

Methodensammlung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik	
<b>Nachweis von Squirrel Monkey Retrovirus (SMRV) mittels real-time PCR</b>	<b>AM026</b>
erstellt vom Unterausschuss Methodenentwicklung der LAG, November 2009	
Status: verabschiedet	

## 1. Zweck und Anwendungsbereich

Diese Methode beschreibt ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuresequenzen des Squirrel Monkey Retrovirus (SMRV) in DNA-Extrakten aus Zellkulturen. Sie dient dazu, Zellkulturen auf mögliche Infektionen von SMRV überprüfen zu können. Hintergrund ist eine ZKBS-Stellungnahme, in der über die Kontamination von Zelllinien mit SMRV berichtet wird [1]. Der Stellungnahme folgend ist SMRV als Spender- und Empfängerorganismus in die Risikogruppe 2 einzuordnen. Mit SMRV infizierte Zelllinien sind demzufolge unter Sicherheitsmaßnahmen der Stufe 2 zu bearbeiten.

Da bei der Infektion einer Zelllinie mit SMRV dessen Genom in die chromosomale DNA der Zellen integriert wird und dort persistiert, ist der Nachweis viraler Sequenzen in der genomischen DNA der Zelllinie ein ausreichender Beleg für eine Infektion mit SMRV. Falls bei positiven Befunden replikative Viren nachgewiesen werden sollen, sind hierfür weitergehende, auf den Nachweis von SMRV-RNA abzielende Untersuchungen erforderlich, die hier nicht beschrieben werden.

## 2. Kurzbeschreibung und Nachweisprinzip

Das SMRV-Genom besitzt die für ein Retrovirus charakteristischen Genabschnitte *gag*, *pol* und *env*. Grundlage für die Entwicklung des Nachweises ist die Nukleinsäuresequenz des SMRV-H-Genoms (GenBank Accession No. M23385). Der SMRV-Nachweis erfolgt durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR), in der SMRV-Nukleinsäuresequenzen der Genabschnitte für *gag* (nt 1879 – 1951; 73 bp) und *env* (nt 6917 – 6990; 74 bp) vervielfältigt und nachgewiesen werden. Die Nachweise sind als real-time PCR-Verfahren konzipiert, bei denen mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Oligonukleotide zur Detektion amplifizierter Zielnukleinsäuresequenzen eingesetzt werden. Der Nachweis sowohl der *gag*-Region als auch der *env*-Region des Virus soll die Robustheit des Nachweises im Fall von Rekombinationsereignissen im SMRV-Genom erhöhen.

Um auszuschließen, dass negative Ergebnisse durch Inhibitoren oder eine zu geringe Menge der DNA hervorgerufen werden, ist eine Amplifikationskontrolle vorgesehen. Dafür wird hier ein real-time PCR-Verfahren zum Nachweis einer *c-myc*-Nukleinsäuresequenz (81 bp) durchgeführt, das zur Überprüfung von Zelllinien verschiedener Spezies (z.B. Mensch, Maus, Ratte, Grüne Meerkatze) eingesetzt werden kann. Die nachgewiesene *c-myc* DNA-Sequenz ist zwischen den Spezies hoch konserviert. Deshalb sollte bei den meisten in der Zellkultur verwendeten Spezies ein positives Ergebnis erzielbar sein.

Hinweis: Falls kein real-time PCR Gerät verfügbar ist, können diese Nachweise auch als konventionelle PCR durchgeführt werden, bei der die Detektion der Amplifikate in einer Agarose-Gelelektrophorese erfolgt. Die Amplifikate sind jedoch sehr klein und deshalb nur in hoch konzentrierten Agarosegelen (> 1,8 %) gut zu erkennen.

### 3. Material

#### 3.1. Geräte

Kunststoff- und Glasmaterialien müssen vor der Verwendung sterilisiert werden. Die Verwendung von aerosolgeschützten Pipettenspitzen dient als Schutz vor Kontamination.

