



Animal Defenders International

5455 Wilshire Boulevard, Suite 2015, LOS ANGELES, CA 90036, USA. Tel: +1 323 935 2234 Fax: +1 323 935 9234
www.adiusa.org usa@ad-international.org

Junio 2, 2026

General Director Francisco Rossi
Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA)
Carrera 68D No. 17-11
Bogotá D.C., Colombia

Respetado Director Francisco Rossi

Asunto: Solicitud de eliminación gradual de la prueba de pirógenos en conejos y adopción de la prueba de activación de monocitos.

Animal Defenders International (ADI), es una organización internacional de protección animal con sede en el Reino Unido, Estados Unidos, Colombia, Perú y Sudáfrica, dedicada a prevenir la crueldad animal; con especial experiencia en el uso de animales en la ciencia, además de una labor más amplia en el ámbito de la vida silvestre, el cautiverio y el bienestar animal. Nos dirigimos a usted en relación con las recientes actualizaciones regulatorias globales sobre la prueba de pirógenos en conejos (RPT) y agradeceríamos su colaboración para obtener información sobre la postura del Instituto respecto a esta prueba y si aún se realiza en laboratorios colombianos. Si la RPT continúa en uso, solicitamos respetuosamente al INVIMA que considere su eliminación gradual formal y que priorice la implementación y promoción de métodos alternativos validados que no utilicen animales.

Recientemente, se ha producido un cambio global significativo hacia el reconocimiento de que muchas pruebas con animales tienen limitaciones científicas y no predicen suficientemente las respuestas humanas, mientras que los métodos sin animales, más relevantes para los humanos, están reemplazando cada vez más estas pruebas y ofreciendo resultados más fiables y clínicamente relevantes. Esta transición se refleja en importantes avances internacionales, como la publicación de hojas de ruta nacionales en Estados Unidos¹ y el Reino Unido², destinadas a reducir y sustituir las pruebas con animales. Estas iniciativas representan un progreso significativo hacia un marco regulatorio más moderno, ético y científicamente avanzado, con el potencial de acelerar el desarrollo de terapias más seguras y eficaces, a la vez que se reduce considerablemente el sufrimiento animal.

En adición, se han producido avances muy significativos en la Unión Europea (UE) y el Reino Unido, donde se ha puesto especial énfasis en la eliminación de la prueba de pirógenos en conejos (RPT). Esta prueba, histórica y obsoleta, se introdujo a principios del siglo XX para detectar la

¹ FDA (2025) Roadmap to reducing animal testing in preclinical safety studies. Available at: <https://www.fda.gov/media/186092/download>

² GOV.UK. (2025). Replacing animals in science: A strategy to support the development, validation and uptake of alternative methods. Available at: <https://www.gov.uk/government/publications/replacing-animals-in-science-strategy/replacing-animals-in-science-a-strategy-to-support-the-development-validation-and-uptake-of-alternative-methods>

contaminación en medicamentos³ y, desde entonces, ha sido criticada por sus profundas limitaciones:

Baja predictibilidad en humanos.

Una preocupación particularmente importante relacionada con el uso continuado de la RPT es su limitada capacidad para predecir las respuestas humanas. Un hallazgo constante en la literatura científica es la falta de correlación entre las respuestas pirógenas observadas en conejos y las observadas en humanos. Esta disparidad surge de diferencias interespecíficas fundamentales en la función del sistema inmunitario, incluyendo la reactividad del sistema inmunitario frente a los pirógenos, los perfiles de liberación de citoquinas⁴ y la sensibilidad a los componentes microbianos⁵. Estas diferencias pueden dar lugar, y de hecho han dado lugar, a resultados discordantes, donde sustancias que no provocan una respuesta pirógena en conejos sí inducen reacciones clínicamente significativas en humanos. Esto significa que un producto que supera la prueba en conejos aún puede causar una reacción pirógena perjudicial en humanos.⁶ Estas limitaciones generan serias preocupaciones respecto a la fiabilidad de la prueba rápida de pirógenos (PRP) como medida de seguridad para el paciente. La contaminación por pirógenos no detectada puede tener graves consecuencias clínicas, como reacciones inflamatorias severas, sepsis, shock o, en casos extremos, la muerte.³ Más allá de las implicaciones para la seguridad del paciente, la falta de precisión predictiva también contribuye a la ineficiencia en las pruebas de productos, lo que conlleva un uso innecesario de tiempo, recursos y gastos financieros. Esta ineficiencia resulta particularmente problemática en el contexto de un panorama de pruebas de endotoxinas y pirógenos en rápida expansión⁷.

Susceptibilidad a falsos positivos

La prueba de pirógenos (RPT) es inherentemente inespecífica⁸ y, por lo tanto, se asocia con una alta incidencia de falsos positivos.³ Desde su reconocimiento por la industria en 1942⁹, la RPT se ha descrito como una prueba que "frecuentemente produce falsos positivos".⁸ El ensayo se basa en la medición de un aumento de la temperatura corporal como parámetro principal¹⁰; sin embargo,

³ Spoladore, J., Gimenes, I., Bachinski, R., Negherbon, J.P., Hartung, T., Granjeiro, J.M. and Alves, G.G. (2021). Standardized pyrogen testing of medical products with the bacterial endotoxin test (BET) as a substitute for rabbit Pyrogen testing (RPT): A scoping review. *Toxicology in Vitro*, 74, p.105160. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105160>

⁴ Schindler, S., Bristow, A., Cartmell, T., Hartung, T. and Fennrich, S. (2003). Comparison of the reactivity of human and rabbit blood towards pyrogenic stimuli. *ALTEX*, 20(2), pp.59–63. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12764541/>

