"2026, Año de Margarita Maza"

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 noviembre hasta el 31 de diciembre 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:		**Cargo:**	
Institución o empresa:		**Dirección:**	
Teléfono:		**Correo electrónico:**	

EL TEXTO EN COLOR ROJO HA SIDO MODIFICADO

Dice	Debe decir	Justificación*
MPB 0950. POTENCIA ~~POR MÉTODO *IN VITRO* DE~~ TOXOIDE DIFTÉRICO POR MÉTODO *IN VITRO*.		
Para evaluar la potencia de la vacuna contra la difteria empleando serología como procedimiento alternativo al desafío en cobayos (MPB 0940; MÉTODOS A y B), se comparan las respuestas de anticuerpos al toxoide diftérico inducidas por las vacunas de prueba con la respuesta de anticuerpos inducida por la vacuna de referencia. Los ensayos ELISA y de células Vero son ejemplos de métodos adecuados para la determinación del título de anticuerpos. Las metodologías que se describen a continuación son de uso opcional, ya que existen otros diseños aceptables que pueden emplearse siempre y cuando estén debidamente validados.		
MUESTRAS DE SUERO.		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
Obtener el suero de los animales previamente inmunizados con la vacuna a evaluar y la vacuna de referencia *(MPB 0940)*. Las muestras de suero pueden almacenarse a menos 20 °C hasta su empleo.		
A. ELISA		
Determinación del título de anticuerpos		
Las titulaciones de sueros de cobayos se realizan en ~~M~~microplacas cubiertas con toxoide diftérico purificado. Se incluyen en cada placa ~~Un~~ antisueros de cobayo, uno como control positivo calibrado en unidades internacionales por mililitro~~;~~, y otro como ~~un~~ control negativo, ~~de suero de cobayo se titula de manera paralela con la muestra de prueba en cada placa~~ para monitorear el desempeño del ensayo. Se visualiza la unión de los anticuerpos contra toxoide diftérico ~~Los anticuerpos antidifteria unidos al toxoide son visualizados~~ por la adición de ~~por~~ un anticuerpo conjugado a una enzima, dirigido contra la IgG de cobayo, seguid~~oa~~ por la adición del sustrato correspondiente. Se mide la densidad óptica y se calcula el título de anticuerpos para cada muestra de suero individual con relación al antisuero de ~~cobayo~~ control positivo. La potencia de la vacuna de prueba se determina comparando la respuesta de anticuerpos en cobayos inmunizados con la vacuna de prueba y con la preparación de vacuna de referencia, calibrad~~oa~~ en unidades internacionales.		
~~**A. MÉTODO ELISA**~~		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
~~**MATERIAL Y REACTIVOS**~~ ***Materiales y reactivos***		
1. Placas de ELISA ~~con~~ de 96 pozos.		
2. Suero de cobayo normal (sin inmunizar; control negativo). ~~NIBSC98/686 o un estándar equivalente.~~		
3. Suero de cobayos inmunizados con la vacuna antidiftérica adsorbida (control positivo). ~~NIBSC 98/572 o un estándar equivalente.~~		
4. Conjugado con peroxidasa: Anticuerpos de conejo o de cabra contra IgG de cobayo conjugados con peroxidasa.		
5. Toxoide diftérico. purificado ~~(NIBSV 02/176) o equivalente,~~ para cubrir placas de ELISA.		
6. Solución amortiguadora de recubrimiento carbonato (pH 9.6): Carbonato de sodio anhidro 1.59 g Bicarbonato de sodio 2.93 g Agua 1 000 mL		
Distribuir en alícuotas de aproximadamente 150 mL y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.		
7. Solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS), pH 7.4: ~~(PBS)~~		
Cloruro de sodio 80 .0 g		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
Fosfato de potasio monobásico 2.0 g Fosfato de sodio dibásico•$2H_2O$ 14.3 g Cloruro de potasio 2.0 g Agua 1 000 mL 8. Almacenar a temperatura ambiente para evitar cristalización. Diluir 1:10 con agua antes de usar.		
8. Solución de ácido cítrico Ácido cítrico•H_2O 10.51 g Agua 1 000 mL Ajustar el pH a 4.0 con NaOH 10 N		
9. Solución amortiguadora para lavado: PBS con 0.05 % (m/v) de polisorbato 20.		
10. Solución ~~D~~diluyente ~~PBS solución amortiguadora bloqueador~~ / bloqueadora: PBS con 0.05 % de polisorbato 20 y 2.5 % de leche descremada deshidratada.		
