ISHA
Institut Scientifique d'Hygiène & d'Analyse

cofrac
ESSAIS
ACCREDITATION N° 1-1759 PORTEE DISPONIBLE SUR www.cofrac.fr

NF VALIDATION 16140

AFNOR CERTIFICATION VALIDATION OF THE METHOD

HQS *Cronobacter* spp

for the detection of *Cronobacter* spp

Protocol for dairy products

SUMMARY REPORT – NOVEMBER 2015 – V1

Expert laboratory :
ISHA
25 avenue de la République
91300 MASSY
FRANCE

Manufacturer :
ADNUCLEIS
30 Chemin des Mouilles
69290 GREZIEU LA VARENNE
FRANCE

This report of analyses concerns only objects subjected to analyses. Its reproduction is authorized only in the form of complete photographic facsimile. It contains 41 pages.
Only certain assays reported in this document are covered by the accreditation of the Section Laboratory of COFRAC. They are identified by the symbol (*).
Assays performed at ISHA: 25, avenue de la République 91300 Massy

Table of contents

1. Introduction 4
1.1. Dates and validation history 4
1.2. Principle and protocol of the alternative method 4
1.2.1. Principle of the method 4
1.2.2. Protocol 4
1.3. Reference method 5
1.4. Scope of application 5
2. Comparative study 6
2.1. Relative accuracy, specificity and sensitivity 6
2.1.1. Number and nature of samples 6
2.1.2. Artificial contamination of samples 6
2.1.3. Confirmation protocol 6
2.1.4. Results 6
2.1.5. Calculation of relative accuracy (AC), relative specificity (SP) and relative sensitivity (SE) 7
2.1.6. Analysis of discordant results 7
2.2. Relative detection level 8
2.2.1. Matrices 8
2.2.2. Spiking protocol 8
2.2.3. Results 8
2.2.4. Conclusion 8
2.3. Selectivity 9
2.3.1. Test protocols 9
2.3.2. Results 9
2.3.3. Conclusion 9
2.4. Practicability 9
3. Interlaboratory study 12
3.1. Collaborative study implementation 12
3.1.1. Participating laboratories 12
3.1.2. Cronobacter absence in the matrix 12
3.1.3. Strain stability in the matrix 12
3.1.4. Samples preparation and spiking 12
3.1.5. Samples labeling 13
3.1.6. Samples shipping, reception and analysis 13
3.2. Results 13
3.2.1. Temperature and state of the samples 13
3.2.2. Total viable counts 13
3.2.3. Expert laboratory results 13
3.2.4. Participating laboratories results 14
3.2.5. Specificity (SP) and sensitivity (SE) calculations 15
3.2.6. Relative accuracy calculations 15
3.2.7. Discordant results analysis 16
3.3. Interpretation 16
3.3.1. Accordance 16
3.3.2. Concordance 16
3.3.3. Concordance odds ratio 16
3.3.4. AC, SP, SE comparison 17
4. Conclusions 18

Appendices

Appendix 1: enumeration of mesophilic lactic acid bacteria
Appendix 2: Stressed bacteria
Appendix 3: AC, SP, SE raw results
Appendix 4: AC, SP, SE values and LCL
Appendix 5: RLoD raw results
Appendix 6: Selectivity raw results
Appendix 7: Interlaboratory TVC raw results
Appendix 8: Expert laboratory results
Appendix 9: Interlaboratory study raw results
Appendix 10: Accordance calculation
Appendix 11: Concordance calculation

1. Introduction

1.1. Dates and validation history

The method HQS *Cronobacter* spp has been validated by AFNOR Certification under the trademark NF Validation 16140 in April 2010 with the attestation number: ADN 33/02 – 04/10.

The method was renewed in October 2014, including the addition of at least ten positive samples containing probiotics.

1.2. Principle and protocol of the alternative method

1.2.1. Principle of the method

HQS *Cronobacter* test is based on a real-time Polymerase Chain Reaction technology. The test allows the presumptive detection of *Cronobacter* by identification of DNA sequences after enrichment in buffered peptone water. The test uses a SYBR Green technology and the amplified sequence is located between the 16 S RNA gene and the 23 S RNA gene (16S-23S rDNA ITS).

1.2.2. Protocol

The protocol of the method is showed in figure 1.

A Realplex thermocycler from Eppendorf was used during the preliminary study.

STEP 1: SAMPLE ENRICHMENT

X g (mL) of sample + 9 X mL of buffered peptone water pre-warmed at 37°C
Incubation at (37±1)°C for at least 24 hours.

STEP 2: DNA EXTRACTION

Transfer 25 µL of enriched broth to an extraction microplate. Close. Place the extraction microplate into the thermocycler and start DNA extraction
Centrifuge the extraction microplate for 2 minutes at 2000 g. Dilute the extract at 1:10 in a dilution tube.

STEP 3: DNA AMPLIFICATION

Transfer 3 µL of the dilution into the PCR well. Close. Centrifuge the PCR microplate for 1 minute at 300g
Place the microplate into the thermocycler and start the detection.

STEP 4: RESULT INTERPRETATION

After checking the controls[a], read the dissociation temperature Tm and compare it to the Tm target ±2°C. A result is presumed positive if the Tm is in this interval.

STEP 5: CONFIRMATION OF PRESUMED POSITIVE SAMPLES

Complete protocol of ISO/TS 22964 standard from the enriched buffered peptone water both (stored at 4°C after extraction):
- enrichment in mLST
- streaking on ESIA
- subculture on TSA
- biochemical confirmation

Figure 1 : alternative method protocol (a=inhibition control, contamination control and EPC)

1.3. Reference method

The technical specification "ISO/TS 22964 (Feb. 2006): milk and dairy products – Detection of *Enterobacter sakazakii*" was applied. The protocol of this method is shown in figure 2.

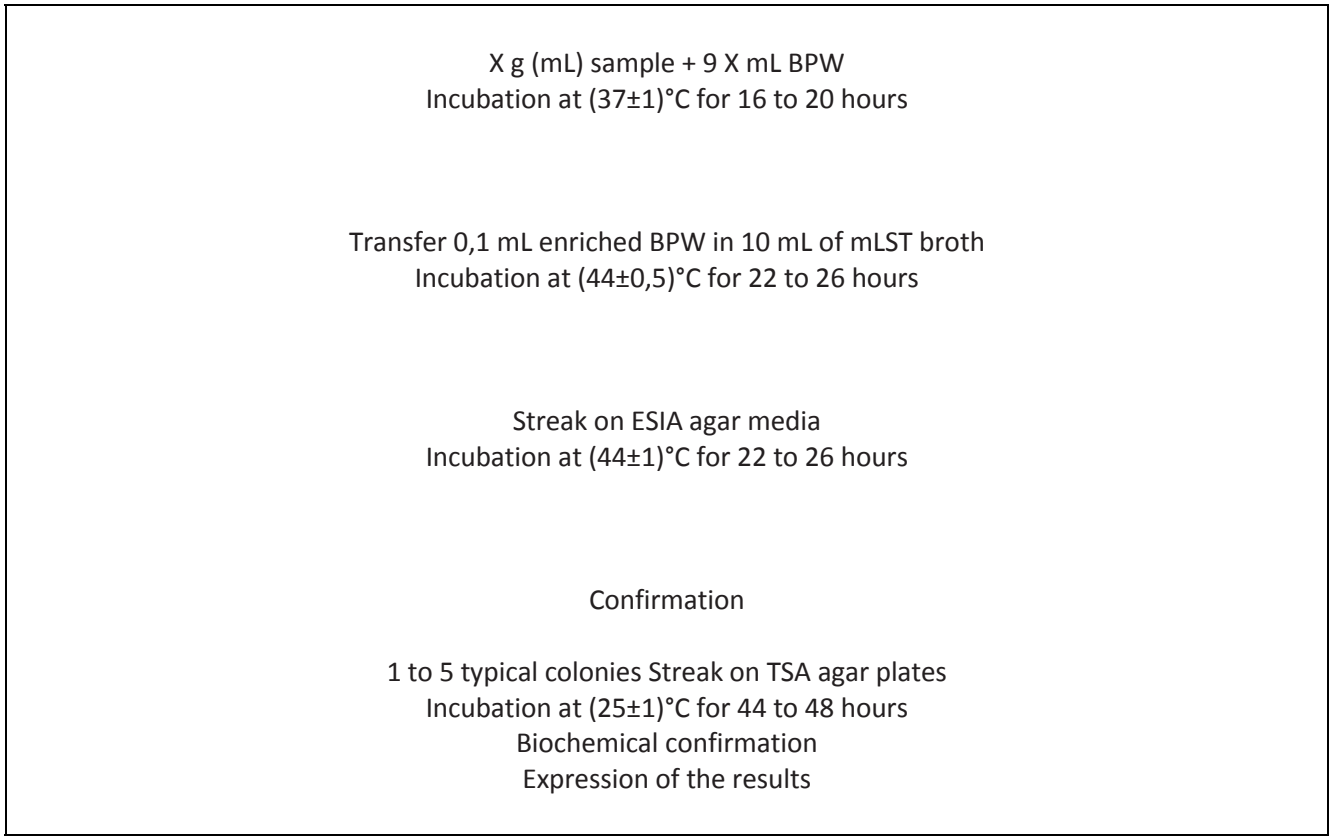


Figure 2: reference method protocol

1.4. Scope of application

The alternative method was tested on one category of products: dairy products and milk powders especially.

2. Comparative study

The following characteristics are studied during the preliminary study:

- Relative accuracy (AC), relative specificity (SP) and relative sensitivity (SE)
- Relative detection level of the alternative method and the reference method
- Selectivity of the alternative method
- Practicability of the alternative method

2.1. Relative accuracy, specificity and sensitivity

The relative accuracy is the degree of correspondence between the response obtained by the reference method and the response obtained by the alternative method on identical samples.
The relative specificity is the ability of the alternative method to not detect the target microorganism when it is not detected by the reference method.
The relative sensitivity is the ability of the alternative method to detect the analyte when it is detected by the reference method.
The objective of this study is to evaluate the performance of both methods on contaminated and non-contaminated samples.

2.1.1. Number and nature of samples

Only one category was studied during the validation study of 2010, dairy products with a focus on powdered infant formula (PIF). A number of 68 samples was analyzed. Test portions of 30 g were tested for PIF and 25 g for other products.
Twenty supplementary assays have been realized in 2014 on milks that contain probiotics.
Types of products are indicated in table 1. The results of probiotics enumeration are presented in appendix 1.

Category	Type	Number of positive*	Number of negative	Total
Dairy products	Milk powder	22	24	**46**
	Milks	14	9	**23**
	Cheese, Yoghurt, Condensed milk	8	11	**19**
	Total	**44**	**44**	**88**

Table 1: nature and number of analyzed samples (*=positive results by any method)

2.1.2. Artificial contamination of samples

Naturally contaminated samples are seldom available. Therefore, artificial contaminations of food samples were almost performed. For spiking, several strains were stressed using different treatments and the stress intensity was evaluated (logarithmic difference between enumeration on non- selective agar –TSA- and selective agar –ESIA- cf. appendix 2).
One naturally contaminated sample was analyzed, so 97,7 % of positive samples are the results of artificial spikings.

2.1.3. Confirmation protocol

The confirmation of presumed positive results, obtained by the alternative method, was realized from the enriched buffered peptone water according to the reference method, namely an enrichment in mLST, followed by a streaking on ESIA, a subculture of typical colonies on TSA and a biochemical confirmation.

2.1.4. Results

Raw results are presented in appendix 3.

