



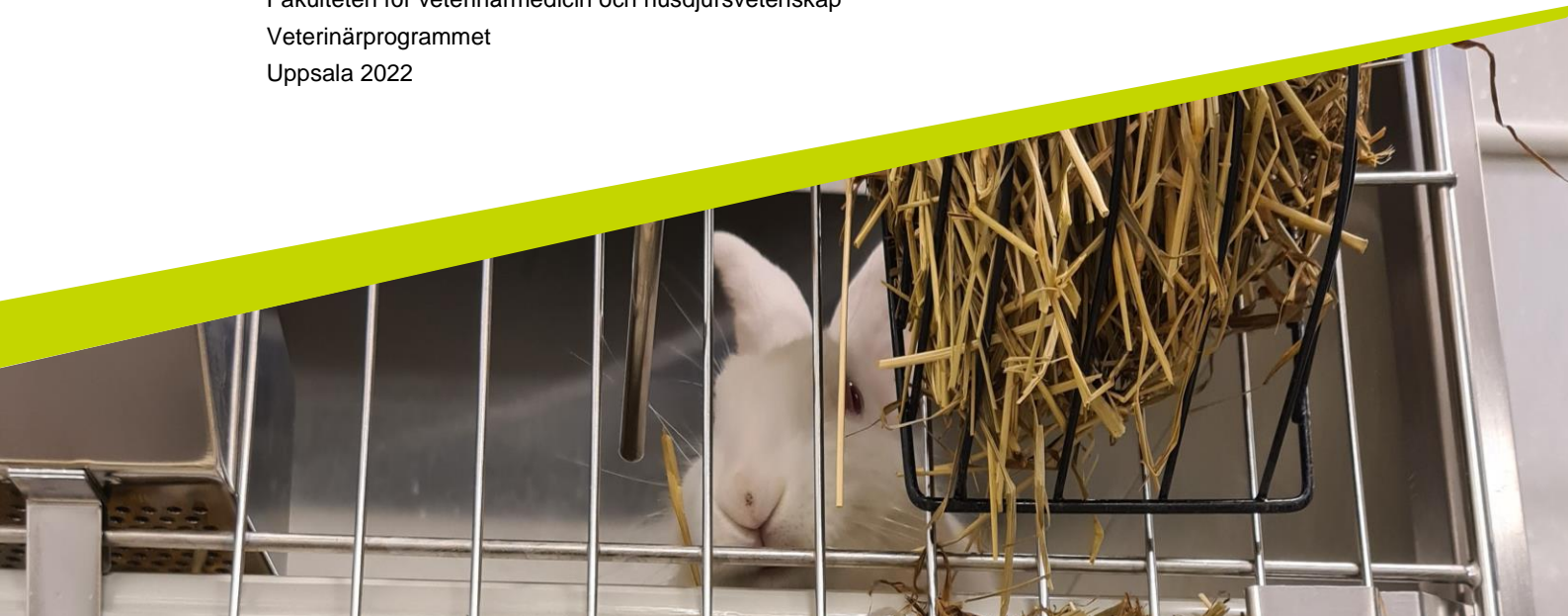
Utvärdering av ett socialiserings- och träningsprogram för kaniner i medicinsk forskning

– en pilotstudie

Evaluation of a socialization and training program for rabbits in medical research – a pilot study

Josefin Brock von Rein

Självständigt arbete • 30 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet
Uppsala 2022



Utvärdering av ett socialiserings- och träningsprogram för kaniner i medicinsk forskning – en pilotstudie

Evaluation of a socialization and training program for rabbits in medical research – a pilot study

Josefin Brock von Rein

Handledare: Patricia Hedenqvist, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper

Bitr. handledare: Elin Manell, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper

Examinator: Anneli Rydén, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: A2E

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0869

Program/utbildning: Veterinärprogrammet

Kursansvarig inst.: Institutionen för kliniska vetenskaper

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2022

Omslagsbild: Josefin Brock von Rein

Nyckelord: Kanin, hantering, träning, socialisering, rädsla, stress, försöksdjur

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för kliniska vetenskaper

Enheten för komparativ medicin och fysiologi

Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Fulltexten kommer dock i samband med att dokumentet laddas upp arkiveras digitalt.

Om ni är fler än en person som skrivit arbetet så gäller krysset för alla författare, ni behöver alltså vara överens. Läs om SLU:s publiceringsavtal här:

<https://www.slu.se/site/bibliotek/publicera-och-analysera/registrera-och-publicera/avtal-for-publicering/>.

JA, jag/vi ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

NEJ, jag/vi ger inte min/vår tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.

Sammanfattning

2018 var kaninen det tredje vanligaste försöksdjuret inom EU. I egenskap av ett litet bytesdjur medföljer dock naturlig rädsla för människan och låg stresströskel vid hantering, vilket riskerar äventyra såväl djurvälstånd som forskningskvalitet. Hittills har ett fåtal studier utvärderat strategier för att reducera stressen hos vuxna kaniner i djurförsök. Däremot har resultat indikerat att potentialen är lika stor för denna ålderskategori som för kaniner innan avvänjning, där effekten av tillvänjning till hantering främst är studerad. Standardiserade riktlinjer gällande förfarandet för tillvänjning är ännu ej formulerade.

Av det skälet ämnade denna studie utvärdera ett socialiserings- och träningsprogram för vuxna kaniner utvecklat på S:t Eriks Ögonsjukhus i Stockholm, tidigare beskrivet av Ersbring 2021. Programmet utvärderades på en grupp om tre hankaniner av rasen New Zealand White i jämförelse med en lika stor icke hanterad kontrollgrupp. Effekterna tolkades förutom med blindad subjektiv beteendeanalys och approach-tester även genom analys av blodglukos och plasmakortisol. Efter programmets fullföljande tränades även kontrollgruppen enligt samma schema medan testgruppen fick fortsatt daglig socialisering och en utvärdering av beteendet upprepades. Strategin möjliggjorde utvärdering av eventuella bibehållna effekter samt resultat av programmets fördröjda start.

