

Ligne directrice de l'OIE

Étalons de référence internationale pour les tests d'amplification en chaîne par polymérase (PCR)

1. Introduction

1.1. Objectif

Ce document fournit des lignes directrices pour la préparation, la validation et la distribution de témoins dans le cadre de tests moléculaires servant d'Étalons de référence internationale pour les tests d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) utilisées pour le diagnostic de maladies infectieuses chez les animaux. Le diagnostic par PCR est devenu la technologie de pointe pour la plupart des maladies animales infectieuses pertinentes pour l'OIE. S'il est vrai que les techniques de PCR – et en particulier celles en temps réel – présentent d'excellentes caractéristiques de performance en termes de sensibilité et de spécificité, la nécessité d'avoir des témoins fiables est cruciale. Dans cette ligne directrice sauf mention contraire, le terme « Étalon » fait référence aux acides nucléiques. Ce type de préparations normalisées est désigné par l'OIE comme Étalon de référence primaire ayant vocation à être utilisé en conjonction avec les tests décrits dans le *Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres* de l'OIE (*Manuel terrestre*).

1.2. Définitions

1.2.1. Étalon

Un Étalon est défini comme une substance (un acide nucléique ici) dont il a été prouvé, au moyen d'une batterie complète de tests analytiques, qu'elle est un matériau authentique d'une grande pureté provenant d'une source reconnue, préparée avec soin, validée scientifiquement, obtenue à partir de matériaux cliniques ou synthétisée artificiellement et dont le statut est connu.

1.2.2. Protocole de test normalisé

Le protocole de test normalisé fait référence à une procédure de test validée et acceptée à l'échelle internationale, tel que mentionné dans le *Manuel terrestre* de l'OIE.

1.2.3. Étalon de référence international

Le terme Étalon de référence internationale est synonyme du terme Étalon primaire. Il représente l'étalon en comparaison duquel tous les autres étalons seront évalués et calibrés.

1.2.4. Étalons secondaires

Les Étalons secondaires sont préparés en comparaison directe avec l'Étalon de référence internationale et doivent imiter les caractéristiques de ce dernier lorsqu'ils sont utilisés pour le protocole de test normalisé. Un Étalon secondaire est typiquement préparé par un Laboratoire de référence internationale afin d'être distribué et utilisé par les laboratoires nationaux ou locaux désignés. Dans un tel cas, l'Étalon secondaire est désigné comme étalon national ou local.

1.2.5. Étalons de travail ou internes

Le terme Étalon de travail ou interne peut être synonyme du terme Étalon secondaire ou bien être un étalon tertiaire calibré en fonction de l'Étalon secondaire. Les Étalons de travail sont définis comme étant un matériau dont les caractéristiques sont jugées satisfaisantes,

préparé à partir d'un lot d'Étalons primaires en vue d'un dépistage systématique de lots à des fins de contrôle qualité dans le cadre d'épreuves biologiques de PCR. Il se doit d'être toujours calibré en fonction de l'Étalon primaire ou de l'étalon de référence officiel and doit être disponible en des quantités suffisantes pour permettre aux laboratoires de diagnostic de normaliser leurs tests quotidiens habituels.

1.3. Champ d'application

Les étalons de référence ont un rôle crucial dans le calibrage et la vérification de la validité des tests, ainsi que dans le contrôle qualité des conclusions obtenues à partir des données analysées. Ils sont un élément clé pour assurer la cohérence du test sur la durée, la qualité des résultats, la stabilité des réactifs et la comparabilité entre les différentes expérimentations. La mise en place et l'utilisation d'étalons de référence sont deux éléments essentiels pour l'obtention de tests répondant à des exigences de contrôle qualité garantissant l'exactitude des résultats et permettant un suivi de la performance de ces tests.

Les Étalons de référence international ont normalement vocation à être utilisés par des laboratoires internationaux, nationaux et autres laboratoire de référence dans le but de calibrer les tests de référence et comme modèles pour la production d'Étalons secondaires. Les Étalons secondaires ou les Étalons de travail sont quant à eux, contrairement à l'étalon international, utilisés au quotidien pour normaliser les tests. Des Étalons de référence international sont nécessaires pour garantir qu'une épreuve PCR donnée est en mesure de mesurer la présence d'acide nucléique cible à un niveau spécifié de sensibilité diagnostique. La sensibilité diagnostique est en rapport avec le risque de réaction faussement négative arrivant au cours d'une épreuve PCR alors qu'un animal est ou a, en fait, été infecté.