⁵ Hasiwa, M., Kullmann, K., von Aulock, S., Klein, C. and Hartung, T. (2007). An in vitro pyrogen safety test for immune-stimulating components on surfaces. *Biomaterials*, 28(7), pp.1367–1375. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.11.016>

⁶ Hegedüs, L. and Benkö, A. (1977). Comparative pyrogen reactivity of rabbit and man to human albumin and immunoglobulin solutions. *Developments in biological standardization*, 34, pp.127–33. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/838137/>

⁷ Grandviewresearch.com. (2025). Pyrogen & Endotoxin Testing Market | Industry Report, 2033. Available at: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/pyrogen-endotoxin-testing-market-report>

⁸ Gwenaél Cirefice, Katrin Schütte, Spreitzer, I., Charton, E., Shahjahan Shaid, Viviani, L., Rubbrecht, M. and Manou, I. (2023). The future of pyrogenicity testing: Phasing out the rabbit pyrogen test. *A meeting report. Biologicals*, 84, pp.101702–101702. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biologics.2023.101702>

⁹ Tui, C. (1942). *A Tentative Test for Pyrogen in Infusion Fluids*. Sage Journals. Available at: <https://journals.sagepub.com/doi/10.3181/00379727-49-13551>

¹⁰ Aim: Pyrogen Testing by Rabbit Method References. (n.d.). Available at: <https://www.pharmaacademias.com/wp-content/uploads/2024/05/Pyrogen-Testing-by-Rabbit-Method.pdf>

esta respuesta fisiológica no es exclusiva de la exposición a pirógenos y puede desencadenarse por diversos factores no pirógenos. En consecuencia, la prueba carece de la especificidad necesaria para la detección fiable de la contaminación pirógena. Entre las influencias no pirógenas se incluyen las condiciones de laboratorio. Se ha demostrado que estos entornos artificiales son estresantes para los animales¹¹ y, por lo tanto, pueden influir en la temperatura corporal independientemente de la presencia de pirógenos.⁵ Dado que la RPT define un resultado positivo basándose en aumentos de temperatura relativamente pequeños, típicamente un aumento de 0,5 °C o superior observado en un número limitado de conejos,¹⁰ incluso fluctuaciones menores e inespecíficas pueden llevar a una clasificación errónea de los resultados. Esta limitación se ve agravada por las diferencias específicas de cada especie en el reconocimiento inmunitario¹², lo que puede provocar falsos positivos en conejos ante sustancias que no son pirógenas en humanos, reduciendo así la especificidad de la prueba.

La consecuencia de estos falsos positivos no solo es la imprecisión científica y la falta de fiabilidad, sino también la considerable ineficiencia. Los resultados erróneos suelen requerir la repetición de la prueba con la RPT.¹³ Esto conlleva un mayor uso de animales (hasta 12 conejos por prueba),¹⁴ un mayor tiempo de procesamiento y un aumento de los costes económicos.

Susceptibilidad a los falsos negativos

Los falsos negativos representan un riesgo significativo e inaceptable en las pruebas de seguridad pirógena, ya que no detectar la contaminación pirógena puede perjudicar directamente al paciente. Desde hace tiempo se reconoce que la RPT tiene una sensibilidad limitada. Esta preocupación está bien documentada en la literatura desde la década de 1970, donde algunos estudios destacaron casos en los que productos contaminados superaron la RPT pero aun así provocaron reacciones pirógenas en humanos.¹⁵ Cabe destacar que un informe de 1974 describió ocho pacientes en tres hospitales que experimentaron reacciones febriles tras la administración de albúmina sérica que previamente cumplía con los requisitos de seguridad de la RPT.¹⁵ Este caso pone de manifiesto un fallo crítico de la prueba para garantizar la seguridad del paciente. Por lo tanto, resulta preocupante que, a pesar de la evidencia del riesgo para el paciente asociado a su uso, la prueba se siga aplicando en el siglo XXI.

Investigaciones posteriores, a lo largo de la década de 1980, confirmaron aún más la limitada sensibilidad de la prueba y señalaron métodos alternativos (como la prueba de lisado de

¹¹ Akhtar, A. (2015). *The flaws and human harms of animal experimentation*. *Cambridge Quarterly of Healthcare Ethics*, 24(04), pp.407–419. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0963180115000079>

¹² Mohanan, P.V., Banerjee, S. and Geetha, C.S. (2011). *Detection of pyrogenicity on medical grade polymer materials using rabbit pyrogen, LAL and ELISA method*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55(5), pp.1170–1174. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.04.005>

¹³ Hartung, Thomas. "The Human Whole Blood Pyrogen Test – Lessons Learned in Twenty Years." *ALTEX*, 2015, pp. 79–100. Available at: <https://pdfs.semanticscholar.org/b3be/427616bf870029a9ec9cdc8059e5ff496a79.pdf>

¹⁴ Burgmaier, L., van den Berg, J., Gajewi, M., Röder, R., Reich, J. and Deutschmann, S.M. (2025). *Validation of the Monocyte Activation Test Demonstrating Equivalence to the Rabbit Pyrogen Test*. *International journal of molecular sciences*, 26(22), p.11136. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms262211136>

¹⁵ Steere, A.C., Rifaat, M.K., Seligmann, E.B., Hochstein, H.D., Friedland, G., Dasse, P., Wustrack, K.O., Axnick, K.J. and Barker, L.F. (1978). *Pyrogen reactions associated with the infusion of normal serum albumin (human)*. *Transfusion*, 18(1), pp.102–7. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1978.18178118551.x>

amebocitos de *Limulus* [LAL] en aquel momento) como opciones más precisas y sensibles.¹⁶ Es importante señalar que se ha demostrado que la RPT es hasta diez veces menos sensible que la respuesta inmunitaria humana,¹⁷ lo que aumenta significativamente el riesgo de resultados falsos negativos. Como consecuencia, las sustancias consideradas seguras según datos obtenidos en conejos a menudo pueden provocar un efecto pirógeno en humanos.