Each sample was analyzed once by the alternative method and once by the reference method. Table 2 presents paired results of both methods for incubation of 24 hours of the alternative method.

Alternative method with 24 hours of incubation		
Response	**Reference method (*) positive (R+)**	**Reference method (*) negative (R-)**
Alternative method positive (A+)	PA=44	PD=0
Alternative method negative (A-)	ND=0 including PPND=0	NA=44 including PPNA=1

Table 2: results of relative accuracy for both methods (PA: positive agreement, NA: negative agreement, ND: negative deviation, PD: positive deviation, PP: presumed positive before confirmation, A+: confirmed positive, A-: negative immediately and negative after confirmation when presumed positive)

2.1.5. Calculation of relative accuracy (AC), relative specificity (SP) and relative sensitivity (SE)

These results allow to calculate the relative accuracy, relative specificity and relative sensitivity according to NF EN ISO standard. Results are indicated in table 3 and also in appendix 4 with the LCL.

Incubation of the alternative method broth: 24 hours									
PA	**NA**	**ND**	**PD**	**N**	Relative accuracy **AC** [(PA+NA)/N]	**N+** PA+ND	Relative sensitivity **SE** [PA/N+]	**N-** NA+PD	Relative specificity **SP** [NA/N-]
44	44	0	0	88	100%	44	100%	44	100%

Table 3: relative accuracy, relative specificity and relative sensitivity of alternative method (PA: positive agreement, NA: negative agreement, ND: negative deviation, PD: positive deviation, AC = (PA+NA)/N x 100%, SE = PA/N+ x 100%, SP = NA/N- x 100%, N+ = PA+ND and N- = NA+PD)

Criteria values in percent are shown in table 4.

	Alternative method 24 hours
Relative accuracy	100%
Relative sensitivity	100%
Relative specificity	100%

Table 4: AC, SE and SP in percent for alternative method

Sensitivity of both methods was recalculated considering all confirmed positive (including alternative method positive deviations). Results are shown in table 5.

	Alternative method 24 hours (PA+PD)/(PA+PD+ND)	**Reference method** (PA+ND)/(PA+PD+ND)
Sensitivity	100%	100%

Table 5: sensitivity of both methods including all confirmed positive

2.1.6. Analysis of discordant results

Discordant results are examined according to annex F of NF EN ISO 16140 standard, with Y as the number of discordant results and m as the smallest of the two values of PD and ND. This analysis is presented in table 6.

	Alternative method 24 hours
Y= PD + ND	Y = 0 + 0 = 0
m=	Y < 6, so the methods are equivalent
M=	
Conclusion	

Table 6: Statistical analysis of discordant results

After 24 hours of incubation, any discordant result is observed. The methods are considered as equivalent.

2.2. Relative detection level

The objective of this study is to determine the level of contamination for which less than 50% of the responses obtained are positive and that for which more than 50% of the responses obtained are positive.

2.2.1. Matrices

A couple “matrix-strain" was studied in parallel with the reference method and the alternative method for each category. The total viable count of each matrix was enumerated. Characteristics of the strain and the matrix are shown in table 7.

Matrix	Strain	ISHA code	Origin
Infant formula powder	*Cronobacter spp*	ENTB.3.1	Milk powder

Table 7: “matrix-strain” couple of the relative detection level

2.2.2. Spiking protocol

Six levels of contamination were tested including the negative control.
Six replicates for each level of contamination were inoculated and analyzed by the reference method and the alternative method.

As the two methods have no common step, 12 test portions of 30 g were prepared for each level of contamination and individually inoculated with a calibrated bacterial suspension. Bacterial suspension of about 10 cells per mL was prepared. From this initial suspension, volumes of 0.9 mL, 0.3 mL and 0.1 mL were used to spike 30 g of sample respectively for the 3 first levels. In parallel, the initial suspension was diluted at ½ and ¼ in order to inoculate the lower levels of contamination with 0.1 mL. For all levels of contamination, homogeneity of the inoculums was checked by enumeration on 30 TSA Petri dishes. Then, the confidence interval was determined according to Poisson law.

2.2.3. Results

Tables 8 and 9 present the relative detection level for each method. Raw results are presented in appendix 5.

		Relative detection level according to the Spearman-Kärber model (cells in 30 g)	
Strain	**Matrix**	**Reference method(*)**	**Alternative method 24 h**
ENTB.3.1	Infant formula powder	0,335 [0,228 ; 0,491]	0,335 [0,228 ; 0,491]

Table 8: relative detection level (3 significant numbers)

		Relative detection level according to the Spearman-Kärber model (cells in 30 g)	
Strain	**Matrix**	**Reference method(*)**	**Alternative method 24 h**
ENTB.3.1	Infant formula powder	0,3 [0,2 ; 0,5]	0,3 [0,2 ; 0,5]

Table 9: relative detection level (1 significant number)

The alternative and the reference method show similar detection levels. The detection limit obtained with both methods is comprised between 0.2 and 0.5 CFU in 30 g.

2.2.4. Conclusion

The relative detection level is similar between both methods.

2.3. Selectivity

The objective of this study is to test:

- the inclusivity: the detection of the target microorganism from a wide range of strains,
- the exclusivity: the lack of interference from a relevant range of non-target microorganisms.

According to the requirements of NF EN ISO 16140, 50 strains of *Cronobacter* and 32 non-target strains were tested.

2.3.1. Test protocols

- Inclusivity

Each *Cronobacter* strain was cultivated twice before inoculation in BPW (about 1 to 100 CFU/225 mL). The complete protocol of alternative method was applied with the minimum time of incubation.

- Exclusivity

Each non-target strain was cultivated twice before inoculation in growth medium (Tryticase Soy Broth) with a level of contamination expected to occur in the food matrices (about 10^5 CFU/mL). After 24 hours of incubation, the HQS test was performed.

2.3.2. Results

Raw results are presented in appendix 6.

The 50 target strains tested were detected by the alternative method. Any non-target strain was detected by the alternative method.

2.3.3. Conclusion

The selectivity of the method is satisfactory.

2.4. Practicability

The practicability was evaluated according to the 13 criteria defined by AFNOR Technical Committee.

1- Mode of packaging of test components
Barrettes of 8 micro tubes with extraction solution.
Barrettes of 8 micro tubes with PCR solution.
Barrettes of 8 micro tubes with control solutions.

2- Volume of reagents
Not specified.

3- Storage conditions of components and shelf-life of unopened products (expiration of not opened products)
The HQS detection kits must be stored at – 20 °C.

4- Modalities after first use
Not specified.

5- Equipment and specific local requirements

Equipment

Real-time PCR thermocycler
Centrifuge
Barrettes supports
Two multi-channel pipettes
Two single channel pipettes
Dilutor
Bunsen burner
Serological pipette pump
Stomacher bag holder
Refrigerator 4°C (2 to 8°C)

PCR encloser
Stomacher (homogenizer)
Incubators
Colour printer
Pipettes supports
Tubes racks

6- Reagents ready to use or for reconstitution

Ready to use solutions.

7- Training period for operator with no experience with the method

4 days are required for technicians with microbiology knowledge.

8- Handling time and flexibility of the method in relation to the number of samples

Steps– Manipulation time	Time (minutes)			
	Alternative method		Reference method	
	1 analysis	20 analyses	1 analysis	20 analyses
Suspension	3	23	3	23
Sampling	1	15	/	/
Extraction	6	26	/	/
Amplification	14	38	/	/
PCR reading	2	5,5	/	/
Broth inoculation and streaking	3	36	6,5	36
Reading	0.7	2	0.2	2
Confirmation test	8	62	4	62
Total	**38,7**	**207,5**	**13,7**	**121**

9- Time required for results

Steps –Time for negative results	Alternative method	Reference method
Suspension	D0	D0
Sampling	D1	D0
Extraction	D1	/
Amplification	D1	/
PCR reading	D1	/
Broth inoculation and streaking	/	D2
Reading	/	D3

Steps –Time for positive results	Alternative method	Reference method
Suspension	D0	D0
Sampling	D1	D0
Extraction	D1	/
Amplification	D1	/
PCR reading	D1	/
Broth inoculation and streaking	D1	D1
Reading	D2	D2
Confirmation	D5	D5

10- Operator qualification

Identical as necessary for the reference method

11- Steps common with the reference method

None.

12- Traceability of analysis results

Traceability realized by paper sheet.

13- Maintenance by laboratory

None.

3. Interlaboratory study

The main object of the collaborative study is to determine the variability of the results obtained by different laboratories analyzing identical samples and to compare these results within the framework of the comparative study of the methods.

3.1. Collaborative study implementation

3.1.1. Participating laboratories

The collaborative study was realized by the expert laboratory and twelve participating laboratories.

3.1.2. Cronobacter absence in the matrix

Before spiking, the absence of *Cronobacter* was verified in the batch of infant formula milk used according to the reference method (ISO/TS 22964).

3.1.3. Strain stability in the matrix

The strain stability in infant formula milk matrix was evaluated for 4 days at (4±2)°C. The strain used was *Cronobacter sakazakii* (ISHA code: ENTB.3.47) isolated from a dairy product industry.

Inoculation of 10 cells in 30 mL of a liquid infant formula. The samples were analysed at D0, D+1, D+2 and D+3 by the reference method and by the alternative method.
The results are summarized in table 10.

Day	Alternative method	Reference method
D0	Presence in 30 mL	Presence in 30 mL
D+1	Presence in 30 mL	Presence in 30 mL
D+2	Presence in 30 mL	Presence in 30 mL
D+3	Presence in 30 mL	Presence in 30 mL

Table 10: results of the stability study of the strain ENTB.3.47 in infant formula milk

The results show that the *Cronobacter sakazakii* strain used is stable for 3 days at (4±2)°C in the liquid infant formula tested.

3.1.4. Samples preparation and spiking

The matrix was inoculated with the target strain suspension to obtain 3 contamination levels:

- L0: 0 cell in 30 mL
- L1: 3 cells in 30 mL
- L2: 30 cells in 30 mL

The matrix was distributed at 30 mL in sterile vials. Every vial was individually spiked and homogenized. Eight samples per level, per laboratory and per method were prepared. Each laboratory received 24 samples to analyze, 1 sample to quantify the endogenous microflora and 1 water sample containing a temperature probe. The results of the enumerations of the TVC, the target levels and the real levels of contamination are presented in table 11.

Matrix	Total viable count (CFU/mL)	Target level (cells / 30 mL)	Real level (cells / 30 mL)	Confidence interval
Liquid infant formula	<10	0	0	0
		3	5	[1 ; 10]
		30	32	[22 ; 44]

Table 11: sample code by contamination level

3.1.5. Samples labeling

The labelling of the bags was realized as follows: a code to identify the laboratory: from A to L (cf. table 12) and a code to identify each sample, only known by the expert laboratory.

The samples and the temperature control vials (water sample with a temperature probe) were stored at 4°C before shipping.

Contamination level	Sample code
L0	2/3/5/7/8/14/19/24
L1	4/6/9/12/15/16/20/22
L2	1/10/11/13/17/18/21/23

Table 12: sample code by contamination level

3.1.6. Samples shipping, reception and analysis

The samples were shipped in a coolbox the 16th of November 2009.
The coolboxes were received the 17th of November 2009 by all the participating laboratories.
The control temperature was recorded upon receipt of the package and the temperature probe sent to the expert laboratory. The samples were analyzed the same day. The expert laboratory concurrently analyzed a set of samples under the same conditions with both methods.

3.2. Results

3.2.1. Temperature and state of the samples

The temperature readings upon reception and the state of the samples and the analysis of thermal profiles are shown in table 13.