Ces Étalons sont si importants que des protocoles adéquats pour la fabrication et la qualification des Étalons de référence doivent être en place pour garantir qu'ils sont correctement caractérisés, qualifiés et stables. Les Étalons de référence doivent être sélectionnés et caractérisés par un Laboratoire de référence désigné suivant une Procédure opérationnelle normalisée (PON) et utilisant des réactifs acceptés au niveau international. Pour la plupart des épreuves, trois Étalons primaires doivent être établis :

- Un étalon fortement positif avec un nombre de copies cible dans un excès au moins 10 000 fois plus élevé que la limite de détection du test PCR spécifique (voir le Chapitre 3.6.3. *Mise au point et optimisation des méthodes de détection de l'acide nucléique* du *Manuel terrestre* de l'OIE).
- Un étalon faiblement positif avec un nombre de copies cible dans un excès au moins 50 fois plus élevé que la limite de détection du témoin fortement positif. Cet étalon est critique pour garantir la sensibilité diagnostique du test.
- Pour les approches semi-quantitatives (par exemple la reverse-transcriptase PCR [RT-PCR] en temps réel), l'étalon fortement positif peut être utilisé pour produire une série de dilutions avec un nombre de copies de la séquence cible connu – ce qui pourra servir de courbe de calibration. Pour les tests non-quantitatifs et quantitatifs (par exemple la PCR traditionnelle), l'étalon de référence faiblement positif peut suffire comme étalon positif.
- Un étalon négatif contenant un nombre élevé de copies d'une cible sans importance.

1.4. Approche

L'approche suivie pour la création et l'utilisation d'étalons est souvent unique car elle dépend du type de substance concerné. Des approches autres que celle présentée ici peuvent aussi être acceptables : ce document n'a pas de valeur légale et fournit uniquement des recommandations illustrant la façon de qualifier de nouveaux étalons et les défis qui se posent pour les conserver. Les Laboratoires de référence de l'OIE fabricant un Étalon international doivent prendre contact avec d'autres Laboratoires de référence de l'OIE – en particulier ceux désignés pour les mêmes maladies – afin d'organiser un système interlaboratoires et d'améliorer la cohérence des résultats entre les différents laboratoires. Un test comparatif apporterait une valeur ajoutée à l'Étalon

international, assurerait une certaine harmonisation entre les laboratoires et promouvrait le réseau et la coopération entre les Centres de référence de l'OIE.

Voici quelques recommandations générales pour qu'un Étalon puissent avoir de bonnes spécifications :

- Définir un programme de qualification solide incluant une stratégie de caractérisation correcte ;
- Minimiser le nombre d'Étalons de référence en circulation ;
- Apporter l'assurance qu'ils sont disponibles de manière permanente ;
- Maximiser leur mise en œuvre pour les rendre facilement accessibles à tous les groupes en ayant besoin ;
- Recueillir et comparer les données scientifiques afin de garantir cohérence, conformité et exactitude ;
- Compiler et mettre à disposition les données historiques concernant la durée et les conditions de conservation, et l'extinction des standards ;
- Considérer les cas où un nouvel étalon de référence doit être qualifié et assigné.

2. Sélection du matériau à utiliser pour l'Étalon

2.1. Considération pour la sélection des matériaux pour l'Étalon

La sélection du type de matériau à utiliser pour l'Étalon est probablement l'étape la plus critique de sa préparation. Certaines méthodes PCR nucléiques utilisent des matériaux de diagnostic obtenus directement à partir d'un cas suspect ; le même test ou un autre peut aussi être appliqué en suivant la cultivation/multiplication préliminaire *in-vivo* ou *in-vitro* de l'agent ou des agents infectieux.

Plusieurs éléments doivent cependant être considérés lors de la préparation d'un Étalon de référence international.

2.1.1. Acceptabilité du matériau

Selon le but du test, la source originale utilisée pour préparer l'étalon exige une évaluation rigoureuse de la « véritable » valeur du matériau, ou tout au moins l'établissement et la justification statistique de sa valeur précise.

