



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

COMENTARIOS

Con fundamento en el numeral 6.3.3.1 de la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SSA1-2020, se publica el presente proyecto a efecto de que los interesados, a partir del 1º de agosto hasta el 30 de septiembre de 2026, lo analicen, evalúen y envíen sus observaciones o comentarios en idioma español y con el sustento técnico suficiente ante la CPFEUM, sita en Río Rhin número 57, colonia Cuauhtémoc, código postal 06500, Ciudad de México, o al correo electrónico: consultas@farmacopea.org.mx.

DATOS DEL PROMOVENTE

Nombre: _____
Institución o empresa: _____
Teléfono: _____

Cargo: _____
Dirección: _____
Correo electrónico: _____

EL TEXTO EN COLOR ROJO HA SIDO MODIFICADO

Dice	Debe decir	Justificación*
MPB 0940. POTENCIA DEL TOXOIDE DIFTÉRICO PURIFICADO (ADSORBIDO)		
MÉTODO 1.		
A. Inmunización de los cobayos para la obtención de suero. Inocular por vía subcutánea una y media dosis individual humana de la vacuna, a no menos de cuatro cobayos de 450 a 550 g. Entre 4 y 6 semanas, sangrar a los animales y separar el suero. Preparar una mezcla a partes iguales del suero de cada cobayo, y en ésta valorar la concentración de antitoxina presente. B. Titulación de la toxina diftérica en Lr/100. MPB 0160. C. Titulación del suero en prueba. Usar una toxina diftérica diluida a 40 L _{r/100} /mL en solución amortiguadora de Glenney, el suero en prueba y una preparación de referencia de antitoxina diftérica diluida a 0.4 UI/mL en SR de solución		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*																														
salina y preparar las siguientes diluciones como se indica en las tablas 0940.1 y 0940.2:																																
Tabla 0940.1. Diluciones del suero en prueba.																																
<table><tr><th>Tubo</th><th>Dilución de suero en prueba</th><th>Suero diluido (ml.)</th><th>Regulador de Glenny (ml.)</th><th>Toxina 40 L₁/100/ml. (ml.)</th><th>Unidades esperadas UI/ml.</th></tr><tr><td>I</td><td>1:2.5 = 0.5 ml. de suero + 0.75 ml. de solución de NaCl 0.15 N</td><td>0.2</td><td>0.1</td><td>0.1</td><td>0.5</td></tr><tr><td>II</td><td>1:10 = 0.5 ml. de dilución I + 1.5 ml. de NaCl 0.15 N</td><td>0.2</td><td>0.1</td><td>0.1</td><td>2.0</td></tr><tr><td>III</td><td>1:25 = 0.5 ml. de dilución II + 0.75 ml. de solución de NaCl 0.15 N</td><td>0.2</td><td>0.1</td><td>0.1</td><td>5.0</td></tr><tr><td>IV</td><td></td><td>0.1</td><td>0.2</td><td>0.1</td><td>10.0</td></tr></table>	Tubo	Dilución de suero en prueba	Suero diluido (ml.)	Regulador de Glenny (ml.)	Toxina 40 L ₁ /100/ml. (ml.)	Unidades esperadas UI/ml.	I	1:2.5 = 0.5 ml. de suero + 0.75 ml. de solución de NaCl 0.15 N	0.2	0.1	0.1	0.5	II	1:10 = 0.5 ml. de dilución I + 1.5 ml. de NaCl 0.15 N	0.2	0.1	0.1	2.0	III	1:25 = 0.5 ml. de dilución II + 0.75 ml. de solución de NaCl 0.15 N	0.2	0.1	0.1	5.0	IV		0.1	0.2	0.1	10.0		
Tubo	Dilución de suero en prueba	Suero diluido (ml.)	Regulador de Glenny (ml.)	Toxina 40 L ₁ /100/ml. (ml.)	Unidades esperadas UI/ml.																											
I	1:2.5 = 0.5 ml. de suero + 0.75 ml. de solución de NaCl 0.15 N	0.2	0.1	0.1	0.5																											
II	1:10 = 0.5 ml. de dilución I + 1.5 ml. de NaCl 0.15 N	0.2	0.1	0.1	2.0																											
III	1:25 = 0.5 ml. de dilución II + 0.75 ml. de solución de NaCl 0.15 N	0.2	0.1	0.1	5.0																											
IV		0.1	0.2	0.1	10.0																											
Tabla 0940.2. Diluciones de la preparación de referencia.																																