Laboratory	Temperature (°C)	State of the samples	Temperature of the probe	
			Mean	SD
A	5,5	Correct	3.7	0.6
B	4,3	Correct	-0.2	0.3
C	8,2	Correct	-1.0	1.0
D	3,2	Correct	2.6	0.4
E	5,0	Correct	2.4	0.5
F	3,6	Correct	2.0	0.2
G	4,2	Correct	2.3	0.5
H	8,1	Correct	1.4	0.6
I	5,6	Correct	2.0	0.2
J	0,0	Correct	3.0	0.6
K	4,2	Correct	2.4	0.4
L	3,7	Correct	2.5	0.4

Table 13: temperature and state of the samples upon reception

The temperature measurements are inferior to 8.4°C for all the laboratories.

3.2.2. Total viable counts

For the whole laboratories, the total viable counts at 30°C vary between < 1 and 50 CFU/mL. Raw results for each laboratory are presented in appendix 7.

3.2.3. Expert laboratory results

The results obtained by the expert laboratory are summarized in table 14 and in appendix 8.

Contamination level	Alternative method	Reference method (*)
L0	0/8	0/8
L1	8/8	8/8
L2	8/8	8/8

Table 14: positive results obtained by expert laboratory by both methods

The results are consistent with those expected.

3.2.4. Participating laboratories results

The results are summarized in tables 15 and 16. Raw data are provided in appendix 9.

- Alternative method results

	Contamination level		
Laboratory	**L0**	**L1**	**L2**
A	**2/8**	8/8	8/8
B	0/8	8/8	8/8
C	0/8	8/8	8/8
D	0/8	7/8	8/8
E	0/8	8/8	8/8
F	0/8	8/8	8/8
G	0/8	8/8	8/8
H	0/8	8/8	8/8
I	0/8	8/8	8/8
J	0/8	8/8	8/8
K	0/8	8/8	8/8
L	0/8	8/8	8/8

Table 15: alternative method positive results for all laboratories

Only the laboratory I reported inhibitions of the PCR reaction for 4 samples (I2, I6, I10 and I16). The protocol which consists in diluting the extract was applied and allowed to “lift” these inhibitions.

- Reference method results

	Contamination level		
Laboratory	**L0**	**L1**	**L2**
A	**2/8**	8/8	8/8
B	0/8	8/8	8/8
C	0/8	8/8	8/8
D	0/8	7/8	8/8
E	0/8	8/8	8/8
F	0/8	8/8	8/8
G	0/8	8/8	8/8
H	0/8	8/8	8/8
I	0/8	8/8	8/8
J	0/8	8/8	8/8
K	0/8	8/8	8/8
L	0/8	8/8	8/8

Table 16: reference method positive results for all laboratories

- Results analysis

Laboratory A gives two positive results at the negative level for both methods.

A second PCR was performed and the results were the same. The collaborative laboratory confirmed a cross contamination of these two samples and the expert laboratory decides to exclude the results of the laboratory A.

3.2.5. Specificity (SP) and sensitivity (SE) calculations

The specificity and sensitivity calculations of both methods are presented in table 17, with the low critical value (LCL). Formulas used are:

For level L0, SP = [1-(FP/N-)] x 100%, N-: total number of L0 tests FP: number of false positive.
For levels L1 and L2, SE = (TP/N+) x 100%, N+: total numbers of L1 or L2 tests, TP: number of true positive.

Specificity / sensitivity	Alternative method	LCL	Reference method	LCL
SP (level L0)	100%	98%	100%	98%
SE (level L1)	99%	98%	99%	98%
SE (level L2)	100%	98%	100%	98%
SE (level L1+L2)	99%	98%	99%	98%

Table 17: specificity (SP), sensitivity (SE) and LCL of alternative and reference method

3.2.6. Relative accuracy calculations

Pairs of results of the different levels of contamination are presented in table 18.

Level	Alternative method	Reference method		
		RM+	RM-	Total
L0	**AM+**	PA=0	PD=0	0
	AM-	ND=0	NA=88	88
	Total	0	88	88
L1	**AM+**	PA=87	PD=0	87
	AM-	ND=0	NA=1	1
	Total	87	1	88
L2	**AM+**	PA=88	PD=0	88
	AM-	ND=0	NA=0	0
	Total	88	0	88
L0+L1+L2	**AM+**	PA=175	PD=0	175
	AM-	ND=0	NA=89	89
	Total	175	89	264

Table 18: tests results for both methods (PA: positive agreement, NA: negative agreement, ND: negative deviation, PD: positive deviation)

Relative accuracy values of the different contamination levels are presented in table 19 with their LCL. Formula used is the following:
AC = (PA+NA)/N x 100%, PA: number of positive agreements, NA: number of negative agreements

Level	Relative accuracy (AC)	LCL (Low Critical Value)
L0	100%	98%
L1	100%	98%
L2	100%	98%
L1+L2	100%	98%
Total	100%	98%

Table 19: relative accuracy values (AC) and LCL of alternative method

3.2.7. Discordant results analysis

No discordant results are observed according to the annex F of ISO 16140 standard. The HQS *Cronobacter* test and the reference method can be considered as equivalent.

3.3. Interpretation

3.3.1. Accordance

The accordance is the percentage chance of finding the same result (i.e. both negative or both positive) from two identical test portions analyzed in the same laboratory, under repeatability conditions (i.e. one operator using the same apparatus and same reagents within the shortest feasible time interval).

To derive the accordance from the results of an interlaboratory study, the probability that two samples give the same result is calculated for each participating laboratory in turn, and this probability is then averaged over all laboratories. Values of accordance are shown in table 20 and raw data in appendix 10.

Level	Alternative method	Reference method
L0	100%	100%
L1	98%	98%
L2	100%	100%

Table 20: accordance by level and method

3.3.2. Concordance

The concordance is the percentage chance of finding the same result for two identical samples analysed in two different laboratories.

To calculate the concordance from the results of an interlaboratory study, take in turn each replicate in each participating laboratory, pair it with identical results of all the other laboratories. The concordance is the percentage of all pairings giving the same results on all the possible pairings of data. Values of concordance are shown in table 21 and raw data in appendix 11.

Level	Alternative method	Reference method
L0	100%	100%
L1	98%	98%
L2	100%	100%

Table 21: concordance by level and method

3.3.3. Concordance odds ratio

If the concordance is smaller than the accordance, it indicates that two identical samples are more likely to give the same result if they are analyzed by the same laboratory than if they are analyzed by different ones, suggesting that there can be variability in performance between laboratories. Unfortunately, the magnitude of the concordance and accordance is strongly dependent on the level of accuracy, making it difficult to assess easily the degree of between-laboratory variation.

It is therefore helpful to calculate the concordance odds ratio (COR) defined as follows: COR = accordance x (100-concordance)/concordance x (100 – accordance).

Values of COR for both methods are shown in table 22.

A value for the odds ratio of 1.00 would be expected if accordance and concordance were equal, and the larger the odds ratio is, the more inter-laboratory variation is predominant. Nevertheless, values above 1.00 can

occur by chance variation, and so a statistical significance test should be used to confirm whether the evidence for extra variation between laboratories is convincing. The “exact test” is the best recommended test for this. The philosophy behind such tests is that the probabilities of occurrence are calculated for all sets of replicate results that could have produced the overall numbers of positives and negatives.

Level	Alternative method			Reference method		
	Accordance	Concordance	COR	Accordance	Concordance	COR
L0	100	100	1,0	100	100	1,0
L1	98	98	1,0	98	98	1,0
L2	100	100	1,0	100	100	1,0

Table 22: COR values for each method by contamination level

3.3.4. AC, SP, SE comparison

Table 23 summarizes the values obtained for AC, SP and SE parameters for the preliminary study and the interlaboratory study.

Parameter	Preliminary study - 24 hours of incubation	Interlaboratory study
AC	100%	100%
SP	100%	100%
SE	100%	99%

Table 23: AC, SP and SE comparison between preliminary and interlaboratory study

The values obtained during the collaborative study are similar to those obtained during the preliminary study.

4. Conclusions

Concerning the comparative study, the performances of the HQS *Cronobacter* test for the detection of *Cronobacter* are similar to those of the ISO/TS 22964.

The study concerned 88 samples of one category of products (dairy products). Values obtained for the 3 criteria are the following:

	Alternative method 24 hours
Relative accuracy	100,0 %
Relative sensitivity	100,0 %
Relative specificity	100,0 %

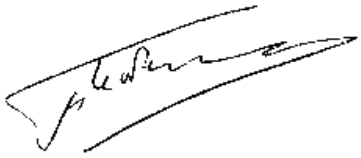
After 24 hours of incubation of the alternative method's broth, no discordant result was observed.

The relative level of detection of the alternative method and the reference method was evaluated. The detection limit obtained with the both methods is between 0.2 and 0.5 CFU in 30 g of product.

The specificity of the method is satisfactory.

Concerning the interlaboratory study, the results obtained for the 12 selected laboratories showed that the values of relative accuracy, relative sensitivity and relative specificity are comparable to those obtained during the preliminary study. The variability of the alternative method, demonstrated by the calculations of accordance, concordance and concordance odds ratio, is similar to that of the reference method.

The study of the practicability of the alternative method shows that the manipulation time is longer than that of the reference method. However negative results are obtained faster (2 days for the alternative method instead of 4 days for the reference method).



Massy, 2015 November 20th
François Le Nestour
Innovation Biology Unit Manager

Appendix 1

Enumeration of mesophilic lactic acid bacteria

Sample	Results (UFC/g)
AC 1	1,1E+05
AC 2	<10
AC 3	1,0E+01
AC 4	<10
AC 5	1,0E+01
AC 6	1,5E+06
AC 7	1,7E+04
AC 8	3,2E+03
AC 9	4,1E+05
AC 10	5,4E+06
AC 11	1,3E+08
AC 12	1,7E+08
AC 13	2,7E+05
AC 14	1,7E+07
AC 15	2,1E+08
AC 16	1,3E+08
AC 17	3,5E+07
AC 18	1,2E+03
AC 19	5,1E+04
AC 20	5,5E+07