- Mikroliter-Tischzentrifuge
- Kolbenhubpipetten (verschiedene Volumina)
- Nitrilhandschuhe (puderfrei)
- PCR-Verbrauchsmaterial:
  - 96-Well PCR-Mikrotiterplatten oder 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße
  - passende optische Abdeckungen für PCR-Mikrotiterplatten bzw. PCR-Reaktionsgefäße
  - 1,5 ml Reaktionsgefäße
  - aerosolgeschützte Pipettenspitzen (diverse)
- real-time PCR-Gerät, das Reaktionsgefäße aus Kunststoff verwendet (geeignet zur Anregung und Emissionsmessung von Fluoreszenz-markierten Oligonukleotiden)

Anmerkung: Zur Optimierung der Methode wurde ein ABI-PRISM 7700 der Fa. Applied Biosystems verwendet.

#### 3.2. Chemikalien

Es sind grundsätzlich analysenreine, für die Molekularbiologie geeignete Reagenzien zu verwenden.

- dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- NukleoSpin® Tissue Kit der Fa. Macherey & Nagel
- steriles deionisiertes Wasser
- Oligonukleotide und DNA-Sonden (siehe Tabellen in den Anhängen)

#### Lösungen

- 10x dNTP-Mix, 4 mmol/l je dNTP
- 2 x TaqMan Mastermix

Anmerkung: Zur Optimierung der Methode wurde der TaqMan Universal PCR Master Mix der Fa. Applied Biosystems verwendet.

#### 3.3. Referenzmaterial

Als Referenzmaterial kann das Plasmid pSMRV (ATCC No. 45034D) mit dem vollständigen Genom von SMRV verwendet werden. Alternativ ist auch Plasmid-DNA mit Teilen des SMRV-Genoms oder PCR-Produkte, die die nachzuweisenden Nukleinsäuresequenzen enthalten, einsetzbar. Zur Messung der Kopienzahl nachgewiesener SMRV-Nukleinsäuresequenzen in einer Probe wird eine Verdünnungsreihe mit definierten Kopienzahlen der Zielsequenzen eingesetzt.

Hinweis: Es sollten keine infektiösen SMRV-Viren oder SMRV-infizierte Zelllinien als Referenzmaterial eingesetzt werden, da hierdurch das Risiko einer erneuten Kontamination entsteht.

## 4. Durchführung

### 4.1. Isolierung der genomischen DNA aus Zelllinien

Für die Isolierung der DNA aus Zelllinien wurde im Ringversuch der NukleoSpin® Tissue Kit eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach Vorschrift des Herstellers mit etwa  $10^7$  Zellen. Nach der DNA-Isolierung ist eine Qualitätskontrolle und Abschätzung der DNA-Konzentration durch OD-Messung 260/280 nm und/oder eine Agarose-Gelelektrophorese erforderlich. Die Fragmentgröße der isolierten DNA sollte über 10 kb liegen und die Konzentration 5 µg/ml oder mehr betragen. In die PCR sollen etwa 10 bis 50 ng DNA eingesetzt werden.

Anmerkung: Für die Isolierung von genomischer DNA aus Zelllinien können auch andere Verfahren eingesetzt werden, so lange sie zu vergleichbarer DNA-Menge und -Qualität führen.

### 4.2. PCR-Nachweise

Um falsch negative Ergebnisse beim Nachweis SMRV-spezifischer Sequenzen auszuschließen, wird zunächst mit allen Proben eine Kontroll-Amplifikation mit dem Referenzgen-Nachweis durchgeführt (siehe 8.1). Alle Proben sollten in diesem Nachweis eindeutig positiv sein. Danach folgen die spezifischen real-time PCR-Nachweise für SMRV-*gag* und SMRV-*env*. Beide Nachweise sollten übereinstimmende Ergebnisse aufweisen.

Die Angaben für die Zusammensetzung der TaqMan-Reaktionsansätze sind in den Anhängen 8.1. bis 8.3. für die Nachweise SMRV-*gag*, SMRV-*env* und *c-myc* zusammengestellt. Generell sind 25 µl-Reaktionen vorgesehen, die 5µl Proben-DNA enthalten. Es sollte für alle Ansätze eines Nachweises ein Pre-Mix hergestellt werden, der aus dem 2x TaqMan-Mastermix, den Primern und der Sonde sowie Wasser zur Volumenergänzung besteht. Die Gesamtmenge der einzelnen zu pipettierenden Lösungen ergibt sich aus der Anzahl der durchzuführenden PCR-Reaktionen. Es sollte ein Volumenüberschuss von mindestens 5% angesetzt werden, um Pipettierungengenauigkeiten auszugleichen.

