

NORME INTERNATIONALE **ISO 10272-1**

Deuxième édition
2017-06

AMENDEMENT 1
2023-01

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Campylobacter* spp. —

Partie 1:

Méthode de recherche

AMENDEMENT 1: Ajout de méthodes pour la confirmation et l'identification moléculaires de *Campylobacter* spp. thermotolérants, de l'utilisation d'un supplément de croissance dans le bouillon de Preston, et modification des essais de performance des milieux de culture

*Microbiology of the food chain — Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. —*

Part 1: Detection method

*AMENDMENT 1: Inclusion of methods for molecular confirmation and identification of thermotolerant *Campylobacter* spp., the use of growth supplement in Preston broth and changes in the performance testing of culture media*



Numéro de référence
ISO 10272-1:2017/Amd.1:2023(F)

© ISO 2023

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 10272-1:2017/Amd 1:2023](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/33ed5462-c7fb-40b4-b3c7-0b9a19c62dd4/iso-10272-1-2017-amd-1-2023)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/33ed5462-c7fb-40b4-b3c7-0b9a19c62dd4/iso-10272-1-2017-amd-1-2023>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2023

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8
CH-1214 Vernier, Genève
Tél.: +41 22 749 01 11
E-mail: copyright@iso.org
Web: www.iso.org

Publié en Suisse

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier, de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

L'attention est attirée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir www.iso.org/avant-propos.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*, en collaboration avec le comité technique CEN/TC 463, *Microbiologie de la chaîne alimentaire*, du Comité européen de normalisation (CEN) conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

Une liste de toutes les parties de la série ISO 10272 se trouve sur le site web de l'ISO.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse www.iso.org/fr/members.html.

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Campylobacter* spp. —

Partie 1: Méthode de recherche

AMENDEMENT 1: Ajout de méthodes pour la confirmation et l'identification moléculaires de *Campylobacter* spp. thermotolérants, de l'utilisation d'un supplément de croissance dans le bouillon de Preston, et modification des essais de performance des milieux de culture

3.1

Remplacer le texte par le suivant:

3.1

Campylobacter

genre de micro-organismes appartenant à la famille *Campylobacteraceae*, formant des colonies caractéristiques sur un milieu sélectif solide, tel que la gélose modifiée à la céfopérazone, au charbon et au désoxycholate (mCCD), lorsqu'il est incubé dans une atmosphère microaérobie à 41,5 °C et présentant certaines caractéristiques avec des essais de confirmation biochimique et par microscopie

Note 1 à l'article: La microscopie, les essais de confirmation biochimique et les caractéristiques de *Campylobacter* sont décrits en 9.5.

Note 2 à l'article: Le présent document vise les espèces thermotolérantes du genre *Campylobacter* d'intérêt en santé humaine. Les espèces le plus souvent rencontrées et d'intérêt en santé humaine sont *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli*. Cependant, d'autres espèces ont été décrites (*Campylobacter lari*, *Campylobacter upsaliensis*, et autres).

Note 3 à l'article: Le *Campylobacter* est généralement capable de se développer dans les milieux d'enrichissement sélectif, à savoir le bouillon de Bolton et le bouillon de Preston.

4.1

Ajouter la note suivante après le dernier alinéa:

NOTE Le milieu d'enrichissement utilisé dans le mode opératoire de recherche B (bouillon de Preston) peut être trop sélectif pour permettre la récupération de souches d'espèces de *Campylobacter* (notamment *C. coli*), voir l'ISO 17995^[8]. L'ajout d'un supplément de croissance au bouillon de Preston améliore la récupération des espèces de *Campylobacter* et certaines souches ne se développeront pas en son absence. Ce problème soulevé après la publication de l'ISO 10272-1:2017 est dû aux propriétés de la solution d'antibiotiques. Les données justificatives sont disponibles à l'adresse: <https://standards.iso.org/iso/10272/-1/ed-1/en/amd/1/>.

9.5.1

Ajouter le texte suivant après le dernier alinéa:

NOTE Les essais PCR pour la confirmation et l'identification des espèces sont décrits aux Annexes D et E. Les résultats de l'étude interlaboratoires sont décrits à l'Annexe F.

9.6.1, deuxième phrase

Remplacer le texte par le suivant:

D'autres espèces ont toutefois été décrites (*Campylobacter lari*, *Campylobacter upsaliensis*, et autres); les caractéristiques fournies dans le Tableau 2 permettent de les différencier du *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli*.

