



Quito - Ecuador

---

---

**NORMA TÉCNICA ECUATORIANA**

**NTE INEN 2661:2013**

---

---

**MICROBIOLOGÍA. DETERMINACIÓN DE *Bacillus cereus*  
RECuento DE COLONIAS- MÉTODo EN SUPERFICIE**

**Primera Edición**

MICROBIOLOGY. DETERMINATION OF *Bacillus cereus* PLATE COUNT A METHOD OF SURFACE.

First Edition

---

DESCRIPTORES: Ciencias naturales, microbiología, alimentos, *bacillus cereus*, ensayo.  
AL 01.05-321  
CDU: 579.67  
CIU: 7422  
ICS: 07.100.30:67.050

<b>Norma Técnica Ecuatoriana Voluntaria</b>	<b>MICROBIOLOGÍA DETERMINACIÓN DE <i>Bacillus cereus</i> RECUENTO DE COLONIAS. MÉTODO EN SUPERFICIE</b>	<b>NTE INEN 2661:2013 2013-01</b>
<p style="text-align: center;"><b>1. OBJETO</b></p> <p>1.1 Esta norma establece el método en superficie para el recuento de colonias de <i>Bacillus cereus</i>.</p> <p style="text-align: center;"><b>2. ALCANCE</b></p> <p>2.1 Esta norma se aplica a los productos destinados al consumo humano y alimentación animal (ver nota 1).</p> <p style="text-align: center;"><b>3. DEFINICIONES</b></p> <p>3.1 Para efectos de esta norma, se adopta la siguiente definición:</p> <p>3.1.1 <i>Bacillus cereus</i>. Microorganismo gram (+) que puede esporular, forma colonias típicas en la superficie de un medio de cultivo selectivo y da una reacción positiva de confirmación en las condiciones especificadas en esta norma.</p> <p style="text-align: center;"><b>4. RESUMEN</b></p> <p>4.1 Una cantidad específica de la muestra de ensayo, si el producto inicial es líquido, o una cantidad específica de una suspensión inicial en el caso de otros productos, se siembra en la superficie de un medio de cultivo sólido contenido en cajas petri.</p> <p>4.1.1 Las demás cajas se preparan en las mismas condiciones, utilizando diluciones decimales de la muestra de ensayo o de la suspensión inicial.</p> <p>4.2 Las cajas se incuban bajo condiciones aeróbicas de 30 °C a 35°C durante 18 h a 48 h.</p> <p>4.3 El número de <i>B. cereus</i> por gramo o por mililitro se calcula a partir del número confirmado de colonias obtenidas en cajas a niveles de dilución elegida para dar un resultado significativo y confirmado de acuerdo al ensayo especificado.</p> <p>NOTA 1. Con el fin de tener un método de ensayo aplicable, la fase de confirmación ha sido restringida al aspecto típico en agar MYP y la prueba de hemólisis. Así, el término "presuntivo" se ha introducido con el fin de reconocer que la fase de confirmación no permite la distinción de <i>B. cereus</i> de otras especies de <i>Bacillus</i> estrechamente relacionadas, pero que se encuentran con menos frecuencia como <i>B. anthracis</i>, <i>B. turingiensis</i>, <i>B. weihenstephanensis</i>, <i>B. mycoides</i>. Una prueba adicional de motilidad puede ayudar a diferenciar <i>B. cereus</i> de <i>B. anthracis</i>, en los casos donde se sospeche la presencia de este último.</p> <p style="text-align: right;"><i>(Continúa)</i></p> <hr/> <p>DESCRIPTORES: Ciencias naturales, microbiología, alimentos, <i>bacillus cereus</i>, ensayo.</p>		

## 5. DILUYENTE, MEDIO DE CULTIVO Y REACTIVOS (ver nota 2)

**5.1 Diluyente.** Agua de peptona, según NTE INEN 1529-1 y cualquier norma específica que trate sobre el producto por examinar.

### 5.2 Medio agar

#### 5.2.1 Medio base

##### 5.2.1.1 Composición

Extracto de carne	1,0 g
Peptona	10,0 g
D-Manitol	10,0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	10,0 g
Rojo de fenol	0,025 g
Agar	12 g a 18 g <sup>a</sup>
Agua	900 mL

<sup>a</sup> Dependiendo de la resistencia del gel del agar.