~~11. Diluyente de muestra:~~ ~~PBS con 0.05 % de polisorbato 20 y 1 % de leche descremada deshidratada.~~		
~~12.~~ 11. Sustrato de la ~~P~~peroxidasa: Preparar un poco antes de ~~usar~~ su empleo: Disolver 10 mg de diamonio 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS) en 20 mL de		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
solución de ácido cítrico. ~~Inmediatamente antes de usar adicionar~~ Agregar 5 µL de peróxido de hidrógeno ~~fuerte~~ (30 %) inmediatamente antes de su uso.		
~~PROCEDIMIENTO~~ ***Procedimiento***		
La siguiente descripción es un ejemplo de distribución de la placa. Los pozos 1A-H son para el suero control negativo, los pozos 4A-H y 10A-H son para el suero de control positivo para monitorear el ensayo. Los pozos 2-3, 5-9 y 11-12 A-H son para las muestras de prueba, ver *Figura 1*.		
 B = Blanco (control negativo) M = Muestras de prueba CP = Control positivo *La muestra de suero pre-diluida se agrega a la fila A de una columna. ***Figura 1***. Disposición de la placa de ELISA		
Nota: Se debe tener cuidado en que las muestras se distribuyan de forma aleatoria en la placa y que las posiciones varíen de una placa a otra, con el fin de evitar sesgos.		
1. Pre-diluir el suero control negativo y el suero control positivo (a partir de aproximadamente 0.01 UI/mL) y, de ser necesario, los sueros de prueba. Los		

	B	M1	M2	CP	M3	M4	M5	M6	M7	CP	M8	M9
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*
B	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2
C	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4
D	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8
E	etc.	etc.	etc.	etc.	etc.	etc.	etc.	etc.	etc.	etc.	etc.	etc.
F												
G												
H												

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
sueros de prueba incluyen aquellos provenientes de cobayos inmunizados con la vacuna de prueba o con la vacuna de referencia. ***Nota:*** El antisuero de cobayo de control positivo, los sueros de prueba y el control negativo se diluyen en *solución diluyente / bloqueadora* hasta alcanzar una concentración que genere una curva dosis-respuesta adecuada. El suero de control negativo no debe diluirse más allá de la dilución más baja utilizada para los sueros de prueba. Se sugiere una dilución de 1/200 como punto de partida para los sueros de prueba, aunque esta variará en función de la dilución de la vacuna utilizada para la inmunización de los cobayos.		
2. ~~A cada pozo adicionar 100 µL de toxoide diftérico (0.5 Lf/mL en solución amortiguadora de carbonato pH 9.6).~~ Cubrir la placa con toxoide diftérico (0.5 Lf/mL en solución amortiguadora de carbonato a pH 9.6), a razón de 100 µL por pozo.		
3. ~~Mantener 1 noche a 4 °C con atmósfera húmeda. (No sobreponer más de cuatro~~		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
~~placas para evitar gradiente de temperatura).~~ Incubar las placas durante una noche a 4 °C en atmósfera húmeda. (No apilar más de cuatro placas para evitar gradientes de temperatura).		
4. ~~Lavar las placas con solución amortiguadora de lavado tres veces.~~ Posterior al tiempo de incubación, lavar las placas tres veces con *solución amortiguadora para lavado*.		
5. Bloquear las placas. adicionando a ~~A~~ cada pozo ~~adicionar~~ 100 µL de~~l diluyente solución amortiguadora bloqueador~~ *solución diluyente / bloqueadora*.		
6. Incubar a 37 °C durante 1 h en atmósfera húmeda.		
7. Lavar las placas con ~~solución amortiguadora de lavado~~ *solución amortiguadora de lavado*.		
8. Adicionar 100 µL de solución ~~amortiguadora bloqueador~~ *diluyente / bloqueadora* a cada pozo, excepto a los de la hilera A.		
9. Adicionar 100 µL del suero que corresponda ~~en~~ a los pozos A y B de cada columna: ~~(se tendrá una columna por suero)~~.		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
- Las ~~C~~columnas ~~2~~ 4 y ~~12~~ 10 contendrán suero control positivo. - La ~~C~~columna 1 contendrá suero control negativo. - Las ~~C~~columnas ~~3 a 11 para prueba de~~ restantes contendrán 9 sueros problema~~, una columna por suero~~.		
10. Hacer diluciones al doble, empleando una micropipeta multicanal, a partir de ~~desde~~ los pozos B hasta ~~a~~ los pozos H. Desechar 100 µL de los pozos H.		