9.6.1

Ajouter le texte suivant comme troisième phrase:

En outre, l'Annexe E décrit les méthodes moléculaires d'identification d'espèces thermotolérantes du genre *Campylobacter*, qui peuvent être utilisées comme alternative à l'identification biochimique décrite en 9.6.2 à 9.6.5.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

9.6.4, deuxième alinéa

Remplacer le texte par le suivant:

Si l'acétate d'indoxyle est hydrolysé, la couleur devient bleue dans les 5 min à 10 min. Si le résultat n'est pas clair après 10 min, un meilleur résultat peut être obtenu après 20 min d'attente. En l'absence de changement de couleur, l'hydrolyse n'a pas eu lieu.

9.6.5, Tableau 2

Remplacer le tableau par le suivant:

Caractéristique	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i> ^b	<i>C. upsaliensis</i> ^b
Catalase (9.6.2)	+	+	+	– ou faible
Hydrolyse de l'hippurate (9.6.3)	+ ^a	–	–	–
Acétate d'indoxyle (9.6.4)	+	+	–	+ ^c
Légende				
+ = positif				
– = négatif				
^a Il existe des souches de <i>C. jejuni</i> présentant un résultat négatif au test de l'hippurate.				
^b Les mêmes caractéristiques peuvent également apparaître pour d'autres <i>Campylobacter</i> spp.				
^c Il existe des souches de <i>C. upsaliensis</i> présentant un résultat négatif à l'essai d'acétate d'indoxyle.				

11.1

Ajouter le texte suivant après la première phrase:

Les résultats ont été publiés, voir Référence [19].

Article B.3

Remplacer le texte de cet article par le suivant:

B.3 Bouillon de Preston**B.3.1 Milieu de base****B.3.1.1 Composition**

Digestion enzymatique de tissus animaux		10,0 g
Peptone		10,0 g
Chlorure de sodium	(n° CAS (ou CAS RN ^{®a}) 7647-14-5)	5,0 g
Eau		940 ml

^a CAS RN[®] est une marque déposée de CAS Corporation. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve l'emploi du produit ainsi désigné. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il peut être démontré qu'ils conduisent au même résultat.

B.3.1.2 Préparation

Dissoudre les constituants de base ou le milieu de base complet déshydraté dans l'eau, en chauffant si besoin.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, le pH du milieu complet soit de $7,4 \pm 0,2$ à 25 °C. Répartir le milieu de base dans des récipients de capacité appropriée. Stériliser à l'autoclave réglé à 121 °C pendant 15 min.

B.3.2 Sang de cheval lysé stérile

Utiliser du sang de cheval lysé par la saponine ou par une congélation, puis décongélation.

B.3.3 Solution d'antibiotiques**B.3.3.1 Composition**

Sulfate de polymyxine B	(n° CAS 1405-20-5)	5 000 UI
Rifampicine	(n° CAS 13292-46-1)	0,01 g
Sel de lactate de triméthoprim	(n° CAS 23256-42-0)	0,01 g
Amphotéricine B	(n° CAS 1397-89-3)	0,01 g
Éthanol à 95 % (fraction volumique)		5 ml

B.3.3.2 Préparation

Dissoudre les constituants dans l'éthanol.

B.3.4 Supplément de croissance**B.3.4.1 Composition**

Pyruvate de sodium	(n° CAS 113-24-6)	0,25 g
Métabisulfite de sodium	(n° CAS 7681-57-4)	0,25 g
Sulfate hydraté de fer (II)	(n° CAS 13463-43-9)	0,25 g
Eau		5 ml

B.3.4.2 Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau puis stériliser par filtration. Il convient de conserver des aliquotes de 5 ml à (-20 ± 5) °C pendant 12 mois au maximum.

B.3.5 Milieu complet

B.3.5.1 Composition

Milieu de base (B.3.1)	940 ml
Sang de cheval lysé stérile (B.3.2)	50 ml
Solution d'antibiotiques (B.3.3)	5 ml
Supplément de croissance (B.3.4)	5 ml

B.3.5.2 Préparation

Refroidir le milieu de base à moins de 47 °C, y ajouter la solution d'antibiotiques, puis le supplément de croissance et enfin le sang lysé stérilement et mélanger le tout. Distribuer stérilement le milieu dans des tubes, des fioles ou des flacons de capacité appropriée afin d'obtenir les quantités nécessaires à l'essai. Si le milieu d'enrichissement a été préparé à l'avance, le conserver dans le noir à 5 °C (6.7) pendant 7 jours maximum.