<table><tr><th>Tubo</th><th>Antitoxina de referencia 1 UI/ml. (ml.)</th><th>Regulador de Glenny (ml.)</th><th>Toxina 40 L₁/100/ml. (ml.)</th></tr><tr><td>1</td><td>0.900</td><td>0.000</td><td>0.3</td></tr><tr><td>2</td><td>0.600</td><td>0.300</td><td>0.3</td></tr><tr><td>3</td><td>0.300</td><td>0.600</td><td>0.3</td></tr><tr><td>4</td><td>0.150</td><td>0.750</td><td>0.3</td></tr><tr><td>5</td><td>0.075</td><td>0.825</td><td>0.3</td></tr></table>	Tubo	Antitoxina de referencia 1 UI/ml. (ml.)	Regulador de Glenny (ml.)	Toxina 40 L ₁ /100/ml. (ml.)	1	0.900	0.000	0.3	2	0.600	0.300	0.3	3	0.300	0.600	0.3	4	0.150	0.750	0.3	5	0.075	0.825	0.3								
Tubo	Antitoxina de referencia 1 UI/ml. (ml.)	Regulador de Glenny (ml.)	Toxina 40 L ₁ /100/ml. (ml.)																													
1	0.900	0.000	0.3																													
2	0.600	0.300	0.3																													
3	0.300	0.600	0.3																													
4	0.150	0.750	0.3																													
5	0.075	0.825	0.3																													
Incubar las mezclas a 37 ± 1 °C durante 3 h. Rasurar el pelo del lomo del animal, posteriormente depilar al cobayo aplicando una preparación depilatoria que no cause daño al animal, humedeciendo previamente con agua tibia la región que se va a depilar. Inocular 0.1 mL de cada mezcla por vía intradérmica a cobayos de 400 a 500 g, en un																																



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
sentido para las diluciones en prueba y en el opuesto para la referencia. Medir las reacciones en los sitios de inoculación entre las 48 y 72 h. Determinar las unidades internacionales de antitoxina por mililitro de suero, en función de las unidades esperadas correspondientes a la mezcla que dio lugar a una reacción eritematosa de aproximadamente 10 mm de diámetro. Procurar que una reacción equivalente aparezca con la mezcla correspondiente al tercer tubo de la de referencia (véase tabla 0940.2).		
MÉTODO 2		
A. Titulación de la toxina diftérica en DL₅₀. Preparar una serie de diluciones utilizando como diluyente solución amortiguadora de Glenny (MPB 0160) para obtener una respuesta gradual, con un factor de dilución constante. Inocular por vía subcutánea 1 mL de las diluciones en cada uno de 16 cobayos de 250 a 300 g. Observar a los animales durante 5 días (considerando la hora de inoculación), registrar las muertes diariamente y calcular la DL₅₀ por un método estadístico de respuesta cuantal que permita calcular límites de confianza. B. Prueba de floculación para toxinas o toxoides Lf/mL. En una serie de diez tubos adicionar las cantidades de toxina o toxoide y solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 como se indica en la tabla 0940.3.		
Solución amortiguadora de fosfatos, pH 7.4 ± 0.1:		

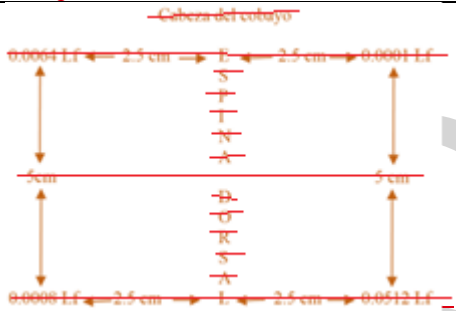


“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
Fosfato dibásico de sodio 20.704 g Fosfato monobásico de potasio 0.183 g Agua destilada 100 mL		
Para un primer ensayo incluir los tubos marcados con asterisco en la misma tabla, o alguna otra combinación de cantidades de antígeno que permitan una distribución convenientemente espaciada. Adicionar 0.5 mL de la antitoxina de referencia conteniendo 50 Lf/mL. Agitar unos segundos e incubar en baño de agua a una temperatura entre 49 y 50 °C. Observar constantemente y seleccionar el tubo que muestre floculación en primer término. Repetir el ensayo utilizando cuatro tubos que en la tabla 0940.3 se encuentran inmediatamente por arriba y cuatro por debajo del tubo seleccionado en el primer ensayo. Leer en la tabla el título que corresponda al tubo que primero muestre la floculación y calcular las Lf/mL de toxina o toxoide de acuerdo con la siguiente fórmula:		
$\text{Lf/mL toxina o toxoide} = \frac{\text{Unidades de antitoxina / mL} \times \text{mL de antitoxina}}{\text{mL de toxina toxoide}}$		
C. Inmunización. Preparar tres diluciones de la referencia de toxoide diftérico adsorbido y tres diluciones semejantes de la vacuna de muestra con un factor de dilución de 2 en SR de solución salina. Las diluciones se eligen de manera que la dosis protectora al 50 %, de cada preparación se encuentre entre la máxima y mínima diluciones empleadas. Inocular por vía subcutánea 1 mL de cada dilución		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
en un grupo de cobayos de 250 a 350 g. Utilizar un número de animales suficiente para cumplir con los criterios de validez. Usar cinco cobayos sin inocular, como testigos. Distribuir al azar los cobayos para cada grupo de tratamiento, e identificar los animales individualmente.		