2.1.2. Spécificité du matériau

L'Étalon doit être représentatif des cibles possibles du test, en étant notamment représentatif de toutes les variations connues et de l'éventail de scénarios attendus pour le processus.

2.1.3. Composants du matériau

Similarité de l'échantillon original avec l'échantillon choisi pour la méthode de test. Le fait qu'il partage les mêmes attributs (notamment en termes d'impuretés) que le matériau clinique à tester est la condition la plus importante pour la préparation de l'Étalon de référence primaire.

2.1.4. Abondance du matériau

Le remplacement d'un Étalon de référence primaire ne devrait être entrepris qu'en cas d'absolue nécessité car il requiert la conduite approfondie de tests et l'obtention d'une quantité importante de données permettant de qualifier l'Étalon candidat comme

remplacement potentiel de l'Étalon primaire. Il est par conséquent fortement recommandé de considérer une source capable de fournir des étalons à tous les utilisateurs potentiels et ce pendant une longue période.

2.2. Type de matériaux

Selon la méthode PCR, des témoins ADN ou ARN seront nécessaires. Compte tenu de sa fragilité, la distribution d'étalons ARN « nus » implique des conditions de transport plus complexes (glace sèche, etc.) que pour l'ADN.

La préparation de témoins par extraction d'acides nucléiques directement à partir d'un agent infectieux est la méthode offrant la similarité la plus élevée avec la plupart des échantillons cliniques. Cette approche n'est cependant pas encouragée en raison des risques d'infectivité résiduelle et de l'absence d'énumération normalisée de cibles sur la base des copies.

L'ADN plasmidique recombinant solubilisé dans une matrice de l'étalon de référence négative, ou la solution tampon la plus appropriée, est considéré comme stable pour la distribution.

Les témoins pour les tests moléculaires impliquant de la RT-PCR doivent être basés sur l'ARN car cela permet également le contrôle de l'étape de transcription inverse. Bien que moins commun que l'utilisation d'ADN recombinant, il est également possible d'obtenir l'ARN pour le contrôle sur la RT-PCR par la transcription *in vitro* de plasmides d'ADN contenant des séquences promotrices spécifiques.

L'encapsulation de l'ADN ou de l'ARN de contrôle normalisé dans une enveloppe protéinique rigide (surnommée « blindage ») augmente de manière significative la stabilité, en particulier dans le cas de l'ARN. Les témoins d'acides nucléiques blindés ont l'avantage supplémentaire, par rapport aux contrôles ADN / ARN « nus », de permettre l'analyse de l'efficacité de la partie d'extraction d'acide nucléique de la PON. Cependant, l'utilisation de tels témoins blindés (par exemple des phages bactériens recombinants) peut être limitée en raison de leur statut potentiel d'OGM.

2.3. Constitution des étalons

La première étape dans la préparation d'un Étalon de référence international est la sélection d'un stock à sérologie négative provenant d'une seule source, ou un ensemble d'échantillons d'animaux n'ayant jamais été exposés ou vaccinés contre l'organisme en question. Ce matériau doit être sélectionné avec soin pour garantir l'absence de preuve de réaction croisée ou d'autres facteurs non-spécifiques susceptibles d'interférer avec le test, tout en montrant un éventail admissible d'activité de fond représentatif de la majorité des échantillons négatifs. Pour les étalons de référence international, il est peut-être souhaitable d'utiliser un ensemble d'échantillons négatifs, afin de minimiser les particularités d'un prélèvement unique.

La deuxième étape réside dans la sélection du matériau à sérologie positive servant à préparer les étalons de référence fortement positifs et ceux faiblement positifs. Comme pour le cas précédent, parce qu'il existe un certain nombre de facteurs pouvant avoir une influence sur le résultat d'une infection, ou simplement la réponse au phénomène en cours d'examen, il est souhaitable d'utiliser un ensemble d'échantillons suffisamment représentatif de la diversité de cas positifs. Si le matériau positif est obtenu dans des conditions expérimentales, il faudra confirmer qu'il imite au plus près le cours naturel des choses, afin d'éviter toute déviation dans la calibration du test et dans l'interprétation des résultats positifs.

