



Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19. The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect, the company's public news and information website.

Elsevier hereby grants permission to make all its COVID-19-related research that is available on the COVID-19 resource centre - including this research content - immediately available in PubMed Central and other publicly funded repositories, such as the WHO COVID database with rights for unrestricted research re-use and analyses in any form or by any means with acknowledgement of the original source. These permissions are granted for free by Elsevier for as long as the COVID-19 resource centre remains active.



Revista Española de Anestesiología y Reanimación

www.elsevier.es/redar



CASO CLÍNICO

Descripción de un modelo ovino para la prueba de ventiladores de urgencia en la pandemia de COVID-19



J. Viscasillas^a, J.M. Alonso-Iñigo^b, A. Gutierrez-Bautista^a, M. Casañ Pallardó^c y J.I. Redondo^a

^a Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Hospital Clínico Veterinario. Facultad de Veterinaria, Universidad Cardenal Herrera-CEU, CEU Universities, Valencia, Spain

^b Servicio de Anestesiología, Reanimación y Tratamiento del Dolor, Hospital Universitari i Politècnic La Fe de Valencia, España

^c Servicio de Anestesiología, Reanimación y Tratamiento del Dolor, Hospital General Universitario de Castellón, España

Recibido el 2 de mayo de 2020; aceptado el 4 de octubre de 2020

Disponible en Internet el 23 de octubre de 2020

PALABRAS CLAVE

Experimento;
Oveja;
Ventilador;
Síndrome de distrés
respiratorio agudo

Resumen La pandemia COVID-19 ha puesto de manifiesto un déficit de ventiladores en el sistema sanitario para estas situaciones. Por ello, varios proyectos nacionales e internacionales se han desarrollado en pocas semanas para producir prototipos de ventiladores de fácil y rápida fabricación. Una de las exigencias de la AEMPS para la realización de estudios clínicos con nuevos prototipos pasa por la validación en un modelo animal. Para ello es importante poder utilizar un modelo animal en el que reproducir diferentes situaciones clínicas de forma fácil. En este artículo describimos el uso de la oveja como modelo animal para evaluar un prototipo de ventilador. El animal estuvo anestesiado durante 10 horas en las que el prototipo fue utilizado hasta en 6 escenarios. Este modelo pareció eficaz y es fácilmente reproducible, por lo que es una excelente opción para este tipo de investigación.

© 2020 Sociedad Española de Anestesiología, Reanimación y Terapéutica del Dolor. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Experiment;
Sheep;
Ventilator;
Acute respiratory
distress syndrome

Description of ovine model for testing ventilator prototypes in the COVID-19 pandemic

Abstract The COVID-19 pandemic has revealed a ventilator deficit in the global health system for this scenario. For this reason, several national and international projects have been developed to get done prototypes of ventilators which could be easy and fast to manufacture. One of the requirements of the AEMPS for conducting clinical studies with new prototypes is through the validation of these new prototypes in an animal model. Therefore, it is important to achieve an animal model which allows us to easily reproduce different clinical scenarios. In this article, we describe the use of a sheep as a research model to assess a prototype ventilator. The animal was anesthetized for 10 hours in which the prototype was tested in up to 6 different

scenarios. This model is effective and easy to reproduce, making it an excellent choice for this kind of research.

© 2020 Sociedad Española de Anestesiología, Reanimación y Terapéutica del Dolor. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

La necesidad de encontrar un puente entre la investigación básica y la clínica dio lugar a la investigación traslacional¹. Este paso en el desarrollo de nuevos fármacos, equipos médicos o procedimientos no solo es necesario, sino que también es un requerimiento legal previo al ensayo clínico.

La pandemia de la COVID-19 ha requerido de la utilización de soporte ventilatorio en un gran número de pacientes. Según varias fuentes, hasta un 15,2%² de estos pacientes necesitaron el uso de ventilación mecánica. Esto hace que ciertos equipos, como los ventiladores de cuidados intensivos, fueran una pieza fundamental en su tratamiento. El stock y la capacidad de fabricación de estos equipos es limitada, lo que en una situación de pandemia como la vivida había un potencial riesgo de no disponer del número de ventiladores necesarios. Con el objetivo de evitar la falta de ventiladores disponibles se han desarrollado diferentes proyectos nacionales e internacionales de diseño y fabricación, la mayoría de ellos con las premisas de que sean de fácil fabricación y bajo coste y con un código *open source* para que sean fabricados rápidamente en masa en cualquier lugar del mundo.