11. Incubar a 37 °C durante 2 h.		
12. Lavar tres veces con *solución amortiguadora ~~de~~ para lavado*.		
13. A cada pozo adicionar 100 µL de *conjugado ~~de~~ con peroxidasa* (dilución 1:2 000).		
14. Incubar a 37 °C durante 1 h en atmosfera húmeda.		
15. Lavar tres veces con *solución amortiguadora para lavado*.		
16. ~~Adicionar~~ Añadir 100 µL del *sustrato ~~para~~ de la peroxidasa* a cada pozo.		
17. Mantener 30 min a temperatura ambiente. Proteger de la luz.		
18. Leer a 405 nm en el orden de adición del sustrato.		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
~~**CÁLCULO DEL TÍTULO RELATIVO DE ANTICUERPOS**~~ ***Cálculo del título relativo de anticuerpos*** El ~~desarrollo de~~ color en los pozos~~, teóricamente~~ es directamente proporcional a la concentración de anticuerpos contra difteria en las muestras. La cantidad relativa de anticuerpos contra difteria en el suero problema ~~en relación al control positivo~~, con respecto a la referencia, se obtiene por ~~análisis de~~ regresión de líneas paralelas, para lo cual se graficará la D.O. contra el logaritmo de la dilución del suero. Se ~~grafican~~ usan solo los valores de D.O. que caen en la parte lineal de la curva.para el cálculo de los títulos Se aplicará un análisis de varianza para probar la ~~prueba de~~ significancia de las desviaci~~ó~~nones que presente la relación dosis-respuesta en lo que se refiere a linealidad y paralelismo. El título relativo final de anticuerpos para cada suero se obtendrá tomando en cuenta las diferencias en los factores de dilución del suero control positivo y de los sueros ~~problema~~ de los cobayos inmunizados en la prueba.		
~~$\frac{(\text{Valor relativo del problema}) \times (\text{Factor de dilución de la muestra})}{\text{Factor de dilución de suero control positivo}}$~~		
$\frac{(\text{Título relativo del suero problema}) \times (\text{Factor de dilución del suero problema})}{\text{Factor de dilución del suero control positivo}}$		
~~**CÁLCULO DE LA POTENCIA DE LA VACUNA**~~ ***Cálculo de la potencia de la vacuna*** Para obtener las curvas ~~de~~ dosis-respuesta para la vacuna de referencia y para la vacuna en prueba,		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
se grafica el logaritmo de los títulos relativos finales de anticuerpos de las muestras individuales de suero contra el logaritmo de las dosis de vacuna inyectadas a los cobayos. Calcular la potencia de la vacuna en prueba con respecto a la vacuna de referencia calibrada en U~~nidades Internacionales~~, comparando las curvas dosis-respuesta por análisis de líneas paralelas usando un programa de computadora.		
~~**CRITERIOS DE**~~ **VALIDEZ DE LA PRUEBA**		
Cálculo del título de anticuerpos		
• La prueba cumplirá con ~~el~~los criterios del ensayo de líneas paralelas en cuanto a linealidad y paralelismo de la relación dosis respuesta.		
• El suero de control negativo no deberá mostrar una respuesta positiva.		
• El suero de c~~obayo antidifteria~~ control positivo mostrará ~~tendrá~~ una curva ~~de~~ dosis-respuesta que ~~se sobrepone~~ coincide con la ~~del~~ de los sueros de los cobayos inmunizados en la prueba en ~~problema~~ al menos ~~en~~ tres puntos de la ~~zona~~ región lineal.		
~~***CÁLCULO DE LA POTENCIA DE LA VACUNA***~~ ***Cálculo de la potencia de la vacuna***		
• El análisis deberá mostrar una pendiente común para las líneas dosis respuesta sin que haya desviaciones significativas del		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
paralelismo y la linealidad a nivel de 5 % ($p<0.05$).		
• La precisión del ensayo se determina por los límites de confianza ~~del~~ al 95 %~~,~~. ~~s~~Se recomienda que los límites de confianza (p = 0.95 %) de la potencia estimada estén dentro del 50 al 200 % de la potencia estimada.		
B. ~~ENSAYO EN~~ CÉLULAS VERO		
La determinación del título de anticuerpos en el suero de cobayo mediante el ensayo de células Vero se basa en el uso de la inhibición metabólica (Método 1) o de la citotoxicidad (Método 2) como puntos finales, y en la inspección microscópica (morfología celular) o visual (color) de las células.		
El límite de detección de antitoxina suele estar entre 0.015 UI/mL (Método 1) y 0.05 UI/mL (Método 2).		
Materiales y reactivos		
Requeridos para ambos métodos:		
– Placas de cultivo de tejidos de fondo plano de 96 pozos, columnas 1-12, filas A-H.		
