



Departamento de Posgrados

Maestría en Gestión de la Calidad y Seguridad Alimentaria

Versión III

**“Acumulación de antibióticos en pollo faenado de expendio
en el mercado mayorista de la ciudad de Cuenca”**

Trabajo de graduación previo la obtención del título de:

“Magister en Gestión de la Calidad y Seguridad Alimentaria”

Autor: Lcdo. Juan Andrés Pacheco Coronel

Director: Dr. Marco Lazo Vélez

Cuenca – Ecuador

2017

DEDICATORIA

El presente trabajo está
dedicado a mi familia y amigos
por su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Marco Lazo Vélez, Director del presente trabajo, por brindarme su guía y conocimiento.

A la Ing. María Fernanda Rosales por su apoyo y colaboración para llevar a cabo la parte experimental.

A la Dra. Diana Chalco Quezada por la guía y colaboración para reforzar el presente trabajo.

A mis compañeros Javier y Jessica por su total soporte.

RESUMEN

El consumo de pollo ha crecido exponencialmente en los últimos años. El uso de antibióticos y agentes promotores de crecimiento son necesarios durante la producción de pollos para consumo humano. Sin embargo, su aplicación es indiscriminada. Del total de la muestra de pollo faenado de expendio en el mercado mayorista de la ciudad de Cuenca un 94 % y 100% fueron positivas para el kit cualitativo "Premi test" y la metodología Kirby-Bauer modificada, respectivamente. Esto afecta la calidad e inocuidad del alimento. Es importante desarrollar más estudios sobre este tema en el Ecuador para determinar una legislación en base a estos.

PALABRAS CLAVE:

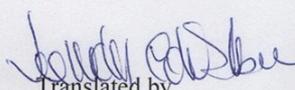
Residuos, antibióticos, pollo, Premi test, Kirby-Bauer.

ABSTRACT

Chicken consumption has grown exponentially in recent years. The use of antibiotics and growth promoting agents are necessary during the production of chicken for human consumption; however, its application is indiscriminate. Of the total sample of chicken slaughtered for sale in the wholesale market in Cuenca, 94% and 100% of them were positive for the Premi-test qualitative kit, and for the modified Kirby-Bauer method, respectively. This affects the quality and safety of the food. Hence, it is important to develop in Ecuador further studies on this topic, in order to establish legislation based on this situation.

KEYWORDS: waste, antibiotics, chicken, Premi test, Kirby-Bauer.


UNIVERSIDAD DEL
AZUAY
Dpto. Idiomas


Translated by
Lic. Lourdes Crespo

INDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT	v
INDICE DE CONTENIDO.....	vi
INDICE DE TABLAS	vii
INDICE DE FIGURAS	viii
1. INTRODUCCION.....	1
2. CAPÍTULO 1: MATERIALES Y MÉTODO	4
2.1 Muestra.....	4
2.2 Preparación de la Muestra.....	4
2.3 Ensayo con el kit Premi test.....	5
2.4 Ensayo de sensibilidad de antibióticos	5
3. CAPÍTULO 2: RESULTADOS	7
4. CAPÍTULO 3: DISCUSIÓN	11
4.1 Premi test.....	11
4.2 Kirby-Bauer.....	13
5. CONCLUSION.....	14
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	15
7. ANEXOS	17
7.1 Instrucciones del Kit.....	17
7.2 Límites de detección.....	19
7.3 Validación del Kit Premi test.....	22

INDICE DE TABLAS

Tabla N° 1: Resultados de Acumulación de antibióticos en pollo faenado de expendio en Cuenca usando Premi test 8

Tabla N° 2: Resultados de presencia de antibióticos en pollo faenado de expendio en Cuenca usando la metodología de Kirby-Bauer 8

INDICE DE FIGURAS

Figura N° 1: Esquema de metodología usada con Premi test.	6
Figura N° 2: Resultados por proveedor.	7
Figura N° 3: Crecimiento de halos por proveedor.	9
Figura N° 4: Resultados de presencia de antibióticos en caldo de pollo..	10
Figura N° 5: Comparativa con estudios similares.	12

Juan Andrés Pacheco Coronel
Trabajo de graduación
Ing. Marco Antonio Lazo Vélez, PhD.
Mayo, 2017

“DETECCION DE RESIDUOS ANTIBIOTICOS EN POLLO FAENADO USANDO PREMITEST”

INTRODUCCION

El consumo de pollo ha crecido exponencialmente en los últimos años, tanto es así, que hoy en día es la carne que más se produce a nivel mundial. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) Los datos para el año 2014 reflejaron una producción de 108,7 millones de TN, superando a otras carnes como la de bovino (68 millones de TN). Por otra parte, El Servicio Ecuatoriano de Normalización (INEC) en un censo realizado a supermercados, tiendas, abarroterías y tercenas, demostró que la carne de mayor consumo en el Ecuador es la de pollo, con 32 kg per cápita, seguida por la del cuy con 25,42 kg y la bovina con 16,87 kg, (Boari et al., 2013). Además, la Encuesta Nacional Salud y Nutrición determinó que el mayor aporte de proteínas en la población ecuatoriana provenía principalmente de dos productos, el pollo (18.2%) y el arroz (19.2%) (Freire et al., 2014).

En Ecuador la entidad encargada de regular y controlar la inocuidad de la producción avícola es Agrocalidad. Ésta ha determinado ciertos controles para los tipos de antibióticos que se comercian en los diversos lugares de expendio veterinario, pero no hay una especificación sobre la dosificación y la administración de estos antibióticos para los animales de la granja.

Si bien el uso de antibióticos en animales es tan necesario como en los seres humanos, estos deben ser usados con criterio, para asegurar sus beneficios y no causar efectos indeseables o efectos que alteren de manera indirecta a la inmunidad del consumidor. Si estos medicamentos se utilizan de manera indiscriminada se podría ocasionar un grave problema de salud pública. Actualmente varias organizaciones mundiales de salud reconocen este, como uno de los mayores desafíos médicos del siglo XXI (Laxminarayan, 2013). Algunas de las causas como el sobre uso de los mismos para tratar infecciones no bacterianas es bien conocido. Sin embargo, la relación entre resistencias bacterianas en humanos y el uso de antibióticos en animales de consumo, es una cuestión en debate.

Los antibióticos utilizados a dosis terapéuticas, durante una infección específica y en animales individuales tienen como fin el control de la enfermedad y el control de la formación de cepas bacterianas resistentes. Las cepas resistentes que pueden formarse, generalmente son destruidas gracias a la acción competitiva de cepas antibiótico susceptibles del comensal ya en estado de normalidad.

Sin embargo, los antibióticos, se utilizan de una manera generalizada y a dosis sub-terapéuticas, dando lugar a la formación de bacterias resistentes. De esta manera se produce un desbalance ecológico y cada animal se comporta como una fábrica productora de genes bacterianos resistentes al antibiótico que reciben, favoreciendo de esta manera, el desarrollo y la propagación de los mismos (Levy y Marshal, 2004). El uso prolongado de Agentes Promotores de Crecimiento, (APC) también se relaciona con la generación de organismos multi-droga resistentes (MDR), los cuales incluyen resistencias a antibióticos a los que nunca han sido expuestos (Alexander et al 2008). Así mismo se han encontrado resistencias inherentes (tetraciclina, eritromicina y ampicilina) en animales nunca expuestos a antibióticos. Este hecho se ha relacionado con factores como la dieta, la edad del animal, el lugar de la crianza y condiciones ambientales (Berge et al., 2005).