En conjunto, esta evidencia plantea serias dudas sobre la continua dependencia de la RPT en las pruebas de seguridad modernas.

Falta de reproducibilidad

La fiabilidad de la prueba de pirógenos en conejos (RPT) ha sido motivo de preocupación durante mucho tiempo debido a su variabilidad inherente⁸ y, por lo tanto, a su falta de reproducibilidad. Desde su uso inicial, diversos estudios han documentado fluctuaciones significativas en los resultados, principalmente debido a la variabilidad biológica del modelo animal. Se sabe que los conejos presentan respuestas termorreguladoras notoriamente inestables,¹⁸ lo cual resulta particularmente problemático dado que la prueba se basa completamente en los cambios de temperatura corporal como parámetro final. Esta inestabilidad compromete la consistencia de los resultados, y un informe muestra que solo alrededor del 40 % de los conejos arrojaron resultados consistentemente fiables en las mismas condiciones.¹⁸ Además, existen pruebas que demuestran una considerable variación en las respuestas individuales de temperatura a los pirógenos, con aumentos registrados que oscilan ampliamente, desde 0,4 °C hasta 1,5 °C, entre los conejos.¹⁹ En algunos casos, los conejos expuestos a pirógenos presentan una elevación mínima o nula de la temperatura,²⁰ lo que dificulta la distinción entre resultados negativos verdaderos y falsos. Además de la variabilidad entre animales, factores externos comprometen aún más la reproducibilidad, especialmente entre laboratorios. Se ha demostrado que las condiciones de laboratorio, incluyendo pequeñas diferencias como la composición de la cama, influyen en los resultados de los experimentos de laboratorio.^{21,22} Para agravar este problema, la prueba de respuesta rápida (RPT) carece de controles internos sólidos¹³ y, por lo tanto, está sujeta a criterios de interpretación inconsistentes entre laboratorios. Por ejemplo, los umbrales para definir una respuesta positiva

¹⁶ Devleeschouwer, M.J. (1985). *Studies on the sensitivity and specificity of the Limulus amebocyte lysate test and rabbit pyrogen assays.* [online] NIH. Available at: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC238789/?page=3>

¹⁷ Hartung, T. (2021). *Pyrogen testing revisited on occasion of the 25th anniversary of the whole blood monocyte activation test.* ALTEX, pp.3–19. Available at: <https://doi.org/10.14573/altex.2101051>

¹⁸ Martin, W.J. and Marcus, S. (1964). *Studies on Bacterial Pyrogenicity.* Applied Microbiology, 12(6), pp.483–486. doi: <https://doi.org/10.1128/am.12.6.483-486.1964>

¹⁹ Stitt, J.T. (1985). *A study of the variability in the febrile responses of rabbits to endogenous pyrogen.* Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985), 59(4), pp.1254–7. doi: <https://doi.org/10.1152/jappl.1985.59.4.1254>

²⁰ Borsook, D., Laburn, H. and Mitchell, D. (1978). *The febrile responses in rabbits and rats to leucocyte pyrogens of different species.* The Journal of Physiology, 279(1), pp.113–120. doi: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1978.sp012333>

²¹ Smith, E., Stockwell, J.D., Schweitzer, I., Langley, S.H. and Smith, A.L. (2026). *Evaluation of cage micro-environment of mice housed on various types of bedding materials.* Contemporary Topics in Laboratory Animal Science, 43(4), pp.12–17. Available at: <https://pubs.usgs.gov/publication/70026990>

²² Richter, S.H., Garner, J.P. and Würbel, H. (2009). *Environmental standardization: cure or cause of poor reproducibility in animal experiments?* Nature Methods, 6(4), pp.257–261. doi: <https://doi.org/10.1038/nmeth.1312>

pueden diferir (p. ej., 0,5 frente a 0,6 grados Celsius),²³ lo que limita la comparabilidad de los resultados entre instalaciones. En conjunto, estos factores socavan la estandarización y la reproducibilidad, y ponen en duda la fiabilidad de la RPT como prueba de seguridad consistente y científicamente sólida.

Falta de validez científica

Curiosamente, la RPT no cumple con los criterios fundamentales requeridos para la validez científica. La validación de un método de prueba se basa en dos principios básicos: fiabilidad y relevancia. La fiabilidad se refiere a la capacidad de un método para generar resultados consistentes y reproducibles, tanto dentro como entre laboratorios. La relevancia se refiere al grado en que el método predice con precisión las respuestas biológicas humanas y es apropiado para su propósito regulatorio previsto.²⁴ Como se ha descrito anteriormente, la RPT presenta deficiencias significativas en ambos aspectos. Su bien documentada variabilidad y falta de reproducibilidad socavan su fiabilidad, mientras que su limitada sensibilidad y las preocupaciones específicas de cada especie ponen en duda su relevancia para la fisiología humana. En conjunto, estas limitaciones indican que la prueba RPT no cumple con los requisitos esenciales de una prueba de seguridad científicamente válida.