2.3.1. Étalons de référence négatifs

Les Étalons de référence négatifs doivent être dérivés d'un panel similaire d'échantillons présentant une activité de fond typique ; sinon, ils devraient a minima être constitués d'acide nucléique préparé de la même façon que l'étalon positif mais dérivé d'une séquence cible sans importance. Ils doivent être exempts de substances inhibitoires potentielles

pouvant fausser l'interprétation du résultat négatif, avoir une réaction croisée artificielle ou alors interférer dans la méthode de test d'une autre manière que le matériau positif.

2.3.2. Étalons de référence positifs

Les Étalons de référence positifs doivent être basés sur un isolat de référence sélectionné de l'agent infectieux à détecter dans le cadre de l'épreuve moléculaire ; ils peuvent être dérivés d'un échantillon similaire ou d'un ensemble d'échantillons, ou encore d'un produit recombinant typifiant la séquence cible. Les isolats sélectionnés doivent être représentatifs du groupe d'agents ciblé par la méthode de test spécifique. Dans l'idéal, la séquence nucléotide de l'isolat sélectionné devrait être connue dans sa totalité ; sinon, la séquence de la région cible suffira.

La plupart des étalons de référence doit être préparée à partir d'une dilution unique de la matrice normalisée négative pour obtenir des activités comparables à celles du matériau testé sur le terrain, la réaction produite ne devant jamais être équivoque. Cependant, pour certaines applications spécifiques de la PCR, il est souhaitable que l'Étalon de référence positif soit exempt de tout autre acide nucléique susceptible d'avoir une réaction croisée ou d'interférer avec la méthode de test.

L'activité des étalons de référence positifs devrait être définie par des points spécifiques dans la partie linéaire de la courbe dose-effet de la cible.

2.3.2.1. Étalon de référence fortement positif

L'Étalon de référence fortement positif doit représenter une activité à mi-chemin entre les points supérieurs et centraux de la portion linéaire de la courbe dose-réponse.

2.3.2.2. Étalon de référence faiblement positif

L'Étalon de référence faiblement positif doit représenter une activité à mi-chemin entre les points centraux et inférieurs de la portion linéaire de la courbe dose-réponse. Cet étalon doit produire des résultats positifs se situant juste au-dessus du palier positif/négatif du protocole de test.

2.4. Sécurité

Les Étalons de référence doivent être préparés de telle façon qu'ils sont exempts de matériau infectieux. Afin de faciliter le transport entre pays, il est recommandé que les Étalons à l'état humide soit traités par une méthode validée garantissant que l'infectivité résiduelle a été inactivée mais qu'elle restera réactive lors de l'analyse. Des exemples possibles sont notamment l'extraction d'acide nucléique par des méthodes validées de phénol / chloroforme ou par l'utilisation de procédés dépendant de sels chaotropiques et d'un chauffage. Après traitement, les échantillons devraient être soumis à des tests d'innocuité adéquats tels que décrit dans le Chapitre 1.1.9. *Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques du Manuel terrestre*, afin de s'assurer qu'ils sont exempts d'agents vivants détectables.

3. Utilisation des Étalons de référence international

3.1. Préparation

Un Étalon de référence international ne doit pas nécessiter la moindre manipulation spéciale (telle que la pré-dilution, par exemple) par le laboratoire bénéficiaire avant son utilisation pour le test en question. Les Étalons de référence positifs devraient donc être préparés, dans la mesure du possible, à partir de matériaux présentant le niveau de réactivité désiré sans dilution supplémentaire nécessaire.

Cependant, pour préparer les Étalons de référence secondaires et de travail, il sera nécessaire au laboratoire de faire des dilutions à partir de l'Étalon de référence international, afin d'obtenir le niveau de réactivité désiré tel que spécifié dans les Sections 2.3.1 et 2.3.2. pour les Étalons de référence fortement et faiblement négatifs ou positifs, respectivement. Il serait désirable de fournir le diluant stérile en accompagnement de l'étalon lyophilisé pour permettre la reconstitution du matériau.

Avant de pouvoir utiliser les étalons comme témoins pour les tests au quotidien, les étalons devraient être testés – comme tout échantillon ou culture de terrain – selon les conditions de diagnostic habituelles, qui peuvent inclure des étapes d'extraction ou de dilution faisant partie de la procédure d'analyse habituelle. Cette démarche permettra de confirmer que la quantité d'acide nucléique cible contenue dans l'étalon de référence est spécifique et sensible dans les limites de détection précises du test de diagnostic.