La propagación de resistencias entre animales y humanos puede darse por diferentes vías, por contacto directo, pero también existen estudios que demuestran la propagación de la resistencia bacteriana por vía indirecta, a través de la ingesta de productos animales, esto es un asunto de interés general por su gran alcance y complejidad. Existe evidencia y estudios que documentan la presencia de abundante cantidad de bacterias resistentes en animales de granja y en carne de pescado de consumo (Cabello, 2006). Sin embargo, demostrar que esta presencia representa un riesgo para los humanos es un asunto más complejo. De manera indirecta Sorensen et al. demostró este potencial riesgo al comprobar la presencia de *Enterococcus faecium* resistentes a glicopeptidos en las heces de humanos tras 14 días de haber comido pollo o cerdo colonizados con estas bacterias (Sorensen et al., 2001).

Estudios cronológicos de incremento en resistencias bacterianas en diferentes poblaciones se correlacionan con la presencia de animales colonizados que actúan como reservorios. En Estados Unidos, España y Holanda, se documentó la relación temporal entre la introducción del tratamiento con fluoroquinolonas en pollos y la presencia de infecciones por *Campylobacter* resistentes a quinolonas en humanos (Smith, 1999). Incluso se cree que la epidemia de *Vibrio cholerae* multiresistente, en Latinoamérica en 1992, se relacionó con la ingesta de camarones colonizados con cepas bacterianas resistentes provenientes de

Ecuador, debido a la gran cantidad de antibióticos utilizados en esta industria (Weber et al., 1994).

Varias han sido las metodologías propuestas para la detección y valoración de los antibióticos en la carne de aves. Una de las más rápidas y sencillas es el kit cualitativo Premi test que se basa en la inhibición del *Bacillus stearothermophilus*, ultrasensible a la mayoría de antibióticos. Cuando se introduce el jugo de la carne y se realiza el ensayo, las esporas del bacillus se encuentran con un medio de agar rico en nutrientes. Si la muestra no contiene antibióticos, las esporas germinan produciendo un ácido que cambia de color violeta a color amarillo. En el caso de que la muestra contenga antibióticos, dichas esporas no germinaran, por ende, no cambiaran de color (R-biopharm, 2017).

Otra forma para determinar la presencia de antibióticos es mediante el método de Kirby-Bauer modificado, que consiste en inocular una cantidad estandarizada de bacterias en una placa de agar de Müller-Hinton, obteniendo así un medio bacteriano luego, al colocar concentraciones conocidas de extracto de carne y vísceras de pollo, si existe la presencia de antibiótico en el extracto se formarán halos de inhibición de desarrollo bacteriano. (Monroy et al., 2015)

El objetivo de este estudio es determinar la presencia de antibióticos en carne y vísceras de pollo que expenden diferentes proveedores en los mercados de la ciudad de Cuenca, utilizando un método rápido y fácil, para determinar el uso indiscriminado en la dosificación de medicamentos en los criaderos de pollo.

CAPÍTULO 1 MATERIALES Y METODOS

2.1 Muestra

Para determinar el número de muestras necesarias para realizar el presente estudio, se utilizó la ecuación (1) que corresponde a un muestreo aleatorio simple sin reposición (Ochoa, 2015)

$$n = \frac{n_0 N}{n_0 + (N - 1)} \quad (1)$$

Donde: n_0 = Tamaño de la muestra aproximada; N = tamaño de la población finita; n = número muestras a comprar.

Para la determinación de N se realizó una encuesta del total de pollos faenados comercializados en los 23 locales registrados en el mercado mayorista El Arenal de la ciudad de Cuenca, la cual estimó en 10050 las unidades vendidas semanalmente.

La ecuación 1 determinó un muestreo de 69 unidades de pollo, pero se incrementó a 72 pollos para obtener un número igual en cada una de los muestreos realizados semanalmente. Dentro del muestreo estimado se determinaron 36 unidades de pollos faenados de dos marcas comerciales, una de ellas no se expende en el mercado, pero fue requerida con el fin de contrastar los resultados entre pollos faenados con y sin marca comercial. Las muestras sin marca fueron recolectadas a dos de los distribuidores permanentes de pollos faenados del mercado.

Se realizó la compra de 12 pollos por cada compra de las 6 que se realizaron en diferentes fechas, (26/07/2016, 12/09/2016, 03/10/2016, 24/10/2016, 09/11/2016, 30/11/2016)

Además, se adquiriendo 3 pollos vivos en el sector de San Joaquín, para ser usados como control negativo, estos no fueron expuestos a ningún tipo de medicamento. Una vez fueron faenados en el laboratorio se almacenaron en congelación -20°C .

2.2 Preparación de la Muestra

De cada uno de los pollos se usó la carne y menudencia para el ensayo, cada muestra fue realizada por duplicado. Se procedió a extraer toda la carne de pollo, eliminando los huesos, una vez realizado esto, se molió la carne en un procesador de alimentos (Black & Decker Powerpro 2 de 120Vac 60Hz 500W, 3600 RPM), con la cuchilla de picar (Pieza N° MP12-3-400) por 4 minutos promedio, convirtiéndola en una pasta, luego se lo colocó en una funda ziploc debidamente rotulada y se lo congeló a -4°C . Se realizó el mismo procedimiento con la menudencia.

2.3 Ensayo con el kit Premi test

Para realizar el ensayo, se procedió a descongelar las muestras, obteniendo el extracto de la carne procesada con una jeringa, y se la colocó en tubos de ensayo rotulados, luego se realizó el ensayo según lo determinado en el manual de instrucciones del kit (R-biopharm, 2017). Posteriormente se leyeron los resultados.

2.4 Ensayo de sensibilidad de antibióticos

Usando la metodología de Kirby-Bauer modificada por Monroy (2015), se sembró *Bacillus cereus* en placas con agar Müller-Hinton. Se realizaron orificios en el agar, de aproximadamente 5 mm y en los cuales se sembró por duplicado 10 µl de cada extracto de carne y menudencia de los pollos de los proveedores estudiados y los pollos control. Posteriormente se los incubó (Esko Isotherm, Ciudad de Singapur, Singapur) por 18-24 horas a 35 °C. Luego se midieron los halos de inhibición en milímetros, alrededor del orificio de siembra.

Prueba de resistencia a la cocción

Se realizó un análisis por duplicado de los extractos de todos los proveedores, sometiéndolos sobre los 65°C, en el baño de María (SL Shel Lab, Hillsboro, USA), por 2 minutos, y se procedió a realizar el método de Kirby-Bauer descrito anteriormente (Espinosa et al., 2012).

También se realizó un ensayo con un pollo de 2278 gr. Se elaboró lo explicado en la preparación de la muestra (2.2) y se procedió a cocinar el pollo en 4 litros de agua a 93 °C por una hora y media, con el fin de obtener un caldo, el cual fue analizado mediante las dos metodologías usadas para detectar la presencia de antibióticos.