En esta situación de urgencia, la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), autoridad competente en España, publicó una resolución en el que recogía los requisitos para homologar un prototipo de ventilador³. En resumen, además de una descripción técnica del prototipo y de pruebas en un pulmón de simulación, la agencia solicitaba que el prototipo fuera probado también en un modelo animal. Sin embargo, en dicha resolución solo se define el modelo de animal (porcino), sin especificar las características del experimento. Esto hace que en un principio no solo se desechen otros modelos animales también válidos sino que no queden definidos los parámetros mínimos de monitorización que se debe emplear en el modelo para asegurar que el ventilador es seguro.

El objetivo de este artículo es describir el modelo animal utilizado en nuestro caso para probar un prototipo de ventilador *open source* desarrollado durante la pandemia de COVID-19. Con ello, pretendemos ayudar a que nuestra experiencia sirva de referencia para otros grupos de investigación.

Caso clínico

El experimento fue aprobado por la Consellería de Agricultura, Desarrollo Rural, Emergencia Climática y Transición Ecológica de la Generalitat Valenciana (código

2020/VSC/PEA/0066) a propuesta del Comité de Ética y Experimentación Animal de la Universidad CEU Cardenal Herrera.

El modelo animal empleado fue el ovino, un carnero de 60 kg de peso y 4 años. Solo se indicó ayuno para sólidos, que fue de 12 h antes del procedimiento, con aporte de líquidos *ad libitum* hasta empezar el experimento. Se colocó un catéter venoso a través de la vena cefálica derecha por el que se administró 0,5 mg/kg de midazolam como premedicación.

La preoxigenación se realizó mediante mascarilla de oxigenación veterinaria con un flujo de 5 L/min durante 5 min. Tras este periodo, con el animal en decúbito esternal, se indujo la anestesia con una combinación de quetamina (5 mg/kg) y propofol (2 mg/kg). Se realizó la intubación orotraqueal con la ayuda de un laringoscopio de pala miller y un *bougie*, y avanzando un tubo endotraqueal con sistema de neumotaponamiento de diámetro interno de 8,5 mm. El animal se conectó a un ventilador convencional mediante un circuito circular por el que se suministraba una FiO₂ de 0,5. El mantenimiento anestésico se hizo por vía intravenosa con infusiones continuas de quetamina (1 mg/kg por hora), fentanilo (10 mcg/kg por hora) y propofol (0,2 mg/kg por minuto).

Al animal se le colocó un catéter arterial mediante técnica Seldinger en la arteria carpal derecha, un catéter central bilumen en la vena yugular externa izquierda también mediante técnica Seldinger y una sonda ruminal para evitar el timpanismo ruminal y su potencial efecto depresor tanto respiratorio como cardiovascular. Los parámetros monitorizados fueron ECG, pulsioximetría, capnografía convencional, espirometría, temperatura central, presión arterial invasiva, presión venosa central (monitor Carescape B450, General Electric, Helsinki, Finlandia) presión esofágica (FlumexGrE, MbMed, Buenos Aires, Argentina), capnografía volumétrica (FlumexGrE, MbMed, Buenos Aires, Argentina), gasto cardíaco mínimamente invasivo (Mostcare, Vygon, Valencia, España), gasometrías (Epoc blood analysis system, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany) arteriales en los momentos previamente establecidos por el experimento y radiografías torácicas.

Tras la inducción y estabilización del animal se inició la ventilación con el prototipo de ventilador ACUTE-19 (fig. 1) en modo de ventilación mandatoria continua controlada por presión (CMV-PC); se instauraron diversos patrones ventilatorios con una FiO₂ variable en 6 fases secuenciales:

1. Ventilación basal sin bloqueo neuromuscular con los siguientes parámetros: *Positive end-expiratory pressure*

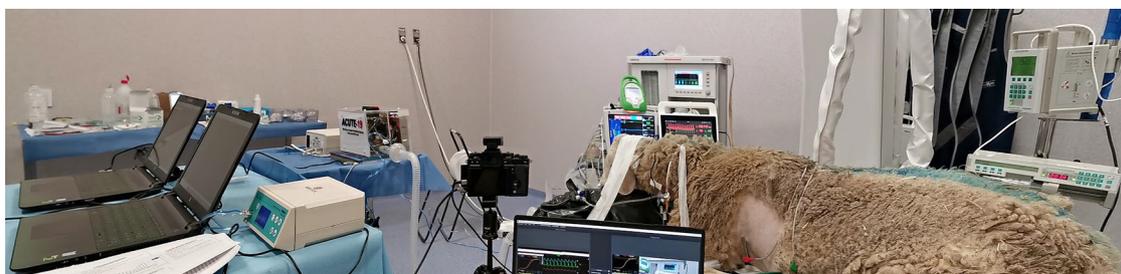


Figura 1 Organización de la sala durante el experimento. Oveja anestesiada con TIVA y posicionada en decúbito esternal en la mesa de radiología. El animal está conectado al prototipo del ventilador y monitorizado con monitor multiparamétrico (B40, GE, Chicago, Illinois, EEUU), de gasto cardíaco (MostCare, Vygon, Ecouen, Francia) y mecánica ventilatoria (FluxMed GrE, MBMED, Buenos Aires Argentina). Todos los datos fueron almacenados y el experimento grabado en su totalidad.

- (PEEP) 5 cmH₂O, presión inspirada (Pinsp) para obtener un volumen tidal (VT) de 6-7 ml/kg, frecuencia respiratoria 14 rpm, relación inspiración:expiración 1:2 y FiO₂ 0,5.
2. Ventilación basal con bloqueo neuromuscular. En esta fase se administró atracurio (0,5 mg/kg) y se mantuvieron los parámetros ventilatorios como en la fase 1. Con una duración de ambas fases de 150 min.
 3. Modelo de distrés respiratorio (SDRA). El modelo SDRA se provocó lavando el surfactante alveolar con 60 ml/kg de solución salina fisiológica a 37 °C⁴. Para ello se introdujo una sonda a través del tubo endotraqueal, por donde se administraron 20 ml/kg de solución salina fisiológica atemperado. Una vez administrado, se realizó una maniobra de *coupage* y se recuperó el contenido líquido con un aspirador quirúrgico. La recolección de un líquido de color blanquecino es compatible con una mezcla de la solución salina fisiológica y el surfactante. Tras terminar esta procedimiento, se conectó al animal de nuevo al ventilador y se monitorizó para comprobar si el modelo SDRA se había conseguido. Se necesitaron 3 lavados para conseguirlo. La confirmación del modelo SDRA se efectuó mediante la observación del descenso de los valores de saturación arterial periférica de oxígeno por

- debajo de 90% seguido por una radiografía de tórax y una gasometría arterial para confirmar un valor de PaO₂/FiO₂ menor de 100⁵.
4. Reclutamiento alveolar y estrategia ventilatoria. Una vez restaurado el modelo SDRA, y tras esperar 20 min, se ejecutó la siguiente estrategia de reclutamiento⁶:
 - Maniobra de reclutamiento alveolar. Se realizó en modo CMV-PC con una *driving pressure* (DP) de 15 cmH₂O, frecuencia respiratoria de 15 rpm, relación inspiración:expiración de 1:1, FiO₂ de 0,8 y PEEP inicial de 5 cmH₂O. Se aumentó el nivel de PEEP de 5 en 5 cmH₂O cada 10 ciclos respiratorios aumentando a 15 ciclos en el último nivel de PEEP (25 cmH₂O) y se consiguió una presión de apertura en vía aérea de 40 cmH₂O (duración de la maniobra: 160 segundos) (fig. 2).
 - Cálculo de PEEP óptima. Se ajustó la presión de trabajo para obtener un Vt de 6-7 ml/kg, una frecuencia respiratoria de 15 rpm y una PEEP de 20 cmH₂O. Se procedió a disminuir el nivel de PEEP de 2 en 2 cmH₂O cada 30 segundos hasta conseguir la PEEP con la mejor complianza dinámica (C_{dyn}). Una vez conocido el nivel de PEEP óptima (PEEP con mejor C_{dyn}), se repitió la misma maniobra de reclutamiento alveolar y se ajustó