D. Desafío. Después de 28 días de la inmunización, desafiar a los animales empleando alguna de las vías descritas a continuación:		
I. Vía intradérmica. Depilar el lomo de todos los cobayos. Preparar una dilución de una toxina apropiada en amortiguador de Glenney, que contenga 0.0512 Lf de toxina en 0.2 mL. Una toxina apropiada contiene entre 0.67 y 1.33 Lf/Lf y un Lf contiene entre 25 000 y 50 000 dosis de reacción mínima para la piel del cobayo. A partir de la dilución original (0.0512 Lf) preparar tres diluciones que contengan 0.0064, 0.0008 y 0.0001 Lf en 0.2 mL. Inocular 0.2 mL de las diluciones por vía intradérmica en cada uno de los cobayos inmunizados como se indica en la siguiente figura:		
		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*																																																																
Figura 0940.1. Distancias recomendadas para inoculación intradérmica de las diluciones.																																																																		
Tabla 0940.3. Prueba de floculación. Titulación de toxina o toxoide en Lf/mL. Escala de 16.6 a 125 Lf/mL para una antitoxina de referencia con 50.0 Lf/mL																																																																		
<table><tr><th>Tubo.</th><th>Toxina o toxoide (mL)</th><th>Solución amortiguadora de fosfatos (mL)</th><th>Título (Lf/mL)</th></tr><tr><td>1</td><td>1.50</td><td>0.50</td><td>16.6</td></tr><tr><td>2</td><td>1.40</td><td>0.60</td><td>17.8</td></tr><tr><td>3</td><td>1.30</td><td>0.70</td><td>19.0</td></tr><tr><td>4</td><td>1.20</td><td>0.80</td><td>20.8</td></tr><tr><td>5</td><td>1.10</td><td>0.90</td><td>22.7</td></tr><tr><td>6</td><td>1.05</td><td>0.95</td><td>23.8</td></tr><tr><td>*7</td><td>1.00</td><td>0.00</td><td>25.0</td></tr><tr><td>8</td><td>0.95</td><td>0.05</td><td>26.6</td></tr><tr><td>*9</td><td>0.90</td><td>0.10</td><td>27.7</td></tr><tr><td>10</td><td>0.85</td><td>0.15</td><td>29.4</td></tr><tr><td>*11</td><td>0.80</td><td>0.20</td><td>31.0</td></tr><tr><td>12</td><td>0.78</td><td>0.22</td><td>32.0</td></tr><tr><td>13</td><td>0.76</td><td>0.24</td><td>32.9</td></tr><tr><td>14</td><td>0.74</td><td>0.26</td><td>33.8</td></tr><tr><td>15</td><td>0.72</td><td>0.28</td><td>34.7</td></tr></table>	Tubo.	Toxina o toxoide (mL)	Solución amortiguadora de fosfatos (mL)	Título (Lf/mL)	1	1.50	0.50	16.6	2	1.40	0.60	17.8	3	1.30	0.70	19.0	4	1.20	0.80	20.8	5	1.10	0.90	22.7	6	1.05	0.95	23.8	*7	1.00	0.00	25.0	8	0.95	0.05	26.6	*9	0.90	0.10	27.7	10	0.85	0.15	29.4	*11	0.80	0.20	31.0	12	0.78	0.22	32.0	13	0.76	0.24	32.9	14	0.74	0.26	33.8	15	0.72	0.28	34.7		
Tubo.	Toxina o toxoide (mL)	Solución amortiguadora de fosfatos (mL)	Título (Lf/mL)																																																															
1	1.50	0.50	16.6																																																															
2	1.40	0.60	17.8																																																															
3	1.30	0.70	19.0																																																															
4	1.20	0.80	20.8																																																															
5	1.10	0.90	22.7																																																															
6	1.05	0.95	23.8																																																															
*7	1.00	0.00	25.0																																																															
8	0.95	0.05	26.6																																																															
*9	0.90	0.10	27.7																																																															
10	0.85	0.15	29.4																																																															
*11	0.80	0.20	31.0																																																															
12	0.78	0.22	32.0																																																															
13	0.76	0.24	32.9																																																															
14	0.74	0.26	33.8																																																															
15	0.72	0.28	34.7																																																															



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice				Debe decir	Justificación*
16	0.70	0.30	35.7		
17	0.68	0.32	36.8		
18	0.66	0.34	37.9		
19	0.64	0.36	39.1		
20	0.62	0.38	40.0		
21	0.61	0.39	41.0		
*22	0.60	0.40	41.6		
23	0.59	0.41	42.3		
24	0.58	0.42	43.1		
25	0.57	0.43	43.9		
26	0.56	0.44	44.6		
27	0.55	0.45	45.4		
28	0.54	0.46	46.3		
29	0.53	0.47	47.2		
30	0.52	0.48	48.1		
31	0.51	0.49	49.0		
*32	0.50	0.50	50.0		
33	0.49	0.51	51.0		
34	0.48	0.52	52.0		
35	0.47	0.53	53.0		
36	0.46	0.54	54.3		
37	0.45	0.55	55.5		
38	0.44	0.56	56.8		
39	0.43	0.57	58.1		
40	0.42	0.58	59.5		
41	0.41	0.59	61.0		
*42	0.40	0.60	62.5		
43	0.39	0.61	64.1		
44	0.38	0.62	65.8		
45	0.37	0.63	67.8		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
46 0.36 0.64 69.4		
47 0.35 0.65 71.4		
48 0.34 0.66 73.5		