Appendix 2 - Stressed bacteria

Numéro d'échantillon	Produit	Code de la souche	Souche	Origine	Traitement	Intensité du stress
RD 2117	Lait demi-écrémé en poudre	ENTB.3.1	*Cronobacter sakazakii subsp sakazakii*	Poudre de lait	20 min à 55°C	0,8
RD 2118	Lait en poudre infantile	ENTB.3.1	*Cronobacter sakazakii subsp sakazakii*	Poudre de lait	20 min à 55°C	0,8
RD 2119	Cantal	ENTB.3.1	*Cronobacter sakazakii subsp sakazakii*	Poudre de lait	20 min à 55°C	0,8
RD 2120	Fromage au lait cru	ENTB.3.2	*Cronobacter sakazakii*	CIP 57.33	20 min à 55°C	1,1
RD 2121	Lait en poudre infantile	ENTB.3.2	*Cronobacter sakazakii*	CIP 57.33	20 min à 55°C	1,1
RD 2122	Lait de croissance	ENTB.3.2	*Cronobacter sakazakii*	CIP 57.33	20 min à 55°C	1,1
RD 2123	Lait en poudre	ENTB.3.21	*Cronobacter muytjensii*	CIP 103581	48 h à pH 3,6	1,6
RD 2124	Lait en poudre pour nourrissons	ENTB.3.21	*Cronobacter muytjensii*	CIP 103581	48 h à pH 3,6	1,6
RD 2125	Emmenthal au lait cru	ENTB.3.21	*Cronobacter muytjensii*	CIP 103581	48 h à pH 3,6	1,6
RD 2126	Yaourt nature	ENTB.3.4	*Cronobacter sakazakii subsp sakazakii*	Institut Pasteur de Lille	15 j à -20°C	0,7
RD 2127	Lait en poudre pour nourrissons	ENTB.3.4	*Cronobacter sakazakii subsp sakazakii*	Institut Pasteur de Lille	15 j à -20°C	0,7
RD 2128	Lait UHT demi-écrémé	ENTB.3.4	*Cronobacter sakazakii subsp sakazakii*	Institut Pasteur de Lille	15 j à -20°C	0,7
RD 2129	Lait concentré	ENTB.3.5	*Cronobacter sakazakii subsp sakazakii*	Institut Pasteur de Lille	20 min à 55°C	1,2
RD 2130	Yaourt aux fruits	ENTB.3.5	*Cronobacter sakazakii subsp sakazakii*	Institut Pasteur de Lille	20 min à 55°C	1,2
RD 2131	Lait demi-écrémé	ENTB.3.5	*Cronobacter sakazakii subsp sakazakii*	Institut Pasteur de Lille	20 min à 55°C	1,2
RD 2144	Lait infantile en poudre	ENTB.3.22	*Cronobacter sakazakii*	CIP 103183 T	15 j à -20°C	0,5
RD 2145	Lait en poudre pour nourrissons	ENTB.3.22	*Cronobacter sakazakii*	CIP 103183 T	15 j à -20°C	0,5
RD 2146	Fromage au lait cru	ENTB.3.22	*Cronobacter sakazakii*	CIP 103183 T	15 j à -20°C	0,5
RD 2147	Lait en poudre pour nourrissons	ENTB.3.23	*Cronobacter sakazakii*	CIP 104951	24 h à pH 2,8	1,8
RD 2148	Lait infantile en poudre	ENTB.3.23	*Cronobacter sakazakii*	CIP 104951	24 h à pH 2,8	1,8
RD 2149	Lait frais pasteurisé entier	ENTB.3.23	*Cronobacter sakazakii*	CIP 104951	24 h à pH 2,8	1,8
RD 2150	Lait en poudre pour nourrissons	ENTB.3.24	*Cronobacter sakazakii*	CIP 104952	10 min à 60°C	2
RD 2151	Lait en poudre écrémé	ENTB.3.24	*Cronobacter sakazakii*	CIP 104952	10 min à 60°C	2
RD 2152	Lait de croissance	ENTB.3.24	*Cronobacter sakazakii*	CIP 104952	10 min à 60°C	2
RD 2153	Lait demi-écrémé en poudre	ENTB.3.6	*Cronobacter sakazakii subsp sakazakii*	Environnement	15 j à -20°C	0,6
RD 2154	Lait fermenté avec L. casei	ENTB.3.6	*Cronobacter sakazakii subsp sakazakii*	Environnement	15 j à -20°C	0,6
RD 2155	Lait frais pasteurisé demi-écrémé	ENTB.3.6	*Cronobacter sakazakii subsp sakazakii*	Environnement	15 j à -20°C	0,6
RD 2156	Lait en poudre hypoantigénique pour nourrissons	ENTB.3.8	*Cronobacter sakazakii*	Lait infantile en poudre	20 min à 55°C	0,9
RD 2157	Yaourt	ENTB.3.8	*Cronobacter sakazakii*	Lait infantile en poudre	20 min à 55°C	0,9
RD 2158	Fromage frais	ENTB.3.8	*Cronobacter sakazakii*	Lait infantile en poudre	20 min à 55°C	0,9
RD 2181	Lait en poudre pour nourrissons	ENTB.3.13	*Cronobacter sakazakii subsp sakazakii*	Environnement industriel	20 min à 55°C	1,2
RD 2182	Lait infantile en poudre	ENTB.3.15	*Cronobacter sakazakii subsp sakazakii*	Environnement industriel	20 min à 55°C	1,1
RD 2183	Lait infantile en poudre	ENTB.3.10	*Cronobacter sakazakii subsp sakazakii*	Environnement industriel	20 min à 55°C	0,5
AC 1	Lait infantile 1 [c]	ENTB.3.7	*Cronobacter spp*	Eau de rivière	10 min à -80°C, 10 min à 59°C	2,8
AC 2	Lait infantile 2 [c]	ENTB.3.12	*Cronobacter spp*	Environnement industriel	10 min à -80°C, 10 min à 59°C	0,7
AC 3	Lait infantile 3 [c]	ENTB.3.32	*Cronobacter spp*	Environnement industrie laitière	10 min à -80°C, 15 min à 59°C	0,5
AC 4	Lait infantile 4 [c]	ENTB.3.28	*Cronobacter spp*	Environnement industrie laitière	10 min à -80°C, 15 min à 59°C	1,0
AC 5	Lait infantile 5 [c]	ENTB.3.51	*Cronobacter turicensis*	ADRIA developpement	10 min à -80°C, 10 min à 59°C	1,9
AC 6	Lait infantile en poudre 6 [c]	ENTB.3.7	*Cronobacter spp*	Eau de rivière	10 min à -80°C, 10 min à 59°C	2,8
AC 7	Lait infantile en poudre 7 [c]	ENTB.3.12	*Cronobacter spp*	Environnement industriel	10 min à -80°C, 10 min à 59°C	0,7
AC 8	Lait infantile en poudre 8 [c]	ENTB.3.32	*Cronobacter spp*	Environnement industrie laitière	10 min à -80°C, 15 min à 59°C	0,5
AC 9	Lait infantile en poudre 9 [c]	ENTB.3.28	*Cronobacter spp*	Environnement industrie laitière	10 min à -80°C, 15 min à 59°C	1,0
AC 10	Lait infantile en poudre 10 [c]	ENTB.3.51	*Cronobacter turicensis*	ADRIA developpement	10 min à -80°C, 10 min à 59°C	1,9
AC 11	Lait infantile en poudre 11 [c]	ENTB.3.11	*Cronobacter spp*	Environnement industriel	10 min à -80°C, 10 min à 59°C	1,6
AC 12	Lait infantile en poudre 12 [c]	ENTB.3.31	*Cronobacter spp*	Environnement industrie laitière	10 min à -80°C, 10 min à 59°C	1,6
AC 13	Lait infantile en poudre 13 [c]	ENTB.3.32	*Cronobacter spp*	Environnement industrie laitière	10 min à -80°C, 15 min à 59°C	0,5
AC 14	Lait infantile en poudre 14 [c]	ENTB.3.33	*Cronobacter spp*	Environnement industrie laitière	10 min à -80°C, 15 min à 59°C	1,5
AC 15	Lait infantile en poudre 15 [c]	ENTB.3.58	*Cronobacter spp*	Proteine pour lait infantile	10 min à -80°C, 15 min à 59°C	1,7
AC 16	Lait infantile 6 [c]	ENTB.3.58	*Cronobacter spp*	Proteine pour lait infantile	10 min à -80°C, 15 min à 59°C	1,7
AC 17	Lait infantile 7 [c]	ENTB.3.11	*Cronobacter spp*	Environnement industriel	10 min à -80°C, 10 min à 59°C	1,6
AC 18	Lait infantile 8 [c]	ENTB.3.31	*Cronobacter spp*	Environnement industrie laitière	10 min à -80°C, 10 min à 59°C	1,6
AC 19	Lait infantile 9 [c]	ENTB.3.32	*Cronobacter spp*	Environnement industrie laitière	10 min à -80°C, 15 min à 59°C	0,5
AC 20	Lait infantile 10 [c]	ENTB.3.33	*Cronobacter spp*	Environnement industrie laitière	10 min à -80°C, 15 min à 59°C	1,5

Appendix 3 - Relative accuracy- Negative samples

Echantillons négatifs

Echantillon	Produit	Taux d'inoculation (UFC/25 ou 30g) a	Méthode alternative			Méthode de référence			MA 24h / MR
			24 heures			ESIA	Confirmation	Résultat final	
			Résultat du test	Confirmation	Résultat final				
RD 2070	Emmenthal au lait cru	/	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2071	Beaufort	/	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2072	Cantal doux	/	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2073	Lait frais pasteurisé demi-écrémé	/	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2074	Lait UHT de croissance	/	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2075	Lait UHT demi-écrémé	/	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2076	Faisselle	/	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2077	Fromage frais au lait entier	/	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2078	Yaourt nature	/	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2079	Yaourt grec	/	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2080	Yaourt à boire	/	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2081	Lait de croissance[c]	/	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2082	Yaourt 0%	/	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2083	Lait en poudre	/	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2084	Lait en poudre pour nourrissons	/	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2085	Lait concentré sucré	/	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2086	Lait en poudre deuxième âge	/	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2087	Lait en poudre infantile	/	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2088	Lait de croissance	/	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2089	Lait demi-écrémé en poudre	/	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2132	Lait infantile en poudre[c]	/	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2133	Lait en poudre hypoallergénique pour nourrissons	/	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2134	Lait en poudre pour nourrissons	/	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2135	Lait en poudre pour nourrissons	/	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2137	Lait demi-écrémé en poudre	/	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2138	Lait en poudre pour nourrissons	/	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2139	Lait infantile en poudre	/	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2140	Lait en poudre pour nourrissons	/	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2141	Lait en poudre écrémé	/	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2142	Lait en poudre hypoantigénique pour nourrissons	/	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2143	Lait demi-écrémé	/	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2146	Fromage au lait cru	1,2	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2149	Lait frais pasteurisé entier	1	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2154	Lait fermenté avec L. casei[c]	1,4	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2159	Lait infantile en poudre reconstitué[b,c]	/	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2184	Poudre de lait	/	-	/	Absence	-	/	Absence	=
RD 2185	Poudre de lait	/	-	/	Absence	-	/	Absence	=

Légende: a: moyenne de 10 dénombrements
b: produit naturellement contaminé en *Enterobacter aerogenes* (colonies non caractéristiques sur ESIA)
=: concordance méthode alternative / méthode de référence
c: lait contenant des probiotiques

Essais de 2014: Echantillons négatifs avec probiotiques

Echantillon	Produit	Taux d'inoculation (UFC/25 ou 30g) a	Méthode alternative				Méthode de référence			MA 24h / MR
			24 heures				ESIA	Confirmation	Résultat final	
			Tm	Résultat du test	Confirmation	Résultat final				
AC 1	Lait infantile 1 c	3	80,6	-	/	Absence	-	/	Absence	=
AC 6	Lait infantile en poudre 6 c	3	79,6	-	/	Absence	-	/	Absence	=
AC 10	Lait infantile en poudre 10 c	3	79,4	-	/	Absence	-	/	Absence	=
	Temoin +		86,7							
	Temoin -		79,4							
AC 11	Lait infantile en poudre 11 c	12	80,2	-	/	Absence	-	/	Absence	=
AC 12	Lait infantile en poudre 12 c	5	85,2	+	-	Absence	-	/	Absence	= (PPNA)
AC 14	Lait infantile en poudre 14 c	3	80	-	-	Absence	-	/	Absence	=
AC 15	Lait infantile en poudre 15 c	3	79,8	-	-	Absence	-	/	Absence	=
	Temoin +		84,4							
	Temoin -		86,2							

Légende: a: moyenne de 10 dénombrements
b: produit naturellement contaminé en *Enterobacter aerogenes* (colonies non caractéristiques sur ESIA)
=: concordance méthode alternative / méthode de référence
c: lait contenant des probiotiques