- Nach der Herstellung des Pre-Mixes kurz mischen.
- Vom Pre-Mix werden je 20 µl in die Wells der PCR-Mikrotiterplatte vorgelegt.
- Danach werden jeweils 5 µl der zu analysierenden DNA zu der Vorlage gegeben.
- PCR-Mikrotiterplatte kurz mischen und zentrifugieren um Luftblasen zu entfernen.
- Nach dem Verschließen der Platte wird die PCR-Reaktion in einem geeigneten real-time PCR Gerät mit dem zum jeweiligen Nachweis angegebenen Temperaturprofil (siehe Anhänge 8.1 bis 8.3) gestartet und die Fluoreszenzzunahme gemessen.

## 5. Durchzuführende Kontrollen

### 5.1 PCR-Reaktionen und Kontrollen

Proben und Kontrollen sollten in Doppelbestimmung analysiert werden.

In jeder Testdurchführung sollten die in der Methode G 00.00-5 der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 28b GenTG [2] angegebenen Kontrollen mitgeführt werden und zu den erwarteten Ergebnissen führen.

In Tabelle 1 sind die Kontrollen für die vorliegende SOP konkret aufgelistet:

**Tabelle 1 – Kontrollen für die PCR-Analyse**

	Negative Prozess-Kontrolle <sup>a</sup>	Positive Prozess-Kontrolle <sup>a</sup>	Negative Extraktionskontrolle <sup>b</sup>	Positive Extraktionskontrolle <sup>b</sup>	PCR-Inhibitionskontrolle <sup>c</sup>	Positive Kontroll-DNA <sup>d</sup>	PCR-Reagenzienkontrolle <sup>d</sup>
Probenaufbereitung							
Nukleinsäureextraktion			Nicht infizierte Zelllinie	SMRV-infizierte Zelllinie*			
Amplifikation			↓	↓	Amplifikationskontrolle <i>c-myc</i>	SMRV-Plasmid (mind. 20 Kopien)	Wasser
Nachweis des PCR-Produktes			↓	↓	↓	↓	↓
erwartetes Ergebnis des PCR-Nachweises			negativ	positiv	positiv	positiv	negativ
<p>* Diese Kontrolle ist nur zu empfehlen, wenn eine SMRV-positive Zelllinie bereits im Labor vorhanden ist (Kontaminationsgefahr!). Die Durchführung einer Amplifikationskontrolle von Proben-DNA mit dem <i>c-myc</i>-Nachweis ist als positive Prozesskontrolle ebenfalls geeignet.</p> <p><sup>a</sup> Die Prozesskontrolle kann bei Zellkulturen, oder deren Überstände durch die negative und positive Extraktionskontrolle ersetzt werden, da vor der DNA-Extraktion keine weitere Probenaufbereitung notwendig ist.</p> <p><sup>b</sup> Diese Kontrolle ist nicht erforderlich, wenn die negative bzw. positive Prozesskontrolle durchgeführt wird.</p> <p><sup>c</sup> Die PCR-Inhibitionskontrolle kann als interne oder externe Amplifikationskontrolle durchgeführt werden. Sie ist verbindlich bei jeder PCR durchzuführen, wenn alle PCR-Nachweise der Probe negativ sind, und für jene Proben, für die die Menge der amplifizierbaren DNA (<i>c-myc</i>-Kopienzahl) nicht bekannt ist.</p> <p><sup>d</sup> Diese Kontrolle ist mit jeder verwendeten Charge der PCR-Reagenzien in jedem PCR-Lauf durchzuführen</p> <p>↓ Verfahrensschritt, der die Einbeziehung dieser Kontrolle umfasst.</p>							

## 5.2 Synthetische Quantifizierungsstandards

Als Quantifizierungsstandards werden mindestens vier Verdünnungsstufen einer Hybridmolekül-Stammlösung in einem Konzentrationsbereich von ca. 10 bis 10<sup>5</sup> Kopien/μl in jeweils zwei Replikaten gemessen. Im Ringversuch wurde dazu ein Dreifach-Hybrid aus den PCR-Produkten SMRV-*gag*/SMRV-*env*/*c-myc* verwendet. Die gemittelten Ct-Werte der Quantifizierungsstandards dienen der Erstellung der Kalibriergeraden.