49 0.33 0.67 75.8		
50 0.32 0.68 78.1		
51 0.31 0.69 80.6		
52 0.30 0.70 83.3		
53 0.29 0.71 86.2		
54 0.28 0.72 89.3		
55 0.27 0.73 92.6		
56 0.26 0.74 95.4		
57 0.25 0.75 100.0		
58 0.24 0.76 104.2		
59 0.23 0.77 108.6		
60 0.22 0.78 113.7		
61 0.21 0.79 119.0		
62 0.20 0.80 125.0		
*Número de tubo para incluir en un primer ensayo:		
Inocular los animales testigo con diluciones que contengan 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 millonésimas de 1 Lf de la toxina de desafío en amortiguador de Glenny. A las 48 h medir los eritemas formados y registrar el número de sitios libres de reacción. Tabular los valores de respuesta del desafío intradérmico para todos los animales que recibieron cada dilución de la vacuna, y usar estos datos sin transformarlos para obtener una estimación de la potencia relativa por un ensayo de líneas paralelas.		
Criterios de aceptación. La prueba es válida si:		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
1. Las curvas dosis-respuesta de ambas preparaciones son lineales y paralelas.		
2. La dilución de la toxina que contiene 50 millonésimos de Lf da un eritema positivo en al menos 80 % de los cobayos testigo.		
3. La dilución que contiene 25 millonésimos de Lf no da reacción en al menos 80 % de los cobayos.		
4. Si estos criterios no se cumplen, utilizar una toxina diferente.		
II. Vía subcutánea. Inocular 1 mL de una toxina diftérica que contenga aproximadamente 100 DL ₅₀ en los animales previamente inmunizados. Revisar a los cobayos dos veces al día, a la misma hora, durante 5 días, y registrar el número de animales protegidos para cada dilución de la vacuna. Inocular a cada uno de los animales testigo 1 mL de una dilución 1:100 de la toxina usada para desafiar a los animales inmunizados. Calcular la potencia relativa por un ensayo de líneas paralelas. Criterios de aceptación. La prueba es válida si:		
1. Mueren algunos, pero no todos los cobayos testigo, inoculados con una dilución 1:100 de la dosis de desafío de la toxina.		
2. La dilución más baja de la vacuna protege a más de la mitad de los animales.		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
3.—La dilución más alta de la vacuna protege a menos de la mitad de los animales.		
4.—Las curvas dosis-respuesta de ambas preparaciones son lineales y paralelas. Si no se cuenta con prueba de paralelismo, la prueba se puede aceptar si la pendiente de la curva más inclinada no es mayor que 150 % de la menos inclinada.		
Los límites de confianza al 95 % de estas pruebas están entre 50 y 200 % de la potencia estimada.		
La potencia de la vacuna antidiftérica se determina mediante la administración de la vacuna a cobayos seguida del desafío con toxina diftérica (métodos A o B) o mediante la determinación del título de anticuerpos contra la toxina o el toxoide diftérico en el suero de los cobayos (método C y MPB 0950 o método D).		
La Unidad Internacional (UI) es la actividad contenida en una cantidad determinada del Estándar Internacional, que consiste en una cantidad de toxoide diftérico adsorbido en hidróxido de aluminio. El contenido de Unidades Internacionales del Estándar Internacional lo establece la Organización Mundial de la Salud (OMS).		
El toxoide diftérico purificado (adsorbido), es adecuado para su uso como preparación de referencia en los métodos A-C.		
El método elegido para el ensayo del toxoide diftérico purificado (adsorbido) depende del propósito previsto. El método A o el B se utilizan:		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
1. durante el desarrollo de una vacuna, para validar su producción;		
2. siempre que se necesite una revalidación tras un cambio significativo en el proceso de fabricación.		
El método A o el B también se pueden utilizar para el ensayo de rutina, pero en el espíritu de las 3Rs, siempre que sea posible se utilizará el método C.		
Se puede utilizar el método C tras verificar su idoneidad para el producto. Para ello, se analizan en paralelo un número adecuado de lotes (normalmente 3) mediante el método C y el método A o el B.		
Cuando se preparan diferentes vacunas (monovalentes o en combinaciones) a partir de toxoide diftérico del mismo origen y a concentración comparable expresada en Lf/ml, se puede suponer que la idoneidad demostrada para la combinación con el mayor número de componentes es válida para las combinaciones con menos componentes y para las vacunas monovalentes. La idoneidad del método C para medir la potencia de la fracción diftérica de toda combinación que contenga en el mismo vial un componente de tos ferina de células enteras o una vacuna conjugada contra <i>Haemophilus</i> tipo b formulada con toxoide diftérico o CRM 197 como proteína acarreadora debe evaluarse siempre por separado.		