Article B.11, Tableau B.1

Remplacer le Tableau B.1 par le suivant:

Tableau B.1 — Essais de performance des milieux de culture de *Campylobacter*

Milieu	Fonction	Incubation	Souches de contrôle	Numéros WDCM ^a	Méthode de contrôle	Critères ^b	Réactions caractéristiques du micro-organisme cible
Bouillon de Bolton	Productivité	(5 ± 1) h/ (37 ± 1) °C, puis (44 ± 4) h/ (41,5 ± 1) °C en atmosphère microaérobie	<i>Campylobacter jejuni</i> ^c + <i>Escherichia coli</i> ^c + <i>Staphylococcus aureus</i> ^c	00156 ou 00005 00012 ou 00013 00032 ou 00034	Qualitative	> 10 colonies caractéristiques sur gélose mCCD	Colonies grisâtres, plates et humides, parfois avec un reflet métallique
	Sélectivité		<i>Campylobacter coli</i> ^c + <i>Escherichia coli</i> ^c + <i>Staphylococcus aureus</i> ^c <i>Escherichia coli</i> ^c <i>Staphylococcus aureus</i> ^c	00004 ou 00072 00012 ou 00013 00032 ou 00034 00012 ou 00013 00032 ou 00034			

^a WDCM: World Data Centre for Microorganisms. Pour plus d'informations sur les numéros d'identification des souches de culture et pour les coordonnées, se référer au catalogue de souches de référence disponible à l'adresse www.wfcc.info^[17].

^b La croissance/turbidité est classée en 0: croissance/turbidité nulle; 1: croissance/turbidité faible; 2: croissance/turbidité marquée (voir l'ISO 11133).

^c Libre choix de la souche, mais au moins l'une des souches doit être utilisée.

^d Libre choix de la souche, mais au moins l'une des souches de *Campylobacter* doit être utilisée.

Tableau B.1 (suite)

Milieu	Fonction	Incubation	Souches de contrôle	Nombres WDCM ^a	Méthode de contrôle	Critères ^b	Réactions caractéristiques du micro-organisme cible
Bouillon de Preston	Productivité	(24 ± 2) h/ (41,5 ± 1) °C en atmosphère microaérobie	<i>Campylobacter jejuni</i> ^c + <i>Escherichia coli</i> ^c + <i>Staphylococcus aureus</i> ^c	00156 ou 00005 00012 ou 00013 00032 ou 00034	Qualitative	> 10 colonies caractéristiques sur gélose mCCD	Colonies grisâtres, plates et humides, parfois avec un reflet métallique
	Sélectivité		<i>Campylobacter coli</i> ^c + <i>Escherichia coli</i> ^c + <i>Staphylococcus aureus</i> ^c	00004 ou 00072 00012 ou 00013 00032 ou 00034			
Gélose mCCD	Productivité	(44 ± 4) h/ (41,5 ± 1) °C en atmosphère microaérobie	<i>Campylobacter jejuni</i> ^c <i>Campylobacter coli</i> ^c	00156 ou 00005 00004 ou 00072	Qualitative	Croissance marquée (2)	Colonies grisâtres, plates et humides, parfois avec un reflet métallique
	Sélectivité		<i>Escherichia coli</i> ^c	00012 ou 00013	Qualitative	Inhibition partielle ou totale (0-1)	Aucune colonie caractéristique
			<i>Staphylococcus aureus</i> ^c	00032 ou 00034	Qualitative	Inhibition totale (0)	—
Gélose au sang Columbia	Confirmation	24 h à 48 h/ (41,5 ± 1) °C en atmosphère microaérobie	<i>Campylobacter jejuni</i> ^d ou <i>Campylobacter coli</i> ^d	00156 ou 00005 ou 00004 ou 00072	Qualitative	Croissance marquée (2)	—

^a WDCM: World Data Centre for Microorganisms. Pour plus d'informations sur les numéros d'identification des souches de culture et pour les coordonnées, se référer au catalogue de souches de référence disponible à l'adresse www.wfcc.info^[17].

^b La croissance/turbidité est classée en 0: croissance/turbidité nulle; 1: croissance/turbidité faible; 2: croissance/turbidité marquée (voir l'ISO 11133).

^c Libre choix de la souche, mais au moins l'une des souches doit être utilisée.

^d Libre choix de la souche, mais au moins l'une des souches de *Campylobacter* doit être utilisée.

Annexe C

Ajouter le texte suivant après la quatrième phrase:

NOTE Les données de validation ont été recueillies auprès des participants utilisant le bouillon de Preston sans supplément de croissance ainsi qu'auprès des participants utilisant le bouillon de Preston avec supplément de croissance (voir 4.1). Par conséquent, les caractéristiques de performance sont considérées comme toujours valides, de sorte qu'il n'est pas nécessaire de les revérifier^[19].