El contexto histórico de la prueba RPT refuerza aún más esta preocupación. Dado que la prueba se introdujo e incorporó al Formulario Nacional de la USP (USP-NF) y a las regulaciones federales mucho antes del establecimiento de los marcos de validación modernos en la década de 1990,²⁵ nunca se evaluó bajo marcos contemporáneos que valoren rigurosamente la fiabilidad, la relevancia y la idoneidad para el propósito previsto.²⁴

Alineación con la misión de INVIMA y las recomendaciones de la OMS

La continua referencia a la prueba de pirógenos en los marcos regulatorios colombianos es incompatible con la misión y visión de INVIMA, así como con las directrices internacionales de salud pública. La OMS ha reconocido explícitamente las importantes limitaciones de la prueba de pirógenos, incluyendo preocupaciones relacionadas con su fiabilidad, variabilidad y falta de relevancia humana.^{26,27,28} Cabe destacar que la OMS ha declarado que “en todos los casos, no se

²³ Du, Y., Li, X.-J. and Tan, D.-J. (2010). Comparison of temperature rise interpretations in the rabbit pyrogen test among Chinese, Japanese, European, and United States pharmacopeias and 2-2-2 theoretical models proposed by S. Hoffmann. *Innate Immunity*, 17(5), pp.486–495. doi: <https://doi.org/10.1177/1753425910384754>.

²⁴ Bas, A., Burns, N., Gulotta, A., Junker, J., Drasler, B., Lehner, R., Aicher, L., Constant, S., Petri-Fink, A. and Rothen-Rutishauser, B. (2021). Understanding the Development, Standardization, and Validation Process of Alternative In Vitro Test Methods for Regulatory Approval from a Researcher Perspective. *Small*, 17(15), p.2006027. doi: <https://doi.org/10.1002/sml.202006027>.

²⁵ Worth, A.P., Berggren, E. and Prieto, P. (2024). Chemicals 2.0 and Why We Need to Bypass the Gold Standard in Regulatory Toxicology. *Alternatives to Laboratory Animals*, 53(1), pp.21–25. doi: <https://doi.org/10.1177/02611929241296328>

²⁶ WHO (2025) Guidelines on the replacement or removal of animal tests for the quality control of biological products, World Health Organization. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/guidelines-on-replacement-of-animal-tests-for-quality-control>

²⁷ nc3rs.org.uk. (n.d.). Review of animal use requirements in WHO biologics guidelines | NC3Rs. Available at: <https://nc3rs.org.uk/our-portfolio/review-animal-use-requirements-who-biologics-guidelines>

²⁸ World Health Organization (2024) WHO guideline on the phasing out of animal tests for the quality control of biological products (Draft, version 1, 29 November 2024). Geneva: World Health Organization. Available at: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologics/call-for-comments/who-guideline-on-3rs---draft-1-version-29-nov-2024-pc_clean.pdf

recomienda el uso de la prueba de pirógenos”,²⁷ citando los “riesgos para la salud potencialmente muy graves”²⁷ de la contaminación por pirógenos y enfatizando la necesidad de reemplazar la prueba con alternativas más fiables y relevantes para el ser humano. Por lo tanto, la continua dependencia regulatoria de la prueba de pirógenos sitúa a Colombia en contradicción con las recomendaciones internacionales establecidas y socava los esfuerzos para armonizar los estándares de prueba.

No eliminar o no actualizar las disposiciones regulatorias obsoletas conlleva el riesgo de transmitir una reticencia a adoptar plenamente la modernización científica. Esto resulta particularmente preocupante considerando la visión declarada por el INVIMA de ser reconocido a nivel nacional e internacional como líder en regulación sanitaria²⁹, ya que el verdadero liderazgo en este campo exige la adopción oportuna de la innovación científica y la implementación de los métodos más relevantes para el ser humano disponibles. La continua dependencia de la RPT, a pesar de sus reconocidas limitaciones en cuanto a fiabilidad, sensibilidad y relevancia para el ser humano, también parece incompatible con la misión del INVIMA de “proteger y promover la salud pública”. La salud pública se protege mejor mediante el uso de métodos modernos y científicamente avanzados que proporcionan resultados más precisos y relevantes para el ser humano, en lugar de seguir dependiendo de pruebas obsoletas basadas en animales con limitaciones científicas reconocidas.

Disponibilidad y ventajas de las alternativas

La RPT es un método histórico que ya no refleja el estado actual del avance científico y tecnológico. Si bien tiene importancia histórica, resulta cada vez más inadecuada para evaluar medicamentos modernos, en particular terapias biológicas complejas³⁰, que requieren enfoques más sensibles, específicos y relevantes para el ser humano. A medida que avanza la innovación farmacéutica, los métodos de pruebas de seguridad deben evolucionar en consecuencia para garantizar una protección adecuada de la salud pública.

La prueba de activación de monocitos (MAT), introducida en la década de 1990,³¹ representa una alternativa reconocida mundialmente⁸, científicamente avanzada y relevante para el ser humano, a la RPT. A diferencia de la RPT, la MAT se ha desarrollado en una época en la que los nuevos métodos se evalúan de acuerdo con los estándares de validación modernos, incluyendo una evaluación rigurosa de la fiabilidad y la relevancia.^{14,32} Los argumentos que sostienen que la MAT no puede utilizarse como método predeterminado a menos que esté completamente validada carecen de fundamento, especialmente considerando que la propia RPT nunca se sometió a

²⁹ Invima.gov.co. (2024). *Qué Hacemos | INVIMA*. Available at: <https://www.invima.gov.co/el-instituto/que-hacemos>.