3.2. Contrôle qualité des étalons

Dans l'idéal, le matériau de référence original devrait provenir du même lot global et être en quantités suffisantes pour durer au moins 5 ans. Il peut être conservé par congélation (si possible à -70°C ou plus bas) et divisé en fractions aliquotes permettant au minimum 500 tests environ chacune.

Après production, plusieurs unités de l'étalon doivent être reconstituées et réévaluées au fil du temps. Le recalcul des nombres cibles basés sur la copie est requis pour le contrôle qualité des étalons pour les dosages quantitatifs. Si un déclin d'activité est possible sur la durée, cette information doit être indiquée.

Pour chaque lot, qu'il soit congelé ou lyophilisé, des références de lot doivent être effectuées pour prouver qu'il est adéquat et confirmer sa valeur « réelle ».

3.2.1. Références de lot

- Une description complète de la source, date de préparation, processus de fabrication, données d'analyse pour la caractérisation (sensibilité/spécificité).
- Un tracé de la courbe dose-effet permettant de quantifier la force d'activité.

3.2.2. Stabilité des lots

- Des tests périodiques d'une fraction aliquote décongelée en une seule fois devraient être effectués au cours de la durée de vie attendue du lot.
- Une démonstration des effets que peuvent générer la congélation à sec, la lyophilisation ou tout autre processus de conservation des lots devrait être effectuée, afin d'évaluer leur impact sur la qualité de l'étalon.
- Données concernant les différentes conditions en place pour le processus global ; si un nouveau processus est utilisé, les données correspondantes doivent être collectées.
- Les données concernant le déclin naturel d'activité et/ou les facteurs pouvant occasionner une dégradation du matériau doivent être collectées.

3.2.3. Fiches de données

Tout lot d'étalons de référence doit être accompagné d'une fiche d'information présentant les données concernant son activité, ses caractéristiques de performance et des aspects opérationnels tels que :

- i) La fiche de données devrait reprendre les informations d'identification spécifiées sur l'étiquette, ainsi que le numéro de lot et la date de production ;

- ii) Description de l'agent infectieux source utilisé pour la préparation de l'étalon (source, souche, origine et numéro d'ordre de sa séquence génétique dans une base de données publique) ;
- iii) Un avertissement stipulant qu'un étalon fortement positif peut engendrer, s'il n'est pas manipulé correctement, une contamination croisée des échantillons ;
- iv) Détails concernant le protocole de fabrication de l'étalon : désignation et origine des plasmides, hôte bactérien, méthodes de purification, (si ARN) transcription run-off ARN, etc. ;
- v) Description des enveloppes protéinées pour les cas d'ADN/ARN blindés ;
- vi) Tests de référence utilisés pour sélectionner les étalons de référence positifs et négatifs candidats, par exemple PCR classique ou en temps réel ;
- vii) Échantillon de profils de titration d'acide nucléique cible sur un schéma basé sur une copie et critères de sélection de dilutions adéquates d'une activité définie pour différents formats d'analyse (par exemple, PCR classique ou en temps réel) ;
- viii) Présence d'acides nucléiques hétérologues quand connu, et tests utilisés pour leur détection ;
- ix) Détails concernant tout test en lien avec la sécurité mené sur les matériaux ;
- x) Une déclaration précisant que cet étalon est prévu uniquement pour des tests *in vitro* ;
- xi) Une description des méthodes de stérilisation, notamment le type d'irradiation, la dose et l'état de l'échantillon au moment de la stérilisation (liquide, congelé, lyophilisé, etc.) ;
- xii) Numéro de lot et date de production ;
- xiii) Reconstitution recommandée (type de fluide reconstituant et volume), conditions de manipulation et de stockage ;
- xiv) Adresse de contact complète, télécopie, email du Laboratoire de référence – pour toute demande d'informations complémentaires.

3.3. Stockage

Tous les matériaux doivent être conservés congelés ou réfrigérés. Les stocks lyophilisés doivent être stockés à une température de 4°C ; de courtes périodes à température ambiante (par exemple pendant le transport) ne devrait cependant pas être nuisibles. Le stockage des étalons dans des cryotubes à -78°C est la solution alternative recommandée. Les ampoules en verre scellées (plutôt que fermées par des bouchons en caoutchouc) sont recommandées pour le stockage longue durée.