Sammantaget detekterades inga signifikanta skillnader mellan tränade och otränade kaniner i någon testparameter vilket sannolikt berodde på gruppernas begränsade storlek. Däremot observerades tydliga trender i beteende, förknippade med reducerad rädsla. Störst effekt av träning observerades hos gruppen vilken genomgått programmet innan blodprovstagning ägde rum. Det fanns även tecken på att träning och socialisering har viss omedelbar påverkan och att daglig socialisering efter en veckas fullföljd träning ger kumulativa resultat. Dock iaktogs ingen påverkan på blodparametrar, möjligtvis på grund av låg stress över lag, inadekvata mätintervall eller att acklimatisering har samma effekt på dessa som socialisering och träning.

I sin helhet stödjer studien resultaten från tidigare forskning inom ämnet men ytterligare studier erfordras för att säkerställa resultaten.

Nyckelord: Kanin, hantering, träning, socialisering, rädsla, stress, försöksdjur

Abstract

In 2018 the rabbit was the third most used research animal within the EU. However, as a small prey species, it possesses an innate fear of humans and a low stress threshold during handling, which puts both animal welfare and research quality at risk. While only a few studies have evaluated strategies toward reducing stress in adult rabbits undergoing experimental trials so far, combined results show a similarly strong potential of reducing stress through application of habituation methods on this age group, as the more extensive research conducted on pups before weaning have done. Still any standardized protocol for such methods remains to be defined.

For this reason, this study aimed to evaluate a training and socialization program developed for adult rabbits at S:t Eriks Eye Hospital in Stockholm, previously described by Ersbring 2021. The program was incorporated for a group of 3 male New Zealand White rabbits and evaluated in comparison to a corresponding non handled control group. Impacts were measured repeatedly through methods of both blinded subjective behavior analysis and approach tests, as well as blood glucose and plasma cortisol evaluation. Following completion of the program the test group was subject to continuous daily socialization whereas the controls initiated the training and socialization protocol. Another evaluation of behavior was then conducted which allowed for further assessment regarding possible sustained effects from training in the test group, in conjunction with consequences of delayed start of the program in the control group.

In conclusion, none of the various tests revealed statistically significant differences between trained and untrained rabbits, which in large probably was due to the limited number of rabbits in each group. There was however strong indication on behavior associated with reduced fear after training, most prominently within the group which enrolled the program prior to blood collection. Furthermore, results were indicative of some immediate positive impact following training together with a further lasting reduction of fear achieved by continuous daily socialization up on completion of the training protocol. Regarding the physiological variables on the other hand, no effects of training were observed. This was likely either due to low stress in general, inadequate measuring intervals or acclimatization having similar effect on these as socialization and training.

In final, the study outcome was in concurrence with previous relevant research. However further studies on larger groups of rabbits are required in order to assure the investigated effects.

Keywords: Rabbit, handling, training, socialization, restraint, fear, stress, research animal

Innehållsförteckning

1. Inledning	9
2. Litteraturoversikt	11
2.1. Introduktion till djurförsök.....	11
2.1.1. Bakgrund och definitioner	11
2.1.2. Statistik	12
2.1.3. Aktuell lagstiftning och principer för 3R	12
2.2. Kaninen som försöksdjur	13
2.2.1. Bakgrund och användningsområden	13
2.2.2. Beteendemässiga tecken på rädsla och stress	14
2.2.3. Negativa välfärdsaspekter och onormala beteenden	14
2.2.4. Hantering under experimentella procedurer och aktuella provtagningstekniker.....	15
2.3. Stressmekanismer och analysmetoder för stress hos kaniner.....	17
2.3.1. Definition och fysiologi bakom stress.....	17
2.3.2. Generella principer för utvärdering av stress hos försöksdjur	18
2.3.3. Fysiologiska och biokemiska stressmarkörer	20
2.3.4. Beteendetest.....	24
2.4. Effekt av socialisering och beskrivning av träningsprogrammet på S:t Eriks Ögonsjukhus.....	24
2.4.1. Bakgrund.....	24
2.4.2. Innehåll och utförande	26
3. Material och metod	27
3.1. Kaninerna	27
3.2. Socialiserings- och träningsprogrammet	28
3.2.1. Utgångspunkt.....	28
3.2.2. Acklimatisering.....	29
3.2.3. Lyft och förflyttning.....	29
3.2.4. Träningen.....	30
3.3. Studiedesign.....	30
3.3.1. Överblick	30
3.3.2. Dokumentation av träningsprogrammet.....	31
3.3.3. Andningsfrekvens	31

3.3.4.	Blodprovstagning	31
3.3.5.	Blodglukos	32
3.3.6.	Plasmakortisol.....	32
3.3.7.	Approach-test.....	32
3.3.8.	Subjektiv beteendeanalys.....	33
3.4.	Databearbetning	34
4.	Resultat.....	35
4.1.	Andningsfrekvens	35
4.2.	Blodprovstagning.....	35
4.3.	Blodglukos	35
4.4.	Plasmakortisol	37
4.5.	Approach-test	40
4.5.1.	Antal kontakter	41
4.5.2.	Tid till första kontakt.....	41
4.5.3.	Antal närmanden <5 cm från handen	42
4.5.4.	Lokalisation i buren	43
4.6.	Subjektiv beteendeanalys.....	45
5.	Diskussion.....	47
5.1.	Utförande av socialisering och träningen	47
5.2.	Effekt av träningsprogrammet	47
5.2.1.	Omedelbara effekter	47
5.2.2.	Effekter efter programmets fullföljande.....	48
5.2.3.	Bibehållna effekter av träningsprogrammet vid fortskridande socialisering	51
5.2.4.	Effekter av fördröjd påbörjad träning	51
5.3.	Felkällor	51
6.	Konklusion	53
	Referenser.....	54
	Tack	63
	Populärvetenskaplig sammanfattning	64
	Bilaga 1.....	68

1. Inledning

Med ett immunsystem likt människans, relativt stor kroppsmassa och blodvolym, lång livslängd, samt följsam natur och enkel skötsel har kaninen blivit en efterfrågad djurmodell inom medicinsk forskning (Nagarajan *et al.* 2021). I egenskap av ett litet bytesdjur med en förhållandevis sent påbörjad domesticeringsprocess (Naff & Craig 2012) har kaninen däremot en naturlig rädsla för människan vilket har konsekvenser för både djurvälstånd och forskningskvalitet (Richmond 2010). Utifrån dessa aspekter har motivationen till utvecklande av principer för hantering och hållande av kaniner höjts, parallellt med att fokus på djurvälstånd i nationella och internationella författningar ökat (Nagarajan *et al.* 2021). Genom traditionella inlärningsstrategier så som habituering, klassisk betingning och motbetingning har flertal studier visat att tillvänjning och träning inför hantering och experimentella procedurer reducerar stress hos försöksdjur. Avseende studier på kaniner har majoriteten av dessa undersökt effekten under doperioden när mottagligheten är som störst. Den existerande forskningen på kaniner efter avvänjning ger däremot indikation om att likvärdiga resultat kan uppnås även för denna ålderskategori.