³⁰ Vipond, C. (2016). *Limitations of the rabbit pyrogen test for assessing meningococcal OMV based vaccines*. ALTEX, pp.47–53. Available at: <https://doi.org/10.14573/altex.1509291>

³¹ Sanquin (n.d.). *MAT regulations*. sanquin.org. Available at: <https://www.sanquin.org/products-and-services/monocyte-activation-test/regulations>

³² Daniels, R., Van, So, C.K., Liesbeth Voeten, Breugelmans, P., Backer, M., Poole, S. and Patel, M. (2024). *Fit for purpose testing and independent GMP validation of the monocyte activation test*. *Current Research in Toxicology*, 8, pp.100206–100206. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.crttox.2024.100206>

requisitos de validación compatibles. Tras casi tres décadas de desarrollo, perfeccionamiento y aplicación, la MAT ha alcanzado un alto nivel de madurez científica que supera al de la RPT.¹⁴

Existe evidencia sustancial que demuestra el rendimiento superior de la MAT en la detección de contaminantes pirógenos. Un caso bien documentado de una base de datos de investigación del gobierno de EE. UU., describe un ensayo clínico con hormona del crecimiento humana en el que los participantes desarrollaron fiebre y respuestas inmunitarias de fase aguda indicativas de exposición a pirógenos, a pesar de que el producto dio negativo tanto en la RPT como en la prueba LAL.^{33,34} Las pruebas posteriores realizadas con células mononucleares de sangre periférica humana, que constituyen la base de la MAT, identificaron con éxito la contaminación pirógena.^{34,35} Este es un ejemplo documentado temprano, que data de 1984, que destaca que la inclusión continua de dichas pruebas en los estándares farmacopeicos contemporáneos actuales justifica una seria reconsideración. La sustitución de la RPT por la MAT conlleva muchos más beneficios:

Relevancia para los humanos

Una ventaja clave de la prueba MAT es su relevancia directa para la fisiología humana. Al medir la respuesta inmunitaria innata humana, específicamente la liberación de citocinas proinflamatorias que median la fiebre,^{35,36} la prueba MAT refleja fielmente los mecanismos biológicos subyacentes a las reacciones pirógenas en humanos. Esto aborda una limitación fundamental de los modelos animales y elimina la necesidad de extrapolación entre especies.³⁵ Entre los métodos disponibles para la detección de pirógenos, incluyendo la prueba LAL y el ensayo del factor C recombinante, la prueba MAT se posiciona de manera única como un ensayo relevante para los humanos, proporcionando así la mayor capacidad predictiva. Como resultado, los estudios comparativos entre la prueba MAT y la prueba RPT han demostrado consistentemente que la prueba MAT es "no inferior, sino superior", a la prueba RPT14 en la detección de sustancias pirógenas.¹⁴ Por lo tanto, su adopción representa no solo un avance científico, sino también un paso necesario para mejorar la fiabilidad, la relevancia y la eficacia general de las pruebas de seguridad para la detección de pirógenos.

Mayor especificidad: menor riesgo de falsos positivos.

La prueba MAT demuestra una especificidad significativamente mayor que la prueba RPT, lo que resulta en un riesgo sustancialmente menor de falsos positivos. Los valores de especificidad reportados para la prueba MAT oscilan entre aproximadamente el 85 % y el 99 %, mientras que la prueba RPT ha demostrado una especificidad considerablemente menor, con valores reportados de

³³ Dinarello, C.A., O'Connor, J., G LoPreste and Swift, R. (1984). Human leukocytic pyrogen test for detection of pyrogenic material in growth hormone produced by recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 20(3), pp.323–329. Available at: <https://doi.org/10.1128/jcm.20.3.323-329.1984>

³⁴ Science.gov. (2018). *vitro pyrogen test: Topics by Science.gov*. Available at: <https://www.science.gov/topicpages/v/vitro%2Bpyrogen%2Btest>

³⁵ da Silva, C.C., Presgrave, O.A.F., Hartung, T., de Moraes, A.M.L. and Delgado, I.F. (2016). Applicability of the Monocyte Activation Test (MAT) for hyperimmune sera in the routine of the quality control laboratory: Comparison with the Rabbit Pyrogen Test (RPT). *Toxicology in Vitro*, 32, pp.70–75. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26688320/>

³⁶ Jeon, Y., Jeon, S., Lim, J.-Y., Koh, H., Choi, C.W., Seong, S.K., Cha, B. and Kim, W. (2024). Monocyte activation test (MAT) as an ethical alternative to animal testing. *BMB Reports*. Available at: <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2024-0089>

alrededor del 58 % en condiciones controladas (p. ej., soluciones salinas sin interferencia del producto).¹³ Esta mayor especificidad refleja la capacidad de la prueba MAT para detectar selectivamente respuestas pirógenas clínicamente relevantes, reduciendo así la probabilidad de clasificar erróneamente productos no pirógenos como contaminados. De hecho, los estudios han demostrado que la prueba MAT no presenta falsos positivos.³² Esto es fundamental, ya que tales resultados pueden provocar el rechazo innecesario del producto, un aumento de los costos y retrasos en la disponibilidad de terapias seguras y eficaces. Por lo tanto, la prueba MAT ofrece un método más fiable y eficiente para la detección de pirógenos.

Mayor sensibilidad: menor riesgo de falsos negativos.

Además de su mayor especificidad, la prueba MAT demuestra una sensibilidad notablemente mejorada en comparación con la prueba RPT. Los estudios han reportado niveles de sensibilidad del 100%,³⁵ lo que indica una capacidad sustancialmente mejorada para detectar sustancias pirógenas en niveles clínicamente relevantes. Como resultado, la prueba MAT puede detectar pirógenos que no son identificados por la prueba RPT.^{34,35} Además, la probabilidad de resultados falsos negativos se reduce significativamente y los estudios han demostrado que la prueba MAT no presenta resultados falsos negativos.^{32,35} Esta mayor sensibilidad se traduce directamente en una mayor seguridad del paciente, ya que reduce el riesgo de que la contaminación pirógena no detectada ingrese al uso clínico.