Après l'Annexe C

Ajouter ce qui suit comme Annexes D, E et F:

Annexe D (informative)

PCR multiplex en temps réel pour la confirmation des *Campylobacter* spp. thermotolérants

D.1 Généralités

La présente annexe décrit une méthode de PCR multiplex en temps réel basée sur l'utilisation de sondes pour la confirmation des *Campylobacter* spp. thermotolérants (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*).

D.2 Principe

Un fragment spécifique de l'ARNr 16S des *Campylobacter* spp. thermotolérants *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* est amplifié par PCR multiplex en temps réel. Le produit PCR est détecté en mesurant la fluorescence de la sonde hydrolysée.

D.3 Réactifs

Pour la qualité des réactifs utilisés, voir l'ISO 22174^[20]. Des réactifs prêts à l'emploi peuvent être disponibles dans le commerce. Il convient de se conformer aux instructions d'utilisation des fabricants.

D.3.1 Réactifs pour l'extraction de l'acide nucléique

D.3.1.1 NaCl, 0,9 % (fraction massique).

D.3.1.2 Eau de qualité PCR.

D.3.1.3 Solution tampon TE.

D.3.2 Réactifs pour PCR en temps réel

D.3.2.1 Eau de qualité PCR.

D.3.2.2 Solution tampon pour PCR, 10×.

NOTE 10× signifie 10 fois, c'est-à-dire la concentration du tampon pour PCR.

La solution tampon pour PCR est généralement livrée avec l'ADN polymérase, laquelle peut contenir ou non du MgCl₂ à une concentration spécifiée par le fabricant. La concentration finale en MgCl₂ est propre à chaque méthode et est, par conséquent, indiquée dans le Tableau D.2 (voir D.5.2).

D.3.2.3 Solution de MgCl₂.

D.3.2.4 ADN *Taq* polymérase thermostable (pour PCR avec induction thermique).

D.3.2.5 Solution dNTP.

D.3.2.6 Oligonucléotides.

Les séquences des oligonucléotides sont répertoriées dans le Tableau D.1.

D.3.2.7 Plasmide IPC-ntb2.

Un vecteur plasmidique transportant une séquence de 125 pb du gène *rbcMT-T* encodant la Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase N-méthyltransférase de *Nicotiana tabacum*^[21]. Le plasmide est utilisé comme témoin interne d'amplification.¹⁾

Tableau D.1 — Séquences des oligonucléotides

Gène	Amorce/sonde	Séquence (5' – 3')
ARNr 16S	Jos-F1 (sens)	CCT GCT TAA CAC AAG TTG AGT AGG
	Jos-R1 (antisens)	TTC CTT AGG TAC CGT CAG AAT TC
	Jos-P (sonde)	FAM ^a - TGT CAT CCT CCA CGC GGC GTT GCT GC-NFQ ^b
Témoin interne d'amplification (TIA)	IPC-ntb2-fw (sens)	ACC ACA ATG CCA GAG TGA CAA C
	IPC-ntb2-re (antisens)	TAC CTG GTC TCC AGC TTT CAG TT
	IPC-ntb2-P (sonde)	ROX ^a -CAC GCG CAT GAA GTT AGG GGA CCA-NFQ ^b
<p>^a Des fluorophores et/ou quencher équivalents peuvent être utilisés pour les sondes s'il peut être démontré qu'ils offrent des résultats similaires ou meilleurs. Les combinaisons alternatives FAM-HEX, FAM-TAMRA, FAM-JOE et FAM-Cy5 ont été utilisées avec des résultats équivalents dans le cadre de la validation de la méthode.</p> <p>^b NFQ: quencher non fluorescent (quencher sombre).</p>		

D.4 Appareillage

Un équipement approprié selon la méthode doit être utilisé et, en particulier, ce qui suit.

D.4.1 Équipement destiné à l'extraction de l'acide nucléique

D.4.1.1 Tubes de micro-centrifugeuse, d'une capacité de 1,5 ml et de 2,0 ml.

D.4.1.2 Bloc thermique, pouvant atteindre une température de 95 °C.

D.4.1.3 Pipettes et pointes à filtre, pour des volumes compris entre 1 µl et 1 000 µl.

D.4.1.4 Centrifugeuse, pour tubes de micro-centrifugeuse d'une capacité de 1,5 ml et de 2,0 ml, par exemple, une micro-centrifugeuse, capable d'atteindre une accélération allant jusqu'à 12 000*g*. Dans certaines étapes, une centrifugeuse réfrigérée est nécessaire.

