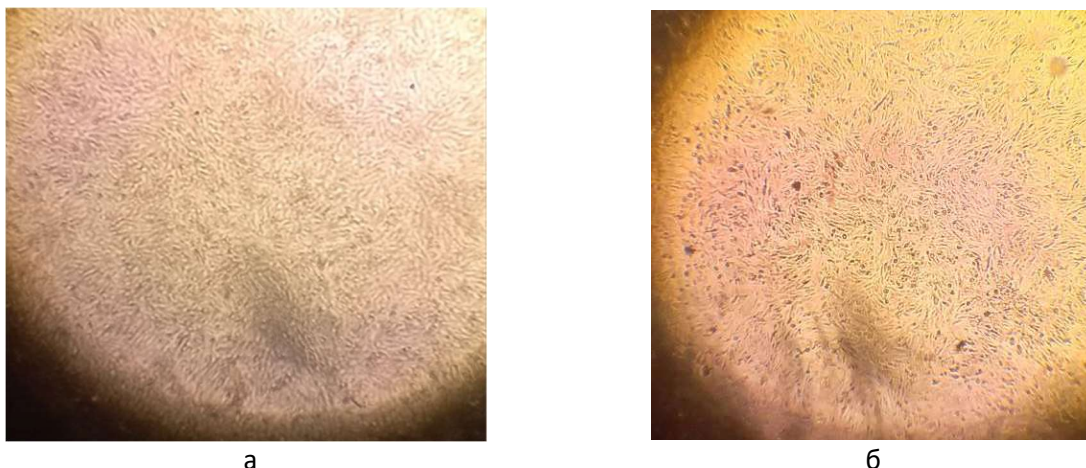


Рисунок 1. Сформований моношар перещеплюваної культури клітин:
а – сублінія FLK-BLV-П 1, вільна від контамінації мікоплазмою;
б – сублінія FLK-BLV-У, контамінована мікоплазмою.

Перещеплювана культура клітин, контамінована мікоплазмою FLK-BLV-У через 48 год росту сформувала 50 % моношару, а через 72 год культивування – 70 % моношару. Це свідчить про те, що контамінація культури клітин мікоплазмою сприяла пригніченню проліферації клітин та зниженню утворення моношару на 30 % для контамінованих культур та на 20 % для культур, які було «проліковано» від мікоплазменної контамінації.

Мітотична активність контамінованих, деконтамінованих («пролікованих») та первинно вільних від контамінації Mycoplasma spp субліній культур клітин FLK-BLV.

Під час визначення клітинної проліферації контамінованих, деконтамінованих («пролікованих») та первинно вільних від контамінації *Mycoplasma spp* субліній культур клітин FLK-BLV було встановлено, що мітотична активність культур клітин за умов контамінації мікоплазмою знижувалася на 22 % через 24 год, на 29 % через 48 год, на 48 % через 72 год та на 39 % через 96 год порівняно до первинно чистих культур.

Для деконтамінованої культури клітин було характерним, що здатність до проліферації почала відновлюватися, але була нижчою у порівнянні із первинно чистими культурами. Так, мітотична активність після курсової обробки антибіотиком тіамулін підвищилася на 15 % протягом 24 год, на 12 % протягом 48 год, на 33 % 72 год та на 9 % протягом 96 год у порівнянні до контамінованої культури (рис. 2).

