



RIDA® GENE Factor V

REF PY1210



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Deutschland

+49 (0) 61 51 81 02-0 /  +49 (0) 61 51 81 02-20 /  www.r-biopharm.com



1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. Mit dem RIDA®GENE Factor V Kit wird eine Punktmutation G zu A an Position 1691 im humanen Faktor V-Gen (Factor V-Leiden Mutation) in genomischer DNA, die aus humanen EDTA-Vollblutproben isoliert wurde, mittels real-time PCR qualitativ nachgewiesen.

Das RIDA®GENE Factor V Kit soll die Diagnose bei der Beurteilung von Patienten mit Verdacht auf Thrombophilie unterstützen.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Thrombosen sind ein großes medizinisches Problem, das altersabhängig ansteigt. Ungefähr 1 von 100.000 Personen unter 40 Jahren erkrankt an einer venösen Thrombose. Diese Wahrscheinlichkeit steigt bei Personen über 75 Jahre auf 1 von 100 Personen pro Jahr⁽¹⁾. Faktor V Leiden gilt als der häufigste genetische Faktor, der in Verbindung mit der Entwicklung von venösen Thromboembolien beschrieben wird⁽²⁾. Dabei handelt es sich um eine Punktmutation im Faktor V Gen an Position 1691, die zu einem Basenaustausch von G zu A führt. Daraus resultierend steht die Bindestelle für das aktivierte Protein C mit gerinnungshemmender Wirkung nicht mehr zur Verfügung (APC Resistenz) und Faktor V wird im Vergleich zum Wildtyp weniger abgebaut, was zu einem hyperkoagulablen Zustand führt⁽³⁾. Faktor V Leiden ist weit verbreitet mit hoher Prävalenz in Europa und nahezu keinen Fällen in Asien und Afrika⁽²⁾. Die Wahrscheinlichkeit, eine venöse Thrombose zu erleiden ist mit der genetischen Veränderung im Faktor V Gen um das 3 bis 8-fache höher, wenn diese Veränderung heterozygot vorliegt. Bei einer homozygoten Mutation an Position 1691 steigt die Wahrscheinlichkeit auf das 10 bis 80-fache. Darüber hinaus steigt in diesem Fall auch die Möglichkeit, eine venöse Thrombose im jungen Alter zu erleiden⁽²⁾. Kommen zu dieser Mutation auch weitere Faktoren, wie z. B. eine Mutation im Faktor II Gen (G20210A), steigt zusätzlich das Risiko von wiederkehrenden Thrombosen⁽¹⁾.

3. Testprinzip

Mit dem RIDA®GENE Factor V Kit wird eine Punktmutation / SNP (single nucleotide polymorphism) G zu A an Position 1691 im humanen Faktor V-Gen (Factor V-Leiden Mutation) in genomischer DNA, die aus humanen EDTA-Vollblutproben isoliert wurde, mittels real-time PCR qualitativ nachgewiesen.

Nach der DNA-Isolierung wird das spezifische Genfragment (Wildtyp oder Mutation) amplifiziert.

Die amplifizierten Zielsequenzen werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit einem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) markiert sind, nachgewiesen. In Gegenwart einer Zielsequenz hybridisieren die Sonden mit den Amplikons. Während der Extension trennt die Taq-Polymerase den Reporter vom Quencher. Der Reporter emittiert ein Fluoreszenzsignal, das durch die optische Einheit eines real-time PCR-Gerätes detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge der gebildeten Amplikons an.

4. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung sind ausreichend für 100 Bestimmungen.