Appendix 3 - Relative accuracy- Positive samples

Echantillons positifs

Echantillon	Produit	Taux d'inoculation (UFC/25 ou 30g) a	Méthode alternative			Méthode de référence			MA 24h / MR
			24 heures						
			Résultat du test	Confirmation	Résultat final	ESIA	Confirmation	Résultat final	
RD 2117	Lait demi-écrémé en poudre	11,7	+	+	Présence	+	+	Présence	=
RD 2118	Lait en poudre infantile	11,7	+	+	Présence	+	+	Présence	=
RD 2119	Cantal	11,7	+	+	Présence	+	+	Présence	=
RD 2120	Fromage au lait cru	15	+	+	Présence	+	+	Présence	=
RD 2121	Lait en poudre infantile	15	+	+	Présence	+	+	Présence	=
RD 2122	Lait de croissance[c]	15	+	+	Présence	+	+	Présence	=
RD 2123	Lait en poudre	9,3	+	+	Présence	+	+	Présence	=
RD 2124	Lait en poudre pour nourrissons	9,3	+	+	Présence	+	+	Présence	=
RD 2125	Emmenthal au lait cru	9,3	+	+	Présence	+	+	Présence	=
RD 2126	Yaourt nature	13,7	+	+	Présence	+	+	Présence	=
RD 2127	Lait en poudre pour nourrissons	13,7	+	+	Présence	+	+	Présence	=
RD 2128	Lait UHT demi-écrémé	13,7	+	+	Présence	+	+	Présence	=
RD 2129	Lait concentré	11	+	+	Présence	+	+	Présence	=
RD 2130	Yaourt aux fruits	11	+	+	Présence	+	+	Présence	=
RD 2131	Lait demi-écrémé	11	+	+	Présence	+	+	Présence	=
RD 2136	Lait en poudre[b]	/	+	+	Présence	+	+	Présence	=
RD 2144	Lait infantile en poudrec	1,2	+	+	Présence	+	+	Présence	=
RD 2145	Lait en poudre pour nourrissons	1,2	+	+	Présence	+	+	Présence	=
RD 2147	Lait en poudre pour nourrissons	1	+	+	Présence	+	+	Présence	=
RD 2148	Lait infantile en poudre	1	+	+	Présence	+	+	Présence	=
RD 2150	Lait en poudre pour nourrissons[c]	8,6	+	+	Présence	+	+	Présence	=
RD 2151	Lait en poudre écrémé	8,6	+	+	Présence	+	+	Présence	=
RD 2152	Lait de croissance	8,6	+	+	Présence	+	+	Présence	=
RD 2153	Lait demi-écrémé en poudre	1,4	+	+	Présence	+	+	Présence	=
RD 2155	Lait frais pasteurisé demi-écrémé	1,4	+	+	Présence	+	+	Présence	=
RD 2156	Lait en poudre hypoantigénique pour nourrissons	4,5	+	+	Présence	+	+	Présence	=
RD 2157	Yaourt	4,5	+	+	Présence	+	+	Présence	=
RD 2158	Fromage frais	4,5	+	+	Présence	+	+	Présence	=
RD 2181	Lait en poudre pour nourrissons	8,7	+	+	Présence	+	+	Présence	=
RD 2182	Lait infantile en poudre	11	+	+	Présence	+	+	Présence	=
RD 2183	Lait infantile en poudre	7	+	+	Présence	+	+	Présence	=

Légende: a: moyenne de 10 dénombrements
ND: déviation négative
b: produit naturellement contaminé
=: concordance méthode alternative / méthode de référence
c: lait contenant des probiotiques

Essais de 2014: Echantillons positifs avec probiotiques

Echantillon	Produit	Taux d'inoculation (UFC/25 ou 30g) a	Méthode alternative				Méthode de référence			MA 24h / MR
			24 heures							
			Tm	Résultat du test	Confirmation	Résultat final	ESIA	Confirmation	Résultat final	
AC 2	Lait infantile 2 c	3	85,5	+	+	Présence	+	+	Présence	=
AC 3	Lait infantile 3 c	2	84,8	+	+	Présence	+	+	Présence	=
AC 4	Lait infantile 4 c	1	85,2	+	+	Présence	+	+	Présence	=
AC 5	Lait infantile 5 c	3	84,1	+	+	Présence	+	+	Présence	=
AC 7	Lait infantile en poudre 7 c	3	85,2	+	+	Présence	+	+	Présence	=
AC 8	Lait infantile en poudre 8 c	2	84,9	+	+	Présence	+	+	Présence	=
AC 9	Lait infantile en poudre 9 c	1	83,8	+	+	Présence	+	+	Présence	=
	Temoin +		86,7							
	Temoin -		79,4							
AC 16	Lait infantile 6 c	3	85,0	+	+	Présence	+	+	Présence	=
AC 18	Lait infantile 8 c	5	85,2	+	+	Présence	+	+	Présence	=
AC 13	Lait infantile en poudre 13 c	27	86,5	+	+	Présence	+	+	Présence	=
AC 17	Lait infantile 7 c	12	84,3	+	+	Présence	+	+	Présence	=
AC 19	Lait infantile 9 c	27	84,9	+	+	Présence	+	+	Présence	=
AC 20	Lait infantile 10 c	3	85,2	+	+	Présence	+	+	Présence	=
	Temoin +		84,4							
	Temoin -		86,2							

Légende: a: moyenne de 10 dénombrements
ND: déviation négative
b: produit naturellement contaminé
=: concordance méthode alternative / méthode de référence
c: lait contenant des probiotiques

Appendix 4 - AC, SE, SP calculations with LCL

24 heures d'enrichissement														
Catégorie	Type	PA	NA	ND	PD	N	Exactitude relative AC (%)	LCL (%)	N+	Sensibilité relative SE (%)	LCL (%)	N-	Spécificité relative SP (%)	LCL (%)
Produits laitiers	Poudre de lait	22	24	0	0	46								
	Lait	14	9	0	0	23								
	Lait concentré	1	1	0	0	2								
	Yaourt	3	4	0	0	7								
	Fromage	4	6	0	0	10								
	Total	44	44	0	0	88	100	98	44	100	98	44	100	98

PA: accord positif, NA: accord négatif, ND: déviation négative, PD: déviation positive, LCL: limite de confiance inférieure

Appendix 5 - Relative level of detection

Matrice: poudre de lait infantile Souche: ENTB.3.1 - *Cronobacter sakazakii* Flore totale: de 90 à 110 UFC/g

Niveau	Code échantillon	Taux d'inoculation[a] (cellules pour 30 g)	Méthode alternative 24 heures			Méthode de référence			Total
			Résultat du test	Confir-mation	Résultat final	ESIA	Confir-mation	Résultat final	
0[b]	A	0	-	/	Absence	-	/	Absence	MA 24 h : 0 MR: 0
	B		-	/	Absence	-	/	Absence	
	C		-	/	Absence	-	/	Absence	
	D		-	/	Absence	-	/	Absence	
	E		-	/	Absence	-	/	Absence	
	F		-	/	Absence	-	/	Absence	
1[c]	A	0,13	-	/	Absence	-	/	Absence	MA 24 h : 0 MR: 0
	B		-	/	Absence	-	/	Absence	
	C		-	/	Absence	-	/	Absence	
	D		-	/	Absence	-	/	Absence	
	E		-	/	Absence	-	/	Absence	
	F		-	/	Absence	-	/	Absence	
2[c]	A	0,23	-	/	Absence	-	/	Absence	MA 24 h : 2 MR: 2
	B		+	+	Présence	+	+	Présence	
	C		-	/	Absence	-	/	Absence	
	D		-	/	Absence	-	/	Absence	
	E		-	/	Absence	-	/	Absence	
	F		+	+	Présence	+	+	Présence	
3[b]	A	0,36	+	+	Présence	+	+	Présence	MA 24 h : 4 MR: 4
	B		-	/	Absence	-	/	Absence	
	C		+	+	Présence	+	+	Présence	
	D		+	+	Présence	+	+	Présence	
	E		+	+	Présence	+	+	Présence	
	F		-	/	Absence	-	/	Absence	
4[b]	A	0,53	+	+	Présence	+	+	Présence	MA 24 h : 4 MR: 4
	B		+	+	Présence	+	+	Présence	
	C		+	+	Présence	+	+	Présence	
	D		-	/	Absence	-	/	Absence	
	E		-	/	Absence	-	/	Absence	
	F		+	+	Présence	+	+	Présence	
5[b]	A	1,07	+	+	Présence	+	+	Présence	MA 24 h : 6 MR: 6
	B		+	+	Présence	+	+	Présence	
	C		+	+	Présence	+	+	Présence	
	D		+	+	Présence	+	+	Présence	
	E		+	+	Présence	+	+	Présence	
	F		+	+	Présence	+	+	Présence	

Légende:

a: moyenne de 30 dénombrements
b: flore totale de 90 UFC/g
c: flore totale de 110 UFC/g

Appendix 5 - RLoD

Lait infantile en poudre - *Cronobacter sakazakii* ENTB.3.1

Niveau	Taux d'inoculation (cellules / 30 g)	Intervalle de confiance	Méthode	Echantillons négatifs	Echantillons positifs	Total
0	0	-	M.R. (*)	6	0	**6**
			M.A.	6	0	**6**
			Total	**12**	**0**	**12**
1	0,13	[0 ; 1]	M.R. (*)	6	0	**6**
			M.A.	6	0	**6**
			Total	**12**	**0**	**12**
2	0,23	[0 ; 1]	M.R. (*)	4	2	**6**
			M.A.	4	2	**6**
			Total	**8**	**4**	**12**
3	0,36	[0 ; 2]	M.R. (*)	2	4	**6**
			M.A.	2	4	**6**
			Total	**4**	**8**	**12**
4	0,53	[0 ; 2]	M.R. (*)	2	4	**6**
			M.A.	2	4	**6**
			Total	**4**	**8**	**12**
5	1,07	[0 ; 3]	M.R. (*)	0	6	**6**
			M.A.	0	6	**6**
			Total	**0**	**12**	**12**