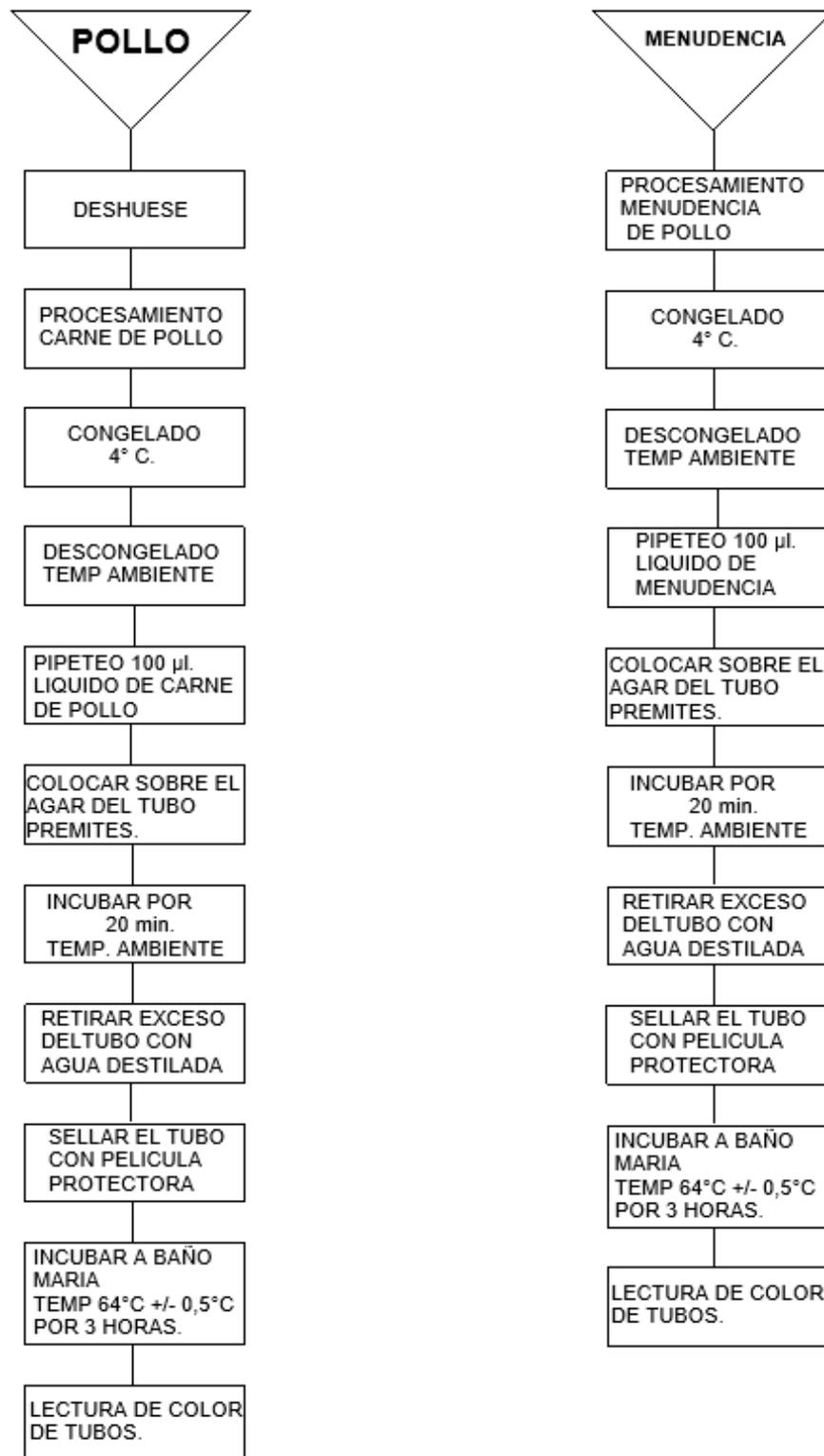


Figura N°1. Se describe el procedimiento realizado para el ensayo elaborado con Premi test tanto para carne y menudencia.

CAPITULO 2

RESULTADOS

En la recolección de muestras se constató que los pollos adquiridos en el supermercado, tenían una coloración amarillenta pálida con relación a los pollos del mercado, éstos no tenían golpes y emanaban olores propios del producto. En el deshuese, los pollos de las muestras control tenían una grasa de color amarillenta, el resto de proveedores tenían una grasa de color amarillo pálido. Al descongelar las muestras, todos los extractos obtenidos de Paute, Santa Isabel y las muestras control tenían una coloración rojiza oscura transparente, mientras que los pollos de la marca comercial 1 y 2 tenían una coloración rosa transparente.

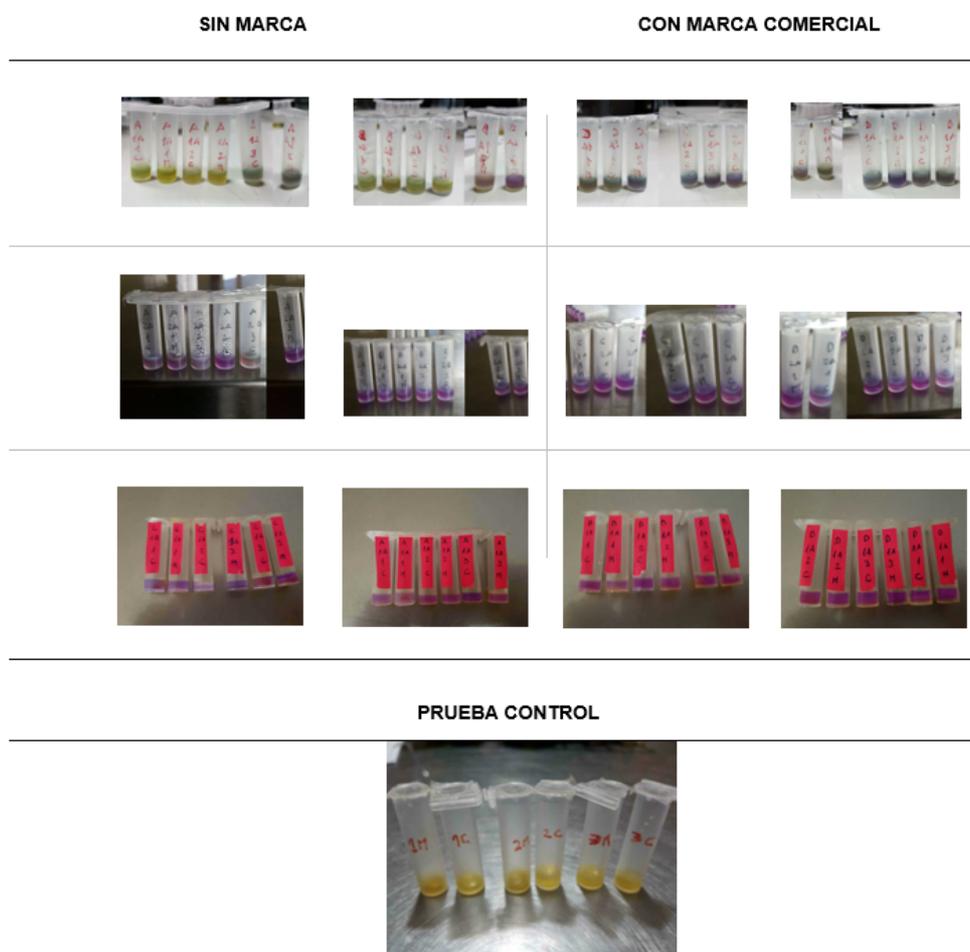


Figura N° 2: Comparación de resultados por proveedor. Por triplicado en carne (C) y menudencia, (M).

Tabla N° 1: Comparación de resultados de acumulación de antibióticos en pollo faenado de expendio en el mercado mayorista de la ciudad de Cuenca y supermercado, usando Premi test.

PROVEEDOR	CARNE		MENUDECENCIA	
	POSITIVO %	NEGATIVO %	POSITIVO %	NEGATIVO %
SIN MARCA	88,88%	11,12%	88,88%	11,12%
CON MARCA COMERCIAL	100%	0%	100%	0%

Las muestras recolectadas en el supermercado dieron en su totalidad positivas tanto para carne y menudencia en mismo porcentaje, mientras que, para las muestras adquiridas en el mercado mayorista de la ciudad de Cuenca, 8 de sus muestras respectivamente dieron negativas, el resto fueron positivas.

Las muestras control sometidas a Premi test, dieron en su totalidad negativas tanto para carne y menudencia.