##### 5.2.1.2 Preparación

- Disolver los componentes o el medio completamente deshidratado en el agua, por calentamiento si es necesario.
- Ajustar el pH, si es necesario, de modo que el pH del medio completo (ver 5.2.4), después de la esterilización sea de  $7,2 \pm 0,2$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .
- Distribuir el medio en cantidades de 90 mL en frascos de capacidad adecuada.
- Esterilizar por 15 minutos en autoclave (ver 6.1), programado a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 5.2.2 Solución de polimixina B

##### 5.2.2.1 Composición

Sulfato de polimixina B	$10^6$ UI
Agua	100 mL

**5.2.2.2 Preparación.** Disolver el sulfato de polimixina B en el agua. Esterilizar por filtración.

**5.2.3 Emulsión de yema de huevo al 50%.** Lavar huevos frescos con pincel rígido y agua. Remojar 1 h en 70% de alcohol. Asépticamente quitar la yema y mezclar (1+ 1) con solución acuosa estéril 0,85% NaCl.

#### 5.2.4 Medio completo (MYP agar)

##### 5.2.4.1 Composición

Medio base (5.2.1)	90 mL
Solución de polimixina B (5.2.2)	1,0 mL
Emulsión de yema de huevo (5.2.3)	10,0 mL

NOTA 2. Pueden ser utilizados reactivos listos para el uso preparados comercialmente.

**5.2.4.2 Preparación**

- Fundir el medio base y mantener un baño de agua (ver 6.4) fijado entre 44 °C a 47 °C.
- Agregar los otros componentes, mezclando bien después de cada adición.
- Mantener el medio completo en el baño de agua (ver 6.4), fijado entre 44°C a 47 °C.

**5.2.5 Preparación de cajas de agar**

- Verter porciones de 15 ml a 20 mL del medio completo (ver 5.2.4) dentro de cajas petri esterilizadas (ver 6.6) y dejar solidificar.
- Las cajas pueden ser almacenadas a 5 °C ± 3 °C durante un máximo de 15 días.
- Antes de utilizarlas, se secan con la superficie de agar hacia abajo, en una incubadora (ver 6.2) a una temperatura entre 37 °C y 55 °C hasta que la su perficie del agar se seque.

**5.3 Agar sangre de oveja****5.3.1 Medio base. Agar base sangre No.2****5.3.1.1 Composición**

Peptona proteosa o peptona equivalente	15 g
Hígado hidrolizado	2,5 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio (NaCl )	5 g
Agar	12 g a 18 g <sup>a</sup>
Agua	1000 mL

<sup>a</sup> Dependiendo de la resistencia del agar.

**5.3.1.2 Preparación**

- Disolver los componentes o el medio deshidratado completo en el agua y calentar hasta ebullición.
- Ajustar el pH, si es necesario, de modo que después de la esterilización, este sea de 7,0 ± 0,2 a 25 °C
- Verter en frascos y esterilizar por 15 min a 121 °C.

**5.3.2 Sangre de oveja desfibrinada****5.3.2.1 Medio completo****5.3.2.1.1 Composición**

Medio base (5.3.1)	100 mL
Sangre desfibrinada de carnero	5 mL a 7 mL

**5.3.2.1.2 Preparación**

- Después de enfriar entre 44 °C a 47 °C, se añade al medio base (ver 5.3.1) la sangre de oveja desfibrinada y se mezcla.
- Verter al menos porciones de 12 mL del medio completo en cajas de Petri estériles (ver 6.6) y dejar que se solidifique.

## 6. EQUIPOS Y MATERIALES DE VIDRIO

**6.1 Equipo para esterilización en seco (horno) o esterilización en húmedo (autoclave).**

**6.2 Cabina de secado o incubadora**, ventilado por convección, para el secado de las cajas de agar, capaz de operar entre  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $55\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**6.3 Incubador**, capaz de operar de  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**6.4 Baños de agua**, capaces de mantenerse de  $44\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $47\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**6.5 pH-metro**, con precisión de  $\pm 0,1$  unidades de pH a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**6.6 Cajas petri**, hechas de vidrio o plástico.

**6.7 Pipetas graduadas**, calibradas para uso bacteriológico solo de las capacidades nominales de 10 mL y 1 mL, graduadas respectivamente en divisiones de 0,5 mL y 0,1 mL (ver nota 3).