En el caso de combinaciones que contienen componentes de difteria y tétanos, el método C puede realizarse con el mismo grupo de animales		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
utilizado para el ensayo del toxoide tetánico purificado (adsorbido), cuando se haya demostrado que las condiciones de inmunización para los componentes de difteria y tétanos (por ejemplo, dosis, duración) son válidas para la vacuna combinada.		
El diseño de los ensayos descritos a continuación utiliza múltiples diluciones para las preparaciones de prueba y de referencia. Una vez que el analista tiene suficiente experiencia con este método para una vacuna determinada, es posible emplear un modelo simplificado, con una dilución única para las preparaciones de prueba y de referencia. Un modelo de este tipo permite al analista determinar si la potencia de la preparación de prueba es significativamente mayor que el mínimo requerido, pero no proporciona información sobre la linealidad, el paralelismo y la forma de la curva dosis-respuesta. El modelo simplificado permite una reducción considerable del número de animales necesarios.		
Cuando se utiliza un ensayo de dilución única, la consistencia de la producción y de la prueba a lo largo del tiempo se controlan mediante indicadores adecuados y realizando periódicamente, por ejemplo, cada 2 años, un ensayo completo de diluciones múltiples. Para el método C, los indicadores adecuados para controlar la consistencia de la prueba son:		
- La media y la desviación estándar de los títulos o puntajes relativos de antitoxina de las muestras de		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
suero obtenidas tras la administración de una dosis fija de la preparación de vacuna de referencia;		
– los títulos o puntajes de antitoxina de las series control (muestras de suero positivas y negativas);		
– la razón entre los títulos de antitoxina o puntajes para el suero control positivo y las correspondientes a las muestras de suero a de la vacuna de referencia.		
MÉTODO A: ENSAYO DE DESAFÍO INTRADÉRMICO EN COBAYO		
Selección y distribución de los animales de ensayo		
Utilice en el ensayo cobayos blancos, sanos, de la misma raza y de un tamaño adecuado para el número prescrito de sitios de desafío, siendo la diferencia de masa corporal entre el animal más pesado y el más ligero no mayor de 100 g. Utilice cobayos del mismo sexo o con machos y hembras distribuidos equitativamente entre los grupos. Distribuya los cobayos en no menos de 6 grupos iguales; utilice grupos que contengan un número suficiente de animales para obtener resultados que cumplan con los requisitos para un ensayo válido prescritos más adelante. Si la toxina de desafío que se va a utilizar no ha mostrado ser estable o no ha sido estandarizada adecuadamente, incluya 5 cobayos como controles no vacunados.		
Preparación de referencia		
Utilice una preparación de referencia adecuada, (p. ej., un toxoide diftérico adsorbido) o un lote de		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
vacuna que haya demostrado ser eficaz en estudios clínicos, o un lote representativo de tal producto, y que haya sido calibrado en Unidades Internacionales en relación con una referencia secundaria o directamente contra el Estándar Internacional para el toxoide diftérico (adsorbido).		
Selección de la toxina de desafío		
Seleccione una preparación de toxina diftérica que contenga de 67 a 133 Lr/100 en 1 Lf y de 25 000 a 50 000 dosis reactivas mínimas (DRM)* para piel de cobayo en 1 Lf. La toxina de desafío también debe tener una pureza de al menos 1 500 Lf por mg de nitrógeno proteico (no dializable).		
*Nota: La DRM, representa la dosis más baja de toxina que, tras 48 horas, provoca un eritema específico (de 5 a 10 mm de diámetro) en más del 50 % de los animales desafiados.		
Si se ha demostrado que la preparación de toxina de desafío es estable, no es necesario verificar su actividad en cada ensayo.		
Dilución de las preparaciones de prueba y de referencia de toxoide		
Utilizando una solución de 9 g/L de cloruro de sodio, prepare diluciones seriadas de la vacuna que se va a examinar y de la preparación de referencia, con un factor de dilución no mayor a 2.5, de manera que las diluciones intermedias, cuando se inyecten por vía subcutánea a una dosis de 1.0 mL por cobayo, resulten en una puntuación intradérmica de aproximadamente 3 cuando se desafía a los animales ^{1, 2} .		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
Inmunización		
Asignar las diluciones de toxoides de prueba y de referencia (una por grupo), a los cobayos, e inyectar por vía subcutánea 1.0 mL de cada dilución en cada cobayo del grupo al que se asigne esa dilución.		
Preparación de la solución de toxina de desafío		
Inmediatamente antes de su uso, diluya la toxina de desafío con un diluyente adecuado para obtener una solución que contenga aproximadamente 0.0512 Lf en 0.2 mL. Prepare a partir de esta dilución una serie de 5 diluciones cuádruples adicionales que contengan aproximadamente 0.0128, 0.0032, 0.0008, 0.0002 y 0.00005 Lf en 0.2 mL.		