Una vez realizada la prueba de Kirby-Bauer se obtuvo los siguientes resultados para los extractos crudos y cocidos:

Tabla N° 2: Resultados de presencia de antibióticos en pollo faenado de expendio en la ciudad de Cuenca usando la metodología de Kirby-Bauer.

PROVEEDOR	CARNE			MENUDECENCIA		
	CRUDO mm.	COCIDO mm.	POSITIVO %	CRUDO mm.	COCIDO mm.	POSITIVO %
SIN MARCA	6	4	100%	10	6	100%
CON MARCA COMERCIAL	8	5	100%	14	9	100%

Se describe el diámetro de los halos de inhibición según proveedores tanto para muestras crudas como para muestras cocidas y el porcentaje de muestras que dieron positivo a la presencia de antibióticos.

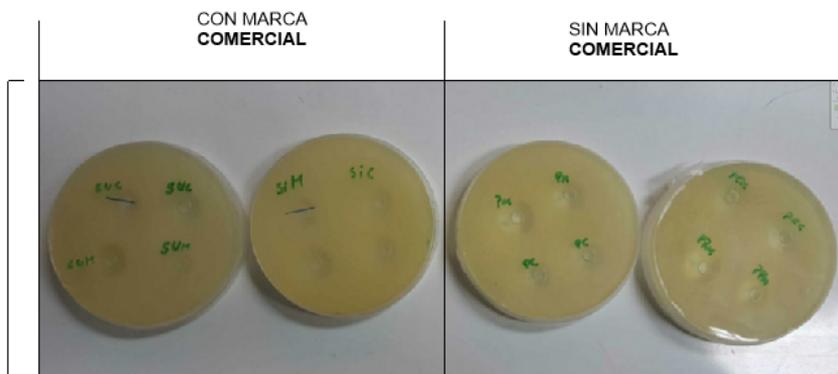
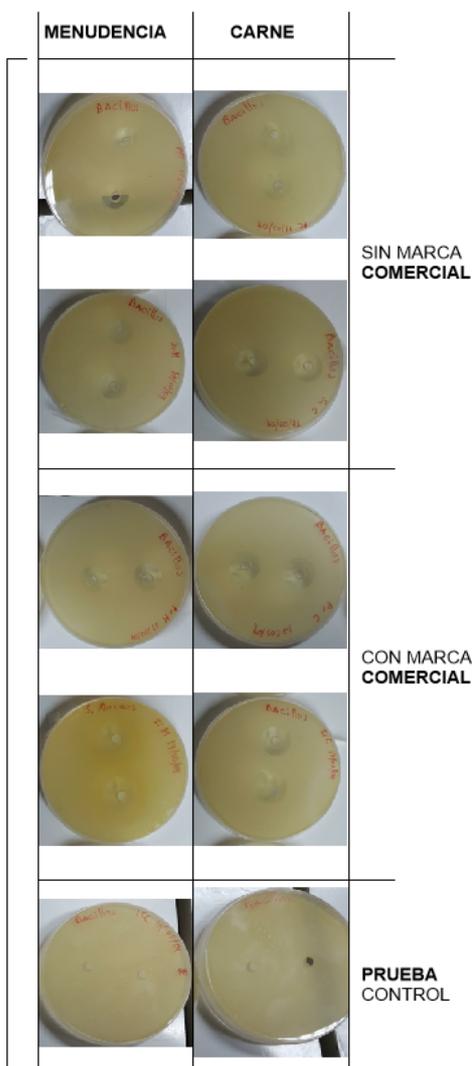


Figura N° 3: Crecimiento de halos por proveedor. Extractos crudos y cocidos sometidos a la metodología de Kirby-Bauer

El caldo de pollo dio negativo en las dos metodologías, mientras que su carne y menudencia crudas, dieron positivas en presencia de antibióticos.



Figura N° 4: Resultados de presencia de antibióticos en caldo de pollo.

CAPITULO 3

DISCUSION

En cuanto a las características organolépticas de los pollos en el momento del muestreo, si bien hay algunas diferencias mencionadas entre proveedores, estas cumplían con lo dispuesto en el numeral 5.5 de la norma ecuatoriana NTE INEN 2346:2015 que indican que estas deben tener características propias del producto.

4.1 Premi test.

En este estudio, realizado con el kit Premi test, se demostró la presencia de antibióticos en 136 de los 144 extractos de pollos faenados, correspondiente al 94,44% del total de las muestras. Mientras que en los extractos recolectados en Paute y Santa Isabel se observó residuos de antibióticos en el 89% de las muestras, en los extractos de los pollos de marca se observó residuos de antibiótico en el 100% de las muestras. Esto nos indica que en las faenadoras de Paute y Santa Isabel, a diferencia de los pollos de marca 1 y 2, se tienen proveedores de diferentes criaderos para satisfacer la demanda.

En el numeral 5.7 de la norma ecuatoriana NTE INEN 2346:2015, para carne y menudencias comestibles de animales de abasto, indica que “Los residuos de medicamentos veterinarios no deben superar los límites establecidos en el CODEX CAC/MRL 2”. El límite de detección de antibióticos del kit Premi test se encuentra de acuerdo a la normativa y al límite máximo permitido de residuos de la Unión Europea. En las muestras estudiadas, utilizando el Kit Premi test se observa que la mayoría de las muestras supera el límite permitido de residuos por lo que estos criaderos no estarían cumpliendo la normativa.

Un estudio realizado en Lima Perú, en una tesis elaborada por Giuliana Azañero y Magna Chiroque (2010), se analizaron los residuos de antibióticos en cuatro zonas comerciales de la ciudad de Lima, utilizando el método microbiológico de cuatro placas. Los resultados que se obtuvieron fueron un total del 100% de muestras positivas para sulfametoxazol y norfloxacinó que superan el límite impuesto por la Unión Europea.

En un estudio similar, realizado en el año 2014 por Mohamed Karmi en Egipto, se demostró que, de un total de 100 muestras de carne de pollo, 85 eran positivas y 15 negativas para residuos de antibióticos. Utilizando el método de cuatro placas observaron un 90% de muestras positivas.

En el año 2014 se realizó un estudio rápido sobre la detección de residuos de antibióticos en carne de pollo utilizando Premi test en Nigeria. De un total de 70 muestras se demostró que 42 eran positivas y 28 negativas, reflejando un porcentaje del 60% de muestras que superan el límite impuesto por el test. Este estudio se realizó con 30 muestras de pollo artesanal y 40 muestras de pollo que se expende en 2 supermercados, 20 muestras de cada supermercado. Se observó residuos en el 63,3% de muestras de pollo artesanal. En el primer supermercado denominado Gariki se obtuvo el 45% de muestras positivas y en el segundo supermercado, Main Market, se obtuvo el 70% de muestras positivas, dando como promedio para los supermercados el 57,5% de muestras positivas.

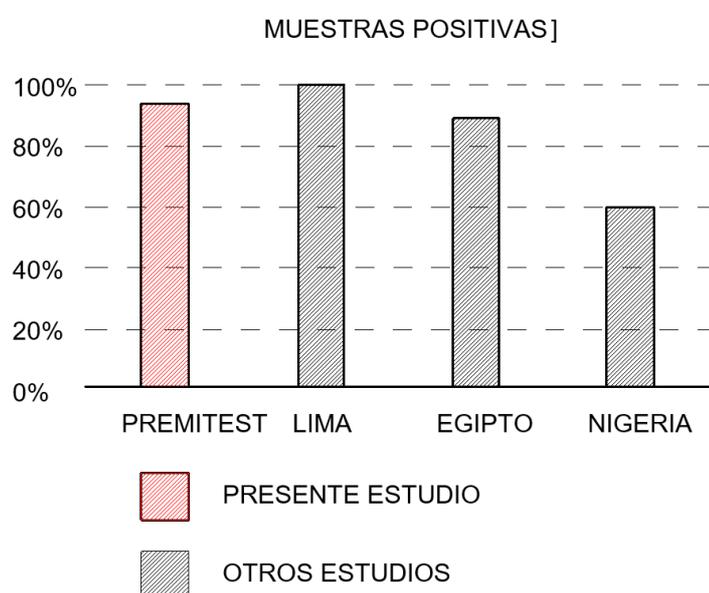


Figura N° 4: Comparativa con estudios similares.