På S:t Eriks Ögonsjukhus i Stockholm bedrivs sedan flera år tillbaka ett socialiseringsprogram för vuxna kaniner med syftet att gradvis vänja kaniner inför hantering och experimentella procedurer inför medicinska försök. Personalens subjektiva upplevelse är att kaninerna efter träningen är mindre stressade och mer lätthanterliga. Med syftet att dokumentera träningen och utvärdera programmet genomförde Ersbring 2021 en primärt deskriptiv studie vars resultat stödde hypotesen om att träningen reducerade kaninernas rädsla. Med anledning av bland annat brist på kontrollgrupp kunde ingen säker slutsats dras, men var trots det av intresse eftersom fåtal liknande program tidigare blivit vetenskapligt granskade enligt författarens kännedom.

Denna studie avser fördjupa sig i frågeställningen kring programmets effekt på kaniners rädsla, och stärka det vetenskapliga belägget för effekten genom strikt definiering och dokumentation av träningens genomförande, analys av fysiologiska och biokemiska stressmarkörer, inkludering av kontrollgrupp samt blindad utvärdering av beteende från filmer. Den slutgiltiga målsättningen är att erhålla ett evidensbaserat standardiserat och effektivt socialiserings- och träningsprogram för kaniner i

medicinsk forskning, och därmed öka djurvård och förutsättningar för hög forskningskvalitet.

2. Litteraturöversikt

2.1. Introduktion till djurförsök

2.1.1. Bakgrund och definitioner

Försöksdjursmedicin är en bred vetenskaplig disciplin innehållande grenar från både biomedicin, human-och veterinärmedicin. Vetenskapen täcker flertal områden inom hållandet av djur i vetenskapligt syfte, där avel, skötsel, djurförsök och djurvälstånd ingår. Sedan begynnelsen av motsvarande verksamheter har variationen av använda djurkategorier ökat och fältet utgör numera en av grundpelarna inom biomedicinsk forskning (Nagarajan *et al.* 2021). Det bör också beläggas att användandet av djur för vetenskapliga ändamål är ett komplext och känsligt ämne, och grund för flera etiska och moraliska ställningstaganden (Bayne *et al.* 2010; Richmond 2010). Mot denna aspekt har under de senaste åren riktats allt större fokus vad gäller både generella attityder och reglerande lagar vilket lett till att djurvälstånd blivit en central dimension.

En vedertagen definition av djurvälstånd bygger på formuleringen om de fem friheterna av brittiska Farm Animal Welfare Council 1992 (Brown & Smiler 2012). Dessa inkluderar frihet från hunger och törst, frihet från obehag, frihet från smärta, skada och sjukdom, frihet att utföra normalt beteende samt frihet från rädsla och stress. Konceptet togs ursprungligen fram i syfte att adressera problem kring användandet av djur inom jordbruket men tillämpas idag ofta även i försöksdjursområden. På samma tema används ofta även begreppet "human hantering" (Tannenbaum 1995). Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 2011) beskriver detta som att behandling av försöksdjur ska ske i enlighet med höga etiska och vetenskapliga standarder (National Research Council, 2011). I Sverige finns djurförsöksetiska nämnder vars uppgift består av att väga nytta av djurförsök mot dess påverkan på djurvälstånden (Jordbruksverket 2021b). Inför samtliga planerade djurförsök krävs att nämnden utför en omfattande etisk prövning och ger sitt godkännande.

Enligt svensk definition inbegriper termen ”försöksdjur” samtliga djur som föds upp för eller används i djurförsök (Djurskyddslag, SFS 2018:1192). Benämningen bibehålls så länge som djuret hålls kvar på vederbörande anläggning. Djur som används i undervisning och i samband med det ej befaras riskera lidande inräknas inte.

I termen ”djurförsök” ingår användning av djur inom områdena grundforskning och tillämpad forskning, sjukdomsdiagnostik, framställning och produktion av farmaceutiska och kemiska produkter inklusive livsmedel, undervisning förknippat med lidande samt övriga verksamheter med likvärdiga ändamål (Jordbruksverket 2021b). Sammanfattningsvis är användningens syfte principiellt avgörande. Sveriges tolkning skiljer sig därmed från övriga EU där förekomst av lidande är en essentiell komponent. Förväntad fysisk-eller mental påfrestning kategoriseras efter svårighetsgrad, där den lägsta nivån beskrivs motsvara ett nålstick.

2.1.2. Statistik

De senast publicerade årliga statistiska sammanställningarna av försöksdjursanvändningen i Sverige och EU redovisar år 2018. I Jordbruksverkets rapport för Sverige ingår bland annat antal försöksdjursanvändningar enligt EU:s definition, och inkluderar både djur som används för första gången samt djur som återanvänds. Med återanvändning syftas på användande av ett redan nyttjat försöksdjur vilket i forskningssynpunkt likväl kunnat ersättas. Totalt registrerades 274 655 användningar, varav majoriteten utgjordes av husmöss (63 %), följt av zebrafiskar och övriga fiskar (16 respektive 9 %). Djurslaget kanin utgjorde <1 % (1738 stycken) (Ljung *et al.* 2020). Inom hela EU motsvarade totalantalet användningar 2 353 112, vilka också dominerades av möss (40 %), följt av råttor (20,3 %). Kaniner var till skillnad från i Sverige det tredje mest använda djurslaget (13 %) tätt följt av domesticerade fjäderfän (11,1 %) (ALURES Statistical EU Database 2020).