Desafío		
Después de 28 días, rasurar ambos flancos de cada cobayo e inyectar 0.2 ml de cada una de las 6 diluciones de toxina por vía intradérmica en 6 sitios separados en cada uno de los cobayos vacunados, de manera de minimizar la interferencia entre sitios adyacentes, cómo se indica en la siguiente figura:		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
Cabeza del cobayo 0.0128 Lf ← 2.5 cm → E ← 2.5 cm → 0.00005 Lf 2.5 cm ↓ S ↓ 2.5 cm 0.0008 Lf ← 2.5 cm → D ← 2.5 cm → 0.0032 Lf 2.5 cm ↓ O ↓ 2.5 cm 0.0002 Lf ← 2.5 cm → R ← 2.5 cm → 0.0512 Lf 2.5 cm ↓ A ↓ 2.5 cm 0.0002 Lf ← 2.5 cm → L ← 2.5 cm → 0.0512 Lf		
Determinación de la actividad de la toxina de desafío		
Si es necesario, inyectar a los animales de control no vacunados diluciones que contengan 80, 40, 20, 10 y 5×10^{-6} Lf de la toxina de desafío en un diluyente apropiado.		
Lectura e interpretación de los resultados		
Examinar todos los sitios de inyección de la toxina 48 h después del desafío y registrar la incidencia de eritema diftérico específico. Registrar también el número de sitios libres de reacción. Tabular las puntuaciones ² del desafío intradérmico para todos los animales que recibieron la misma dilución de vacuna. Esos datos, sujetos a una transformación adecuada, tal como (puntuación) ² o $\arcsen((puntuación/6)^2)$, se pueden emplear para obtener una estimación de la potencia relativa para cada una de las preparaciones de prueba mediante análisis cuantitativo de líneas paralelas.		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
Notas: 1) Un resultado es positivo si la pápula del eritema que sigue a la inyección de la toxina de desafío es igual o mayor a 5 mm de diámetro. 2) Por ejemplo, a un animal con reacciones de eritema positivas en los 6 sitios de desafío (sin protección) se le debe asignar una puntuación de cero. A un animal con tres reacciones positivas y tres negativas (protección moderada) se le debe asignar una puntuación de tres, y a un animal con seis sitios de reacción negativos (protección total) se le debe asignar una puntuación de seis.		
Requisitos para una prueba válida		
La prueba no es válida a menos que:		
– tanto para la vacuna que se va a examinar como para la preparación de referencia, la puntuación media obtenida en el nivel de dosis más bajo sea inferior a 3 y la puntuación media en el nivel de dosis más alto sea superior a 3;		
– cuando sea aplicable, la dilución de toxina que contiene 40×10^{-6} Lf dé un eritema positivo en al menos el 80 % de los sitios del cobayo de control y la dilución que contiene 20×10^{-6} Lf dé un eritema positivo en menos del 80 % de los sitios del cobayo correspondiente. Si no se cumplen estos criterios, se debe seleccionar una toxina diferente);		
– los límites de confianza ($P = 0.95$) de la potencia estimada estén comprendidos entre el 50 y el 200 %;		
– el análisis estadístico no muestre ninguna desviación de la linealidad ni del paralelismo.		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
La prueba puede repetirse, pero cuando se realiza más de un ensayo, todos los resultados válidos deben combinarse en la estimación de la potencia.		
MÉTODO B: ENSAYO DE DESAFÍO LETAL EN COBAYO		
Selección y distribución de los animales de ensayo		
Utilice en el ensayo cobayos sanos de la misma raza, con un peso de 250 a 350 g cada uno. Utilice cobayos del mismo sexo o con machos y hembras distribuidos equitativamente entre los grupos. Distribuya los cobayos al azar en no menos de 6 grupos iguales e identifique los animales individualmente; utilice grupos que contengan un número suficiente de animales para obtener resultados que cumplan los requisitos para un ensayo válido prescritos más adelante. Si la toxina de desafío que se va a utilizar no ha mostrado ser estable o no ha sido estandarizada adecuadamente, incluya 4 grupos más de 5 cobayos como controles no vacunados.		
Preparación de referencia		
Utilice una preparación de referencia adecuada, (por ejemplo, un toxoide diftérico adsorbido) o un lote de vacuna que haya demostrado ser eficaz en estudios clínicos, o un lote representativo de tal producto, y que haya sido calibrado en Unidades Internacionales en relación con una referencia secundaria o directamente contra el Estándar Internacional para el toxoide diftérico (adsorbido).		
Selección de la toxina de desafío		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
Seleccione una preparación de toxina diftérica que contenga no menos de 100 LD ₅₀ por mililitro. Si se ha demostrado que la preparación de toxina de desafío es estable, no es necesario verificar su dosis letal en cada ensayo.		