En la figura N° 4, se puede apreciar que todos los estudios analizados dan un índice superior al 50 % de sus muestras positivas en residuos de antibióticos en carne. El estudio realizado en Lima es el que más se asemeja al presente estudio, ya que todas sus muestras dieron positivo.

En lo que se refiere a Premi test, existen otros estudios realizados en diferentes tipos de carne que indican la alta presencia de antibióticos en las muestras recolectadas.

La Universidad de Cuenca realizó una tesis similar en bovinos faenados en el camal de Azogues en el año 2016, utilizando el kit de detección rápida de residuos de antibióticos Premi test, teniendo como resultado que el 82% de 189 muestras analizadas fueron positivas, al comparar estos resultados con el presente estudio se puede determinar que el uso de

antibióticos en granjas en el Austro es indiscriminado, obteniéndose altos índices de residuos de antibióticos en las principales carnes de expendio en los mercados (Parra & Rojas, 2016)

Otro estudio realizado con el kit Premi test, en la Buenos Aires en el 2017 sobre la presencia de antibióticos en muestras de salmón de pescaderías, recolecto 103 muestras en diferentes barrios, de los cuales, expendedores de 6 barrios dieron un 100% de positivo en todas sus muestras.

4.2 Kirby-Bauer.

Por otra parte, analizadas la muestra por el método alternativo de Kirby-Bauer, tanto en carne cruda como en cocida (**Figura 3**), se pudo observar un 100% de crecimiento de halos de inhibición para las muestras de Paute, Santa Isabel, marca comercial 1 y 2, lo que indica la presencia de antibióticos en todas las muestras, muy similar a los resultados obtenidos con el Premi test. Las pruebas con muestras de control dieron como resultado un 100% de negativos. Los halos de inhibición de la marca comercial 2 fueron los mayores con 8 mm. de diámetro en carne y 14 mm. en menudencia, luego de la cocción disminuyeron 4 mm. en carne y menudencia, seguido por la marca comercial 1 que obtuvo halos con diámetros de 8 mm. en carne y 13 mm en menudencia, al someterlas a cocción disminuyeron 3 mm. en carne y 5 mm. en menudencia. Las muestras de Paute tuvieron diámetros de halo de 6 mm. en carne y 11 mm. en menudencia, luego de la cocción disminuyeron 2 y 4 mm, respectivamente. La muestra que generó los halos de menor diámetro es la perteneciente a Santa Isabel con 5 mm. en carne y 9 mm. en menudencia en crudo, cocidas disminuyeron 2 mm. en carne y 4 mm. en menudencia.

En este trabajo se pudo observar que, al someter a cocción a las muestras, el diámetro de los halos de inhibición disminuyó en promedio un 37,94%, sin embargo, continuó existiendo presencia de antibióticos luego de dicha cocción. En un estudio realizado por (Espinosa et al., 2012), sobre efecto del congelado y cocinado en residuos de oxitetraciclina en camarón de cultivo, esta observó que la cocción disminuía el contenido de antibióticos en un 36,6%, datos que son aproximados a los determinados en este estudio.

El caldo de pollo sometido a los ensayos de Kirby-Bauer y Premi test, dieron negativos, en presencia de antibióticos, a pesar que su carne y menudencia crudas dieron positivos, esto se atribuye a la dilución del extracto en la cantidad de agua usada en el caldo y la desnaturalización de antibióticos sometidos a calor demostrado en el ensayo de cocción de extracto.

5. CONCLUSIONES

En base a los objetivos planteados y a los resultados obtenidos en el presente estudio sobre la detección de residuos de antibióticos en pollo faenado de expendio en la ciudad de Cuenca, se concluye que mediante el KIT de Detección rápida Premi test, validado por AFNOR, se determinó la presencia de residuos de antibióticos en carne y menudencia del total de muestras de pollo analizadas en un 94,4%. Mientras que el 100% de muestras fueron positivas para el método de Kirby-Bauer. Esto evidencia el uso indiscriminado de agentes promotores de crecimiento o el uso preventivo de antibióticos, lo que sin duda afecta la calidad e inocuidad del alimento. Se recomienda que se desarrollen más estudios sobre este tema en el Ecuador para determinar una legislación en base a estos.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alexander TW, Y. L. (2008). Effect of Subtherapeutic Administration of Antibiotics on the Prevalence of Antibiotic-Resistant Escherichia Coli Bacteria in Feedlot Cattle.
- Berge, A. C. (2005). *Animal and Farm Influences on the Dynamics of Antibiotic Resistance in Faecal Escherichia Coli in Young Dairy Calves*.
- Cabello, F. C. (2006). *Heavy use of Prophylactic Antibiotics in Aquaculture: a Growing Problem for Human and Animal Health and for the Environment*.
- Espinosa A, P. L. (2012). Efecto del Congelado y Cocinado Sobre Residuos de Oxitetraciclina en Camarón de Cultivo. Sonora, México.
- FAO. (14 de 02 de 2017). *Organización de las Naciones Unidas Para la Alimentación y la Agricultura*. Obtenido de <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/background.html>
- Institute, A. M. (2008). *The Facts About Antibiotics in Livestock & Poultry Production*. Washington.
- Laxminarayan, R. (2013). Antibiotic Resistance - The Need For Global Solutions. *The Lancet Infectious Diseases*, 1 - 42.
- Levy. (2004). Antibacterial Resistance Worldwide: Causes, Challenges and Responses. 122–129.
- Levy SB, F. G. (1976). *Changes in Intestinal Flora of Farm Personnel After Introduction of a Tetracycline-Supplemented Feed on a Farm*.
- Monroy, R. (Enero de 2015). Desarrollo de una Técnica para la Detección in Vitro de la Presencia de Antibióticos en Muestras de Hígado de res, Cerdo y Pollo. Guanajuato, México.
- Ochoa, C. (3 de Agosto de 2017). *Netquest*. Obtenido de Netquest: <https://www.netquest.com/blog/es/blog/es/muestreo-probabilistico-muestreo-aleatorio-simple>
- Parra, M. G., & Rojas, A. E. (2016). *Detección de la presencia de Antibióticos en Canales Bovinas Faenadas en el Camal Municipal de la Ciudad de Azogues Mediante la Prueba Microbiana PREMI®-TEST*. Cuenca: Universidad de Cuenca.
- Price LB, G. J. (2007). *Elevated Risk of Carrying Gentamicin-Resistant Escherichia Coli Among U.S. Poultry Worker*.
- R-biopharm. (28 de 03 de 2017). *R-biopharm*. Obtenido de <http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis/residues/antibiotics/premitest/item/premitest-4x25>
- Rosana Boari, N. C. (2013). Estudio de Cadenas Pecuarias del Ecuador. 5-17. Ecuador.
- Smith KE, B. J. (1999). *Quinolone-Resistant Campylobacter Jejuni Infections in Minnesota*.
- Sørensen TL, B. M.-M. (2001). *Transient Intestinal Carriage After Ingestion of Antibiotic-Resistant Enterococcus Faecium From Chicken and Pork*.
- Stokestad, E. L. (1949). *Further Observations on the Animal Protein*.