Appendix 6 - Selectivity

Inclusivity

	Code souche	*Microorganisme*	Origine	Concentration (UFC/225 mL)	Test	Confirmation
1	ENTB.3.1	*Cronobacter sakazakii subsp*	Poudre de lait	36	Positif	positive
2	ENTB.3.2	*Cronobacter sakazakii*	CIP 57.33	32	Positif	positive
3	ENTB.3.3	*Cronobacter sakazakii*	Poudre de lait	25	Positif	positive
4	ENTB.3.4	*Cronobacter sakazakii subsp*	Institut Pasteur de Lille	24	Positif	positive
5	ENTB.3.5	*Cronobacter sakazakii subsp*	Institut Pasteur de Lille	16	Positif	positive
6	ENTB.3.6	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement	14	Positif	positive
7	ENTB.3.7	*Cronobacter sakazakii subsp*	Eau de rivière	19	Positif	positive
8	ENTB.3.8	*Cronobacter sakazakii*	Lait infantile en poudre	33	Positif	positive
9	ENTB.3.10	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement industriel	21	Positif	positive
10	ENTB.3.11	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement industriel	21	Positif	positive
11	ENTB.3.12	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement industriel	25	Positif	positive
12	ENTB.3.13	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement industriel	26	Positif	positive
13	ENTB.3.14	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement industriel	24	Positif	positive
14	ENTB.3.15	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement industriel	36	Positif	positive
15	ENTB.3.16	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement industriel	33	Positif	positive
16	ENTB.3.17	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement industriel	23	Positif	positive
17	ENTB.3.19	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement industriel	28	Positif	positive
18	ENTB.3.20	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement industriel	40	Positif	positive
19	ENTB.3.21	*Cronobacter muytjensii*	CIP 103581	15	Positif	positive
20	ENTB.3.22	*Cronobacter sakazakii*	CIP 103183	26	Positif	positive
21	ENTB.3.23	*Cronobacter sakazakii*	CIP 104951	13	Positif	positive
22	ENTB.3.24	*Cronobacter sakazakii*	CIP 104952	13	Positif	positive
23	ENTB.3.25	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement industriel	74	Positif	positive
24	ENTB.3.26	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement industriel	66	Positif	positive
25	ENTB.3.27	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement industriel	57	Positif	positive
26	ENTB.3.28	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement industriel	93	Positif	positive
27	ENTB.3.29	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement industriel	82	Positif	positive
28	ENTB.3.30	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement industriel	56	Positif	positive
29	ENTB.3.31	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement industriel	67	Positif	positive
30	ENTB.3.32	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement industriel	62	Positif	positive
31	ENTB.3.33	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement industriel	71	Positif	positive
32	ENTB.3.34	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement industriel	56	Positif	positive
33	ENTB.3.35	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement industriel	80	Positif	positive
34	ENTB.3.36	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement industriel	46	Positif	positive
35	ENTB.3.37	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement industriel	37	Positif	positive
36	ENTB.3.38	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement industriel	49	Positif	positive
37	ENTB.3.39	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement industriel	55	Positif	positive
38	ENTB.3.40	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement industriel	13	Positif	positive
39	ENTB.3.41	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement industriel	30	Positif	positive
40	ENTB.3.42	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement industriel	67	Positif	positive
41	ENTB.3.43	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement industriel	56	Positif	positive
42	ENTB.3.44	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement industriel	30	Positif	positive
43	ENTB.3.45	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement industriel	79	Positif	positive
44	ENTB.3.46	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement industriel	48	Positif	positive
45	ENTB.3.47	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement industriel	42	Positif	positive
46	ENTB.3.48	*Cronobacter sakazakii subsp*	Environnement industriel	45	Positif	positive
47	ENTB.3.49	*Cronobactersakazakii*	Industrie laitière	38	Positif	positive
48	ENTB.3.50	*Cronobactersakazakii*	Industrie laitière	36	Positif	positive
49	ENTB.3.51	*Cronobactersakazakii*	Industrie laitière	46	Positif	positive
50	ENTB.3.52	*Cronobactersakazakii*	Industrie laitière	23	Positif	positive

Appendix 6 - Selectivity

Exclusivity

	Code souche	*Microorganisme*	Origine	Concentration (UFC/mL)	Test
1	ENTB.1.1	*Enterobacter aerogenes*	industrie laitière	1,4E+05	Négatif
2	ENTB.1.2	*Enterobacter aerogenes*	CIP 60.86 T	3,4E+05	Négatif
3	ENTB.2.1	*Enterobacter cloacae*	Eaux usagées	5,6E+05	Négatif
4	ENTB.2.2	*Enterobacter cloacae*	Eau de puits	4,8E+05	Négatif
5	ENTC.2.1	*Enterococcus faecium*	industrie laitière	1,5E+04	Négatif
6	ESC.1.3	*Escherichia coli*	industrie laitière	3,6E+05	Négatif
7	ESC.1.5	*Escherichia coli*	Camembert (isol. TBX)	3,7E+05	Négatif
8	HAF.1.1	*Hafnia alvei*	taboulé	7,7E+05	Négatif
9	HAN.1.1	*Hansenula anomala*	industrie laitière	8,9E+04	Négatif
10	LACB.1.1	*Lactobacillus casei*	produit laitier	5,6E+04	Négatif
11	SAL.1.121	*Salmonella enterica Salamae*	Lait cru	3,0E+05	Négatif
12	STA.2.1	*Staphylococcus epidermidis*	produit laitier	2,1E+05	Négatif
13	PSE.1.2	*Pseudomonas aeruginosa*	omelette gruyère	2,2E+05	Négatif
14	PSE.2.2	*Pseudomonas fluorescens*	CIP102127	8,5E+04	Négatif
15	SAL.1.98	*Salmonella enterica Newport*	Fromage au lait cru	4,2E+05	Négatif
16	SAL.1.163	*Salmonella enterica Infantis*	Lait (alim. humaine)	2,3E+05	Négatif
17	SER.1.1	*Serratia ficaria*	CIP 79.23	1,9E+05	Négatif
18	SER.2.1	*Serratia fonticola*	CIP 103580	8,6E+04	Négatif
19	SHI.1.1	*Shigella flexneri*	CIP 82.48T	3,2E+05	Négatif
20	SHI.2.1	*Shigella sonnei*	ATCC 9290	4,2E+05	Négatif
21	ESC.2.1	*Escherichia hermanii*	CIP 103176	4,1E+05	Négatif
22	CIT.1.1	*Citrobacter freundii*	CIP 53.62	1,2E+06	Négatif
23	KLE.2.1	*Klebsiella pneumoniae*	pâtisserie	3,8E+05	Négatif
24	KLE.1.1	*Klebsiella oxytoca*	salade soja	6,7E+05	Négatif
25	SAL.1.6	*Salmonella enterica Arizonae*	Saucisson sec	2,7E+05	Négatif
26	CIT.2.1	*Citrobacter koseri*	CIP 72.11	3,3E+05	Négatif
27	ENTB.4.1	*Enterobacter hormaechei*	CIP 104956	1,6E+05	Négatif
28	ENTB.5.1	*Enterobacter amnigenus*	CIP 104982	2,1E+05	Négatif
29	ENTB.6.1	*Enterobacter gergoviae*	CIP 76.1	3,5E+05	Négatif
30	ENTB.7.1	*Enterobacter nimipressuralis*	CIP 105047	4,8E+05	Négatif
31	ENTB.8.1	*Enterobacter pyrinus*	CIP 104019	1,7E+05	Négatif
32	ENTB.2.3	*Enterobacter cloacae*	CIP 106422	1,2E+05	Négatif

Appendix 7 - Interlaboratory study TVC results

Laboratoire	Résultats du dénombrement (UFC/mL)
A	<10
B	<1
C	<10
D	<10
E	<1
F	<1
G	3*
H	<10
I	<1
J	<10
K	50
L	<10
Expert	<10

*: nombres estimés

Appendix 8 - IL study - Expert lab results

Code	Méthode alternative					Méthode de référence		
	Tm	Résultat PCR	ESIA	Confirmation	Présence / Absence	ESIA	Confirmation	Présence / Absence
ISHA1	86,3	+	+	+	Présence	+	+	Présence
ISHA2	75,2	-	/	/	Absence	-	/	Absence
ISHA3	77,2	-	/	/	Absence	-	/	Absence
ISHA4	85,6	+	+	+	Présence	+	+	Présence
ISHA5	77,3	-	/	/	Absence	-	/	Absence
ISHA6	85,4	+	+	+	Présence	+	+	Présence
ISHA7	77,0	-	+	+	Présence	+	+	Présence
ISHA8	77,4	-	/	/	Absence	-	/	Absence
ISHA9	86,3	+	+	+	Présence	+	+	Présence
ISHA10	85,9	+	+	+	Présence	+	+	Présence
ISHA11	85,5	+	+	+	Présence	+	+	Présence
ISHA12	85,3	+	+	+	Présence	+	+	Présence
ISHA13	85,3	+	+	+	Présence	+	+	Présence
ISHA14	78,0	-	/	/	Absence	-	/	Absence
ISHA15	85,3	+	+	+	Présence	+	+	Présence
ISHA16	85,8	+	+	+	Présence	+	+	Présence
ISHA17	86,3	+	+	+	Présence	+	+	Présence
ISHA18	86,0	+	+	+	Présence	+	+	Présence
ISHA19	77,5	-	/	/	Absence	-	/	Absence
ISHA20	85,4	+	+	+	Présence	+	+	Présence
ISHA21	85,3	+	+	+	Présence	+	+	Présence
ISHA22	85,3	+	+	+	Présence	+	+	Présence
ISHA23	85,3	+	+	+	Présence	+	+	Présence
ISHA24	77,2	-	/	/	Absence	-	/	Absence
Témoin +	85,3	+						
Témoin -	/	-						

Appendix 9 - IL study - Collaborative labs results

Thermocycleur: Applied Biosystems ABI 7000

Code	Méthode alternative					Méthode de référence		
	Tm	Résultat PCR	ESIA	Confirmation	Présence / Absence	ESIA	Confirmation	Présence / Absence
A1	84,8	+	+	+	Présence	+	+	Présence
A2	76,9	-	/	/	Absence	-	/	Absence
A3	85,2*	+	+	+	Présence	+	+	Présence
A4	85,5	+	+	+	Présence	+	+	Présence
A5	75,2	-	/	/	Absence	-	/	Absence
A6	85,2	+	+	+	Présence	+	+	Présence
A7	77,9	-	+	+	Présence	+	+	Présence
A8	77,5	-	/	/	Absence	-	/	Absence
A9	84,8	+	+	+	Présence	+	+	Présence
A10	85,2	+	+	+	Présence	+	+	Présence
A11	85,2	+	+	+	Présence	+	+	Présence
A12	85,2	+	+	+	Présence	+	+	Présence
A13	85,2	+	+	+	Présence	+	+	Présence
A14	77,5	-	/	/	Absence	-	/	Absence
A15	85,2	+	+	+	Présence	+	+	Présence
A16	84,8	+	+	+	Présence	+	+	Présence
A17	84,8	+	+	+	Présence	+	+	Présence
A18	84,8	+	+	+	Présence	+	+	Présence
A19	84,8*	+	+	+	Présence	+	+	Présence
A20	84,8	+	+	+	Présence	+	+	Présence
A21	84,8	+	+	+	Présence	+	+	Présence
A22	84,8	+	+	+	Présence	+	+	Présence
A23	84,8	+	+	+	Présence	+	+	Présence
A24	77,2	-	/	/	Absence	-	/	Absence
Témoin +	85,0	+						
Témoin -	77,0	-						

*: résultat douteux, Ct faible

Thermocycleur: Applied Biosystems ABI 7500

Code	Méthode alternative					Méthode de référence		
	Tm	Résultat PCR	ESIA	Confirmation	Présence / Absence	ESIA	Confirmation	Présence / Absence
B1	84,2	+	+	+	Présence	+	+	Présence
B2	76,7	-	/	/	Absence	/	/	Absence
B3	77,0	-	/	/	Absence	/	/	Absence
B4	84,2	+	+	+	Présence	+	+	Présence
B5	77,3	-	/	/	Absence	/	/	Absence
B6	84,6	+	+	+	Présence	+	+	Présence
B7	77,0	-	/	/	Absence	/	/	Absence
B8	76,6	-	/	/	Absence	/	/	Absence
B9	84,5	+	+	+	Présence	+	+	Présence
B10	84,6	+	+	+	Présence	+	+	Présence
B11	84,8	+	+	+	Présence	+	+	Présence
B12	84,8	+	+	+	Présence	+	+	Présence
B13	84,9	+	+	+	Présence	+	+	Présence
B14	77,3	-	/	/	Absence	/	/	Absence
B15	84,7	+	+	+	Présence	+	+	Présence
B16	84,5	+	+	+	Présence	+	+	Présence
B17	84,5	+	+	+	Présence	+	+	Présence
B18	84,8	+	+	+	Présence	+	+	Présence
B19	77,3	-	/	/	Absence	/	/	Absence
B20	84,8	+	+	+	Présence	+	+	Présence
B21	84,9	+	+	+	Présence	+	+	Présence
B22	84,9	+	+	+	Présence	+	+	Présence
B23	84,7	+	+	+	Présence	+	+	Présence
B24	77,0	-	/	/	Absence	/	/	Absence
Témoin +	84,4	+						
Témoin -	77,0	-						