Tab. 1: Packungsinhalt

Kit Code	Reagenz	Menge		Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2 ×	1050 µl	gelb, gebrauchsfertig
2	Taq-Polymerase	1 ×	80 µl	rot, gebrauchsfertig
A	Control A	1 ×	200 µl	blau, gebrauchsfertig
B	Control B	1 ×	200 µl	grün, gebrauchsfertig

5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Bitte folgen Sie den Handhabungsvorgaben in Tabelle 2 und lagern Sie das Kit unmittelbar nach Verwendung gemäß den aufgeführten Angaben.
- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden und können ungeöffnet bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Vor dem Gebrauch sollten die Reagenzien schonend aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei 2 - 8 °C).
- Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu 20 Mal beeinträchtigt die Testeigenschaft nicht (ggf. Aliquots nach dem ersten Auftauen herstellen und die Reagenzien sofort wieder einfrieren).
- Alle Reagenzien während der PCR-Vorbereitung geeignet kühlen (2 - 8 °C).

Tab. 2: Lagerungsbedingungen und -hinweise

	Lagertemperatur	Maximale Lagerzeit
ungeöffnet	-20 °C	Bis zum aufgedrucktem Verfallsdatum verwendungsfähig
geöffnet	-20 °C	20 Tau-/Frier-Zyklen

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

6.1 Laborzubehör

Folgendes Zubehör wird für die Verwendung des RIDA®GENE Factor V Kits benötigt:

Zubehör
Extraktionsplattform: Maxwell® RSC (Promega)
Real-time PCR Geräte: <ul style="list-style-type: none">• LightCycler® 480 II (Roche)• cobas z 480 Analyzer (Roche)• Mx3005P (Agilent Technologies)• ABI 7500 (Applied Biosystems)• CFX96™ (Bio-Rad)
RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) (R-Biopharm) bei Verwendung des LightCycler® 480 II und cobas z 480 Analyzer
Real-time PCR-Verbrauchsmaterialien (Platten (low profile, white wells, clear frame), Reaktionsgefäße, Folien)
Zentrifuge mit Rotor für Platten
Vortexer
Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
Pipettenspitzen mit Filtern
Puderfreie Einmalhandschuhe

Bei Fragen zur Verwendung von Geräten zur automatischen Abarbeitung wenden Sie sich bitte an die R-Biopharm AG unter pcr@r-biopharm.de.

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in-vitro*-Diagnostik.

Dieser Test ist nur von qualifiziertem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten.

Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.

Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.

Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben, persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen.

In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken. Eine räumliche Trennung, gesonderte Kleidung und Instrumente für Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten um eine Querkontamination oder falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.

Vermeiden Sie eine Kontamination der Proben und der Komponenten des Kits mit Mikroben und Nukleasen (DNase / RNase).

Klinische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, entsprechend entsorgt werden.

Das Austauschen und Vermischen der Komponenten (Reaction Mix, Taq-Polymerase, Control A, Control B) einer Kit-Charge mit den Komponenten einer anderen Charge ist untersagt.

Das Testkit darf nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

Weitere Details zum Safety Data Sheet (SDS) finden Sie unter der Artikelnummer auf <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Für Anwender in der Europäischen Union: Im Zusammenhang mit dem Produkt auftretende schwerwiegenden Vorfälle sind der R-Biopharm AG und der zuständigen nationalen Behörde zu melden.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

8.1 Probenlagerung

Der Test ist für die Untersuchung humaner EDTA-Vollblutproben entwickelt worden. Bis zur DNA-Extraktion sind die Proben bei Raumtemperatur bis zu 24 Stunden und bei 2 - 8 °C bis zu 72 Stunden zu lagern⁽⁴⁾. Eine mikrobielle Kontamination der Proben ist unbedingt zu vermeiden. Die Verwendung von Hitze inaktivierten, lipämischen, hämolytischen, ikterischen oder trüben Proben kann zu verfälschten Ergebnissen führen.