**6.8 Asas de Digrafsky o su similar**, hechas de vidrio o de plástico (ver nota 3).

## 7. MUESTREO

**7.1** Es importante que el laboratorio reciba una muestra que sea realmente representativa y no haya sido alterada durante el almacenamiento o transporte.

**7.2** El muestreo no es parte del método especificado en esta norma. Si no hay una norma específica, que trate sobre la toma de muestra del producto en cuestión, se recomienda que los interesados lleguen a un acuerdo sobre este tema.

## 8. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE ENSAYO

**8.1** Preparar la muestra de ensayo de acuerdo con la norma específica adecuada para el producto que se trate.

**8.2** Si no hay una norma específica, se recomienda que las partes interesadas lleguen a un acuerdo sobre este tema.

## 9. PROCEDIMIENTO

### 9.1 Porción de ensayo, suspensión inicial y diluciones

**9.1.1** Ver NTE INEN1529-2 y la norma específica apropiada al producto concerniente.

### 9.2 Inoculación e incubación

**9.2.1** Transferir, por medio de una pipeta estéril (ver 6.7), 0,1 mL de la dilución de la muestra de ensayo, a dos cajas con agar (ver 5.2.5). Repetir el procedimiento con otras diluciones decimales si es necesario (ver nota 4).

NOTA 3. Los materiales desechables son una alternativa aceptable a los objetos de vidrio reutilizables, si tienen especificaciones similares.

NOTA 4. Para ciertos productos, es recomendable estimar bajos números de *B. cereus*, los límites de detección pueden ser elevados por un factor de 10 mediante el examen de 1,0 mL de la muestra de ensayo si el producto inicial es líquido, o 1,0 mL de la suspensión inicial de los otros productos. Distribuir el 1 mL del inóculo sobre las superficies de tres placas utilizando el asa de Digrafsky o su similar estéril (ver 6.8).

**9.2.2** Cuidadosamente difundir el inóculo sobre la superficie de la placa de agar sin tocar las paredes de la caja petri con el asa de Digrafsky o su similar (ver 6.8). Utilizar un asa de Digrafsky o su similar estéril nuevo para cada caja.

**9.2.3** Invertir las cajas inoculadas e incubar durante 18 h a 24 h en un incubador (ver 6.3) programado de 30 °C a 35 °C. Si las colonias no son claramente visibles, incubar las cajas por 24 h adicionales antes del conteo.

### **9.3 Recuento de colonias**

**9.3.1** Después del período de incubación (ver 9.2.3), seleccionar las cajas, preferiblemente de dos diluciones sucesivas, que contengan entre 15 y 150 colonias.

**9.3.2** Contar las colonias de *Bacillus cereus* presuntivas en cada caja. Las colonias presuntivas son grandes, rosadas (indica que la fermentación del manitol no ha ocurrido, ver nota 5), de bordes irregulares y generalmente son rodeadas por una zona de precipitación (indica la producción de lecitinasa, ver nota 6).

**9.3.3** Si hay menos de 15 colonias características en las cajas inoculadas, es posible hacer una estimación del recuento como se describe en el capítulo 10.

**9.3.4** Si un inóculo de 1,0 mL se extendió a lo largo de las tres cajas (ver 9.2.2), el tratamiento de estas cajas es como una, en todos los posteriores conteos y procedimientos de confirmación.

### **9.4 Confirmación**

#### **9.4.1 Selección y purificación de colonias para confirmación**

**9.4.1.1** Seleccionar cinco colonias presuntivas de cada caja, elegidas como en el numeral 9.3. Si hay menos de cinco colonias en la caja, tomar todas las colonias presuntivas. Confirmar estas colonias como se especifica en los numerales 9.4.2 y 9.4.3.

**9.4.1.2** Si las cajas están sobrepobladas y no es posible seleccionar colonias bien aisladas, se marcan cinco colonias presuntivas sobre cajas con medio completo (ver 5.2.4) trazando una raya sobre ellas. Incubar (ver 6.3) de 30°C a 35°C durante 18 h a 24 h.

**9.4.1.3** Seleccionar de cada caja, al menos una colonia bien aislada con un color rosa. Confirmar esta colonia como se especifica en los numerales 9.4.2 y 9.4.3.

#### **9.4.2 Ensayo de hemólisis en agar sangre de cordero**

**9.4.2.1** Sembrar las colonias seleccionadas (ver 9.4.1) mediante estriado, inoculación y por punción, en la superficie del agar sangre de cordero (ver 5.3), de manera que permita una buena interpretación de la reacción de hemólisis.