– Suero fetal bovino		
– Solución de L-glutamina 200 mM.		
– Suspensión de células Vero (de riñón de Mono Verde Africano).		
– Toxina diftérica.		
– Suero de cobayos inmunizados con vacuna antidiftérica adsorbida (control positivo).		

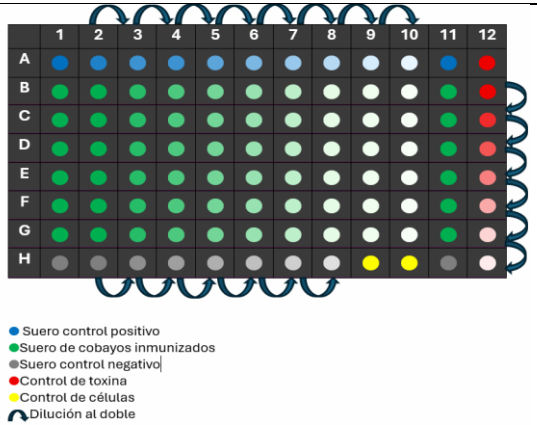
CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
Requeridos para el Método 1:		
– MEM Modificado. Medio Mínimo Esencial (MEM) modificado con sales de Earle, sin L-glutamina y sin bicarbonato de sodio.		
– Medio 199 modificado. Medio 199 con solución de Hank y L-glutamina, sin bicarbonato de sodio.		
– Solución al 7.5% (m/v) de bicarbonato de sodio.		
– Solución de penicilina/estreptomicina		
Requeridos para el Método 2:		
– Medio Mínimo Esencial (MEM)		
– Solución de antibióticos (10 000 Unidades de penicilina, 10 mg de estreptomicina y 25 µg de anfotericina B por mililitro).		
– MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio].		
– Solución amortiguadora HEPES 1M a pH 8.1. (HEPES en solución acuosa de hidróxido de sodio).		
– Solución de glucosa.		
– Solución salina amortiguadora estéril de fosfato a pH 7.4 (PBS).		
– Solución de MTT. 0.1 g de MTT en 20 mL de PBS. Esterilizada por filtración y almacenada en frasco oscuro.		
– Solución de ajuste de pH. 40 ml de ácido acético + 1.25 mL de ácido clorhídrico 1 M y 8.75 mL de agua.		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
– Solución amortiguadora de extracción, pH 4.7. 10 g de laurilsulfato de sodio en agua + 50 mL de dimetilformamida, ajustada a 100 mL con agua. Ajustar el pH si es necesario con solución de ajuste de pH.		
Método 1. Inhibición metabólica		
La toxina diftérica causa un efecto citopático en las células Vero que conduce a la lisis celular. Los anticuerpos dirigidos contra la toxina pueden inhibir este efecto citopático. Por consiguiente, es posible determinar de manera indirecta la potencia de una vacuna contra la difteria con la ayuda de este sistema celular si se cultivan las células en presencia de diferentes diluciones de suero de animales inmunizados, mezcladas con una toxina a concentración constante. En este método, el color amarillo del medio indica células viables y el rojo, células muertas. Cuando solo una parte de las células están muertas, el color puede ser naranja.		
Procedimiento		
1. Tripsinizar una monocapa de células Vero, cultivadas en medio de mantenimiento [MEM + L-glutamina + bicarbonato de sodio, con suero fetal bovino al 6% (v/v)].		
2. Preparar una suspensión celular en medio C [Medio 199 modificado + L-glutamina + bicarbonato de sodio + penicilina/estreptomicina, con suero fetal		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
bovino al 2% (v/v)] que contenga aproximadamente 1 x 10^5 células/mL.		
3. Depositar 25 µL de medio de cultivo B (Medio 199 + L-glutamina + bicarbonato de sodio + penicilina/estreptomicina, con suero fetal bovino al 2%) en cada pozo, excepto los de la columna 1 (*Ver Figura 2*).		
 *Figura 2.* Disposición de la placa de células Vero		
4. Depositar o añadir 25 µL de antisuero de cobayo contra difteria (suero control positivo, dilución de trabajo en medio de cultivo B de 0.40 UI/mL) en los pozos A1, A2 y A11.		
5. Depositar o añadir 25 µL de las muestras de suero de cobayos inmunizados en los pozos B-G de las columnas 1, 2 y 11.		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
6. Depositar o añadir 25 µL de suero control negativo en la fila H de las columnas 1, 2 y 11.		
7. Con una micropipeta multicanal, realizar diluciones seriadas al doble, de la columna 2 a la columna 10, para las filas A-G.		