8.2 Probenvorbereitung

8.2.1 DNA-Isolierung aus EDTA-Vollblut

Für die DNA-Isolierung aus EDTA-Vollblut wird ein kommerziell erhältliches DNA-Isolierungskit oder DNA-Extraktionssystem (z.B. Maxwell® RSC Instrument (Promega)) empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Bei Verwendung des Maxwell® RSC Instruments (Promega) wird empfohlen die Blutproben für mindestens 5 min bei Raumtemperatur durchzumischen. Für die Probenvorbereitung sollen in ein 2 ml Reaktionsgefäß 30 µl Proteinase K zugefügt werden. Aus der Blutprobe sollen 200 µl und aus dem Lysepuffer 300 µl hinzugefügt werden. Den Ansatz 10 s vortexen und für 20 min bei 56 °C inkubieren. Bei der Extraktion müssen 100 µl des Elutionspuffers eingesetzt werden. Die weiteren Angaben des Herstellers sind zu beachten.

9. Testdurchführung

9.1 Herstellung des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Bei jedem Testlauf müssen die Control A und Control B mitgeführt werden.

Es wird empfohlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab. 3). Vor der Benutzung den **Reaction Mix**, die **Taq-Polymerase**, die **Control A** und die **Control B** auftauen, vortexen (mit Ausnahme der Taq-Polymerase) und kurz zentrifugieren. Reagenzien sind während der Arbeitsschritte stets geeignet zu kühlen (2 – 8 °C).

Tab. 3: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	Gesamt	20 µl	220 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

9.2 Herstellung des PCR-Mix

Je 20 µl des Master-Mix in die jeweiligen Reaktionsgefäße (Platten) pipettieren.

Proben: Je 5 µl Eluat zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Kontrollen: Je 5 µl Control A zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Je 5 µl Control B zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Platte verschließen, mit wenigen Umdrehungen pro Minute kurz zentrifugieren und in das real-time PCR-Gerät überführen. Die PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab. 4, Tab. 5).

9.3 Geräteeinstellungen

9.3.1 Universal real-time PCR-Profil

Zur Harmonisierung der RIDA®GENE Assays wurde das RIDA®GENE Factor V Kit im Universalprofil verifiziert. Das bietet die Möglichkeit DNA und RNA Assays miteinander zu kombinieren. Daher ist im Universalprofil eine reverse Transkription vorangestellt.

Tab. 4: Universal real-time PCR Profil für LightCycler® 480 II und cobas z 480 Analyzer

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Tab. 5: Universal real-time PCR Profil für Mx3005P, ABI 7500 und CFX96™

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 6: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
Roche LightCycler® 480 II	Faktor V WT	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	Mutation	533/580	
Roche cobas z 480 Analyzer	Faktor V WT	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	Mutation	540/580	
Agilent Technologies Mx3005P	Faktor V WT	FAM	-
	Mutation	HEX	
Applied Biosystems ABI 7500	Faktor V WT	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	Mutation	VIC	
Bio-Rad CFX96™	Faktor V WT	FAM	-
	Mutation	HEX	

10. Qualitätskontrolle – Anzeichen für Reagenzienverfall

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. **Control A** und **Control B** müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 7).

Tab. 7: Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen

Probe	FAM	VIC	Zielgen Ct
Control A	+	-	Siehe Certificate of Analysis
Control B	-	+	Siehe Certificate of Analysis

* + = positiv
- = negativ

Wenn die beiden Kontrollen, **Control A** und **Control B**, nicht spezifikationsgerecht sind, ist der gesamte PCR-Lauf zu wiederholen. Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung Folgendes zu überprüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte
- Korrekte Testdurchführung

Sind bei Wiederholung die Bedingungen wiederum nicht erfüllt, wenden Sie sich bitte an den Hersteller oder Ihren lokalen R-Biopharm-Distributor.

11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 8.