Thermocycleur: Applied Biosystems ABI 7500

Code	Méthode alternative					Méthode de référence		
	Tm	Résultat PCR	ESIA	Confirmation	Présence / Absence	ESIA	Confirmation	Présence / Absence
C1	84,5	+	+	+	Présence	+	+	Présence
C2	76,7	-	/	/	Absence	/	/	Absence
C3	77,1	-	/	/	Absence	/	/	Absence
C4	84,8	+	+	+	Présence	+	+	Présence
C5	77,1	-	/	/	Absence	/	/	Absence
C6	84,8	+	+	+	Présence	+	+	Présence
C7	77,1	-	/	/	Absence	/	/	Absence
C8	76,8	-	/	/	Absence	/	/	Absence
C9	84,5	+	+	+	Présence	+	+	Présence
C10	84,8	+	+	+	Présence	+	+	Présence
C11	84,8	+	+	+	Présence	+	+	Présence
C12	84,8	+	+	+	Présence	+	+	Présence
C13	84,1	+	+	+	Présence	+	+	Présence
C14	76,7	-	/	/	Absence	/	/	Absence
C15	84,8	+	+	+	Présence	+	+	Présence
C16	84,5	+	+	+	Présence	+	+	Présence
C17	84,5	+	+	+	Présence	+	+	Présence
C18	84,8	+	+	+	Présence	+	+	Présence
C19	77,3	-	/	/	Absence	/	/	Absence
C20	84,8	+	+	+	Présence	+	+	Présence
C21	84,9	+	+	+	Présence	+	+	Présence
C22	84,9	+	+	+	Présence	+	+	Présence
C23	84,7	+	+	+	Présence	+	+	Présence
C24	77,0	-	/	/	Absence	/	/	Absence
Témoin +	Non renseigné							
Témoin -	Non renseigné							

Thermocycleur: Applied Biosystems ABI 7500

Code	Méthode alternative					Méthode de référence		
	Tm	Résultat PCR	ESIA	Confirmation	Présence / Absence	ESIA	Confirmation	Présence / Absence
D1	84,4	+	+	+	Présence	+	+	Présence
D2	76,3	-	/	/	Absence	/	/	Absence
D3	77,4	-	/	/	Absence	/	/	Absence
D4	85,0	+	+	+	Présence	+	+	Présence
D5	76,6	-	/	/	Absence	/	/	Absence
D6	84,7	+	+	+	Présence	+	+	Présence
D7	76,6	-	/	/	Absence	/	/	Absence
D8	76,8	-	/	/	Absence	/	/	Absence
D9	84,7	+	+	+	Présence	+	+	Présence
D10	84,7	+	+	+	Présence	+	+	Présence
D11	84,7	+	+	+	Présence	+	+	Présence
D12	85,0	+	+	+	Présence	+	+	Présence
D13	85,0	+	+	+	Présence	+	+	Présence
D14	76,0	-	/	/	Absence	/	/	Absence
D15	84,7	+	+	+	Présence	+	+	Présence
D16	84,7	+	+	+	Présence	+	+	Présence
D17	84,7	+	+	+	Présence	+	+	Présence
D18	84,7	+	+	+	Présence	+	+	Présence
D19	77,4	-	/	/	Absence	/	/	Absence
D20	77,4	-	/	/	Absence	/	/	Absence
D21	85,0	+	+	+	Présence	+	+	Présence
D22	84,7	+	+	+	Présence	+	+	Présence
D23	84,7	+	+	+	Présence	+	+	Présence
D24	76,8	-	/	/	Absence	/	/	Absence
Témoin +	84,7	+						
Témoin -	77,1	-						

Thermocycleur: Eppendorf Realplex

Code	Méthode alternative					Méthode de référence		
	Tm	Résultat PCR	ESIA	Confirmation	Présence / Absence	ESIA	Confirmation	Présence / Absence
E1	86,1	+	+	+	Présence	+	+	Présence
E2	79,0	-	/	/	Absence	/	/	Absence
E3	84,0	+	-	/	Absence	/	/	Absence
E4	85,0	+	+	+	Présence	+	+	Présence
E5	84,0	+	-	/	Absence	/	/	Absence
E6	85,3	+	+	+	Présence	+	+	Présence
E7	78,0	-	/	/	Absence	/	/	Absence
E8	83,0	+	-	/	Absence	/	/	Absence
E9	85,8	+	+	+	Présence	+	+	Présence
E10	85,2	+	+	+	Présence	+	+	Présence
E11	85,0	+	+	+	Présence	+	+	Présence
E12	85,0	+	+	+	Présence	+	+	Présence
E13	84,9	+	+	+	Présence	+	+	Présence
E14	78,0	-	/	/	Absence	/	/	Absence
E15	84,9	+	+	+	Présence	+	+	Présence
E16	85,1	+	+	+	Présence	+	+	Présence
E17	85,6	+	+	+	Présence	+	+	Présence
E18	85,6	+	+	+	Présence	+	+	Présence
E19	77,0	-	/	/	Absence	/	/	Absence
E20	85,0	+	-	/	Absence	/	/	Absence
E21	85,1	+	+	+	Présence	+	+	Présence
E22	85,0	+	+	+	Présence	+	+	Présence
E23	85,4	+	+	+	Présence	+	+	Présence
E24	78,0	-	/	/	Absence	/	/	Absence
Témoin +	86,2	+						
Témoin -	78,0	-						

Thermocycleur: Applied Biosystems ABI 7500

Code	Méthode alternative					Méthode de référence		
	Tm	Résultat PCR	ESIA	Confirmation	Présence / Absence	ESIA	Confirmation	Présence / Absence
F1	84,5	+	+	+	Présence	+	+	Présence
F2	76,9	-	/	/	Absence	/	/	Absence
F3	77,2	-	/	/	Absence	/	/	Absence
F4	84,8	+	+	+	Présence	+	+	Présence
F5	77,2	-	/	/	Absence	/	/	Absence
F6	84,5	+	+	+	Présence	+	+	Présence
F7	76,9	-	/	/	Absence	/	/	Absence
F8	76,6	-	/	/	Absence	/	/	Absence
F9	84,5	+	+	+	Présence	+	+	Présence
F10	84,8	+	+	+	Présence	+	+	Présence
F11	84,8	+	+	+	Présence	+	+	Présence
F12	85,1	+	+	+	Présence	+	+	Présence
F13	85,1	+	+	+	Présence	+	+	Présence
F14	77,2	-	/	/	Absence	/	/	Absence
F15	84,5	+	+	+	Présence	+	+	Présence
F16	84,2	+	+	+	Présence	+	+	Présence
F17	84,5	+	+	+	Présence	+	+	Présence
F18	84,8	+	+	+	Présence	+	+	Présence
F19	77,5	-	/	/	Absence	/	/	Absence
F20	85,1	+	+	+	Présence	+	+	Présence
F21	85,1	+	+	+	Présence	+	+	Présence
F22	84,8	+	+	+	Présence	+	+	Présence
F23	84,5	+	+	+	Présence	+	+	Présence
F24	77,0	-	/	/	Absence	/	/	Absence
Témoin +	84,8	+						
Témoin -	76,9	-						

Thermocycleur: Applied Biosystems ABI 7300

Code	Méthode alternative					Méthode de référence		
	Tm	Résultat PCR	ESIA	Confirmation	Présence / Absence	ESIA	Confirmation	Présence / Absence
G1	84,5	+	+	+	Présence	+	+	Présence
G2	/	-	/	/	Absence	/	/	Absence
G3	/	-	/	/	Absence	/	/	Absence
G4	84,5	+	+	+	Présence	+	+	Présence
G5	/	-	/	/	Absence	/	/	Absence
G6	84,6	+	+	+	Présence	+	+	Présence
G7	/	-	/	/	Absence	/	/	Absence
G8	/	-	/	/	Absence	/	/	Absence
G9	84,6	+	+	+	Présence	+	+	Présence
G10	84,6	+	+	+	Présence	+	+	Présence
G11	84,7	+	+	+	Présence	+	+	Présence
G12	84,7	+	+	+	Présence	+	+	Présence
G13	84,5	+	+	+	Présence	+	+	Présence
G14	/	-	/	/	Absence	/	/	Absence
G15	84,6	+	+	+	Présence	+	+	Présence
G16	84,5	+	+	+	Présence	+	+	Présence
G17	84,5	+	+	+	Présence	+	+	Présence
G18	84,5	+	+	+	Présence	+	+	Présence
G19	/	-	/	/	Absence	/	/	Absence
G20	84,5	+	+	+	Présence	+	+	Présence
G21	84,5	+	+	+	Présence	+	+	Présence
G22	84,5	+	+	+	Présence	+	+	Présence
G23	84,4	+	+	+	Présence	+	+	Présence
G24	/	-	/	/	Absence	/	/	Absence
Témoin +	84,5	+						
Témoin -	/	-						

Thermocycleur: Applied Biosystems ABI 7500

Code	Méthode alternative					Méthode de référence		
	Tm	Résultat PCR	ESIA	Confirmation	Présence / Absence	ESIA	Confirmation	Présence / Absence
H1	84,7	+	+	+	Présence	+	+	Présence
H2	77,3	-	/	/	Absence	/	/	Absence
H3	77,3	-	/	/	Absence	/	/	Absence
H4	84,7	+	+	+	Présence	+	+	Présence
H5	77,0	-	/	/	Absence	/	/	Absence
H6	84,4	+	+	+	Présence	+	+	Présence
H7	77,3	-	/	/	Absence	/	/	Absence
H8	77,3	-	/	/	Absence	/	/	Absence
H9	85,0	+	+	+	Présence	+	+	Présence
H10	85,0	+	+	+	Présence	+	+	Présence
H11	84,7	+	+	+	Présence	+	+	Présence
H12	84,7	+	+	+	Présence	+	+	Présence
H13	84,7	+	+	+	Présence	+	+	Présence
H14	77,0	-	/	/	Absence	/	/	Absence
H15	84,7	+	+	+	Présence	+	+	Présence
H16	85,0	+	+	+	Présence	+	+	Présence
H17	85,0	+	+	+	Présence	+	+	Présence
H18	85,0	+	+	+	Présence	+	+	Présence
H19	77,3	-	/	/	Absence	/	/	Absence
H20	84,7	+	+	+	Présence	+	+	Présence
H21	84,7	+	+	+	Présence	+	+	Présence
H22	84,7	+	+	+	Présence	+	+	Présence
H23	84,7	+	+	+	Présence	+	+	Présence
H24	77,3	-	/	/	Absence	/	/	Absence
Témoin +	84,4	+						
Témoin -	77,3	-						