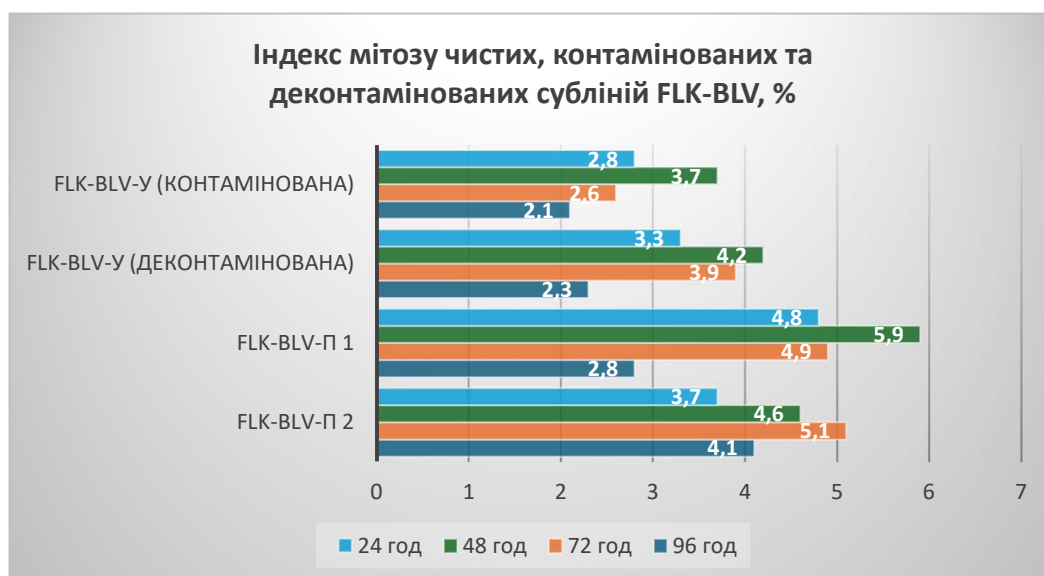


Рис. 2. Індекс мітозу чистих, контамінованих та деконтамінованих субліній FLK-BLV, %

Індекс мітозу у деконтамінованої культури був нижчим на 22 % через 24 год, на 20 % через 48 год, на 22 % через 72 год та на 33 % через 96 год порівняно до первинно чистих культур.

Таким чином, мітотична активність за мікоплазменної контамінації знижувалась в середньому на 34,5 % порівняно до первинно чистих культур. За умов деконтамінації антибіотком тіамулін мітотична активність зростала на 17,25 % у порівнянні до контамінованої культури, але водночас була нижчою на 24,25% порівняно до первинно чистих культур.

Антигенпродуруючі властивості контамінованих, деконтамінованих («пролікованих») та первинно вільних від контамінації Mycoplasma spp субліній культур клітин FLK-BLV. Аналіз антигенпродуруючої здатності субліній культур клітин FLK-BLV, контамінованих мікоплазмою, деконтамінованих від мікоплазми та первинно здорових свідчить, що сублінія FLK-BLV-У (контамінована) продукувала антиген зі зниженою активністю. Робочого титру (++++) не було встановлено, було зареєстровано позитивний титр 1:1,5 ++. Після обробки антибіотиком та звільнення від мікоплазми титр продукованого лейкозного антигену підвищився: робочий титр антигену для діагностики лейкозу у РІД в FLK-BLV-У (деконтамінована) був встановлений в нативному розчині (рис. 3).

Результати, що відображено на Рис. 1 свідчать, що робочий титр лейкозного антигену на ++++ у реакції імунодифузії (РІД) від первинно чистої культури FLK-BLV-П 2 було встановлено в розчинах від нативного до розведення 1:0,5. Крайні антигенпродуруючі властивості проявила первинно чиста сублінія клітин FLK-BLV- П 1: робочий титр лейкозного антигену на ++++ проявлявся у розчинах від нативного до розведення 1:1.

Таким чином, контамінація мікоплазмою знижувала антигенпродуруючі властивості культур FLK-BLV. Після деконтамінації робочий титр підвищився у порівнянні до періоду обробки антибіотиком, але повністю не відновився.

Обговорення. Нами проведено дослідження мітотичної активності та динаміки формування моношару та антигенпродуруючих властивостей первинно чистих, контамінованих та деконтамінованих культур клітин FLK-BLV. В доступних джерелах наукових баз даних *PubMed, Scopus, Web of Science* повідомлень саме впливу мікоплазменної контамінації на біологію клітин FLK-BLV та на здатність продукції лейкозного антигену обмежено.