8. Con una micropipeta monocanal, realizar diluciones seriadas al doble, en la fila H de la columna 2 a la 8.		
9. Desechar 25 µL de los pozos de la columna 10 en las filas A-G y del pozo H8.		
10. Reconstituir la toxina diftérica con solución salina para obtener una solución de 50 UI/mL.		
11. Preparar una dilución de trabajo de toxina de 1.0 UI/mL en medio B.		
12. Añadir 25 µL de esta solución de trabajo en los pozos A12 y B12 (control de toxina).		
13. Con una micropipeta monocanal, realizar diluciones seriadas al doble transfiriendo 25 µL de un pozo al siguiente, a partir del pozo B12 al H12. Cambiar la punta entre cada dilución.		
14. Desechar 25 µL del pozo H12.		
15. Añadir 25 µL de medio B a los pozos B12-H12.		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
16. Añadir 25 µL de la dilución de trabajo de la toxina diftérica (1.0 UI/mL) en cada pozo de las filas A-H, de las columnas 1-10, excepto en los pozos H9 y H10 (sólo células, sin suero ni toxina).		
17. Cubrir las placas con sus tapas o película plástica adhesiva y agitar suavemente.		
18. Incubar las placas al menos durante 2 h a 37 °C, en presencia de CO_2 y en atmósfera húmeda.		
19. Depositar en todos los pozos 200 µL de la suspensión celular con 1 x 10^5 células/mL.		
20. Cubrir las placas con película plástica adhesiva.		
Nota: Cabe señalar que el uso de película plástica adhesiva para sellar las placas evita el libre intercambio de gases entre el medio de cultivo y el aire, constituyendo un paso importante en los métodos que se basan en cambios de color del medio de cultivo para determinar los puntos finales del ensayo.		
21. Incubar la placa a 37 °C durante 5 días.		
22. Verificar la ausencia de contaminación microbiana mediante examen microscópico.		
– Los pozos amarillos se registran como negativos (hubo neutralización),		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
– Los pozos rojos indican células muertas y se registran como positivos (no hubo neutralización).		
Un color entre amarillo y rojo indica una mezcla de células viables y muertas, y se registra como positivo/negativo (neutralización parcial). Los resultados basados en el cambio de color pueden confirmarse mediante la lectura de células viables y muertas al microscopio. La potencia de las muestras de suero de cobayos inmunizados se obtiene comparando el último pozo de la preparación estándar que exhiba neutralización completa de la toxina (amarillo), con el último pozo de la muestra que evidencie el mismo efecto (ver ***CÁLCULO DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS***). Para los cálculos de potencia, debe recordarse que el punto final puede estar entre un pozo negativo y uno positivo/negativo.		
~~Para la prueba de neutralización de la toxina diftérica, preparar diluciones al doble del suero de cobayos inmunizados con la vacuna de referencia y vacuna antidiftérica en prueba usando como diluyente medio de crecimiento (MEM 5 a 7 % suero fetal bovino) en una microplaca de 96 pozos de fondo plano. Después de la adición de la dosis de prueba de toxina diftérica (4X DCM o Dosis Citopática Mínima), incubar las mezclas a temperatura ambiente durante 1 h para neutralizar la toxina. Agregar células Vero e incubar la placa por 6 días a 37 °C en atmósfera con 5 % de CO_2.~~		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
~~Después de los 6 días realizar el ensayo con MTT [Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio].~~		
Método 2. Citotoxicidad		
La deshidrogenasa mitocondrial de células viables reduce el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) a un producto de color azul/púrpura (formazán), que sirve como una medida cuantitativa de la presencia de células vivas, indicando cuando la toxina ha sido neutralizada por la antitoxina. Los pozos incoloros indican ausencia de células viables, apuntando a la presencia de una cantidad insuficiente de antitoxina para neutralizar la dosis de prueba de la toxina.		