Dilución de las preparaciones de prueba y de referencia de toxoide		
Utilizando una solución de 9 g/L de cloruro de sodio, prepare diluciones seriadas de la vacuna a examinar y de la preparación de referencia, con un factor de dilución no mayor a 2.5 veces. Las diluciones intermedias de ambas series, cuando se inyectan por vía subcutánea a una dosis de 1.0 mL por cobayo, deben proteger aproximadamente al 50 % de los animales de los efectos letales de la inyección subcutánea de la cantidad de toxina diftérica prescrita para esta prueba.		
Inmunización		
Asignar una dilución de toxoide a cada grupo de cobayos, e inyectar por vía subcutánea 1.0 mL de cada dilución a cada cobayo.		
Preparación de la solución de toxina de desafío		
Inmediatamente antes de su uso, diluya la toxina de desafío con un diluyente adecuado para obtener una solución que contenga aproximadamente 100 LD ₅₀ por mililitro. Si es necesario, prepare a partir de esta dilución diluciones 1 a 32, 1 a 100 y 1 a 320 con el mismo diluyente, para verificar la actividad de la toxina.		
Desafío		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
Después de 28 días, inyectar 1.0 mL de solución de toxina diftérica de desafío que contenga aproximadamente 100 DL ₅₀ en los animales previamente inmunizados. Revisar a los cobayos dos veces al día, a la misma hora, durante 5 días, y registrar el número de animales protegidos para cada dilución de la vacuna.		
Determinación de la actividad de la toxina de desafío		
Si es necesario, asignar la solución de toxina de desafío y cada una de las 3 diluciones preparadas a partir de ella a cada uno de los 4 grupos de 5 cobayos testigo, e inyectar por vía subcutánea 1.0 mL de cada solución a cada cobayo del grupo correspondiente.		
Lectura e interpretación de resultados		
Contar el número de cobayos supervivientes 4 días después de la inyección de la toxina de desafío. Calcular la potencia relativa de la vacuna a examinar con respecto a la potencia de la preparación de referencia, con base en la proporción de animales supervivientes en cada uno de los grupos de cobayos vacunados, utilizando los métodos estadísticos habituales (ensayo de líneas paralelas/respuesta cuantil).		
Requisitos para una prueba válida		
La prueba no es válida a menos que:		
– tanto para la vacuna que se va a examinar como para la preparación de referencia, la dosis protectora del 50 % se encuentre entre la dosis		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
más alta y la más baja de las preparaciones administradas a los cobayos;		
– cuando corresponda, el número de animales que mueren en los 4 grupos de 5 cobayos inyectados con la solución de toxina de desafío y sus 3 diluciones indique que la dosis de desafío fue aproximadamente 100 DL ₅₀ ;		
– los límites de confianza ($P = 0.95$) de la potencia estimada estén comprendidos entre el 50 y el 200 %;		
– el análisis estadístico no muestre ninguna desviación de la linealidad ni del paralelismo.		
La prueba puede repetirse, pero cuando se realiza más de un ensayo, todos los resultados válidos deben combinarse en la estimación de la potencia.		
MÉTODO C. ENSAYO DE ANTICUERPOS EN COBAYO		
Selección y distribución de los animales de ensayo		
Utilice en el ensayo cobayos sanos de la misma raza, con un peso de entre 250 a 350 g cada uno. Utilice cobayos del mismo sexo o con machos y hembras distribuidos equitativamente entre los grupos. Distribuya los cobayos en no menos de 6 grupos iguales e identifique los animales individualmente; utilice grupos que contengan un número suficiente de animales para obtener resultados que cumplan los requisitos para un ensayo válido prescritos más adelante. Utilice otro grupo de cobayos no vacunados del mismo origen para proporcionar un control sérico negativo. Si se		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
ha demostrado la consistencia del ensayo, puede utilizarse un control sérico negativo de referencia.		
Preparación de referencia		
Utilice una preparación de referencia adecuada, (por ejemplo, un toxoide diftérico adsorbido) o un lote de vacuna que haya demostrado ser eficaz en estudios clínicos, o un lote representativo de tal producto, y que haya sido calibrado en Unidades Internacionales en relación con una referencia secundaria o directamente contra el Estándar Internacional para el toxoide diftérico (adsorbido).		
Dilución de las preparaciones de prueba y de referencia de toxoide		
Utilizando una solución de 9 g/L de cloruro de sodio, prepare diluciones seriadas de la vacuna a examinar y de la preparación de referencia. Se ha comprobado que es adecuado un factor de dilución de entre 2.5 y 5. Utilice no menos de 3 diluciones dentro del rango de, por ejemplo, 0.5 a 16 UI/mL para la vacuna de referencia y dentro del rango de, por ejemplo, 1:2 a 1:125 para la vacuna que se va a examinar. Utilice las diluciones para la inmunización preferiblemente dentro de 1 h de su preparación. Asigne una dilución a cada grupo de cobayos.		
Inmunización		
Inyectar por vía subcutánea a cada cobayo 1.0 mL de la dilución asignada a su grupo.		