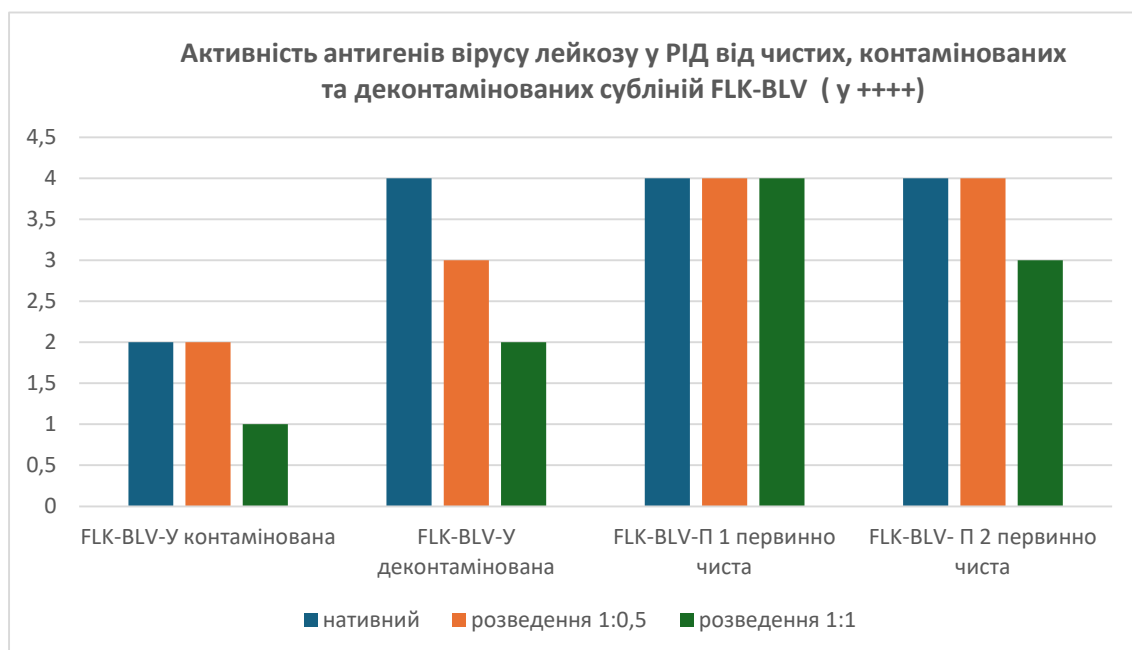


Рис. 3. Активність антигенів вірусу лейкозу у РІД від чистих, контамінованих та деконтамінованих субліній FLK-BLV

Забруднення клітинних культур мікоплазмою вперше було описано 50 років тому, стверджується, що приблизно 5–35 % сучасних клітинних культур є забрудненими. (Young et al., 2010; Carrillo-Ávila et al., 2023). Але, нажаль, проблема контамінації мікоплазмою культур клітин актуальна і сьогодні. За даними Huang et al. (2023), мікоплазми, діаметр яких становить від 0,3 до 0,8 мкм, – це унікальні прокаріотичні мікроорганізми, які не мають клітинної стінки. Вони є одними з найменших мікроорганізмів, здатних виживати самостійно, знаходячись між бактеріями та вірусами. На сьогоднішній день ідентифіковано понад 200 видів мікоплазм, і нові види продовжують відкриватися щорічно. Мікоплазма може інфікувати різні частини тіла, такі як легені, шкіра, сечовивідні шляхи та кров, що призводить до низки симптомів.

Окрім шкідливого впливу мікоплазм на здоров'я людини, дослідники визначають інші аспекти, особливо їхній вплив на культуру клітин (Corral-Vázquez et al., 2017; Malik et al., 2023). Мікоплазми можуть інфікувати широкий спектр еукаріотичних клітин, включаючи клітинні лінії ссавців, птахів та комах. Забруднення мікоплазмою в культурі клітин може відбуватися різними шляхами, включаючи забруднені клітинні лінії, реанти, обладнання або персонал. Мікоплазми мають здатність проходити через фільтр (0,22 мкм), який використовується для деконтамінації бактерій, що створює високий ризик зараження в лабораторній культурі клітин.

В результаті проведених нами досліджень підтверджено, що мітотична активність та динаміка формування моношару знижувались на 34,5 та 30 % відповідно за умов контамінації мікоплазмою культур FLK-BLV. Після «лікування» антибіотиком тіамулін ці показники частково відновлювалися, але були нижчими на 20 та 24,5 % відповідно порівняно до таких у первинно чистих культур.

Nikfarjam et al. (2012), Uphoff et al. (2014) підтверджують, що побічні ефекти зараження мікоплазмою клітинних культур включають пригнічення проліферації, збільшення загибелі клітин, фрагментацію ДНК та апоптоз.

Нами встановлено, що контамінація мікоплазмою знижувала антигепродукуючі властивості культур FLK-BLV: титр був нижчим на ++ порівняно до первинно чистих культур. Ми проводили обробку культури антибіотиком, а саме тіамуліном в концентрації 30 µg/mL у середовищі культури, тривалість обробки: 21 день, із регулярною заміною середовища кожні 2–3 дні. Після деконтамінації робочий титр відновлювався, але був нижчим за такого у первинно вільних від мікоплазми культур.