## 6. Auswertung

Die Zielsequenz gilt als nachgewiesen, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:

- Mit dem jeweiligen Primer(/Sonden)-System ist ein PCR-Produkt bzw. ein amplifikationsbedingter Anstieg der gemessenen Fluoreszenz festzustellen. Da mindestens ein SMRV-Genom in jeder Zelle der Zelllinie vorliegt, sollten beim Einsatz von 10 ng DNA/Reaktion die ermittelten Ct-Werte deutlich unter 35 liegen. Höhere Ct-Werte sollten durch eine Wiederholung der Messung verifiziert werden, um eine Kontamination bei der Messung auszuschließen.
- In den PCR-Kontrollansätzen ohne DNA-Zugabe (PCR-Reagenzienkontrolle) ist kein PCR-Produkt bzw. kein amplifikationsbedingter Fluoreszenzanstieg festzustellen.

- In den Ansätzen der Positivkontrollen und der Amplifikationskontrollen werden die erwarteten PCR-Produkte bzw. die erwarteten Ct-Werte erhalten.

## 7. Ringversuch

Die Validierung der real-time PCR-basierten SMRV-Nachweisverfahren erfolgte 2008 in einem Ringversuch des Unterausschusses „Methodenentwicklung“ der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik. Von 10 teilnehmenden Laboren wurden je 18 kodierte DNA-Proben (5 ng/µl) untersucht, die SMRV-DNA in 4 Konzentrationen sowie SMRV-negative DNA enthielten (Tabelle 2).

Die untersuchten DNA-Proben aus der SMRV-positiven Zelllinie Colo357 mit geringen Zielsequenz-Konzentrationen von 2 bzw. 347 Kopien stellten Dreifach-Blindproben dar. Als Doppel-Blindproben wurden DNA-Extrakte aus den SMRV-negativen Zelllinien SC1 und  $\psi$ -2 sowie aus den SMRV-positiven Zelllinien Namalva und Colo357 mit 9.085 bzw. 38.337 Kopien untersucht. 4 weitere DNA-Proben aus SMRV-negativen Zelllinien (Vero-B4, HeLa-S3, HEK-293, NRK) wurden als Einfach-Blindproben untersucht. Desweiteren erhielten die Labore DNA-Standards für die Erstellung von Standardkurven für SMRV-*gag*, SMRV-*env* und das Referenzgen *myc* (jeweils 5 Standards mit 100.000 Kopien, 8.100 Kopien, 2.700 Kopien, 900 Kopien, 300 Kopien). Jede Probe bzw. Standard-DNA war als Doppelbestimmung (2 PCR-Ansätze je DNA-Lösung) zu untersuchen. Jeder Teilnehmer erhielt zur Durchführung der PCR-Untersuchungen ein **TaqMan® Universal PCR Master Mix Kit** (für 200 Reaktionen) sowie die benötigten Primer und Sonden.

**Tabelle 2: Verwendetes Probenmaterial**

Proben-Nr.	Identisches Material wie Proben-Nr.	Zelllinie	Spezies	Kopienzahl im PCR-Ansatz *	Qualitative Bewertung
1	-	Vero-B4	AGMK	0	-
2	5, 15	Colo357	Human	2	+
3	11	SC1	Maus	0	-
4	16	Colo357	Human	38337	+
5	2, 15	Colo357	Human	2	+
6	14	$\psi$ -2	Maus	0	-
7	10, 18	Colo357	Human	347	+
8	-	HeLa-S3	Human	0	-
9	12	Namalva	Human	9085	+
10	7, 18	Colo357	Human	347	+
11	3	SC1	Maus	0	-
12	9	Namalva	Human	9085	+
13	-	HEK-293	Human	0	-
14	6	$\psi$ -2	Maus	0	-
15	2, 5	Colo357	Human	2	+
16	4	Colo357	Human	38337	+
17	-	NRK	Ratte	0	-
18	7, 10	Colo357	Human	347	+

\* vom Probenherstellerlabor ermittelt

Eine statistische Auswertung der Ergebnisse des Ringversuchs erfolgte 2009 im Auftrag des BVL [3]. Die Auswertung erfolgte sowohl für jede einzelne Probe als auch für die in Doppel- bzw. Dreifach-Blindwerten analysierten Proben.