~~Ensayo con MTT~~		
~~1. Por cada siete muestras de suero utilizar una microplaca.~~		
~~2. Depositar 50 µL de medio completo a todos los pozos de la columna 2 hasta la columna 11.~~		
~~3. Poner 100 µL de medio completo a cuatro pozos de la columna 12 (12A, 12B, 12C y 12D) *Control de células*.~~		
~~4. Poner 50 µL de medio completo a los otros cuatro pozos de la columna 12 (12E, 12F, 12G, 12H) Control de toxina.~~		
~~5. Adicionar 100 µL de cada uno de los sueros problema a la columna 1 (A-suero 1; B-suero 2, C-suero 3 etc. hasta G), en~~		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
~~hilera H adicionar al pozo H1, 100 µL de antitoxina (suero) control.~~		
~~6. Realizar diluciones al doble desde columna 1 hasta columna 11.~~		
~~7. Adicionar 50 µL de toxina difteria diluida a 4X DCM a cada pozo de la columna 1 hasta columna 11 y a cuatro pozos de la columna 12 (12E – 12H control de toxina) mezclar por agitación suave.~~		
~~8. Incubar a temperatura ambiente durante 1 h.~~		
~~9. Agregar a cada pozo 50 µL de células Vero (4 × 10^5 células/mL). Cubrir con película plástica adhesiva la placa.~~		
~~10. Incubar 6 días a 37 °C.~~		
~~11. Quitar la película plástica y adicionar 10 µL de MTT a cada uno de los pozos.~~		
~~12. Incubar a 37 °C entre 2 y 4 h.~~		
~~13. Eliminar con cuidado el medio con pipeta multicanal.~~		
~~14. Agregar 100 µL de solución amortiguadora de extracción.~~		
~~15. Incubar una noche a 37 °C para extraer el color y solubilizar el Formazan.~~		
~~16. Leer la absorbancia entre 550 y 570 nm.~~		
Procedimiento		
1. Tripsinizar una monocapa de células Vero, cultivadas en medio completo [MEM + solución de glucosa + solución de		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
antibióticos, con suero fetal bovino al 10% (v/v)]		
Nota: La formulación de este medio puede variar.		
2. Preparar una suspensión celular en medio completo que contenga aproximadamente 4×10^5 células/mL.		
3. Depositar 50 µL de medio de cultivo completo en cada pozo, excepto los de la columna 1.		
4. Depositar 100 µL de suero control positivo, dilución de trabajo a 0.12 UI/mL en medio de cultivo completo, en el pozo A1 y añadir 50 µL al pozo A11.		
5. Depositar 100 µL de muestras de suero de cobayos inmunizados, prediluidas si es necesario, en los pozos B1-G1.		
6. Añadir 50 µL de la misma muestra a los pozos B11-G11 de la fila correspondiente.		
7. Depositar 100 µL de suero control negativo en el pozo H1 y añadir 50 µL en el pozo H11.		
8. Con una micropipeta multicanal, realizar diluciones seriadas al doble transfiriendo 50 µL de un pozo al siguiente, trabajando transversalmente en la placa (de la columna 1 a la 10 para las filas A-G).		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
9. Con una micropipeta monocanal, realizar diluciones seriadas al doble transfiriendo 50 µL de un pozo al siguiente, trabajando transversalmente en la placa (de la columna 1 a la 8 para la fila H).		
10. Preparar una dilución de trabajo de toxina diftérica, de actividad y contenido de Lf conocidos, en medio de cultivo completo, para que contenga al menos 4 Dosis Citopáticas Mínimas (4X DCM).		
11. Añadir 50 µL de la toxina diluida a cada pozo, excepto al H9 y al H10 *(control de células),* A11-H11 (*control de suero*) y A12-H12 (*control de toxina*).		
12. Añadir 100 µL de la toxina diluida al pozo A12 y realizar diluciones seriadas al doble transfiriendo 50 µL de un pozo al siguiente con una micropipeta monocanal, trabajando de arriba hacia abajo en la placa (del pozo A12 al H12).		
13. Desechar 50 µL del pozo H12.		
14. Depositar 50 µL de medio completo a los pozos H9 y H10.		
15. Cubrir las placas con sus tapas o película plástica adhesiva y dejar reposar 1 h a temperatura ambiente para permitir la neutralización de la toxina.		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
16. Añadir 50 µL de suspensión celular con aproximadamente 4×10^5 células/mL a cada pozo.		
17. Sellar las placas e incubarlas a 37 °C durante 6 días.		
18. Verificar la ausencia de contaminación microbiana mediante examen microscópico.		
19. Añadir 10 µL de solución de MTT a cada pozo e incubar las placas a 37 °C durante 2-4 h más.		
20. Retirar cuidadosamente el medio y añadir 100 µL de solución amortiguadora de extracción, pH 4.7 a cada pozo.		
21. Incubar las placas a 37 °C de un día para otro, para facilitar el proceso de extracción.		
22. Una vez que se han completado la extracción y la solubilización leer las placas a 570 nm.		
~~**Interpretación:**~~ ~~Color azul oscuro = Células viables~~ ~~Color azul claro = Toxicidad parcial~~ ~~Incoloro = Toxicidad y muerte celular~~		
– Los pozos azules/púrpura se registran como negativos (las células están vivas, la antitoxina neutralizó la toxina).		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
– Los pozos incoloros (*blancos*) indican células muertas (no se neutralizó la toxina) y se registran como positivos.		