Miller et al. (2003), Hoermann et al. (2010) свідчать про вплив мікоплазменної контамінації на біологію та, відповідно, продуктивність клітин: хоча мікоплазмова інфекція може легко залишитися непоміченою, враховуючи, що інфіковані клітини часто не проявляють видимих або морфологічних симптомів, забруднення клітинних ліній мікоплазмою може мати широкий вплив на клітинну біологію. Ці порушення можуть змінювати ДНК, РНК, синтез білка, метаболізм та загальні клітинні процеси, хоча повідомлялося про небагато прикладів систематичних досліджень впливу мікоплазми. Мікрочиповий аналіз забруднених клітин людини в культурі показав, що мікоплазма може впливати на експресію сотень генів, включаючи ті, що кодують іонні канали, рецептори, фактори росту та онкогени.

За даними Nikfarjam et al. (2012), Uphoff et al. (2012) викорінення контамінації перещеплюваних клітинних ліній мікоплазмою та поява специфічних протимікоплазмових антибіотиків разом із доступністю найбільш чутливого та надійного методу виявлення, а саме ПЛР, є ефективними методами отримання культур, вільних від мікоплазми. Крім того, незважаючи на те, що антибіотики можуть точно «вилікувати» інфіковані культури, необхідний регулярний моніторинг, оскільки повторне зараження або виникнення резистентності може відбутися в будь-який момент культивування клітинних ліній (Nir-Paz et al., 2002; Armstrong et al., 2010).

Висновки

1. Контамінація культури клітин FLK-BLV мікоплазмою викликала пригнічення проліферації клітин та зниженню утворення моношару на 30 % для контамінованих культур та на 20 % для деконтамінованої культури.

2. Звільнення від мікоплазми покращує ростові властивості культур клітин FLK-BLV. Порівняно до первинно чистих культур мітотична активність за мікоплазменної контамінації знижувалась в середньому на 34,5 %. За умов деконтамінації антибіотком тіамулін мітотична активність зростала на 17,25 % у порівнянні до контамінованої культури, але водночас була меншою на 24,25 % порівняно до первинно чистих культур.

3. Аналіз антигенпродукуючої біологічної активності субліній клітин, контамінованих мікоплазмою, деконтамінованих від мікоплазми та первинно чистих культур свідчить про підвищення антигенпродукуючих властивостей та титру антигену внаслідок деконтамінації культур клітин. Встановлено відсутність робочого титру антигену (на ++++) від контамінованої сублінії FLK-BLV-У у порівнянні до робочого титру антигену титру в розведенні 1:1 антигену від деконтамінованої культури FLK-BLV-У та титрів від 1:1,5 до 1:2 від первинно чистих неконтамінованих культур клітин FLK-BLV-П 1, FLK-BLV-П 2.