Tab. 8: Interpretation der Ergebnisse*

Nachweis von		
<i>Faktor V WT</i>	<i>Mutante</i>	Ergebnis
+	-	Faktor V Wildtyp (homozygot) nachweisbar
-	+	Faktor V Mutation in Position 1691 (homozygot) nachweisbar
-	-	Zielsequenz nicht nachweisbar, ungültig
+	+	Heterozygoter Phänotyp

* + = positiv
- = negativ

Der PCR-Lauf ist nicht auswertbar, wenn die Kontrollen im Nachweissystem keine Amplifikationen bzw. keiner der Targetkanäle ein positives Ergebnis zeigen. Der gesamte PCR-Lauf ist zu wiederholen.

Der PCR-Lauf ist nicht auswertbar, wenn die Probe im Nachweissystem keine Amplifikation zeigt. In diesem Fall wurde entweder die DNA nicht zugegeben oder ungeeignete Template-DNA (Qualität, PCR-Inhibitoren) verwendet. Die extrahierte Probe sollte erneut amplifiziert oder die Isolierung und Reinigung der Probe sollte verbessert werden.

12. Grenzen der Methode

1. Das RIDA®GENE Factor V Kit weist die Position 1691 sowie deren möglichen SNP (single nucleotide polymorphism) im humanen Faktor V-Gen (Factor V-Leiden Mutation) aus humanen EDTA Vollblutproben nach. Ein Zusammenhang zwischen der Höhe des ermittelten Ct-Werts und dem Auftreten schwerer klinischer Symptome kann hieraus nicht abgeleitet werden. Die erzielten Ergebnisse sind immer in Verbindung mit dem vollständigen klinischen Bild zu interpretieren.
2. Das Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung sollte nicht allein zur Diagnose führen, sondern immer im Zusammenhang mit der Anamnese und Symptomatik des Patienten betrachtet werden.
3. Dieser Test ist nur für humane EDTA-Vollblutproben validiert.
4. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung können zu falsch-negativen Ergebnissen führen.
5. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu falsch-negativen oder ungültigen Ergebnissen führen.
6. Dieser Assay sollte gemäß der GLP-Verordnung (Gute Laborpraxis) durchgeführt werden. Der Anwender muss bei der Durchführung des Tests die Anweisungen des Herstellers genau befolgen.
7. Das Gendiagnostikgesetz (GenDG) setzt für alle genetischen Analysen gemäß GenDG eine ausführliche Aufklärung und eine schriftliche Einwilligung der Patienten voraus.

13. Leistungsmerkmale

13.1 Analytische Leistungsmerkmale

13.1.1 Analytische Spezifität

Interferierende Substanzen

Das Vorhandensein von PCR-Inhibitoren und interferierenden Substanzen kann zu ungültigen Ergebnissen führen. Daher wurden die Auswirkungen verschiedener Substanzen, die aufgrund von verbreitetem Vorkommen in den entsprechenden Proben vorliegen könnten, untersucht.

Substanzen, die möglicherweise die Testergebnisse signifikant beeinflussen könnten, wurden zunächst mit hohen Konzentrationen (Simulation des „worst case“) in einem Interferenz-Screen untersucht. Wurde in diesem Interferenz-Screen bei einer untersuchten Substanz eine mögliche Interferenz festgestellt, wurde eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der Konzentration der betreffenden Substanz und der Interferenz hergestellt.

Für die in Tabelle 9 aufgeführten Substanzen wurden keine Interferenzen festgestellt

Tab. 9: Potentiell interferierende Substanzen

Potentiell interferierende Substanz	Konzentration
Medunasal Heparin 500 I.U. Ampullen (Heparin)	15 U/ml
Cholesterin	3 mg/ml
Bilirubin	0,1 mg/ml
Hämoglobin	0,2 mg/ml
K ₂ EDTA	1,8 mg/ml

13.1.2 Präzision

Die Präzision des Factor V Kits wurde für folgende Betrachtungsebenen ermittelt.

Intra-Assay Präzision: Bestimmung von 5 Kontrollproben mit je 20 Replikaten auf dem LightCycler® 480 II unter identischen Bedingungen.