La potencia de la antitoxina de prueba se obtiene comparando el último pozo de la preparación de antitoxina de referencia que muestra neutralización de la toxina, con el último **pozo** de la preparación de antitoxina que muestra el mismo efecto. El título de anticuerpos neutralizantes de la muestra examinada se puede calcular multiplicando el factor de dilución por el número total de UI/mL de la preparación de referencia en el punto final (ver ***CÁLCULO DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS***). La prueba es válida si todas las células del control de toxina están muertas y la antitoxina de referencia produce neutralización en al menos las dos primeras diluciones analizadas.		
DETERMINACIÓN DE LA DOSIS DE PRUEBA DE TOXINA DIFTÉRICA El ensayo de neutralización de la toxina descrit~~a~~o en esta monografía, se realiza utilizando una dosis 4X de DCM. La DCM es la mínima concentración de toxina (en Lf/mL) que produce efecto citopático en células Vero después de 6 días de cultivo. Con esta dosis de toxina es posible determinar niveles bajos de antitoxina diftérica en muestras de suero. Debido a que la sensibilidad de las células Vero a la toxina diftérica puede variar con diferentes lotes de células o de suero, la DCM será determinada cada vez que esas variables cambien. La DCM se determina por titulación de una toxina diftérica		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
purificada estable~~,~~ se determina de acuerdo ~~al~~ con el siguiente protocolo de titulación:		
1. Preparar una microplaca de 96 pozos rotulándola con fecha y número de microplaca.		
2. Usando una micropipeta multicanal ~~L~~llenar cada pozo de las columnas 2 a 10 con 50 µL de Medio Mínimo Esencial (MEM) + ~~con 5-10 % de suero de ternera~~, L-Glutamina 2 mM~~,~~ + D-Glucosa 0.1 % (m/v), HEPES (ácido *N*-2-hidroxietil piperazina-*N*'-2-etanosulfónico) 15 mM~~,~~ + penicilina 100 UI/mL ~~y~~ + estreptomicina 100 µg/mL~~)~~ , con 5-10 % (v/v) de suero fetal bovino. ***Nota:*** Pueden usarse otras formulaciones de medio de cultivo.		
3. Diluir la toxina diftérica control en el medio anterior (*completo)* para tener una concentración inicial de aproximadamente 0.001 Lf/mL.		
4. ~~Adicionar~~ Depositar 100 µL de la solución de toxina diluida a cada pozo de la columna 1 usando una micropipeta.		
5. Preparar diluciones seriadas al doble en volúmenes de 50 µL comenzando ~~d~~en la columna 1 y hasta la columna 10, usando una		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
micropipeta multicanal. Desechar 50 µL de los pozos de la columna 10.		
6. Adicionar 50 µL de medio completo a cada pozo de las columnas 1 a la 10, para llevar el volumen total a 100 µL.		
7. ~~Poner~~ Depositar 100 µL de *medio completo* ~~a~~ en los pozos de *control de células* en la columna 11.		
8. ~~Adicionar~~ Depositar 150 µL de *medio completo* ~~a~~ en los pozos de *control blanco* en la columna 12.		
9. Preparar una suspensión de células Vero en medio completo que contenga aproximadamente 4×10^5 células/mL.		
10. Adicionar 50 µL de la suspensión celular a todos los pozos de la microplaca, excepto a los pozos de *control blanco* de la columna 12. El volumen total en todos los pozos será de 150 µL~~/pozo~~.		
11. Mezclar por agitación suave y cubrir la microplaca con ~~un film~~ película plástica adhesiva.		
12. Incubar durante 6 días a 37 ° C y 5 % de CO_2.		
13. Retirar la película plástica adhesiva y verificar la ausencia de		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
contaminación microbiana mediante examen microscópico.		
14. ~~Preparar una solución de MTT [bromuro de 3 (dimetiltiazol-2 il)-2,5 difenil tetrazolio] que contenga 5 mg/mL en solución salina de fosfatos (PBS), esterilizado por filtro de 0.2 µm.~~ Adicionar a cada pozo de la microplaca 10 µL de solución de MTT.		
15. Incubar la microplaca a 37 ° C durante 2 a 4 h adicionales para permitir el metabolismo del MTT por las células viables y la formación de cristales de formazán de color azul.		
16. Eliminar con cuidado el medio con una micropipeta multicanal.		
17. Adicionar 100 µL de solución amortiguadora de extracción a cada pozo y regresar la microplaca a la incubadora, manteniéndola a 37 °C de un día para otro para facilitar el proceso de extracción. Una vez que la extracción y solubilización han concluido, el color es muy estable.		