**9.4.2.2** Incubar de 30°C a 35°C durante 24 h ± 2 h e interpretar la reacción de hemólisis.

#### **9.4.3 Interpretación bioquímica (ver tabla 1)**

NOTA 5. Si las cajas contienen numerosos microorganismos fermentadores de manitol que conducen a la producción de ácido, entonces el color rosa característico de las colonias de *Bacillus cereus* se puede reducir o desaparecer por completo.

NOTA 6. Algunas cepas de *Bacillus cereus* producen poco o nada de lecitinasa. Las colonias de estas cepas no estarán rodeadas por una zona de precipitación. Estas colonias también deben ser sometidas a pruebas de confirmación.

TABLA 1. Resultados de ensayos

Ensayo	Resultado confirmativo de <i>Bacillus cereus</i> presuntivo
Medio de agar MYP (9.4.1)	Formación de colonias rosas, rodeadas de precipitado
Hemólisis (9.4.2)	Reacción positiva <sup>a</sup>
<sup>a</sup> El ancho de la zona de hemólisis puede variar.	

## 10. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

**10.1 Recuento de colonias de *B. cereus* presuntivo** (Ver ISO 7218:1996 /Adm. 1:2001 para cálculos).

### 10.1.1 Método de cálculo

**10.1.1.1** En caso de que dos diluciones se encuentren dentro del rango de 15 a 150 colonias de *Bacillus cereus*. Se calcula el número de N microorganismos por mililitro o por gramo de producto, dependiendo del caso, utilizando la siguiente ecuación:

$$N = \frac{\sum a}{(n_1 + 0,1 n_2)d}$$

donde

- a es la suma de colonias de las cajas seleccionadas en cada dilución.
- $\sum a$  es la suma de colonias de *Bacillus cereus* contadas después de la identificación en todas las cajas seleccionadas.
- $n_1$  es el número de cajas seleccionadas en la primera dilución.
- $n_2$  es el número de cajas retenidas en la segunda dilución.
- d es el factor de dilución correspondiente a la primera dilución.
- 0,1 constante debido al método de siembra en superficie.

Se aproxima el resultado calculado a dos cifras significativas.

Se toma como resultado el número de *Bacillus cereus* por mililitro, o por gramo del producto, expresado como un número entre 1,0 y 9,9 multiplicado por  $10^x$ , donde x es la potencia apropiada de 10.

### EJEMPLO

Un recuento directo de *B. cereus* a  $30\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$  dio los siguientes resultados:

- en la primera dilución retenida ( $10^{-3}$ ): 63 y 80 colonias;
- en la segunda dilución retenida ( $10^{-4}$ ): 7 y 4 colonias.

se sacaron los siguientes números:

para 63 colonias: 5 colonias, 4 de las cuales concordaban con los criterios, dando  $a = 50$ ;

para 80 colonias: 5 colonias, 3 de las cuales concordaban con los criterios, dando  $a = 48$ ;

para 7 colonias: 5 colonias, 4 de las cuales concordaban con los criterios, dando  $a = 6$ ;

para 4 colonias, se encontró que todas eran el microorganismo que se buscaba.

Por lo tanto,

$$N = \frac{\sum a}{(n_1 + 0,1 n_2)d}$$

$$= 50 + 48 + 6 + 4/(2+0,2) \times 10^{-3}$$

$$= 108/ 2,2 \times 10^{-3} = 49090$$

Aproximando el resultado tal como se especificó anteriormente, se obtiene 49 000 o  $4,9 \times 10^4$  ufc/mL o ufc/g de producto.

**10.1.1.2** En caso de encontrarse una sola dilución, dentro del rango de 15 a 150 colonias, el resultado final se multiplicará por 10, debido a que se realizó una siembra en superficie.

### 10.1.1.3 Cálculo de números pequeños

Si dos cajas, correspondientes a la muestra de ensayo (productos líquidos) o la suspensión inicial (otros productos), contienen menos de 15 colonias, se calcula el promedio aritmético  $m$  de las colonias de *B. cereus* en ambas cajas.

El resultado se informa de la siguiente manera:

- número estimado,  $N_E$  de ufc/mL

$$N_E = m \text{ (productos líquidos)}$$

- número estimado,  $N_E$  de ufc/g

$$N_E = m/d \text{ (otros productos)}$$

donde:

$d$  es el factor de dilución de la suspensión inicial.