Inter-Assay Präzision: Bestimmung von 5 Kontrollproben in 20 Läufen in Duplikaten an 10 Arbeitstagen (2 Läufe pro Tag) von zwei unterschiedlichen Operatoren unter reproduzierbaren Bedingungen.

Die Testungen zur *Intra-* und *Inter-Assay* Präzision erfolgten mit drei unterschiedlichen Lots.

Die Präzisionsdaten wurden mit fünf Kontrollproben, sowie dem Assay zugehörigen Kontrollen ermittelt.

Der höchste erhaltene Variationskoeffizient der jeweiligen Messungen mit dem RIDA®GENE Factor V Kit auf dem LightCycler® 480 II lag bei 1,37 %.

Tab. 10: Ergebnisse der Präzision des RIDA®GENE Factor V Kits für 1691G.

Ct- Mittelwert / VK	Intra-Assay			Inter-Assay			Inter- Lot	
	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1-3	
1	Ct	27,9	28,3	28,3	28,3	28,2	28,4	28,3
	VK (%)	0,45 %	0,37 %	0,36 %	0,95 %	1,05 %	1,04 %	1,03 %
2	Ct	23,3	23,6	23,6	23,5	23,4	23,6	23,5
	VK (%)	0,38 %	0,28 %	0,19 %	1,07 %	1,37 %	1,25 %	1,24 %
3	Ct	22,0	22,3	22,3	22,3	22,3	22,4	22,3
	VK (%)	0,49 %	0,37 %	0,43 %	1,08 %	1,13 %	1,18 %	1,14 %
4	Ct	20,8	21,0	21,0	21,0	21,0	21,1	21,1
	VK (%)	0,43 %	0,44 %	0,51 %	1,19 %	1,26 %	1,31 %	1,27 %
5	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	VK (%)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Tab. 11: Ergebnisse der Präzision des RIDA®GENE Factor V Kits für 1691A.










Ct- Mittelwert / VK	Intra-Assay			Inter-Assay			Inter- Lot	
	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1-3	
1	Ct	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	VK (%)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2	Ct	24,2	24,2	24,2	24,2	24,5	24,6	24,4
	VK (%)	0,53 %	0,65 %	0,73 %	1,01 %	0,86 %	0,73 %	1,21 %
3	Ct	23,1	23,1	23,2	23,0	23,4	23,5	23,3
	VK (%)	0,67 %	0,58 %	0,75 %	0,76 %	0,98 %	1,02 %	1,35 %
4	Ct	21,8	21,8	21,8	21,7	22,0	22,1	21,9
	VK (%)	0,73 %	0,63 %	0,65 %	0,76 %	0,77 %	0,88 %	1,21 %
5	Ct	28,8	28,9	28,8	28,7	29,1	29,1	29,0
	VK (%)	0,39 %	0,72 %	0,41 %	0,56 %	0,77 %	0,92 %	1,04 %

14. Versionsübersicht



Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2022-03-08	Freigabeversion

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

	In-vitro-Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstelldatum
	Hersteller

Testspezifische Symbole

	Reaktions-Mix
	Taq-Polymerase
	Kontrolle A
	Kontrolle B

16. Literatur

1. Zhang S, Taylor AK, Huang X, Luo B, Spector EB, Fang P, et al. Venous thromboembolism laboratory testing (factor V Leiden and factor II c.*97G>A), 2018 update: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Genet Med. 2018;20(12):1489-98.
2. Kujovich JL. Factor V Leiden thrombophilia. Genet Med. 2011;13(1):1-16.
3. Safavi-Abbasi S, Di Rocco F, Nakaji P, Feigl GC, Gharabaghi A, Samii M, et al. Thrombophilia Due to Factor V and Factor II Mutations and Formation of a Dural Arteriovenous Fistula: Case Report and Review of a Rare Entity. Skull Base. 2008;18(2):135-43.
4. Probenlagerung vor Extraktion: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI document MM13-A, Vol. 24, N. 31, 2005