Reproducibilidad mejorada

La prueba MAT ha demostrado un alto grado de consistencia en diversas condiciones experimentales. Los estudios muestran que el ensayo produce resultados fiables y reproducibles en diferentes lotes de reactivos,¹⁴ lo que respalda su idoneidad para el uso rutinario en entornos de control de calidad. Es importante destacar que la prueba MAT mantiene un rendimiento estable a pesar de las fuentes inherentes de variabilidad que pueden surgir en entornos de laboratorio prácticos. Esto incluye la variabilidad biológica en las células donantes humanas, las diferencias entre lotes de reactivos y las variaciones de procedimiento, como los cambios en el tiempo de estimulación y los puntos de medición de citocinas.¹⁴ A pesar de estos factores, se ha demostrado que los parámetros clave, como las respuestas de interleucina-6, se mantienen estables, con una detección consistente de la actividad pirógena incluso cuando se varían las condiciones del ensayo.¹⁴ Esta resistencia a la variabilidad biológica y técnica distingue a la MAT de la RPT, que es altamente sensible a factores externos y carece de reproducibilidad. La robustez demostrada de la MAT en condiciones reales de laboratorio refuerza su idoneidad como un reemplazo moderno de la RPT en los marcos de pruebas regulatorias.

En general, la MAT ha demostrado ser significativamente más fiable y relevante que la RPT. La evidencia indica que la MAT tiene un rendimiento al menos equivalente, y en muchos casos superior, al de la RPT en parámetros clave, y cumple con los requisitos para la aprobación de la FDA.¹⁴ Por lo tanto, resulta cada vez más difícil justificar que la RPT siga siendo el método predeterminado.

Precedentes regulatorios

Los avances regulatorios internacionales demuestran cada vez más una clara tendencia global a abandonar las pruebas de pirógenos con conejos y adoptar la prueba MAT. En 2025, tanto la Dirección Europea de Calidad de los Medicamentos y la Atención Sanitaria como la Agencia Reguladora de Medicamentos y Productos Sanitarios supervisaron la eliminación completa de la prueba de pirógenos con conejos (RPT) de las farmacopeas europea y británica,^{2,37,38} y la eliminación gradual en el Reino Unido se identificó como una prioridad regulatoria.² Estos avances demuestran no solo el consenso científico sobre las limitaciones del ensayo, sino también la viabilidad regulatoria de la transición completa para abandonar las pruebas de pirógenos con conejos. Además, otros marcos farmacopeicos internacionales importantes, incluidos los de India y China, reconocen explícitamente la prueba MAT como un método aceptado para la detección de pirógenos.⁸

La transición para abandonar la RPT también está cobrando un impulso significativo en América Latina. En el país vecino Brasil, la prueba MAT se ha incorporado formalmente a los textos farmacopeicos y regulatorios como un método aceptado para la detección de pirógenos.³⁹ Además, la sustitución obligatoria de la RPT por la MAT ya se ha implementado en algunos sectores, y su puesta en marcha debe completarse antes de que finalice este año.⁴⁰ La adopción de medidas similares en Colombia contribuiría a mejorar el progreso en Latinoamérica en su conjunto. Esto podría posicionar a la región como líder internacional en la implementación de estrategias de análisis modernas y relevantes para los seres humanos, especialmente en un momento en que ciertas jurisdicciones, incluyendo Estados Unidos, aún no han completado la transición de la RPT a la MAT.

Perspectiva de bienestar animal

La RPT plantea importantes preocupaciones en materia de bienestar animal debido a la naturaleza de los procedimientos y las condiciones en las que se mantienen y utilizan los conejos durante las pruebas. Los conejos sometidos al análisis suelen permanecer confinados en pequeños dispositivos de sujeción durante periodos prolongados para facilitar la monitorización y la administración repetidas.⁴¹ En la literatura científica se han documentado lesiones asociadas a la sujeción, incluyendo casos de luxación de cadera.⁴² Es frecuente y previsible que los conejos se estresen durante los procedimientos de la RPT.⁴³ Durante todo el proceso de prueba, los conejos son

³⁷ Council of Europe (2024). *Ph. Eur. bids adieu to rabbit pyrogen test in its monographs*. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. Available at: <https://www.edqm.eu/en/-/ph.-eur.-bids-adieu-to-rabbit-pyrogen-test-in-its-monographs>

³⁸ *www.pharmacopoeia.com*. (n.d.). *About the BP - British Pharmacopoeia*. Available at: <https://www.pharmacopoeia.com/the-bp/about>

³⁹ *Www.gov.br*. (2024). *SumrioExecutivoANVISA2024_Verso_Incls.pdf*— Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Available at: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/gestao/relatorios-de-gestao/SumrioExecutivoANVISA2024_Verso_Incls.pdf/view

⁴⁰ *Mctic.gov.br*. (2026). *MCTI*. Available at: https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/Resolucao_CONCEA_n_74_de_20012026.html

⁴¹ SHEAGREN, J.N. and WOLFF, S.M. (1966). *Demonstration of Endogenous Pyrogen in Afebrile Rabbits*. *Nature*, 210(5035), pp.539–540. doi: <https://doi.org/10.1038/210539a0>

⁴² Itami, T., Ema, M. and Kanoh, S. (1983). *Studies on the Dutch Rabbit for Pyrogen Test*. *Experimental Animals*, 32(2), pp.71–76. doi: https://doi.org/10.1538/expanim1978.32.2_71

⁴³ Caldeira, C., Freitas, R., Lopes, I.G. and Presgrave, O. (2014). *Normal temperature variation in New Zealand white rabbits during restraint for preliminary pyrogen test*. *Pharmeuropa Bio & Scientific Notes*, 2014, pp.122–7. Available at:

sometidos a inyecciones y mediciones repetidas e invasivas de la temperatura rectal,^{10,44} lo cual es inherentemente estresante y probablemente incómodo para los animales. Las condiciones de vida, el alojamiento y el manejo suelen ser más estresantes para los animales que el propio procedimiento experimental.⁴⁵ Además, los conejos son sometidos a protocolos restrictivos de alimentación e hidratación, incluyendo períodos en los que se les retira el alimento durante horas antes de la prueba y, en algunos casos, se les restringe el acceso al agua.⁴⁴ Esto contribuye aún más al estrés y compromete su bienestar. Por lo tanto, la continua dependencia de la prueba de temperatura rectal plantea serias preocupaciones éticas y parece incompatible con los principios modernos de bienestar animal y el compromiso reconocido internacionalmente de reemplazar el uso de animales cuando existan alternativas científicamente adecuadas.