References

1. Armstrong, S. E., Mariano, J. A., & Lundin, D. J. (2010). The scope of mycoplasma contamination within the biopharmaceutical industry. *Biologicals : Journal of the International Association of Biological Standardization*, 38(2), 211–213. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2010.03.002>
2. Bai, L., Yokoyama, K., Watanuki, S., Ishizaki, H., Takeshima, S. N., & Aida, Y. (2019). Development of a new recombinant p24 ELISA system for diagnosis of bovine leukemia virus in serum and milk. *Archives of virology*, 164(1), 201–211. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-4058-5>
3. Bartlett, P. C., Ruggiero, V. J., Hutchinson, H. C., Droscha, C. J., Norby, B., Sporer, K. R. B., & Taxis, T. M. (2020). Current developments in the epidemiology and control of enzootic bovine leukosis as caused by bovine leukemia virus. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 9(12), 1058. <https://doi.org/10.3390/pathogens9121058>
4. Buzafa, E., & Dereń, W. (2003). Comparison of PLA with AGID and ELISA results in serology diagnosis of bovine leukosis. *Polish journal of veterinary sciences*, 6(3), 9–11.
5. Carrillo-Ávila, J. A., de la Fuente, A., Aguilar-Quesada, R., Ligeró, G., Del Río-Ortiz, J. M., & Catalina, P. (2023). Development and evaluation of a new qPCR assay for the detection of mycoplasma in cell cultures. *Current issues in molecular biology*, 45(8), 6903–6915. <https://doi.org/10.3390/cimb45080435>
6. Corral-Vázquez, C., Aguilar-Quesada, R., Catalina, P., Lucena-Aguilar, G., Ligeró, G., Miranda, B., & Carrillo-Ávila, J. A. (2017). Cell lines authentication and mycoplasma detection as minimum quality control of cell lines in biobanking. *Cell and tissue banking*, 18(2), 271–280. <https://doi.org/10.1007/s10561-017-9617-6>
7. Heinecke, N., Tórtora, J., Martínez, H. A., González-Fernández, V. D., & Ramírez, H. (2017). Detection and genotyping of bovine leukemia virus in Mexican cattle. *Archives of virology*, 162(10), 3191–3196. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3477-z>
8. Hoermann, G., Spersger, J., Einwallner, E., Makristathis, A., Perne, A., Willinger, B., & Schwarzinger, I. (2010). Interference of Mycoplasma infection in a gene expression study: it was the environment and not the gene. *Applied and environmental microbiology*, 76(23), 7867–7869. <https://doi.org/10.1128/aem.01265-10>
9. Huang, X., Yu, M., Wang, B., Zhang, Y., Xue, J., Fu, Y., & Wang, X. (2023). Prevention, diagnosis and eradication of mycoplasma contamination in cell culture. *Journal of biological methods*, 10, e99010005. <https://doi.org/10.14440/jbm.2023.407>
10. Kuczewski, A., Orsel, K., Barkema, H. W., Kelton, D. F., Hutchins, W. A., & van der Meer, F. J. U. M. (2018). Short communication: Evaluation of 5 different ELISA for the detection of bovine leukemia virus antibodies. *Journal of dairy science*, 101(3), 2433–2437. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13626>

11. Lv, G., Wang, J., Lian, S., Wang, H., & Wu, R. (2024). The Global epidemiology of bovine leukemia virus: current trends and future implications. *Animals : an open access journal from MDPI*, 14(2), 297. <https://doi.org/10.3390/ani14020297>
12. Malik, P., Mukherjee, S., & Mukherjee, T. K. (2023). Microbial contamination of mammalian cell culture. In: Mukherjee, T.K., Malik, P., Mukherjee, S. (eds) *Practical Approach to Mammalian Cell and Organ Culture*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-19-1731-8_5-1
13. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. World Organisation for Animal Health; Paris, France: 2018. [(accessed on 11 August 2020)]. *Enzootic bovine leukosis*; pp. 1113–1124. Available online: <https://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>
14. Miller, C. J., Kassem, H. S., Pepper, S. D., Hey, Y., Ward, T. H., & Margison, G. P. (2003). Mycoplasma infection significantly alters microarray gene expression profiles. *BioTechniques*, 35(4), 812–814. <https://doi.org/10.2144/03354mt02>
15. Nikfarjam, L., & Farzaneh, P. (2012). Prevention and detection of Mycoplasma contamination in cell culture. *Cell journal*, 13(4), 203–212. PMID: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23508237/>
16. Nir-Paz, R., Prévost, M. C., Nicolas, P., Blanchard, A., & Wróblewski, H. (2002). Susceptibilities of *Mycoplasma fermentans* and *Mycoplasma hyorhinitis* to membrane-active peptides and enrofloxacin in human tissue cell cultures. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(5), 1218–1225. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.5.1218-1225.2002>
17. Soheily, Z., Soleimani, M., & Majidzadeh-Ardebili, K. (2019). Detection of mycoplasma contamination of cell culture by a loop-mediated isothermal amplification method. *Cell journal*, 21(1), 43–48. <https://doi.org/10.22074/cellj.2019.5624>.
18. Uphoff, C. C., & Drexler, H. G. (2014). Detection of Mycoplasma contamination in cell cultures. *Current protocols in molecular biology*, 106, 28.4.1–28.4.14. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2804s106>
19. Uphoff, C. C., Denkmann, S. A., & Drexler, H. G. (2012). Treatment of mycoplasma contamination in cell cultures with Plasmocin. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 267678. <https://doi.org/10.1155/2012/267678>
20. Young, L., Sung, J., Stacey, G., & Masters, J. R. (2010). Detection of Mycoplasma in cell cultures. *Nature protocols*, 5(5), 929–934. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.43>