En el Anexo A se tabulan valores de límites de confianza para números pequeños de colonias, en caso de validación del método.

**10.2 Sin colonias.** Si las dos cajas correspondientes a la muestra de ensayo (productos líquidos) o la suspensión inicial (otros productos) no contienen colonias presuntivas de *Bacillus cereus*, reportar los resultados como sigue:

- menor a 10 ufc por gramo (otros productos).

**10.3 Precisión** (ver como referencia ISO 7932).

## 11. INFORME DE ENSAYO

**11.1** El informe de ensayo debe especificar:

- a) toda la información necesaria para la completa identificación de la muestra;
- b) el método de muestreo usado, si se conoce;
- c) el método de ensayo usado, con referencia a esta norma;
- d) la temperatura de incubación;
- f) el resultado de la(s) prueba(s) obtenidos.



**ANEXO A**  
(normativo)**LÍMITES DE CONFIANZA PARA LA ESTIMACIÓN DE NÚMEROS PEQUEÑOS DE COLONIAS**

**A.1** Los límites de confianza al 95 % de nivel de la estimación de pequeños números, cuando el número de colonias en cajas seleccionadas es menor que 15, se dan en la tabla A.1.

**TABLA A.1**

Número de colonias	Límites de confianza	
	inferior	superior
1	<1	2
2	<1	4
3	<1	5
4	1	6
5	2	9
6	2	10
7	2	12
8	3	13
9	4	14
10	4	16
11	5	18
12	6	19
13	7	20
14	7	21
15	8	23

## ANEXO B

TABLA B.1. Características diferenciales de llamado-largo Grupo I especies de *Bacillus*

Característica	<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. mycoides</i>	<i>B. weihenstephanensis</i>	<i>B. anthracis</i>	<i>B. megaterium</i>
Reacción gram	+( <sup>a</sup> )	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+
Movilidad	±( <sup>b</sup> )	±	-( <sup>c</sup> )	+	-	±
Reducción de nitrato	+	+	+	+	+	-( <sup>d</sup> )
Descomposición de tirosina	+	+	±	+	-( <sup>d</sup> )	±
Resistencia la lisozima	+	+	+	+	+	-
Reacción yema de huevo	+	+	+	+	+	-
Utilización anaeróbica de glucosa	+	+	+	+	+	-
Reacción VP	+	+	+	+	+	-
Ácido producido de manitol	-	-	-	-	-	+
Hemólisis (oveja RBC)	+	+	+	ND	-( <sup>d</sup> )	-
Características de patogenicidad conocida	Producción de enterotoxinas	Cristales de endotoxina patogénica para insectos	Crecimiento rizoidal	Crecimiento a 6°C; no crecimiento a 43°C	Patógeno para animales y humanos	

<sup>a</sup> +, 90-100% de colonias son positivas.

<sup>b</sup> ±, 50-50% de colonias son positivas.

<sup>c</sup> -, 90-100% de colonias son negativas.

<sup>d</sup> -, más colonias son negativas.

ND No determinado

## APÉNDICE Z

### Z.1 DOCUMENTOS NORMATIVOS A CONSULTAR

- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-1 *Control microbiológico de los alimentos. Preparación de medios de cultivo y reactivos.*
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-2 *Control microbiológico de los alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico.*
- ISO 5725-1 *Accuarcy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 1: General principles and definitions.*
- ISO 5725-2 *Accuarcy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.*
- ISO 7932 *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of presumptive Bacillus cereus – Colony – count technique at 30°C.*
- MOSSEL, D. A.A., KOOPMAN, M. J. and JONGERIUS, E. *Appl. Microbiol.*, 15, 1967, pp. 650-653
- ICMSF. *Microorganismos in foods*, Vol. 1, 2<sup>nd</sup> edn., University of Toronto Press, 1978.
- COWELL and MORISETTI *J. Sci. Fd. Agric.*, 20, 1969, p. 573
- IN 'T VELD, P.H., SOENTORO, P.S.S. and NOTERMANS, S.H.W. *I.J. Food Microbiol.*, 20, 1993, pp. 23-36
- SCHULTEN, S.M., VAN de LUSTGRAAF, B.E.B., NAGELKERKE, N.J.D. and IN 'T VELD, P.H. *Report No. 286555001*, National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands, 1998
- SCHULTEN, S.M., IN 'T VELD, P.H., NAGELKERKE, N.J.D., SCOTTER, S., DE BUYSER, M.L., ROLLIER, P. and LAHELLEC, C. *I.J. Food Microbiology*, 57, 2000, pp. 53-61