2.1.3. Aktuell lagstiftning och principer för 3R

Försöksdjursverksamhet är vitt utbredd globalt och regleras i allmänhet i respektive lands nationella lagstiftning (Nagarajan *et al.* 2021). Utöver det finns diverse internationella riktlinjer och inflytelserika ideella organisationer som verkar brett inom sektorn. Trots omfattande framsteg i flertal länder finns fortfarande nationer i framförallt Afrika och Mellanöstern där föreskrifter och reglerande organ för försöksdjurmedicin saknas (Vasbinder & Locke 2016; Mohr *et al.* 2017). I Sverige lyder samtlig användning av djurförsök under ett gemensamt EU direktiv samt nationella författningar där Jordbruksverket bär statligt myndighetsansvar.

I flera länders regelverk är strävan efter god djurvälstånd inom försöksdjursverksamheten en vedertagen grundläggande princip (Richmond 2010). Principen drivs

dels av moraliska och etiska skäl men är numer även starkt motiverad ur forskningssynpunkt. En förklaring är att djur som hålls under väl anpassade förhållanden löper mindre risk för tillstånd av stress, vilket annars kan ligga bakom variation hos försöksdjuren. Detta fenomen har bland annat utforskats av Verwer *et al.* (2009b), med anledning av svårtolkade resultat från en biverkningsstudie av vaccin på kaniner. Variationer i kaninernas kärntemperatur efter inokulation visades vara den främsta komplicerande faktorn och hypotiserades vara orsakad av stressframkallande hantering och andra suboptimala miljöfaktorer. Genom modifieringar inom dessa områden lyckades Verwer *et al.* demonstrera att kaniner under förhållanden som var bättre anpassade till deras naturliga behov och biologiska rytm hade normal cirkadisk kroppstemperatur. Vidare reagerade hanterade kaniner likartat med en dosrelaterad ökning i temperatur efter inokulation, till skillnad från ohanterade som uppvisade en större variation.

Tre nyckelstrategier utgör en internationellt accepterad utgångspunkt för ovan beskrivna ändamål: replace, reduce och refine (Richmond 2010). Begreppen används ofta med förkortningen 3R och motsvaras på svenska av orden begränsning, ersättning och förfining. Förkortningen instiftades 1959 av de två brittiska forskarna William Russell och Rex Burch, i en publikation med anslag från Universitetsförbundet för djurskydd, en oberoende vetenskaplig välgörenhetsorganisation (The Universities Federation for Animal Welfare u.å.). Replace, eller ersätta, innebär utbyte mot en eller flera forskningsmetoder som ej kräver användning av försöksdjur (Richmond 2010; Jordbruksverket 2021a). Reduce, eller reducera, betyder att minska antalet försöksdjur som krävs för likvärdiga eller bättre resultat. Refine, eller förfina, syftar till att minimera lidandet hos djur som används. Principerna är i olika grad befästa i respektive länders lagverk. I EU trädde 9:e november 2010 ett nytt direktiv i kraft med specifik avsikt att implementera strategierna. Bland annat ställs krav på att samtliga djurförsök på förhand måste redovisa hur djuranvändningen i fråga relaterar till respektive punkt.

2.2. Kaninen som försöksdjur

2.2.1. Bakgrund och användningsområden

Tamkaninen är ett nattaktivt bytesdjur härstammande från den europeiska vildkaninen (*Oryctolagus cuniculus*) (Lidfors *et al.* 2007; Varga & Harcourt-Brown 2014). Domesticering tros ha inletts av franska munkar kring år 500 e.Kr, vilket lett till framavling av flertal olika raser (Lidfors *et al.* 2007). Beteendet från vildkaninen har däremot inte utvecklats i någon avsevärd utsträckning vilket är viktigt att beakta vid till exempel hantering (Hawkins *et al.* 2008). Från att ursprungligen fötts upp för köttproduktion och handel av hud och päls har kaninen även blivit

populär som sällskapsdjur och för jakt (Nagarajan *et al.* 2021). Bidragande faktorer till att den också blivit efterfrågad inom forskning inkluderar den relativt stora kroppsmassan, stora blodvolymen, långa livsspannet och ett immunsystem liknande människans. Kaninens följsamma natur och enkla skötsel är ytterligare anledningar (Burkholder *et al.* 2012). Rasen New Zealand White (NZW) selekterades för snabb tillväxt och föddes fram för köttproduktion och pälshandel (Lidfors *et al.* 2007), men har även blivit en vanlig ras inom djurförsök. Områden där kaninen blivit en särskilt attraktiv djurmodell innefattar bland annat polyklonal antikroppsproduktion och studier om ateroskleros, ögonsjukdomar, infektionssjukdomar, ortopedi samt neoplasmer (Lidfors *et al.* 2007; Burkholder *et al.* 2012).

2.2.2. Beteendemässiga tecken på rädsla och stress

I likhet med andra små bytesdjur är kaninens initiala reaktion vid uppfattad fara att frysa sina rörelser för att undvika detektion (Mcbride 2017). Om hotet kommer närmre utlöses ett flyktbeteende. I samband med faran kan kaninen stampa med baktassarna i syfte att varna andra artfränder (Lidfors *et al.* 2007). I händelse av att kaninen tillfångatas kan den antingen strida i försvar eller som en sista utväg, inträda ett tillstånd av tonisk immobilitet (Humphreys & Ruxton 2018). Strategin kan verka förebyggande av ytterligare attack, allt medan kaninen förblir högst alert och uppmärksam på möjliga flyktvägar (Mcbride 2017). Till skillnad från andra fysiologiska flyktmekanismer kännetecknas den toniska immobiliteten av en depression av cirkulatoriska parametrar (Giannico *et al.* 2014). Tillståndet är reversibelt men kan persistera upp till timmar trots att kaninen undkommit (Humphreys & Ruxton 2018). Om initialt flyktförsök misslyckas kan kaninen även frambringa ett högt skrik vilket kan åstadkomma rovdjuret att ta avstånd (Lidfors *et al.* 2007).

Kronisk stress kan associeras med flertal beteendeförändringar (Gunn & Morton 1995). Karakteristiskt ses en ökad frekvens av särskilda beteenden medan andra minskar. Generellt kan en reduktion av beteendernas komplexitet och variation förekomma. Beteenden vars utförande kan minska inkluderar reproduktionsbeteende och utforskande beteende. Till beteenden som kan förstärkas räknas vaksamhet, skyddssökande, onormala beteenden samt beteenden förknippade med rädsla, så som lättskrämthet och tendens att frysa (Morgan & Tromborg 2006).