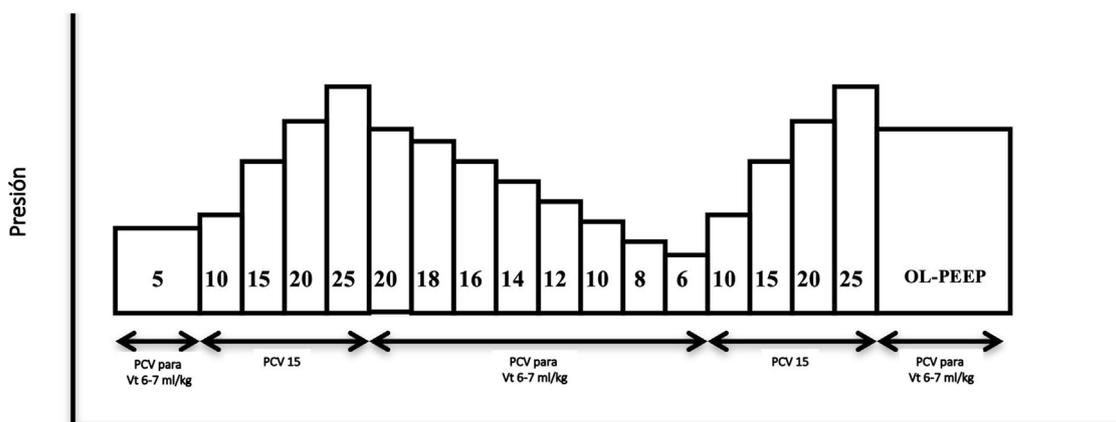


Figura 2 Esquema de maniobra de reclutamiento alveolar realizada en la fase 4 tras provocar el distrés respiratorio agudo en el animal. PCV (ventilación controlada por presión), OL-PEEP (Open lung PEEP). Figura adaptada de Ferrando C, Soro M, Unzueta C, et al. Rationale and study design for an individualised perioperative open-lung ventilatory strategy with a high versus conventional inspiratory oxygen fraction (iPROVE-O2) and its effects on surgical site infection: study protocol for a randomised controlled trial. BMJ Open 2017 Jul 31;7(7):e016765. doi: 10.1136/bmjopen-2017-016765.

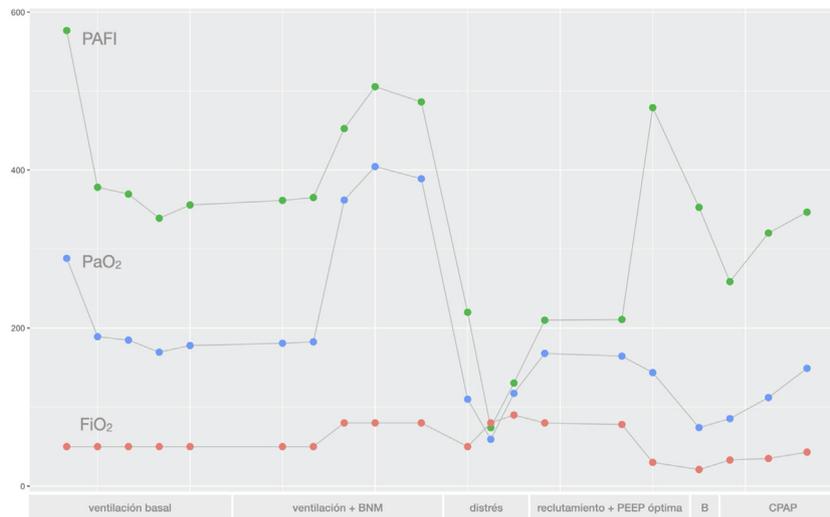


Figura 3 Gráfica mostrando los resultados de PaO₂ (en mmHg), FiO₂ (%) y PaO₂/FiO₂ obtenidos a lo largo de las diferentes fases del estudio; 1) Ventilación basal, 2) Ventilación basal con bloqueante neuromuscular (BNM), 3) Distrés respiratorio agudo, 4) Reclutamiento alveolar con búsqueda de PEEP óptima, 5) Broncoconstricción (B) y 6) ventilación espontánea con CPAP.

el nivel de PEEP con mejor C_{dyn} añadiendo 2 cmH₂O a los valores obtenidos.

- Ventilación postreclutamiento. Se ajustó la *driving pressure* para obtener un VT de 6-7 ml/kg, una frecuencia respiratoria de 15 rpm, una relación de inspiración:expiración de 1:2 y PEEP de mejor C_{dyn}, manteniendo la ventilación durante 90 min.
5. Modelo de broncoconstricción: CMV-PC en un modelo de broncoconstricción una vez recuperado del distrés respiratorio. Tras varias horas de estabilización, y ya con el pulmón recuperado, se administraron 0,03 mg/kg de neostigmina por vía intravenosa para producir broncoconstricción, que se confirmó por el aumento de la resistencia de vías aéreas en la espirometría.
 6. Ventilación espontánea con diferentes valores de *continuous positive airway pressure* (CPAP). Por último, se redujeron las dosis de las infusiones de ketamina, fentanilo y propofol al 50% con el objetivo de disminuir la profundidad anestésica y recuperar la actividad espontánea. En ese momento, se comenzó a administrar diferentes niveles de CPAP y valorar sus efectos en los parámetros monitorizados.