### Z.2 BASES DE ESTUDIO

- Norma Técnica Colombiana ICONTEC 4679. *Microbiología. Método horizontal para el recuento de Bacillus cereus técnica de recuento de colonias.* Instituto Colombiano de Normas Técnicas, Bogotá 2006.
- ISO 7932 *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of presumptive Bacillus cereus – Colony – count technique at 30°C*, Ginebra 2004.
- Bacteriological analytical manual, Chapter 14 bacillus cereus. U.S. Food and Drug administration, 2012.
- AOAC. Official method 938.26. Differentiation of members of bacillus cereus Group. Microbiological Method. U. S., 2005.

## INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

**Documento:** NTE INEN 2661 **TÍTULO:** MICROBIOLOGÍA. DETERMINACIÓN DE **Código:** BACILLUS CEREUS. RECUENTO DE COLONIAS- MÉTODO AL 01.05-321 EN SUPERFICIE

<b>ORIGINAL:</b> Fecha de iniciación del estudio: 2012-03-05	<b>REVISIÓN:</b> Fecha de aprobación anterior del Consejo Directivo Oficialización con el Carácter de por Acuerdo Ministerial No. publicado en el Registro Oficial No.  Fecha de iniciación del estudio:
--	--

Fechas de consulta pública: de 2012-04-09 a 2012-04-23

Subcomité Técnico: **Microbiología**

Fecha de iniciación: 2012-05-04

Fecha de aprobación: 2012-06-07

Integrantes del Subcomité Técnico:

### NOMBRES:

Bioq. Bertha Pérez (Presidenta)  
Ing. Dayana Donoso  
Dra. Elena Granda Moreno  
  
Dra. Bioq. Pamela Jácome  
Bioq. Magaly Chasi  
Ing. Mary Casa  
Dra. Patricia Massuh  
Bioq. Cristina Araujo  
Dra. Luisa Ponguillo  
  
Dr. Luis Soto  
Dr. Bioq. Edgar Ruiz (Secretario Técnico)

### INSTITUCIÓN REPRESENTADA:

MIPRO  
INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE (QUITO)  
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL  
ECUADOR  
LABORATORIO MULTIANALITYCA  
UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR  
ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL  
INSTITUTO NACIONAL DE PESCA  
MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA  
INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE  
(GUAYAQUIL)  
LABSU (EL COCA)  
INEN

Otros trámites:

La Subsecretaría de la Calidad del Ministerio de Industrias y Productividad aprobó este proyecto de norma

Oficializada como: Voluntaria  
Registro Oficial No. 881 de 2013-01-29

Por Resolución No. 12340 de 2012-12-28

---

**Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN - Baquerizo Moreno E8-29 y Av. 6 de Diciembre  
Casilla 17-01-3999 - Telfs: (593 2)2 501885 al 2 501891 - Fax: (593 2) 2 567815  
Dirección General: E-Mail: [direccion@inen.gob.ec](mailto:direccion@inen.gob.ec)  
Área Técnica de Normalización: E-Mail: [normalizacion@inen.gob.ec](mailto:normalizacion@inen.gob.ec)  
Área Técnica de Certificación: E-Mail: [certificacion@inen.gob.ec](mailto:certificacion@inen.gob.ec)  
Área Técnica de Verificación: E-Mail: [verificacion@inen.gob.ec](mailto:verificacion@inen.gob.ec)  
Área Técnica de Servicios Tecnológicos: E-Mail: [inenlaboratorios@inen.gob.ec](mailto:inenlaboratorios@inen.gob.ec)  
Regional Guayas: E-Mail: [inenguayas@inen.gob.ec](mailto:inenguayas@inen.gob.ec)  
Regional Azuay: E-Mail: [inencuenca@inen.gob.ec](mailto:inencuenca@inen.gob.ec)  
Regional Chimborazo: E-Mail: [inenriobamba@inen.gob.ec](mailto:inenriobamba@inen.gob.ec)  
URL: [www.inen.gob.ec](http://www.inen.gob.ec)**