2.2.3. Negativa välfärdsaspekter och onormala beteenden

Suboptimala inhysningsförhållanden kan ge upphov till flera onormala beteenden (Mcbride 2017). Stereotypier så som gallerbitning, grävande i burgolvet och inaktivitet är några av de mest påfallande exemplen. Beteendena beskrivs vara uttryck för frustration, ångest och tristess till följd av inskränkt möjlighet till naturliga

beteenden. Symtomens fortskridande kan relateras till kemiska förändringar i hjärnan och dölja tillståndens allvarlighet.

Negativa miljöaspekter kan också manifesteras i passivitet, överdriven eller nedsatt aptit, stört sexuellt beteenden, samt onormal putsning (Mcbride 2017). Passivitet kan leda till onormal hållning, stört rörelsemönster samt försvagning av skelettet. Överdriven putsning kan ge upphov till bildande av hårbollar som kan bidra till ileus, medan nedsatt putsning kan påverka pälskvaliteten. Tristess kan yttras i hukande hållning, slöhet och matt blick. Liten burstorlek, smal aktivitetsyta, och brist på berikning är potentiella bakomliggande orsaker. Även social isolering kan ge negativ påverkan och fysiska symtom på stress. Miljöfaktorer så som temperatur, ljud och ljus kan också orsaka stress då ej anpassade korrekt för djurslaget.

Eftersom mänsklig kontakt upplevs hotfullt för bytesdjur utgör såväl hantering som mänsklig närvaro sannolikt också källor till stress hos kaniner i laboratoriemiljö (Pongrácz & Altbäcker 1999; Balcombe *et al.* 2004; Mullan & Main 2007; Mcbride 2017). Både experimentella procedurer och rutinmässiga skötselåtgärder så som burstädning, förflyttning, eller vägning har identifierats som stressutlösande moment i flera studier genom inverkan på såväl beteendemässiga som fysiologiska variabler (Pongrácz & Altbäcker 1999; Balcombe *et al.* 2004).

2.2.4. Hantering under experimentella procedurer och aktuella provtagningstekniker

Grundläggande principer

Med hänsyn till kaninens lättskrämnda natur bör all hantering ske med varsamhet (Brewer 2006). Personalen bör ha god kännedom om kaninens reaktioner på skrämmande ljud och hantering (Lidfors *et al.* 2007). En god förhållningsregel i förebyggande av stress och skadeuppkomst är praktiserande av ett mjukt, lugnt och självsäkert handlag (Pekow 2012). Bäst effekt har interaktion förenlig med kaninens naturliga beteende (Hawkins *et al.* 2008). Eftersom kaninen kan särskilja människor från varandra (Davis & Gibson 2000) kan hantering av bekanta personer associerade med positiva upplevelser lindra stress och stimulera intresse. Positiva interaktioner kan involvera smekning och belöningar med aptitliga foder (Hawkins *et al.* 2008; Swennes *et al.* 2011). Goda förutsättningar skapas också genom att gradvis vänja djuren med aktuella fixerings- och provtagningsmetoder (Burkholder *et al.* 2012). Anestetika och sederande läkemedel kan underlätta ytterligare och efter smärtsamma ingrepp bör analgetika administreras. Personal bör uppmärksammas på när en viss metod inte är framgångsrik och anpassa strategin därefter. Till exempel genom hjälp från ytterligare personal eller byte av teknik. För beskrivning

av tekniker avseende lyft, bärande och fixering hänvisas läsaren till Ersbring (2021).

Blodprovstagning

Blodprovsanalys är ofta en nödvändig diagnostik i forskningssammanhang (Parasuraman *et al.* 2010). Volym och provtagningsfrekvens baseras generellt på provtagningsens syfte och djurets totala blodvolym (Morton *et al.* 1993). I regel kan upp till 1 % av kroppsvikten, motsvarande 10 % av blodvolymen, tas ut med två veckors intervall utan risk för följd effekter av blodförlust (McGuill & Rowan 1989; Morton *et al.* 1993; Diehl *et al.* 2001). Blod kan erhållas från vener, artärer och via hjärtstick (Pekow 2012). Tekniken och strategin som används bör i enlighet med 3R ta hänsyn till både analysen i fråga samt vilken metod som åsamkar minst stress (Morton *et al.* 1993).

Hos kanin är de rekommenderade platserna för upprepad provtagning *vena auricularis marginalis*, *arteria auricularis centralis* och *vena jugularis* (Diehl *et al.* 2001). Örats kärl är lättillgängliga och används oftast i praktiken (Massányi *et al.* 2020). Det är också den minst invasiva blodtagningstekniken (National Centre for the Replacement Refinement & Reduction of Animals in Research 2021). Både ven och artär löper ytligt på den dorsala sidan. Upp till åtta prover med maximalt 0.5–10 ml per dygn kan samlas (National Centre for the Replacement Refinement & Reduction of Animals in Research 2021). För större blodvolym används med fördel artären men medför däremot ökad risk för blödning och hematom. I förebyggande syfte rekommenderas därför tryck mot insticksstället i minst 2 minuter efter provtagning. Upprepad kontroll bör utföras efter 5 och 10 minuter (Diehl *et al.* 2001).

Vid provtagning från örats kärl kan antingen en 19-23 G nål av butterfly-modell (National Centre for the Replacement Refinement & Reduction of Animals in Research 2021) eller kateter med förlängningsslang och spruta användas (Pekow 2012). För arteriellt prov kan en 22 G dubbelögdad nål för uppsamling i vakuumrör nyttjas (Pekow 2012). Borttagning av päls utförs ofta för att underlätta visualisering av kärlet, men finns enligt vissa inget behov för. Om klippmaskin är opraktisk kan icke toxiskt hårborttagningsmedel, till exempel Veet®, användas. Rakning med hjälp av skalpellblad avråds på grund av avskalning av hudens epidermal lager (Morton *et al.* 1993). Ett alternativ till borttagning är att separera pälsen med hjälp av topikal anestesi eller glidslem. Innan provtagning tvättas området därefter med varm antiseptisk lösning och torkas (Pekow 2012). Blod tas från distala delen av kärlet bort från öronbasen. Vid upprepade stick kan nålen föras mot öronbasens riktning och höger- och vänster sidas öra alterneras mellan (National Centre for the Replacement Refinement & Reduction of Animals in Research 2021). Vid sticket förs nålen i kranial riktning i en nästintill parallell vinkel med örat. Under venös

provtagning kan öronbasen med fördel stasas inför sticket. Cirka en halv nåslängd förs in i kärlet (0,5 cm). När önskvärd blodmängd erhållits uppnås homeostas genom ett lätt tryck över kärlet med kompress (Pekow 2012).