Consideraciones prácticas, económicas y de implementación

Tiempo y eficiencia operativa

La RPT es un procedimiento que requiere mucho tiempo y resulta complejo desde el punto de vista operativo. Tras la administración de la sustancia de prueba, los conejos deben someterse a un periodo de monitorización de aproximadamente tres horas con mediciones repetidas de temperatura, generalmente cada 30 minutos.⁴⁴ Además, pueden requerirse extensos procedimientos de preparación y acondicionamiento previos a la prueba, que en algunos casos se extienden hasta 48 horas antes de que pueda comenzar la prueba, lo que prolonga considerablemente el proceso general.⁴⁴ Si bien la prueba de activación de monocitos (MAT) también puede requerir mucho tiempo,¹⁷ ofrece una mayor eficiencia temporal en comparación con la RPT. A diferencia de la MAT, la RPT con frecuencia requiere repetir la prueba debido a la variabilidad, los resultados falsos positivos y las respuestas inconsistentes,^{8,13} lo que genera retrasos adicionales.

El uso de animales vivos introduce además importantes requisitos logísticos relacionados con el cuidado animal. Esto incluye la necesidad de animales sanos, alojados individualmente y mantenidos en condiciones ambientales estrictamente controladas, como temperatura, humedad, iluminación y exposición al ruido.⁴⁴ Los horarios regulados de alimentación e hidratación, y los requisitos de sujeción de los animales⁴⁴ añaden aún más complejidad. Además de imponer una carga considerable en materia de bienestar animal, estos requisitos ponen de manifiesto la susceptibilidad de la prueba de pirógenos en conejos (RPT) a influencias externas que pueden afectar a los resultados y reducir su fiabilidad. En cambio, los métodos de laboratorio, como la MAT, evitan muchas de estas variables y pueden implementarse en un entorno de pruebas más controlado y estandarizado.

https://www.researchgate.net/publication/272079772_Normal_temperature_variation_in_New_Zealand_white_rabbits_during_restraint_for_preliminary_pyrogen_test

⁴⁴ Franco, E., Garcia-Recio, V., Jiménez, P., Garrosa, M., Gírbés, T., Cordoba-Díaz, M. and Cordoba-Díaz, D. (2018). Endotoxins from a Pharmacopoeial Point of View. *Toxins*, 10(8), p.331. doi: <https://doi.org/10.3390/toxins10080331>

⁴⁵ Stauffacher, M. (2004). *The Development of Science-based Guidelines for Laboratory Animal Care: Proceedings of the November 2003 International Workshop*. NIH.

Costos

La RPT también conlleva costes financieros sustanciales, con estimaciones que oscilan entre los 2100 y los 4050 dólares por prueba.⁴⁶ Estos costes podrían aumentar con el tiempo a medida que disminuya la demanda de pruebas en conejos y la infraestructura necesaria para el mantenimiento de las instalaciones de cría y alojamiento se vuelva más costosa.⁸ Si bien la implementación de la MAT puede implicar mayores costes de inversión inicial asociados a la adquisición de equipos, la prueba resulta más rentable a largo plazo.⁸ Esto se debe a ventajas como una mayor confianza en las decisiones de liberación de lotes, tiempos de prueba más rápidos, menores costes de mantenimiento del laboratorio, eliminación de los gastos de cría de animales, reducción de las pérdidas asociadas a los falsos positivos y a las pérdidas innecesarias de producto.⁸ En conjunto, estas ventajas respaldan una estrategia de pruebas más sostenible económicamente. Esto es especialmente relevante dado el crecimiento previsto del mercado de pruebas de pirógenos en los próximos años. Considerando la magnitud de la industria farmacéutica estadounidense y su papel fundamental en las pruebas de pirógenos, incluso reducciones modestas en los costos de las pruebas por lote podrían traducirse en considerables beneficios económicos para todo el sector.

Aplicabilidad e idoneidad para la terapéutica moderna

La prueba de pirógenos en conejos (RPT, por sus siglas en inglés) también presenta importantes limitaciones en su aplicabilidad, lo que reduce aún más su utilidad en el desarrollo farmacéutico moderno. Ciertas categorías de medicamentos no son adecuadas para las pruebas con conejos debido a la interferencia biológica con el ensayo o a problemas de seguridad para los propios animales.