Stokestad, E. L. (1950). Further Observations on The "Animal Protein Factor." *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*, 523–528.

Weber JT, M. E. (1994). Epidemic cholera in Ecuador: Multidrug-Resistance and Transmission by Water and Seafood. *Epidemiol. Infect*, 443–448.

William Freire, M. J. (2014). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Quito, Ecuador.

7. ANEXOS

7.1 Instrucciones de uso del kit.

Premi[®]Test

Ensayo de difusión estándar para detectar residuos antimicrobianos en carne (AFNOR), pescado, huevos, riñones, orina, sangre y pienso
2010/11/29

Contenido

25 tubos de ensayo con *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* en un agente de ágar sólido, puntas de pipeta desechables, película perforada de protección + jeringa.

Especificación del producto

Premi[®]Test es una prueba microbiana de amplio espectro, especialmente diseñada para la detección de sustancias antimicrobianas, tales como residuos antibióticos y sulfonamidas en carne fresca, pescado y huevos a niveles iguales o inferiores al Nivel Máximo de Residuos permitido.

Principio del ensayo

- Premi[®]Test se basa en la inhibición del crecimiento del *Bacillus stearothermophilus*, un microorganismo con alta sensibilidad a la mayor parte de los antibióticos y sulfonamidas. Se introduce una cantidad estándar de esporas en un medio de ágar con nutrientes seleccionados. Al agregar jugo de carne al Premi[®]Test y calentarlo a 64°C, las esporas germinan. Si **no** se encuentra presente sustancia inhibidora alguna, las esporas germinadas se multiplican produciendo un ácido, identificable por un cambio del color del indicador del tubo, virando de violeta a amarillo. Si se encuentra presente una cantidad suficiente de residuos antimicrobianos (sobre el nivel de detección), las esporas no se reproducirán y el color seguirá siendo violeta.
- R-Biopharm AG puede aplicarse también en muestras de huevos, riñones, orina, sangre y pienso.

Advertencia

El ensayo es *extremadamente* sensible a los antibióticos y otras sustancias inhibitoras; se debe evitar en todo momento cualquier contaminación con tales materiales. Se recomienda lavarse bien las manos antes de iniciar la prueba. Utilice papel o una toalla limpia para secarse las manos.

Instrucciones de uso

- Lavarse bien las manos antes de comenzar la prueba.
- Recortar el número de tubos necesarios sin dañar el aluminio de las ampollas contiguas.
- Quitar con cuidado el aluminio de los tubos que se vayan a utilizar (no abra más tubos de los necesarios). Tomar aproximadamente 2 cm³ de carne magra y utilizar una prensa para extraer aproximadamente 250 µl de jugo de carne. Otra manera de obtener jugo de carne sería con una Multipress o congelando/descongelando la muestra (Información disponible sobre la Multipress en www.r-biopharm.com)
- Colocar una nueva punta de pipeta en la jeringa para cada toma de muestra. Pipetear 100 µl de líquido sobre el ágar del tubo de ensayo. No dañar el ágar
- Preincubar durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- Elimine el jugo de carne del tubo de ensayo de la prueba realizando dos lavados con agua destilada y elimine el agua del tubo de ensayo cuidadosamente.
- Cerrar el tubo de ensayo con la película protectora incluida en el envase, para evitar así la evaporación. Incubar el tubo de ensayo en un calentador R-Biopharm AG o en baño de agua (64°C ± 0,5°C) durante aproximadamente 3 horas .
- Simultáneamente se recomienda hacer una muestra ya comprobada como negativa. Leer los resultados una vez la muestra negativa haya cambiado de color. El Premi[®]Test Starter Kit incluye todo el instrumental necesario (prensa de carne, tijeras, termómetro, incubadora, pipeta y cronómetro) Para facilitar el uso de Premi[®]Test, existe un documento PowerPoint disponible para el usuario

Lectura de los resultados del ensayo

- Leer únicamente el color de los 2/3 inferiores del tubo de ensayo.
- Un claro cambio de color (de violeta a amarillo) indica la ausencia de antibióticos / sulfonamidas por encima del límite de detección del ensayo.
- Un cambio de color poco manifiesto indica la presencia de antibióticos y/o sulfonamidas al mismo nivel o sobre el límite de detección del ensayo.

Control negativo

Se recomienda la realización de un control negativo, p.ej. congelando y almacenando el jugo de carne procedente de una muestra ya probada como negativa. Leer los resultados de la prueba después de que el control negativo haya cambiado de color. **No utilizar nunca agua como control negativo.**

Control positivo

Se recomienda realizar con regularidad una prueba de control positivo (protocolo disponible en R-Biopharm AG) para verificar el correcto funcionamiento del test.

Almacenamiento

Los tubos de ensayo deben ser conservados en lugar fresco (3 – 10 °C). Advertencia: **¡NO CONGELAR!**

Responsabilidad limitada

Premi[®]Test es una prueba de screening por lo que los resultados no se pueden garantizar al 100%. Además, la apreciación visual del cambio de color, en especial en caso de un resultado amarillo/violeta, puede variar en función del observador. Si los resultados del ensayo tuvieran consecuencias graves para el usuario, éstos deberán ser corroborados mediante un método analítico completo aprobado. R-Biopharm AG y sus filiales no se responsabilizan por cualquier efecto colateral, ni por daños, gastos y desembolsos incurridos en relación con el uso del ensayo; los clientes liberan a R-Biopharm AG de los mismos. La responsabilidad de R-Biopharm AG se limita a la sustitución de los ensayos si es que se puede probar su mal funcionamiento.

7.2 Límites de detección.

PREMITEST

Substance	Chicken	Pork	Beef	Egg	Eel	Salmon	Trout	Shrimp	Feed (Pigs)	Feed (Poultry)	Urine	Pork kidney (extraction)	Honey (extraction)
β-lactams													
Amoxicillin	5	5	5	5	5	5	5	15			5	5	<12,5
Ampicillin	5	5	5	5	5	5	5				5	2,5 - 5	25
Penicillin-G	2,5	2,5	2,5	2,5	5	5	5	5	10	10	5	2,5	<12,5
Cloxacillin		>100		100							50		100
Oxacillin		100										<50	75
Dicloxacillin													<75
Cephalosporins													
Cefquinome	75	100	100		200	200	200						
Ceftiofur	100	200	100	400	200	200	200				100	<250	
Cephapirin											100		
Macrolides													
Tylosin	50	25 - 50	50	50	75	100	75		400	200	50		
Erythromycin	100	100	100	50	200	200	200	100			100		
Lincomycin	100	100	100		200	300	200				100	<300	
Tilmicosin	50	50	50								50		
Spiramycin	1000	1000	1000		750	1000	750						
Tulathromycin											18000		
Tetracyclines													
Chlortetracycline	100	100	100	600	200	200	200	1000			50	400	80
Oxytetracycline	100	100	100	400	200	200	200	100	2000	800	50	400	75
Doxycycline	100	100	100	200	150	150	150					<200	50
Tetracycline		50		200								<200	50
Demeclocycline		50										200	
Sulphonamides													
Sulphamethazine	75	50-100	100	25	75	75	75				100	75	75
Sulphadiazine	75	50-75	75	25	75	75	75	50	>4000	4000		<75	75
Sulphamethizole		50-100										<100	75
Sulphaquandine	<200	150	<200									<150	75
Sulphadimethoxine		25 - 50	<100					50			100	<25	75
Sulphapyridine	<50	50	<100									<75	75
Sulphamethoxypridine	<100	25										<50	75
Sulphisoxazole	<100	25										75	50-75
Sulphathiazole	<100	25										<75	<50
Sulphachloropyridazine	<100	25									100	<50	<50
Sulphamerazine	<100	25	<100									<75	75
Sulphanilamide	<100	150										100 - 200	75
Sulphaquinoxaline	<100	50	<50									50	75
Sulphamethozole	<100		<50										
Sulfamethoxazole				25									
Aminoglycosides													
Gentamicin	100	100	100	100	200	200	300				100	>500	
Streptomycin	1500	1500	3000	1000	1500	3000	3000		16000	8000		>500	
Neomycine	300	300	300	300	300	300	300	200			300	2500	
Dihydrostreptomycin											3000		
Quinolones													
Oxolinic acid					>4000	>4000	4000	>10000					
Sarafloxacin					1500	1500	1200						
Enrofloxacin	>600	>600	>600								600		
Flumequine	>100	>100	>100										
Danofloxacin											600		
Polypeptides													
Virginiamycin	500	500	500										
Bacitracin	500	500	500						20000	10000			
Zn-bacitracin	1250												
Colistin	>1000												
Ionophores													
Salinomycin	1000								20000	8000			
Monensin	1250								>8000	6000			
Oligosaccharides													
Avilamycin	>5000								>20000	>20000			
Others													
Florphenicol	100	100	100		200	400	400	5000			100		
Chloramphenicol	2500	2500	2500	2500	2500	2500	3000						
Trimethoprim	50				12,5/2,5	12,5/2,5	12,5/2,5						
Thiamphenicol					>1500	1500	1500						
Narasin	1250												
Amprolium	>2000												
Phosphomycine	>1500												
Ronidazole										>5000			
Furazolidone	>1500												