Förfining av provtagingsproceduren kan åstadkommas genom bland annat topikal administration av lokalanestetika vid planerat stickställe (Meredith 2015). För detta syfte används ofta EMLA-kräm, vilken appliceras på huden 45–60 minuter innan provtagning. Huden kan med fördel även värmas upp försiktigt inför provtagningen för att frambringa vasodilatation, till exempel genom att varsamt stryka huden (National Centre for the Replacement Refinement & Reduction of Animals in Research 2021). Vasodilatation kan också åstadkommas med hjälp av ett neuroleptikum som även ger avslappnande effekt (Pekow 2012). Slutligen är adekvat fixering, god belysning och väl tillämpad aseptik tre viktiga faktorer för att skapa goda förutsättningar.

2.3. Stressmekanismer och analysmetoder för stress hos kaniner

2.3.1. Definition och fysiologi bakom stress

Definition av stress

Stress kan beskrivas som den sammanlagda effekten av yttre och inre faktorer vilka ger upphov till rubbning av homeostasen (Pekow 2005). Förändringen utlöser en adaptiv respons innefattande fysiologiska, mentala eller beteendemässiga reaktioner i strävan efter normalisering av påverkade funktioner. När anpassningsmekanismerna inte räcker till utvecklas ett aversivt tillstånd. Biologiska underhållsfunktioner som tillväxt, immunförsvar och reproduktionsförmåga nedprioriteras och onormala beteenden och sjukdomsrisken ökar (Pekow 2005; Fink 2016). Beskrivningen baseras på den ursprungliga biomedicinska definitionen av stress formulerad av fysiologen Hans Selye (von Holst 1998). Selye grundade även begreppet ”stressor” vilket representerar det stressframkallande stimuli.

Fysiologiska mekanismer

Primärt bidrar fyra fysiologiska system till reaktioner i den adaptiva responsen; beteende, autonoma nervsystemet (ANS), neuroendokrina systemet samt immunförsvaret (Pekow 2005). Den akuta fasen involverar det så kallade ”Fight and Flight syndrome” med omedelbar biokemisk respons inducerad av katekolaminer (adrenalin och noradrenalin), och strax därefter glukokortikoider (Fink 2016). Katekolaminerna frisätts från binjuremärgen till följd av aktivering av det sympatoadrenala systemet (SAM), medan glukokortikoiderna frisätts från binjurebarken genom ökad

aktivitet i hypotalamiska–hypofysära–adrenokortikala (HPA) axeln. Effekterna erhålls genom hormonernas synergiska verkan och består bland annat av ökat blodglukos, förhöjda kardiovaskulära funktioner, samt ökat blodflöde till skelettmuskulaturen. Samtidigt uppstår en nedreglering av andra fysiologiska system som reproduktion, digestion och immunförsvar (Pekow 2005). Hormonella effekter uppkommer först efter några timmar. Dessa inkluderar minskade nivåer av gonadotropin frisättande hormon (GRH), luteiniserande hormon (LH), tyroideastimulerande hormon (TSH) samt follikelstimulerande hormon (FSH). Även insulin minskar med en parallell ökning av glukagon och resulterande hyperglykemi. Stiger gör också nivåer av somatostatin, prolaktin och tillväxthormon.

Kronisk stress yttrar sig oftast intermittent med större variation i fysiologiska processer. Intensitets-och tidsaspekter är några bakomliggande faktorer (Pekow 2005) men även stressorens emotionella eller fysiologiska särprägel. Mason et al (1968) kom fram till att situationer av ovisshet var den mest potenta triggern för höjning glukokortikoidkoncentrationen (Mason 1968). I sin tur var upplevelsen av kontroll mest effektiv för dess sänkning. Vid återkommande stress kan responsen också bero på om habituering eller sensitisering mot stimuli utvecklas (Pekow 2005). I de fall stressorens påverkan vidmakthålls kan hanteringsmekanismer anta en aktiv eller passiv karaktär (Henry 1986, 1992). Aktiva stressreaktioner kännetecknas av aktiv ansträngning för kontrollering av miljön, till exempel genom att strida för att försvara en hierarkisk status eller att fly från en fara. SAM aktiveras kroniskt medan aktiviteten i HPA-axeln varierar. Passiva stressreaktioner uppstår när aktiva hanteringsmekanismer inte räcker till. Tillståndet associeras med hjälplöshet, immobilitet och depressiva symtom. Till skillnad från i aktiva stressreaktioner förekommer en kraftigt ökad aktivitet i HPA, medan SAM förblir relativt oförändrat.

2.3.2. Generella principer för utvärdering av stress hos försöksdjur

Utvärdering av en stressors påverkan kan principiellt göras utifrån ett epidemiologiskt eller fysiologiskt perspektiv (von Holst 1998). Det epidemiologiska studerar framför allt samband mellan stressoren och utveckling av sjukdomar och andra dysfunktioner. Endast ett fåtal variabler väsentliga för det specifika organet eller organsystemet undersöks. Det fysiologiska perspektivet undersöker stressorens effekt på de bakomliggande fysiologiska stressmekanismerna och tillämpas i första hand inom stressforskning.

Mätbara fysiologiska och biokemiska parametrar inkluderar bland annat hjärt- och andningsfrekvens (Pekow 2005; Baias *et al.* 2012), kroppstemperatur (Olivier *et al.* 2003), glukokortikoidkoncentration (Baias *et al.* 2012) samt de sekundära stress-

markörerna totalprotein, glukos och laktat (Fazio *et al.* 2015). Olika mått på immunfunktion kan också vara användbara (Pekow 2005). Eftersom reaktion på ett stimulus är högst individuell bör flera fysiologiska variabler mätas samtidigt (von Holst 1998). En del parametrar kan analyseras utan behov av hanterings- eller fixeringsprocedurer, till exempel via telemetriska implantationsdon (Pekow 2005; Verwer *et al.* 2009b). Strategin kan förebygga att mätningen i sig utlöser en stressrespons och försvårar tolkning av data (Verwer *et al.* 2009b).