Por ejemplo, los sedantes que disminuyen la temperatura corporal pueden interferir con la respuesta febril medida en conejos, mientras que los compuestos citotóxicos, como los agentes quimioterapéuticos, pueden presentar problemas de seguridad para los animales.¹³ La RPT tampoco es adecuada para probar agentes inmunosupresores y no se puede aplicar a ciertos productos derivados de humanos, incluidos componentes sanguíneos, preparaciones de células madre y otras terapias celulares.⁴⁷ Estas limitaciones son cada vez más importantes dado el panorama cambiante de la terapéutica moderna. Muchos productos biológicos contemporáneos, incluidos los inmunosupresores biológicos, presentan dificultades para el uso de la RPT. Por ejemplo, los inmunosupresores como infliximab⁴⁸ y adalimumab,⁴⁹ aún pueden requerir pruebas de pirógenos según los requisitos actuales del CFR, a pesar de la evidencia mencionada que indica que la prueba de pirógenos (RPT) no es confiable o adecuada en estos contextos. Dado que es muy probable que ya se estén implementando métodos de prueba alternativos para productos donde la

⁴⁶ ICCVAM Background Review Document: Validation Status of Five In Vitro Test Methods Proposed for Assessing Potential Pyrogenicity of Pharmaceuticals and Other Products Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). (2008). Available at: <https://ntp.niehs.nih.gov/sites/default/files/iccvam/docs/pyrogen/brd/pyrobrd2008.pdf>

⁴⁷ Hartung, T., Borel, A. and Schmitz, G. (2016). Detecting the Broad Spectrum of Pyrogens with the Human Whole-Blood Monocyte Activation Test. Bioprocessintl.com. Available at: <https://www.bioprocessintl.com/bioanalytical-methods/detecting-the-broad-spectrum-of-pyrogens-with-the-human-whole-blood-monocyte-activation-test>

⁴⁸ Drugs.com. (n.d.). Infliximab Uses, Dosage, Side Effects, Warnings. Available at: <https://www.drugs.com/infliximab.html>

⁴⁹ Drugs.com. (n.d.). Adalimumab: Uses, Dosage, Side Effects, Warnings. Available at: <https://www.drugs.com/adalimumab.html>

RPT no es adecuada, la adopción generalizada de alternativas sin animales en todas las categorías de productos es factible y es poco probable que introduzca riesgos adicionales.

Otras limitaciones incluyen la incapacidad de la RPT para evaluar de manera confiable ciertos tipos de materiales, incluidos algunos productos sólidos,⁵⁰ y su incapacidad para distinguir entre diferentes clases de pirógenos.⁵⁰ El ensayo también proporciona solo una indicación relativamente básica de la respuesta febril en lugar de generar información cuantitativa detallada sobre la naturaleza o magnitud de la contaminación.¹³ En consecuencia, la cantidad de información útil disponible para las investigaciones de contaminación puede ser limitada. Por otro lado, la prueba MAT es adecuada para una gama más amplia de tipos de productos y proporciona resultados cuantitativos en lugar de cualitativos.¹³

Conclusión

Ante las importantes preocupaciones científicas, regulatorias, éticas y prácticas asociadas con la prueba rápida de pirógenos (PRP), resulta cada vez más difícil justificar su uso dentro del marco regulatorio actual. La evidencia demuestra que la PRP presenta limitaciones significativas en cuanto a fiabilidad, reproducibilidad, especificidad, sensibilidad y relevancia para los humanos, además de generar serias preocupaciones sobre el bienestar animal. Estas deficiencias socavan la confianza en la capacidad de la prueba para salvaguardar adecuadamente la salud pública.

Actualmente, se reconocen como alternativas validadas sin animales, como la prueba MAT, enfoques más relevantes para los humanos, fiables y científicamente avanzados para la detección de pirógenos. Las autoridades regulatorias internacionales y las farmacopeas están avanzando hacia la sustitución y eliminación de las pruebas de pirógenos basadas en conejos, lo que refleja un creciente consenso científico de que la dependencia continua de la PRP está obsoleta y ya no representa la mejor práctica.

Colombia tiene ahora una importante oportunidad para alinearse con estos avances globales y demostrar liderazgo en la modernización científica, la protección de la salud pública y el bienestar animal. La transición hacia métodos validados y relevantes para humanos fomentaría la innovación, mejoraría la armonización regulatoria con los estándares internacionales, fortalecería la confianza en las prácticas de pruebas de seguridad y reduciría el sufrimiento innecesario de los animales.

Recomendaciones/Solicitudes

A la luz de la evidencia presentada, solicitamos respetuosamente al INVIMA que considere las siguientes acciones:

- 1. Aclarar la posición regulatoria actual de Colombia con respecto a la prueba de pirógenos en conejos (RPT),** incluyendo si el ensayo aún es requerido, recomendado o de uso rutinario dentro de los contextos regulatorios y de laboratorio colombianos.

⁵⁰ Tindall, B., Demircioglu, D. and Uhlig, T. (2021). Recombinant bacterial endotoxin testing: a proven solution. *BioTechniques*, 70(5), pp.290–300. doi: <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0165>

2. **Revisar y reevaluar la continuidad de la inclusión o aceptación de la RPT dentro de los marcos regulatorios colombianos** a la luz de la evidencia científica actual, las recomendaciones de la OMS y los avances regulatorios internacionales.
3. **Apoyar formalmente y priorizar la adopción de métodos validados de prueba de pirógenos sin animales, en particular la prueba MAT**, como reemplazo de las pruebas de pirógenos con conejos siempre que sea científica y técnicamente factible.
4. Revisar y actualizar los textos regulatorios, documentos de orientación y referencias farmacopeicas pertinentes para asegurar su alineación con los estándares científicos modernos y las metodologías sin animales reconocidas internacionalmente.

Agradeceríamos enormemente cualquier información que el INVIMA pueda proporcionarnos sobre el uso actual, la regulación o la eliminación gradual prevista de la prueba de pirógenos en Colombia, así como sobre cualquier iniciativa en curso relacionada con la implementación de métodos alternativos de análisis de pirógenos.

Gracias por su tiempo y consideración de este importante asunto. Esperamos su respuesta.

Atentamente,

Klaudia Jukonis, BSc (Hons), MSc.,
Science Policy Advisor

En nombre de ADI Colombia:

EduardoPena@ad-international.org / infolatam@ad-international.org