En la [figura 3](#) se resumen los resultados obtenidos en cada momento del experimento de los principales parámetros de oxigenación monitorizados en el animal.

Discusión

La elección del modelo animal en experimentación animal debe basarse en los criterios de reemplazo, reducción y refinamiento¹. En nuestro caso buscamos una especie humana, con características parecidas a la especie humana, con previa experiencia en su uso para este tipo de experimento, y con un protocolo que permitiera probar el ventilador en diferentes escenarios clínicos y que fuera fácilmente reproducible. Además, el modelo utilizado debía ser

sencillo de ejecutar, con fármacos y técnicas normalmente utilizadas en centros de experimentación animal.

La AEMPS indicaba que el experimento debe hacerse en un modelo porcino. Sin embargo, en el momento en que se publicó la norma nuestro proyecto estaba muy avanzado y ya habíamos obtenido los permisos para llevarlo a cabo en un modelo ovino, que, *a priori*, considerábamos más adecuado. Tras ponernos en contacto con la AEMPS, nos autorizó a emplear este modelo tras justificar su idoneidad.

Las ovejas son animales gregarios, domesticados desde hace miles de años y fáciles de manejar, explorar y administrar fármacos por cualquier vía, incluso la intravenosa, sin necesidad de sedación previa, que es una de las principales ventajas frente al modelo porcino.

El modelo ovino se utiliza de forma extendida en medicina translacional para diferentes campos de la investigación. Específicamente se ha utilizado antes para el estudio de diferentes modelos de enfermedad respiratoria y de diferentes estrategias ventilatorias⁷.

Aunque en un primer momento el hecho de ser una especie herbívora y rumiante puede hacernos pensar que es una especie más alejada de la especie humana que otras muy empleadas en experimentación animal, como el cerdo, la anatomía y fisiología del aparato respiratorio de la oveja se asemeja más al humano que las de otras especies. Asimismo, es muy útil en experimentos donde es necesario estudiar parámetros respiratorios y obtener mediciones de mecánica respiratoria⁷.

El animal estuvo anestesiado durante 10 h en las que se probaron todos los escenarios descritos, sin tener más complicaciones que las asociadas al modelo de distrés respiratorio, que fueron resueltas con una maniobra de reclutamiento utilizando el prototipo del ventilador. El uso de una monitorización avanzada nos dio una información detallada del estado del animal en todo momento tanto desde la perspectiva cardiovascular como respiratoria. Ello nos permitió confirmar, por un lado, que producíamos el efecto buscado en cada momento con nuestras maniobras, y, por otro, a la vez que no teníamos efectos secundarios

no deseados. Aunque el grado de monitorización no estaba tampoco definido en la resolución de la AEMPS, creemos que es importante tener al menos un control de todos estos parámetros cuando se está probando un prototipo de ventilador.

El modelo ovino ha sido muy utilizado en el estudio del síndrome de distrés respiratorio agudo⁸. Este modelo de distrés ha sido realizado mediante varias técnicas como, por ejemplo, la administración de humo de algodón directamente en el pulmón⁹, administración de lipopolisacáridos de *Escherichia coli*¹⁰ o el lavado alveolar con suero salino fisiológico y la consecuente pérdida de surfactante alveolar⁴. Las diferencias entre ellos dependen del producto utilizado para producir el daño tisular, la gravedad del cuadro y la patofisiología que produce. Esta última técnica, el lavado alveolar con suero salino, es la empleada en nuestro modelo. Este modelo de distrés ha sido utilizado en diversos estudios para evaluar maniobras de reclutamiento alveolar^{11,12}. El modelo utilizado en nuestro caso es un método sencillo, rápido, seguro y fácilmente reproducible para valorar el efecto de las maniobras ventilatorias. Este modelo también permite resolver el síndrome, por lo que el animal puede potencialmente ser utilizado para otras maniobras o escenarios, como en este caso. De esta forma optimizamos el concepto de «reducción» del principio de las 3 R formulados por Russel y Burch, en Inglaterra en 1959, que marcaron uno de los pilares de la experimentación animal¹.