Motsvarande dilemma kan uppstå till följd av snabba skift i hormonnivåer på grund av den naturliga pulsatila frisättningen (von Holst 1998). Koncentrationer beror också på metabolismen och clearance vilka i sin tur också påverkas av stress. Av de orsakerna är det svårt att fastställa en sann basalnivå och dra slutsatser ifrån enstaka mätningar. Dygnsrytmen är också en viktig faktor att ta i beaktande, men kan kringgåas genom att till exempel göra upprepade mätningar vid konsekventa tidpunkter på dygnet.

Ett alternativ eller komplement till analys av de fysiologiska parametrarna är beteende-analys (von Holst 1998; Pekow 2005). Beteende kan bedömas utifrån totalt tillbringad tid, frekvens av eller tidpunkt för en viss aktivitet eller beteende (Pekow 2005). Analys kan genomföras via direkt observation eller filminspelning. Specifika etogram kan nyttjas som underlag för gradering (Verwer *et al.* 2009b; Trocino *et al.* 2014). Några modeller utgår från bedömning av individens prestation vid konfrontering av kända stressorer (von Holst 1998). Beteendet tolkas sedan som en representation av rädsla-eller stressnivån. Två traditionella exempel på dessa är open-field test och novel object test, vilka betraktats som generella indikatorer för kaniners rädsla i allmänhet (Irene Olivas & Arantxa Villagrà 2012; Buijs & Tuytens 2015). För att specifikt undersöka rädsla för människor används approach test och tonic immobility test (Verwer *et al.* 2009b). För beskrivning av respektive tester som inte appliceras i denna studie hänvisas läsaren till Ersbring 2021.

Resultat från beteendetester har också föreslagits kunna bero på personlighetstyp i det avseende att vissa beteenden uttrycks förhållandevis konstant över tid (Andersson *et al.* 2014). I en beteendestudie där 61 kaniner av olika kön, ras och ålder inkluderades utvecklade Andersson *et al.* denna hypotes och urskilde tre unika personlighetsdimensioner; ”mod”, ”utforskande” och ”ångest”. Effekten har även relateras till skillnader i stresshanteringsmekanismer där två primära former beskrivits (Wechsler 1995). Aktiv hantering kännetecknas av aktiva reaktioner, medan passiv hantering karakteriseras av immobilitet och undvikande beteende. Det har även demonstrerats att kön (Papaioannou *et al.* 2002) och avelsektion (Price 1984) är faktorer som kan inverka på testerna. Slutligen bör observations-inducerad påverkan alltid tas i beaktande (Pekow 2005).

2.3.3. Fysiologiska och biokemiska stressmarkörer

Kortisol

Kortisol är kaninens dominerande glukokortikoid (Hamilton & Weeks 1985; Illera *et al.* 1993; Fecteau *et al.* 2007) och representerar en av de vanligaste markörerna vid uppskattning av stress hos djur (Mormède *et al.* 2007). Hormonet produceras i binjurebarken och har påverkan på flertal system i kroppen (Fink 2016). Effekten på protein- och kolhydratmetabolismen är en central funktion, där kortisolet utövar en katabol effekt i perifera vävnader (proteolys och lipolys) respektive anabol i levern (glukoneogenes och proteinsyntes) (Mormède *et al.* 2007). Kortisol ger också upphov till reducerat upptag av glukos till cellerna varvid blodglukos och insulinsekretion ökar. Hämning av immunförsvaret är ytterligare en viktig effekt, liksom påverkan på blodtryck och andra mekanismer inducerade av katekolaminer (Doenecke & Beato 1980; Munck *et al.* 1984).

Glukokortikoidernas syntes och frisättning från binjurebarken till blodet regleras av adrenokortikotrop hormon (ACTH) (Mormède *et al.* 2007). ACTH härrör från specialiserade celler i adenyhypofysen. Framställningen styrs genom koordinerade effekter av neuropeptiderna kortikotropinfrisättande hormon (CRH) samt vasopressin (AVP), vilka syntetiseras av särskilda neuroner i den paraventrikulära hypotalmiska kärnan (PVN). PVN aktiveras i sin tur på signaler från flertal andra system och tar bland annat emot information om metabolismen och dygnsrytmen (från andra hypotalmiska kärnor), perifera nervsignaler (via hjänstammen), blodplasmakomposition (från subfornikala organet) samt emotionell status (från limbiska systemet). Homeostas styrs genom feedbackreglering genom kortisolet.

Hos kanin följer dygnskoncentrationen naturligt en cirkadisk rytm med lägst koncentration kring 06.00 (4400 pg/mL) och högst mellan 12:00-18:00 (9200 pg/mL) (Szeto *et al.* 2004). Koncentrationer upp till över 25 000 pg/ml har däremot kunnat mätas med signifikant samband till social stress (Szeto *et al.* 2004) samt 14 600 pg/mL i relation värmestress (de la Fuente *et al.* 2007). Eftersom HPA axelns aktivitet är känslig för en mängd olika stimuli kan fluktuationer däremot ske även utan relation till psykologisk stress eller dygnsrytmen (Mormède *et al.* 2007). Genetiska förutsättningar, ålder och fysiologisk status, liksom externa faktorer inklusive foderintag, temperatur och fuktighet är några exempel på potentiellt påverkande faktorer.

I en översiktsartikel avseende HPA axelns funktion som ett verktyg för utvärdering av djurvälstånd av Mormède *et al.* (2007) har djurslag och relativ basalnivå identifierats som primära faktorer för kortisolsvarets omfattning snarare än stressorens styrka (Mormède *et al.* 2007). I stället hävdas responsen av ACTH kunna vara en känsligare markör baserat på resultat från dos-respons studier utförda på människor

(Oelkers *et al.* 1988), grisar (Zhang *et al.* 1990) och kalvar (Veissier *et al.* 1999), genom experimentella injektioner med ökande koncentrationer CRH. Av den orsaken kan simultan analys av ACTH ge bättre underlag för uppskattning av stressorens intensitet.