2010/12/03

All detection limits are given in µg/kg = ppb.

Premi[®]Test is manufactured by DSM PremiTest B.V. The Netherlands

R-Biopharm AG
 An der neuen Bergstraße 17
 64297 Darmstadt, Germany
 Phone: +49 (0) 61 51 - 81 02-0
 Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-40
 E-mail: info@r-biopharm.de



CODEX ALIMENTARIUS

Eritromicina 

Especie	Tejido	LMR	Año de adopción	Nota
Pollo/Gallina	Grasa	100 µg/kg	2008	El LMR incluye la piel + grasa
Pollo/Gallina	Hígado	100 µg/kg	2008	
Pollo/Gallina	Riñón	100 µg/kg	2008	
Pollo/Gallina	Músculo	100 µg/kg	2008	
Pollo/Gallina	Huevos	50 µg/kg	2008	

Flumequina 

Especie	Tejido	LMR	Año de adopción	Nota
Pollo/Gallina	Músculo	500 µg/kg	2005	
Pollo/Gallina	Grasa	1000 µg/kg	2005	
Pollo/Gallina	Hígado	500 µg/kg	2005	
Pollo/Gallina	Riñón	3000 µg/kg	2005	

Lincomicina 

Especie	Tejido	LMR	Año de adopción	Nota
Pollo/Gallina	Riñón	500 µg/kg	2003	
Pollo/Gallina	Hígado	500 µg/kg	2003	
Pollo/Gallina	Grasa	100 µg/kg	2003	Nuevo LMR para la piel con grasa adherida de 300 µg/Kg.
Pollo/Gallina	Músculo	200 µg/kg	2003	

Neomicina 

Especie	Tejido	LMR	Año de adopción	Nota
Pollo/Gallina	Músculo	500 µg/kg	1999	
Pollo/Gallina	Hígado	500 µg/kg	1999	
Pollo/Gallina	Grasa	500 µg/kg	1999	
Pollo/Gallina	Riñón	10000 µg/kg	1999	
Pollo/Gallina	Huevos	500 µg/kg	1999	

Tilmicosin 

Especie	Tejido	LMR	Año de adopción	Nota
Pollo/Gallina	Músculo	150 µg/kg	2011	
Pollo/Gallina	Riñón	600 µg/kg	2011	
Pollo/Gallina	Grasa/Piel	250 µg/kg	2011	
Pollo/Gallina	Hígado	2400 µg/kg	2011	

Tilosina 

Especie	Tejido	LMR	Año de adopción	Nota
Pollo/Gallina	Hígado	100 µg/kg	2009	
Pollo/Gallina	Músculo	100 µg/kg	2009	
Pollo/Gallina	Huevos	300 µg/kg	2009	
Pollo/Gallina	Riñón	100 µg/kg	2009	
Pollo/Gallina	Grasa/Piel	100 µg/kg	2009	

COMPARACIÓN

	CODEX		PREMI - TEST
	MUSCULO	MENUDENCIA	
ERITROMICINA	100	100	100
FLUMEQUINA	500	500	>100
LINCOMICINA	200	500	100
NEOMICINA	500	500	300
TILMICOSIN	150	600	50
TILOSINA	100	100	50

7.3 Validación del Kit Premi test.

This certificate contains 5 pages

1/5



Alternative methods for agribusiness
Analytical performances certified

CERTIFICATE OF VALIDATION* OF ANALYSIS ALTERNATIVE METHOD

**following the protocol defined by the NF VALIDATION technical board
and applicable to screening methods for the detection of antibiotic and
other related molecules (Rev. 0)*

Certificate No.: RBP 31/02 – 04/11

Validation date: 24.11.2011
Renewal date: 03.07.2014
End of validity: 30.08.2018

The Company R-BIOPHARM AG
An der neuen Bergstraße 17
64297 Darmstadt
Germany

Site of production DSM Food Specialties
Postbox 1
2600 MA Delft
Netherlands

is hereby authorized to refer to this NF VALIDATION certificate for the following alternative qualitative analysis method:

PREMI® TEST

Rapid test for the presumptive detection of antibiotic residues in muscles

Protocol reference : Insert 1011 – 2014/10/15

SCOPE

Pork, beef and poultry meats (excluding ground meat).

RESTRICTIONS

None.

REFERENCE METHOD

French official method : Four plates LMV/90/01 (version 5 from 10/12/2008).

Managing Director
Franck LEBEUGLE



AFNOR Certification

11, rue Francis de Pressensé – 93571 La Plaine Saint-Denis Cedex - France
Phone +33 (0)1 41 62 80 00 – Fax +33 (0)1 49 17 90 00
www.afnor.org - <http://nf-validation.afnor.org/en/>

PRINCIPE OF THE METHOD

Premi[®]Test is a wide spectrum microbial screening test for the presumptive detection of antibiotic residues in meat. The test is based on the inhibition of the growth of *Bacillus stearothermophilus*, a thermophilic bacterium which is very sensitive to many antibiotics and sulpha compounds. A standardised number of spores is imbedded in agar medium containing selected nutrients.

Premi[®]Test is applied to meat juices introduced into ready to use tubes containing spores of *Bacillus stearothermophilus* into the agar medium. After 20 minutes and then removing the diffusion juice, the tube is incubated for 2 h 40 min at 64 °C, then the color is checked in interval of 5 min until the color has changed from purple to yellow.

In case of change of color (multiplication of germinated spores producing acid), the test is negative. When anti-microbial compounds are present in sufficient amount, bacteria will be unable to grow, and therefore no colour change will be observed.

The positive samples have to be confirmed by a physico-chemical method for identification and quantification (excluded from NF VALIDATION scope).