Des cycles de congélation-décongélation doivent être évités, en particulier pour les étalons « nus » d'ANR : les étalons de référence doivent donc toujours être divisés en fractions aliquotes et stockés afin de rester homogènes et stables dans le temps. L'utilisation d'un étalon de référence de travail pour les tests habituels est fortement recommandée, afin de limiter l'utilisation de l'étalon primaire. Si possible, le recours à une fraction aliquote unique (utilisée immédiatement et ensuite jetée) est préférable.

3.4. Étiquetage et identification

Les Laboratoires de référence de l'OIE délivrant des étalons de référence internationaux pour les analyses PCR doivent s'assurer que les fractions aliquotes sont identifiées clairement et accompagnées d'une fiche de données adéquate. Les laboratoires demandeurs devraient être clairement informés du fait que les étalons de référence internationaux ont pour but d'être utilisés pour la calibration de leurs propres tests et la promotion de l'harmonisation au niveau international.

L'étiquette devrait au minimum faire figurer les informations suivantes : logo de l'OIE ; étalon de référence international de l'OIE pour (test) de (maladie) ; indication si l'étalon est fortement positif, faiblement positif ou négatif ; nom du Laboratoire de référence ; méthode de reconstitution ; conditions de stockage. Dans le cas des étalons pour les tests quantitatifs : nombres/volume de copies cibles. L'espace disponible sur l'étiquette ne permet pas toujours d'inclure tous ces éléments ; des abréviations peuvent être utilisées et certains éléments peuvent figurer sur la fiche d'information plutôt que sur l'étiquette.

Afin de permettre à un laboratoire de diagnostic de préparer un étalon de référence secondaire pour sa propre utilisation, il sera nécessaire que le Laboratoire de référence de l'OIE fournisse des données spécifiques sur la sélection et/ou la préparation des étalons de référence primaires.

4. Approbation des étalons de référence par l'OIE

Un Étalon de référence ne peut pas être délivré sous le nom de l'OIE tant qu'il n'a pas été validé par la Commission des normes biologiques de l'OIE agissant sous l'autorité de l'Assemblée mondiale de l'OIE.

L'ensemble des données techniques et statistiques concernant l'évaluation des étalons de référence candidats, ainsi que les données pour la fiche d'information dans leur totalité doivent être soumis à l'OIE. La Commission des normes biologiques de l'OIE examinera ces informations. En cas d'approbation de sa part, l'étalon de référence sera ajouté à la liste des étalons de référence internationaux disponibles. Cette liste sera fournie à tous les Pays membres de l'OIE sur demande, et se trouve également sur le site Web de l'OIE (www.oie.int/fr/).

5. Références

FRYER J.F., BAYLIS S.A., GOTTLIEB A.L., FERGUSON M., VINCINI G.A., BEVAN V.M., CARMAN W.F. & MINOR P.D. (2008). Development of working reference materials for clinical virology. *J. Clin. Virol.*, **43**, 367–371.

GADKAR VY & FILION M. (2014). New Developments in Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction Technology. *Curr. Issues Mol. Biol.*, **16**, 1–6. Epub 2013 Apr 8. Review. PubMed PMID: 23562919.

LIN G., ZHANG K., ZHANG D., HAN Y., XIE J. & LI J. (2017). Fast preparation of a long chimeric armored RNA as controls for external quality assessment for molecular detection of Zika virus. *Clin. Chim. Acta*, **466**, 138–144. doi: 10.1016/j.cca.2017.01.023. Epub 2017 Jan 19. PubMed PMID: 28111270.

PASLOSKE B.L., WALKERPEACH C.R., OBERMOELLER R.D., WINKLER M. & DUBOIS D.B. (1998). Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 3590–3594.

STEVENSON J., HYMAS W. & HILLYARD D. (2008). The use of Armored RNA as a multi-purpose internal control for RT-PCR. *J. Virol. Methods*, **150**, 73–76.

VILLANOVA G.V., GARDIOL D., TABORDA M.A., REGGIARDO V., TANNO H., RIVADENEIRA E.D., PEREZ G.R. & GIRI A.A. (2007). Strategic approach to produce low-cost, efficient, and stable competitive internal controls for detection of RNA viruses by use of reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **45**, 3555–3563.