## 7.1 Ringversuchsergebnisse

Alle 10 teilnehmenden Labore gaben Ergebnisse ab; ein Labor gab für den SMRV-*gag* Nachweis in den Proben identische Ct-Werte an, so dass hier von einer Einzelbestimmung ausgegangen wurde. Die Ergebnisse der Kopienzahlbestimmungen anhand der erstellten Standardkurven sind in der Tabelle 3 dargestellt.

**Tabelle 3: Auswertung (DIN 38402 A45) der Quantifizierungen der Genkopienzahlen mittels real-time PCR (Mittelwerte, sowie relative Wiederhol- und Vergleichsstandardabweichungen)**

Zielgen	Proben Nr.	Anzahl Einzelwerte	Kopienzahl im PCR-Ansatz (Mittelwert)	Rel. Wiederhol-STD	Rel. Vergleich-STD
SMRV- <i>gag</i>	2	18	2,76	79,20 %	110,55 %
	4	19	40883,77	3,96 %	21,67 %
	5	18	2,12	53,61 %	65,89 %
	7	19	342,16	7,07 %	26,02 %
	9	19	9537,76	5,25 %	15,15 %
	10	19	345,06	5,17 %	16,58 %
	12	19	9556,63	7,11 %	19,30 %
	15	19	2,37	25,19 %	128,16 %
	16	19	41686,36	5,69 %	22,10 %
	18	19	345,12	11,23 %	18,26 %
SMRV- <i>env</i>	2	19	4,78	33,97 %	82,19 %
	4	20	41121,09	4,33 %	26,77 %
	5	20	3,95	47,20 %	69,67 %
	7	20	357,88	9,27 %	21,78 %
	9	20	9290,87	4,38 %	22,66 %
	10	20	387,77	13,98 %	19,17 %
	12	20	10398,24	8,71 %	21,93 %
	15	19	4,95	32,41 %	85,42 %
	16	20	41638,79	7,92 %	30,80 %
	18	20	367,93	4,54 %	18,50 %
Referenzgen <i>myc</i>	2	20	8230,32	7,31 %	14,36 %
	4	20	7396,84	6,65 %	20,49 %
	5	20	8276,56	9,84 %	19,99 %
	7	20	7742,90	6,38 %	24,54 %
	9	20	6501,35	4,65 %	22,17 %
	10	20	7783,99	9,22 %	22,23 %
	12	20	6358,97	2,64 %	19,49 %
	15	20	8294,20	3,01 %	18,12 %
	16	20	8217,67	5,24 %	22,28 %
	18	20	8387,77	7,62 %	28,38 %

Die höchsten Werte der relativen Wiederhol- und Vergleichstandardabweichungen sowohl bezüglich SMRV-gag als auch bezüglich SMRV-env sind für die Proben 2, 5 und 15 zu verzeichnen. Diese 3 Proben stellen identisches Material (Zelllinie Colo357, Spezies Mensch) dar mit dem kleinsten untersuchten SMRV-Anteil von 2 Kopien/PCR-Ansatz (vom Hersteller angegebene Kopienzahl). Für die übrigen Proben werden deutlich kleinere und recht ähnliche Standardabweichungen erreicht: die relativen Wiederholstandardabweichungen liegen für SMRV-gag zwischen 4% und 10% und für SMRV-env zwischen 4% und 14%; die relativen Vergleichstandardabweichungen liegen für SMRV-gag zwischen 15% und 26% und für SMRV-env zwischen 19% und 30%.

Gemäß den ermittelten Varianzfunktionen wurde für SMRV-gag ab 20 Kopien je PCR-Ansatz eine relative Vergleichstandardabweichung von unter 30% erreicht, für SMRV-env war hierfür eine Genkopienzahl von mindestens 40 je PCR-Ansatz erforderlich. Ab 300 Genkopien / PCR-Ansatz lag die relative Vergleichstandardabweichung für SMRV-gag bei 20% und für SMRV-env bei 23%. Die Ergebnisse der Auswertung nach ISO 5725-3 sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