El modelo utilizado es sencillo de repetir, con fármacos y técnicas normalmente utilizadas en centros de investigación animal.

Para terminar, los resultados obtenidos en la gasometría y mostrados en la gráfica muestran una buena oxigenación en las fases 1 y 2. El valor de PaO₂/FiO₂ < 100 conseguido tras el lavado alveolar del surfactante reprodujo un modelo de distrés respiratorio agudo severo y las maniobras de reclutamiento alveolar mejoraron de forma significativa la oxigenación. Por último, tanto en las fases 5 como en la 6 la oxigenación se mantuvo también adecuada.

Conclusión

A modo de conclusión podemos afirmar que el modelo ovino utilizado en este experimento fue capaz de cumplir todos los objetivos previamente establecidos para valorar el prototipo del ventilador en diferentes escenarios clínicos. Por todo ello, creemos que este modelo animal utilizado para estudiar el prototipo de ventilador es fácil de emplear, de reproducir y puede evaluar diferentes escenarios clínicos en un solo animal en las circunstancias actuales de urgencia sanitaria por COVID-19.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Tannenbaum J, Bennett B. Russell and Burch's 3 Rs then and now: The need for clarity in definition and purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2015;54:120–32. PMID: PMC4382615.
2. Villalonga R, Martín MC, Avilés-Jurado FX, Alvarez J, Aldecoa C, de Haro C, et al. Documento de consenso de la Sociedad Española de Medicina Intensiva, Crítica, y Unidades Coronarias (SEMICYUC), la Sociedad Española de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello (SEORL-CCC) y la Sociedad Española de Anestesiología y Reanimación (SEDAR) sobre la traqueotomía en pacientes con COVID-19. *Rev Esp Anesthesiol Reanim.* 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.redar.2020.05.001>.
3. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Información sobre prototipos de respiradores, pruebas de seguridad y requisitos de investigación clínica. 27 de marzo 2020; <https://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/productosSanitarios/2020/NI-PS.11-2020-respiradores-pruebas-investigaciones.pdf>
4. Lachmann B, Robertson B, Vogel J. In vivo lung lavage as an experimental model of the respiratory distress syndrome. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1980;24:231–6.
5. Ranieri VM, Rubenfeld GD, et al. Acute respiratory distress syndrome: The Berlin definition. *JAMA.* 2012;307:2526–33. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2012.5669>.
6. Ferrando C, Soro M, Canet J, Unzueta MC, Suárez F, Librero J, et al. Rationale and study design for an individualized perioperative open lung ventilatory strategy (iPROVE): Study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* 2015;27;16:193. <http://dx.doi.org/10.1186/s13063-015-0694-1>.
7. Meeusen E, Snibson K, Hirst S, Bischof R. Sheep as a model species for the study and treatment of human asthma and other respiratory diseases. *Drug Discov Today Dis Models.* 2009;6:101–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ddmod.2009.12.002>.
8. Ballard-Croft C, Wang D, Sumpter R, Zhou X, Zwischenberger J, et al. Large-animal models of acute respiratory distress syndrome. *Ann Thorac Surg.* 2012;93:1331–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.athoracsur.2011.06.107>.
9. Asmussen S, Ito H, Traber DL, Lee J, Cox R, Hawkins H, et al. Human mesenchymal stem cells reduce the severity of acute lung injury in a sheep model of bacterial pneumonia. *Thorax.* 2014;69:819–25. <http://dx.doi.org/10.1136/thoraxjnl-2013-204980>.
10. Cardenas N, Aranda-Valderrama P, Carney JP, Sellares Torres J, Alvarez D, Kocydirim E, et al. Cell therapy for ARDS: Efficacy of endobronchial versus intravenous administration and biodistribution of MAPCs in a large animal model. *Open Resp Res.* 2019;1–10. <http://dx.doi.org/10.1136/bmjresp-2018-000308>.
11. Yehya N. Lessons learned in acute respiratory distress syndrome from the animal laboratory. *Ann Transl Med.* 2019;7:503–15. <http://dx.doi.org/10.21037/atm.2019.09.33>.
12. Engel M, Nowacki RM, Reiss LK, Uhlig S, Willems CH, Kloosterboer N, et al. Comparison of recruitment maneuvers in ventilated sheep with acute respiratory distress syndrome. *Lung.* 2013;191:77–86. <http://dx.doi.org/10.1007/s00408-012-9428-2>.