Thermocycleur: Applied Biosystems ABI 7500

Code	Méthode alternative					Méthode de référence		
	Tm	Résultat PCR	ESIA	Confirmation	Présence / Absence	ESIA	Confirmation	Présence / Absence
I1	84,4	+	+	+	Présence	+	+	Présence
I2	/	-	/	/	Absence	/	/	Absence
I3	/	-	/	/	Absence	/	/	Absence
I4	85,1	+	+	+	Présence	+	+	Présence
I5	/	-	/	/	Absence	/	/	Absence
I6	85,1	+	+	+	Présence	+	+	Présence
I7	/	-	/	/	Absence	/	/	Absence
I8	/	-	/	/	Absence	/	/	Absence
I9	84,4	+	+	+	Présence	+	+	Présence
I10	84,7	+	+	+	Présence	+	+	Présence
I11	84,7	+	+	+	Présence	+	+	Présence
I12	85,1	+	+	+	Présence	+	+	Présence
I13	85,1	+	+	+	Présence	+	+	Présence
I14	/	-	/	/	Absence	/	/	Absence
I15	84,7	+	+	+	Présence	+	+	Présence
I16	84,4	+	+	+	Présence	+	+	Présence
I17	84,4	+	+	+	Présence	+	+	Présence
I18	84,7	+	+	+	Présence	+	+	Présence
I19	/	-	/	/	Absence	/	/	Absence
I20	85,1	+	+	+	Présence	+	+	Présence
I21	85,1	+	+	+	Présence	+	+	Présence
I22	84,7	+	+	+	Présence	+	+	Présence
I23	84,7	+	+	+	Présence	+	+	Présence
I24	/	-	/	/	Absence	/	/	Absence
Témoin +	84,6	+						
Témoin -	/	-						

Thermocycleur: Applied Biosystems ABI 7500

Code	Méthode alternative					Méthode de référence		
	Tm	Résultat PCR	ESIA	Confirmation	Présence / Absence	ESIA	Confirmation	Présence / Absence
J1	84,3	+	+	+	Présence	+	+	Présence
J2	77,0	-	/	/	Absence	/	/	Absence
J3	72,6	-	/	/	Absence	/	/	Absence
J4	85,0	+	+	+	Présence	+	+	Présence
J5	77,4	-	/	/	Absence	/	/	Absence
J6	84,6	+	+	+	Présence	+	+	Présence
J7	84,6	-	/	/	Absence	/	/	Absence
J8	77,0	-	/	/	Absence	/	/	Absence
J9	84,6	+	+	+	Présence	+	+	Présence
J10	84,6	+	+	+	Présence	+	+	Présence
J11	85,0	+	+	+	Présence	+	+	Présence
J12	85,0	+	+	+	Présence	+	+	Présence
J13	85,0	+	+	+	Présence	+	+	Présence
J14	77,3	-	/	/	Absence	/	/	Absence
J15	84,6	+	+	+	Présence	+	+	Présence
J16	84,6	+	+	+	Présence	+	+	Présence
J17	84,6	+	+	+	Présence	+	+	Présence
J18	84,6	+	+	+	Présence	+	+	Présence
J19	85,0	+	-	/	Absence	/	/	Absence
J20	85,0	+	+	+	Présence	+	+	Présence
J21	85,0	+	+	+	Présence	+	+	Présence
J22	85,0	+	+	+	Présence	+	+	Présence
J23	84,6	+	+	+	Présence	+	+	Présence
J24	77,6	-	/	/	Absence	/	/	Absence
Témoin +	Non renseigné							
Témoin -	Non renseigné							

Thermocycleur: Applied Biosystems ABI 7300

Code	Méthode alternative					Méthode de référence		
	Tm	Résultat PCR	ESIA	Confirmation	Présence / Absence	ESIA	Confirmation	Présence / Absence
K1	84,1	+	+	+	Présence	+	+	Présence
K2	82,3	-	/	/	Absence	/	/	Absence
K3	77,2	-	/	/	Absence	/	/	Absence
K4	84,7	+	+	+	Présence	+	+	Présence
K5	84,7	+	-	/	Absence	/	/	Absence
K6	84,4	+	+	+	Présence	+	+	Présence
K7	76,9	-	/	/	Absence	/	/	Absence
K8	76,9	-	/	/	Absence	/	/	Absence
K9	84,5	+	+	+	Présence	+	+	Présence
K10	84,5	+	+	+	Présence	+	+	Présence
K11	84,9	+	+	+	Présence	+	+	Présence
K12	84,9	+	+	+	Présence	+	+	Présence
K13	84,9	+	+	+	Présence	+	+	Présence
K14	85,1	+	-	/	Absence	/	/	Absence
K15	84,5	+	+	+	Présence	+	+	Présence
K16	84,2	+	+	+	Présence	+	+	Présence
K17	84,5	+	+	+	Présence	+	+	Présence
K18	84,9	+	+	+	Présence	+	+	Présence
K19	84,9	+	-	/	Absence	/	/	Absence
K20	84,9	+	+	+	Présence	+	+	Présence
K21	84,9	+	+	+	Présence	+	+	Présence
K22	84,9	+	+	+	Présence	+	+	Présence
K23	84,5	+	+	+	Présence	+	+	Présence
K24	84,5	+	-	/	Absence	/	/	Absence
Témoin +	84,5	+						
Témoin -	76,7	-						

Thermocycleur: Applied Biosystems ABI 7300

Code	Méthode alternative					Méthode de référence		
	Tm	Résultat PCR	ESIA	Confirmation	Présence / Absence	ESIA	Confirmation	Présence / Absence
L1	84,9	+	+	+	Présence	+	+	Présence
L2	77,0	-	/	/	Absence	/	/	Absence
L3	77,0	-	/	/	Absence	/	/	Absence
L4	84,9	+	+	+	Présence	+	+	Présence
L5	77,0	-	/	/	Absence	/	/	Absence
L6	84,9	+	+	+	Présence	+	+	Présence
L7	77,0	-	/	/	Absence	/	/	Absence
L8	77,0	-	/	/	Absence	/	/	Absence
L9	84,9	+	+	+	Présence	+	+	Présence
L10	84,9	+	+	+	Présence	+	+	Présence
L11	84,9	+	+	+	Présence	+	+	Présence
L12	84,9	+	+	+	Présence	+	+	Présence
L13	84,9	+	+	+	Présence	+	+	Présence
L14	77,0	-	/	/	Absence	/	/	Absence
L15	84,9	+	+	+	Présence	+	+	Présence
L16	84,9	+	+	+	Présence	+	+	Présence
L17	84,9	+	+	+	Présence	+	+	Présence
L18	84,9	+	+	+	Présence	+	+	Présence
L19	77,0	-	/	/	Absence	/	/	Absence
L20	84,9	+	+	+	Présence	+	+	Présence
L21	84,9	+	+	+	Présence	+	+	Présence
L22	84,9	+	+	+	Présence	+	+	Présence
L23	84,9	+	+	+	Présence	+	+	Présence
L24	77,0	-	/	/	Absence	/	/	Absence
Témoin +	Non renseigné							
Témoin -	Non renseigné							

Appendix 10 - Accordance calculation

Méthode alternative Nombre de réplicats: 8

Niveau L0

Laboratoire	Nombre de positifs	Probabilité de positifs	Probabilité de paires de positifs	Probabilité de négatifs	Probabilité de paires de négatifs	Probabilité de paires de résultats identiques
B	0	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000
C	0	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000
D	0	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000
E	0	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000
F	0	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000
G	0	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000
H	0	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000
I	0	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000
J	0	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000
K	0	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000
L	0	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000
Moyenne						100,0%

Niveau L1

Laboratoire	Nombre de positifs	Probabilité de positifs	Probabilité de paires de positifs	Probabilité de négatifs	Probabilité de paires de négatifs	Probabilité de paires de résultats identiques
B	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
C	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
D	7	0,875	0,766	0,125	0,016	0,781
E	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
F	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
G	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
H	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
I	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
J	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
K	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
L	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
Moyenne						98,0%

Niveau L2

Laboratoire	Nombre de positifs	Probabilité de positifs	Probabilité de paires de positifs	Probabilité de négatifs	Probabilité de paires de négatifs	Probabilité de paires de résultats identiques
B	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
C	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
D	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
E	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
F	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
G	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
H	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
I	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
J	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
K	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
L	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
Moyenne						100,0%

Méthode de référence Nombre de réplicats: 8

Niveau L0

Laboratoire	Nombre de positifs	Probabilité de positifs	Probabilité de paires de positifs	Probabilité de négatifs	Probabilité de paires de négatifs	Probabilité de paires de résultats identiques
B	0	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000
C	0	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000
D	0	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000
E	0	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000
F	0	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000
G	0	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000
H	0	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000
I	0	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000
J	0	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000
K	0	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000
L	0	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000
Moyenne						100,0%

Niveau L1

Laboratoire	Nombre de positifs	Probabilité de positifs	Probabilité de paires de positifs	Probabilité de négatifs	Probabilité de paires de négatifs	Probabilité de paires de résultats identiques
B	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
C	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
D	7	0,875	0,766	0,125	0,016	0,781
E	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
F	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
G	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
H	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
I	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
J	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
K	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
L	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
Moyenne						98,0%

Niveau L2

Laboratoire	Nombre de positifs	Probabilité de positifs	Probabilité de paires de positifs	Probabilité de négatifs	Probabilité de paires de négatifs	Probabilité de paires de résultats identiques
B	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
C	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
D	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
E	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
F	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
G	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
H	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
I	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
J	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
K	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
L	8	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000
Moyenne						100,0%

Appendix 11 - Concordance calculation

Méthode alternative

Niveau L0

Laboratoire	Nombre de négatifs	Paires interlaboratoires avec le même résultat	Nombre total de paires interlaboratoires
B	8	640	640
C	8	640	640
D	8	640	640
E	8	640	640
F	8	640	640
G	8	640	640
H	8	640	640
I	8	640	640
J	8	640	640
K	8	640	640
L	8	640	640
Total		7040	7040
Concordance		100,0%	

Niveau L1

Laboratoire	Nombre de positifs	Paires interlaboratoires avec le même résultat	Nombre total de paires interlaboratoires
B	8	632	640
C	7	632	640
D	8	560	640
E	8	632	640
F	8	632	640
G	8	632	640
H	8	632	640
I	8	632	640
J	8	632	640
K	8	632	640
L	8	632	640
Total		6880	7040
Concordance		97,7%	

Niveau L2

Laboratoire	Nombre de positifs	Paires interlaboratoires avec le même résultat	Nombre total de paires interlaboratoires
B	8	640	640
C	8	640	640
D	8	640	640
E	8	640	640
F	8	640	640
G	8	640	640
H	8	640	640
I	8	640	640
J	8	640	640
K	8	640	640
L	8	640	640
Total		7040	7040
Concordance		100,0%	

Méthode de référence

Niveau L0

Laboratoire	Nombre de négatifs	Paires interlaboratoires avec le même résultat	Nombre total de paires interlaboratoires
B	8	640	640
C	8	640	640
D	8	640	640
E	8	640	640
F	8	640	640
G	8	640	640
H	8	640	640
I	8	640	640
J	8	640	640
K	8	640	640
L	8	640	640
Total		7040	7040
Concordance		100,0%	

Niveau L1

Laboratoire	Nombre de positifs	Paires interlaboratoires avec le même résultat	Nombre total de paires interlaboratoires
B	8	632	640
C	7	632	640
D	8	560	640
E	7	632	640
F	8	632	640
G	7	632	640
H	8	632	640
I	8	632	640
J	7	632	640
K	8	632	640
L	7	632	640
Total		6880	7040
Concordance		97,7%	

Niveau L2

Laboratoire	Nombre de positifs	Paires interlaboratoires avec le même résultat	Nombre total de paires interlaboratoires
B	8	640	640
C	8	640	640
D	8	640	640
E	8	640	640
F	8	640	640
G	8	640	640
H	8	640	640
I	8	640	640
J	8	640	640
K	8	640	640
L	8	640	640
Total		7040	7040
Concordance		100,0%	