D.4.2 Équipement destiné à la PCR en temps réel

D.4.2.1 Pipettes et pointes à filtre, d'une capacité comprise entre 1 µl et 1 000 µl.

D.4.2.2 Tubes de micro-centrifugeuse, d'une capacité de 1,5 ml et de 2,0 ml.

D.4.2.3 Microtubes PCR à paroi mince, tubes de réaction de 0,2 ml ou 0,5 ml, microplaques PCR multi-puits ou autres consommables adaptés.

D.4.2.4 Instrument de PCR en temps réel.

D.5 Mode opératoire

D.5.1 Extraction de l'acide nucléique

Une anse de 1 µl de colonies suspectes (voir 9.5.2) est mise en suspension dans 1 ml de solution de NaCl à 0,9 % et l'ADN est extrait grâce à une étape de lyse thermique (15 min à 95 °C). Après une étape

1) Le plasmide IPC-ntb2 a été utilisé comme témoin interne d'amplification dans l'étude de validation du système PCR. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi du produit désigné. D'autres systèmes de témoins internes d'amplification peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils offrent des résultats équivalents ou meilleurs. Si nécessaire, adapter les quantités de réactifs et le programme de réglage de la température et de la durée.

de centrifugation supplémentaire pendant 3 min à 10 000g, 5 µl du surnageant sont utilisés comme solution d'ADN cible. Si l'ADN est destiné à être conservé, il convient d'utiliser un tampon TE au lieu de NaCl à 0,9 %. D'autres méthodes d'extraction de l'ADN peuvent être utilisées si elles se sont révélées appropriées. Avant d'être ajoutée au mélange réactionnel de la PCR, il convient de diluer 100 fois la solution d'ADN cible dans de l'eau stérile.

D.5.2 Configuration de la PCR

La méthode est décrite pour un volume total de 25 µl par réaction PCR avec les réactifs listés dans le Tableau D.2. La PCR peut également être effectuée avec un volume plus élevé si les solutions sont ajustées de manière appropriée. Les concentrations finales des réactifs données dans le Tableau D.2 se sont révélées appropriées.

Tableau D.2 — Réactifs

Réactif	Concentration finale	Volume par échantillon µl
Solution d'ADN cible (dilution 1:100)	250 ng maximum	2,5 µl
ADN <i>Taq</i> polymérase ^a	1 UI	Tel que requis
Tampon pour PCR (sans MgCl ₂) ^b	1×	Tel que requis
Solution de MgCl ₂	2,5 mM	Tel que requis
Solution dNTP	0,2 mM de chaque dNTP	Tel que requis
Amorces PCR (selon le Tableau D.1)	500 nM de chaque amorce	Tel que requis
Sondes PCR (selon le Tableau D.1)	100 nM de chaque sonde	Tel que requis
Eau de qualité PCR	—	Tel que requis
Plasmide IPC-ntb2	25 copies par réaction	Tel que requis
Volume total	—	25
^a De l'ADN <i>Taq</i> polymérase à induction thermique a été utilisé dans le cadre de la validation de la méthode. ^b Si la solution tampon pour PCR contient déjà du MgCl ₂ , la concentration finale en MgCl ₂ dans le mélange réactionnel est ajustée à 2,5 mM.		

D.5.3 Témoins de PCR

Conformément à l'ISO 22174^[22], les témoins suivants sont nécessaires:

- témoin négatif de PCR: l'eau de qualité PCR est utilisée comme témoin négatif;
- témoin positif de PCR: l'ADN de *C. jejuni*, *C. coli* ou *C. lari* est utilisé comme témoin positif;
- témoin d'amplification: le système contient un témoin interne d'amplification (voir D.3.2.7).

D.5.4 Programme de réglage de la température et de la durée

Le programme de réglage de la température et de la durée, présenté dans le Tableau D.3, a été utilisé dans le cadre de la validation de la méthode avec les thermocycleurs Applied Biosystem 7500 Fast, Stratagene MX3000P, Biorad CFX 96 et iCycler iQ5²⁾. L'utilisation d'autres thermocycleurs peut nécessiter une adaptation. La durée de l'activation/dénaturation initiale dépend de la polymérase utilisée.

2) Applied Biosystem 7500 Fast, Stratagene MX3000P, Biorad CFX 96 et iCycler iQ5 sont des exemples de produits appropriés disponibles dans le commerce auprès de ThermoFisher Scientific, Agilent Technologies et Bio-Rad. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils donnent les mêmes résultats.