Toma de muestras de sangre		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
De 35 a 42 días después de la inmunización, tomar una muestra de sangre de cada cobayo vacunado y de control utilizando un método adecuado.		
Preparación de las muestras de suero		
Evitar la congelación y descongelación frecuente de las muestras de suero. Para prevenir la contaminación microbiana, es preferible realizar las manipulaciones en una cabina de flujo laminar.		
Determinación del título de anticuerpos		
Determinar el título o puntuación relativa de anticuerpos de cada muestra de suero mediante un método inmunoquímico adecuado. Se ha comprobado que los métodos que se describen en <i>MPB 0950</i> (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas -- ELISA y ensayo de células Vero) son adecuados.		
Cálculo de la potencia		
Calcular la potencia de la vacuna a examinar en Unidades Internacionales respecto a la preparación de referencia, utilizando los métodos estadísticos habituales.		
Requisitos para una prueba válida		
La prueba no es válida a menos que:		
– los límites de confianza ($P = 0.95$) de la potencia estimada estén comprendidos entre el 50 y el 200 %;		
– el análisis estadístico muestre una pendiente significativa y ninguna desviación de la linealidad y el paralelismo de las curvas dosis-respuesta (justificar estadísticamente si se encuentran desviaciones significativas).		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
La prueba puede repetirse, pero cuando se realiza más de un ensayo, todos los resultados válidos deben combinarse en la estimación de la potencia.		
MÉTODO D: INDUCCIÓN DE ANTITOXINA (NIH MODIFICADO)		
Inmunización de los cobayos para la obtención de suero		
Inyectar por vía subcutánea una y media dosis individual humana (0.75 mL) de la vacuna, a no menos de cuatro cobayos de 450 a 550 g. Entre las 4 y las 6 semanas posteriores a la vacunación, sangrar a los animales y separar el suero. Preparar una mezcla a partes iguales del suero de cada cobayo, y en ésta valorar la concentración de antitoxina presente.		
Titulación de la toxina diftérica en Lr/100 Se realiza de acuerdo con el <i>MPB 0160</i> .		
Titulación de la antitoxina diftérica inducida		
Usar una toxina diftérica diluida a 40 Lr/100/mL en solución amortiguadora de Glenny, el suero en prueba y una preparación de referencia de antitoxina diftérica diluida a 0.4 UI/mL en solución salina SR (NaCl 0.15 M), para preparar las diluciones que se indican en las <i>tablas 0940.1 y 0940.2</i> .		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice						Debe decir		Justificación*
Tabla 0940.1. Diluciones del suero en prueba.								
Tubo	Dilución de suero en prueba	Suero diluido (mL)	Regulador de Glenny (mL)	Toxina 40 Lr/100/mL (mL)	Unidades esperadas UI/mL			
1	I 1:2.5 = 0.5 m L de suero + 0.75 mL de solución de NaCl 0.15 M	0.2	0.1	0.1	0.5			
2	de NaCl 0.15 M	0.1	0.2	0.1	1.0			
3	II 1:10 = 0.5 m L de dilución I + 1.5 mL de NaCl 0.15 M	0.2	0.1	0.1	2.0			
4	III 1:25 = 0.5 m L de dilución II + 0.75 mL de solución de NaCl 0.15 M	0.2	0.1	0.1	5.0			
5		0.1	0.2	0.1	10.0			
Tabla 0940.2. Diluciones de la preparación de referencia.								
Tubo	Antitoxina de referencia 0.4 UI/mL (mL)	Regulador de Glenny (mL)	Toxina 40 Lr/100/mL (mL)					
1	0.900	0.000	0.3					



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice				Debe decir	Justificación*
2	0.600	0.300	0.3		
3	0.300	0.600	0.3		
4	0.150	0.750	0.3		
5	0.075	0.825	0.3		
Incubar las mezclas a 37 ± 1 °C durante 3 h.					
Depilación de cobayos					
Rasurar el pelo del dorso y los flancos del animal, procediendo después a depilar la piel aplicando una preparación que no cause daño, y humedeciendo con agua tibia la región que se va a depilar, usando también agua tibia para eliminar los restos de mezcla depilatoria.					
Inyección de animales y lectura de resultados					
Inyectar 0.1 mL de cada mezcla por vía intradérmica a cobayos de 400 a 500 g, previamente rasurados o depilados, a ambos lados de la espina dorsal, en un sentido para las diluciones en prueba y en el opuesto para la referencia. Medir las reacciones en los sitios de inyección entre las 48 y 72 h posteriores. Determinar las unidades internacionales de antitoxina por mililitro de suero, en función de las unidades esperadas correspondientes a la mezcla que dio lugar a una reacción eritematosa de aproximadamente 10 mm de diámetro. Procurar que una reacción equivalente aparezca con la mezcla correspondiente al tercer tubo de la serie de referencia (véase <i>tabla 0940.2</i>).					

*Para una mejor comprensión de su solicitud adjunte bibliografía u otros documentos que sustenten sus comentarios.