~~18. Solución amortiguadora de extracción: preparar una solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10 % (m/v) en dimetilformamida~~		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
~~al 50 % (v/v) en ácido acético al 2 %. Ajustar el pH a 4.7.~~		
18. Leer la absorbancia ~~entre 550 y~~ a 570 nm.		
~~**Interpretación:**~~		
– Color azul oscuro = Células viables.		
– Color azul claro = Toxicidad parcial.		
– Incoloro = Toxicidad y muerte celular.		
~~**CÁLCULO DE LA DOSIS CITOPÁTICA MÍNIMA DE LA TOXINA DIFTÉRICA.**~~ ~~La Dosis Citopática Mínima se define como la dilución y más baja concentración de toxina en la cual la absorbancia (viabilidad celular) es menor del 50 % de la media geométrica de la D.O. obtenida en los pozos que contienen solamente células Vero (pozos control de células).~~ La DCM puede definirse como la dilución que corresponde a la concentración de toxina más baja a la que la absorbancia (y, por ende, la viabilidad celular) es inferior al 50 % de la media geométrica de la densidad óptica (DO) obtenida en los pozos que contienen únicamente células Vero (*de control de células*). Si todas las células mueren en todas las diluciones de la toxina, el ensayo se repetirá iniciando con una dilución menor ~~de toxina~~.		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
CÁLCULO DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS ***Nota:*** Sección aplicable, con algunas modificaciones, al *Método 1*.		
La presencia de un color azul obscuro significa que hubo neutralización de la toxina y hay células viables. Un color azul claro indica neutralización parcial de la toxina y la persistencia de algunas células viables, mientras que la ausencia de color indica toxicidad completa y muerte celular. La Figura 3 muestra un ejemplo del ensayo con células Vero tras la extracción con MTT. Calcular para cada placa ~~utilizada en el ensayo~~ la media geométrica de la D.O de los pozos de *control de células* (H9 Y H10 en la Figura 3) y dividir entre dos para obtener el valor de D.O. al 50 %. A una muestra cuyo punto final se sitúa en el primer pozo se le asigna una puntuación de 1. A una muestra con punto final en el pozo 6 se le asigna una puntuación de 32, y a una con punto final en el pozo 11, una puntuación de 1024. Cuando el punto final es <1, debe aplicarse una puntuación de 0,5; cuando es >1024, debe aplicarse una puntuación de 2048. Cabe señalar que la presencia de muestras de suero con puntuaciones de punto final *fuera de rango* puede provocar falta de linealidad y/o falta de paralelismo en las relaciones dosis-respuesta y, por tanto, afectar a la validez de la prueba (ver *MPB 0940*); por ello, debe evitarse siempre que sea posible. El punto final de cada muestra de suero de cobayo inmunizado con la vacuna de prueba y la ~~y del suero~~ de referencia		

Dice	Debe decir	Justificación*
serán convertidos a ~~valores de~~ títulos relativos por comparación con el v~~alor de punto~~ título final de la antitoxina control (*control de suero*). El punto final representa el último pozo en el que el valor de DO es >50% de la DO del control de células. A su vez, el título consiste en la dilución total del suero ~~obtenido en cada una de las placas. y puede expresarse como un título basado en la dilución total del suero control~~ en el punto final.		
Por ejemplo,~~:~~ ~~S~~si la antitoxina control (*control de suero*) se prediluyó 1:12.5 antes de la titulación y el punto final del ensayo es 16 (dilución 5 en la Figura 3, correspondiente a 1:16 en la placa) el título final para la antitoxina control (*control de suero*) es 12.5 × 16 = 200.		
 *Figura 3.* Resultados MTT.		
El título final para cada muestra de suero se calcula con la siguiente fórmula:		
$TS = Punto\ final\ del\ suero \times Título\ final\ de\ la\ antitoxina$		
Cualquier dilución del suero previa a la titulación deberá considerarse para el cálculo del título final.		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
CÁLCULO DE LA POTENCIA DE LA VACUNA Con los títulos de todas las muestras de suero se calcula la potencia de la vacuna de prueba con relación a la vacuna de referencia. Obtener las curvas dosis-respuesta para la vacuna de referencia y para las vacunas de prueba. Graficar el logaritmo de los títulos de anticuerpos contra el logaritmo de las dosis de vacuna inyectadas a los cobayos. La potencia se calcula en Unidades Internacionales con relación a la vacuna de referencia comparando ambas curvas dosis-respuesta por análisis de líneas paralelas utilizando un programa estadístico con computadora.		

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

CONSULTA