Note 1: It should be noted that the alternative method Premi[®]Test and the official method called the Four Plate Test (Reference method), are based on different principles: Premi[®]Test can detect a large number of commonly used antibiotics in meat with a single bacterial strain, while the reference method detects antibiotics using 4 bacterial strains (all different from that of Premi[®]Test). Moreover, the Four Plate Test is based on the analysis of pieces of frozen muscle, while Premi[®]Test is based on the analysis of meat juices. These two methods cannot be considered equivalent, which explains the data obtained in accuracy determination.

Note 2 (History of validation): The method was firstly validated in 2006 for DSM Food Specialties under the reference DSM 28/1 – 06/06. In 2011, the certification for Premi[®]Test was granted to R-Biopharm AG under the reference RBP 31/02 – 04/11, without any change in the alternative method.

Since July 2014, the certification for Premi[®]Test has been renewed without conducting any additional validation study. Nor the alternative method, nor the validation protocol and the official method taken as a reference have changed since the previous validation study.

LIMIT OF DETECTION

- Tests were performed with the Premi[®]Test only, on samples of pork meat juices containing antibiotics. Six antibiotics were tested each at 3 concentration levels. The concentrations tested were very close to the MRLs. Five samples were tested for each antibiotic and by concentration level, giving a total of 90 samples.
- Juices of white pork meat (negative controls) were also tested in blind duplicate giving a total of 40 analyses.

The detection limits are presented in the table hereafter:

Family	Sulfonamides	Tetracyclines	Macrolides	Beta-lactams	Aminoglycosides	Beta-lactams	Total
Antibiotic	Sulfadimazine	Oxytetracycline	Tylosin	Amoxicillin	Gentamycin	Ceftiofur	
MRL muscle (µg/kg)	100	100	100	50	50	1000	-
Concentrations tested (µg/kg)	50/100/200	50/100/200	50/100/200	25/50/100	50/100/200	100/200/400	-
Detection rate at 50% of MRL	0%	60%	80%	100%	0%	-	48%
Detection rate at the MRL	20%	80%	100%	100%	0%	100%	67%
Detection rate at the MRL x 2	100%	100%	100%	100%	40%	100%	90%

MRL : Maximal Residues Limits

The detection limit is at the MRL for 3 antibiotics (tylosin, amoxicillin, ceftiofur), and at 2 x MRL for 2 other antibiotics (sulfadimerazine and oxytetracycline).
For gentamycin, the detection limit is upper than the MRL (40% of positives at 2 x MRL).

Blank samples (n = 2 x 20 = 40) :

Repetitions	Blank 1	Blank 2	Blank 3	Blank 4	Blank 5	Blank 6	Blank 7
1	-	-	-	-	-	-	-
2	-	D+	-	-	D+	-	-
Repetitions	Blank 8	Blank 9	Blank 10	Blank 11	Blank 12	Blank 13	Blank 14
1	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	D+	-	-	-
Repetitions	Blank 15	Blank 16	Blank 17	Blank 18	Blank 19	Blank 20	
1	-	D+	-	-	-	-	
2	-	+	D+	-	-	-	

RATE OF FALSE-POSITIVES AND FALSE-NEGATIVES:

The false-negative rate of Premi®Test has always been lower than that of the Four Plate Test. It is this rate which has to be minimal for a screening method for antibiotic residues. Conversely the false positive rate of Premi®Test proved in the final stage of the preliminary study* to be higher than that of the Four Plate Test. This does not affect the performance of the method as any positive sample must be confirmed by a physico-chemical method for identification and quantification.

* Results of the 3rd phase of the validation study are available in the study report summary.

COMPARATIVE STUDY

Comparison of performances of the alternative method and the reference method

In 2006, tests were carried out on samples of pork naturally containing antibiotics. Five pieces of pork muscle were analysed by the reference method and the Premi®Test method, for 3 antibiotics (oxytetracycline/sulfadimethoxine, tylosine, amoxicilline), each of them being tested at one concentration.

The results obtained by comparing the Premi®Test to the reference method are presented in the following table:

		Reference method			
		Answer	R+	R-	Total
Alternative method	A+		11	4	15
	A-		2	3	5
	Total		13	7	20

According to EN ISO 16140 standard, the following calculations were established:

- Relative accuracy: AC = 70%
- Relative specificity: SP = 42.9%
- Relative sensitivity: SE = 84.6%

Remark: In the context of this protocol, the value of AC = 70% obtained between the Premi®Test and the official reference method is due to the numbers of false negative and positive results obtained by the official reference method, and not to a problem of sensitivity or specificity of the Premi®Test.

PRATICABILITY

- **Results (positive or negative)** are obtained in 4 to 5 hours with the Premi[®]Test against 24 hours with the reference method.

INTERLABORATORY STUDY

The interlaboratory study was conducted in 2006 with 11 participating laboratories. The analyses were carried out on samples from 4 different matrices, each one with 4 concentrations of antibiotics.

The laboratories tested, in double, one sample for **each level** of contamination, giving a total of 32 analyses for each participating laboratory. Laboratories performed two series of analyses, only with the alternative method.

In addition, the laboratories tested a negative control sample by matrix and a positive control sample containing penicillin G at 10 µg/kg.

Results obtained by combination of « matrix/antibiotic » and by level of contamination are as follows:

Matrix/antibiotic Levels (µg/kg)	Total number of samples	Number of samples analysed*	Number of negative results	Number of positive results	% of positive samples
Pork/Oxytetracycline 0	22	18	36	0	0%
Pork/Oxytetracycline 20	22	18	36	0	0%
Pork/Oxytetracycline 200	22	18	32	4	11%
Pork/Oxytetracycline 400	22	18	11	25	69%
Beef/Sulfadimerazine 0	22	18	32	4	11%
Beef/Sulfadimerazine 20	22	18	33	3	8%
Beef/Sulfadimerazine 200	22	18	30	6	17%
Beef/Sulfadimerazine 400	22	18	17	19	53%
Pork/Ceftiofur 0	22	18	30	6	17%
Pork/Ceftiofur 40	22	18	34	2	6%
Pork/Ceftiofur 400	22	18	32	4	11%
Pork/Ceftiofur 800	22	18	0	36	100%
Chicken/Tylosin 0	22	18	36	0	0%
Chicken/Tylosin 10	22	18	36	0	0%
Chicken/Tylosin 100	22	18	6	30	83%
Chicken/Tylosin 200	22	18	0	36	100%
Total	352	288	401	175	-

* One laboratory was excluded because of a too long delivery time, un-frozen samples and a negative control sample (chicken) were found positive on both series of analyses.

* Another laboratory was excluded because of a negative control sample (chicken) found positive during the first serie of analyses.

As a reminder, the Maximal Residues Limits (MRLs) for each antibiotics tested are as follow :

Oxytetracycline:	MRL = 100 µg/kg
Sulfadimerazine:	MRL = 100 µg/kg
Ceftiofur:	MRL = 1,000 µg/kg
Tylosin:	MRL = 100 µg/kg

Conclusion

The detection limits at 50% were defined from the results obtained during the interlaboratory study, for each combination of "matrix/antibiotic". The data are presented as an interval, the first value corresponding to the results of the expert laboratory and the second to the results of the interlaboratory study:

Pork/Oxytetracycline:	200 – 400 µg/kg	Chicken/Sulfadimerazine:	200 – 400 µg/kg
Pork/Ceftiofur:	400 – 600 µg/kg	Chicken/Tylosin:	50 – 100 µg/kg

General conclusion

Comparative and interlaboratory studies gave concordant detection level results.

The rate of false-negative results for Premi[®]Test appeared systematically inferior to the one's of the official reference method (it has to be the minimum rate for a screening method of antibiotic residues).

Please send any queries concerning the performance of the validated method to AFNOR Certification.

You may download a summary document on the preliminary and inter-laboratory studies on <http://nf-validation.afnor.org/en/>