**Tabelle 4: Statistische Kenngrößen nach ISO 5725-3, basierend auf ausreißerbereinigten Daten**

Gen	Probe	Anzahl Einzelwerte	Kopienzahl im PCR-Ansatz (Mittelwert)	Rel. Wiederhol-STD	Rel. Zwischen-STD	Rel. Vergleich-STD
SMRV-gag	4 + 16	38	41364,8	5,29%	6,76%	20,37%
	9 + 12	34	9384,4	6,84%	10,53%	13,67%
	7 + 10 + 18	51	339,5	9,28%	11,93%	15,38%
SMRV-env	4 + 16	36	41379,9	10,05%	13,15%	18,74%
	9 + 12	36	9865,1	13,29%	19,92%	20,22%
	7 + 10 + 18	54	371,2	12,49%	13,51%	15,01%

Aus 4 Laboratorien wurden falsch-positive Ergebnisse für die Proben 3, 6 und 17 für den SMRV-gag-Nachweis und bei den Proben 3, 13 und 17 für den SMRV-env-Nachweis berichtet. Falsch-negative Befunde wurden aus 3 Laboratorien berichtet: Für den SMRV-gag-Nachweis in einem Labor für die Proben 5 und 15 und in einem anderen Labor für die Probe 2; für den SMRV-env Nachweis in einem Labor für die Proben 2 und 15. Die zweiten Replikate des einen Labors bezüglich SMRV-gag wurden als ungültig erklärt, da diese exakt dem ersten Replikat entsprachen. Diese fehlenden Werte werden nicht in die Bestimmung der falsch-negativ Rate einbezogen, vielmehr wurde die Grundgesamtheit entsprechend verringert. Für beide viralen Gene ergibt sich jeweils eine falsch-positiv Rate von 2,5%. Die falsch-negativ Rate für SMRV-gag liegt bei 1,6% und für SMRV-env bei 1%.

Die detaillierte Auswertung der Ringversuchsergebnisse ist dem Statistikbericht „Ringversuch Nachweis von SMRV mittels real-time PCR“ [3], der auf Anfrage beim Bundesamt für Verbraucherschutz (BVL) erhältlich ist, zu entnehmen.

Anmerkung: Teil dieses Ringversuchs waren auch qualitative PCR-Verfahren, die von Knipschild und Röder (unveröffentlicht) entwickelt worden waren. Da diese Methoden im Ringversuch nicht zufriedenstellend validiert wurden, kann deren Verwendung nur dann eingeschränkt empfohlen werden, wenn kein real-time PCR Gerät zur Verfügung steht. Eine Methodenbeschreibung entsprechend der Anhänge unter 8. ist beim Unterausschuss Methodenentwicklung erhältlich.

## 8. Anhänge: PCR-Verfahren zum spezifischen Nachweis von SMRV und zugehörigen Amplifikationskontrollen.

Anhang 8.1. Real-time PCR-Nachweis von *c-myc*-Sequenzen (Amplifikationskontrolle)

Anhang 8.2. Real-time PCR-Nachweis von SMRV-*gag*-Sequenzen

Anhang 8.3. Real-time PCR-Nachweis von SMRV-*env*-Sequenzen

## 9. Referenzen

1. Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung des Squirrel Monkey Retrovirus gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV: Az. 6790-05-02-37  
([http://www.bvl.bund.de/cln\\_007/nn\\_520782/DE/06\\_\\_Gentechnik/093\\_\\_ZKBS/01\\_\\_Allg\\_\\_Stellungnahmen/09\\_\\_viren/Squirrel\\_\\_Monkey\\_\\_Retrovirus,templateld=raw,property=publicationFile.pdf/Squirrel\\_Monkey\\_Retrovirus.pdf](http://www.bvl.bund.de/cln_007/nn_520782/DE/06__Gentechnik/093__ZKBS/01__Allg__Stellungnahmen/09__viren/Squirrel__Monkey__Retrovirus,templateld=raw,property=publicationFile.pdf/Squirrel_Monkey_Retrovirus.pdf))
2. Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 28b GenTG, G 00.00-5: „Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuresequenzen mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) – Allgemeine Hinweise und Anforderungen“, in Vorbereitung
3. **quo data** - Gesellschaft für Qualitätsmanagement und Statistik mbH, Dresden. (März 2009) Ringversuch „Nachweis von SMRV mittels real-time PCR“