På grund av HPA axelns organisation betraktas frisättningen av glukokortikoider vara en långsam process (Mormède *et al.* 2007). Följt exponering för en stressor kan en höjning i blodet först detekteras efter ett fåtal minuter och analyseras av den orsaken traditionellt med åtminstone 10 minuters latens. Reaktionen brukar sedan vara synlig i upp till omkring en timme efteråt. Vid kronisk stress sjunker normalt värdet också så småningom, trots att stressorens effekt vidmakthålls. Vidare kan upprepade exponeringar för en viss stressor successivt öka HPA axelns följaktiga svar på det specifika stimulit i fråga.

Kortisolmolekylen är identisk hos alla djurarter och nivåer kan bestämmas från plasma, serum, urin, feces och saliv (von Holst 1998). Analys av plasma är den vanligaste metoden vid skattning av djurvälstånd (Mormède *et al.* 2007), kräver små blodvolymmer och är en säker, relativt enkel metod (von Holst 1998). Vid de andra mätmetoderna analyseras exkretionen av kortisol vilket gör att metabolismen av hormonet måste beaktas. Dessutom försvåras tolkningen av de respektive sekretionernas variabla volymer. Detta gäller dock inte halten i saliv som är oberoende av salivproduktionen och hos de flesta arter korresponderar väl med hemokoncentrationen. Andra fördelar är metodens icke-invasiva karaktär samt att den är selektiv för den biologiskt relevanta icke-proteinbundna fraktionen (Riad-Fahmy *et al.* 1982; Vining *et al.* 1983; Wade 1991). Metoden har demonstrerats vara tillämpbar för även små däggdjur i en studie med marsvin (Fenske 1996).

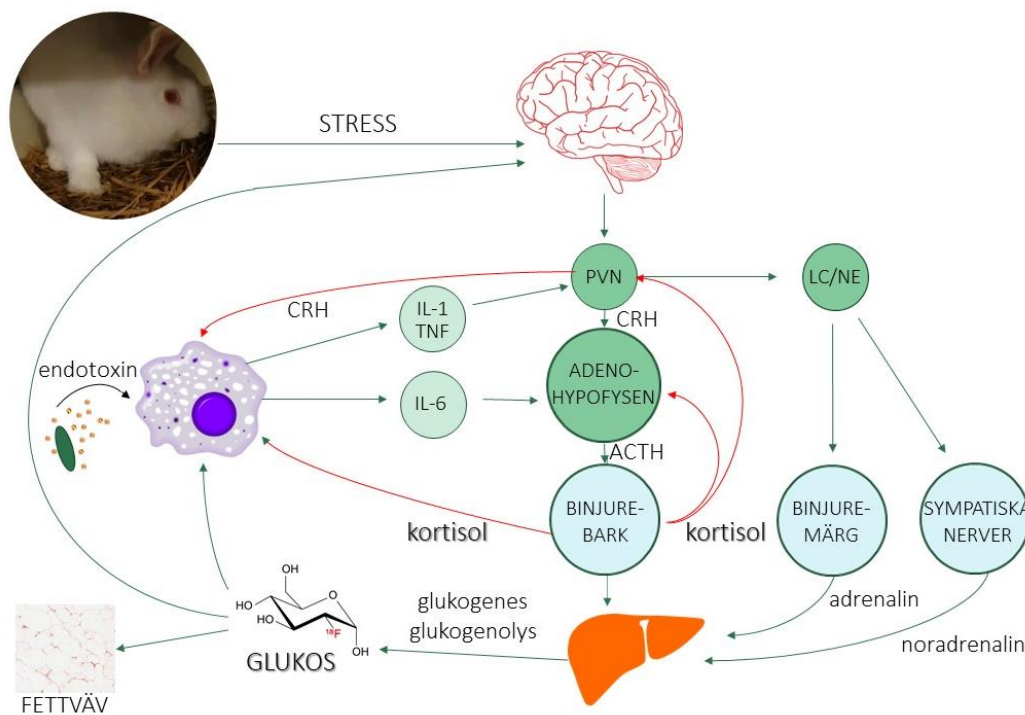
Glukos

Hemokoncentrationen av glukos påverkas av flera samverkande faktorer. Bland annat spelar fodermängd och fodertyp i digestionskanalen, glukoneogenes, glykogenolys och perifert utnyttjande av glukos en viktig roll (Lasson 2004).

Metabolismen av glukos regleras främst av pankreashormonerna insulin och glukagon, katekolaminer och glukokortikoider (Bentley 1998). Hos kaniner skiljer sig metabolismen från andra smådjur. Detta beror dels på det dagskontinuerliga födointaget, dels på grund av deras utnyttjande av flyktiga fettsyror som en primär energikälla genom cecotrofi (Melillo 2007). Det är demonstrerat att en kanin som fastas kan upprätthålla glukosnivåer i upp till fyra dagar enbart genom denna mekanism (Kozma *et al.* 1974).

Vid exponering för externa stressorer sker stegring a blodglukos under påverkan av glukokortikoider och katekolaminer (Fink 2016) (se figur 1). Interna stressorer så

som endotoxiner kan i sin tur utlösa stress via proinflammatoriska cytokiner där framförallt IL-6, IL-1 och TNF spelar stoll roll (Marik & Bellomo 2013). Glukokortikoider orsakar uppreglering av glukoneogenesen och minskar perifer förbrukning av glukos. Katekolaminer ger i sin tur ökning av glukagon och glykogenolys medan insulinsekretion hämmas. Syftet är att mobilisera snabba resurser. Effekten har studerats hos flertal djurarter (Balcombe *et al.* 2004) och hos kaniner genom både experimentell injektion av ACTH (Drouhault *et al.*) samt som resultat av miljörelaterade stressorer (Balcombe *et al.* 2004). Bland dessa är blodprovstagning och transport två utvärderade parametrar (Heding & Anderson 1973; Knudtzon 1984; Fazio *et al.* 2015).



Figur 1. Frisättning av glukos via stressinducerade signalvägar inklusive negativ feed-back-reglering av kortisol. Glukos som inte utnyttjas i den akuta stressresponsen lagras som energi i fettvävnaden. LC/NA, Locus Corlieus/Noradrenalin sympatiska systemet. Josefin Brock von Rein.

Hyperglykemi liksom hypoglykemi är utifrån klinisk erfarenhet också vanligt hos unga anorektiska kaniner och vid kritiska sjukdomstillstånd (Paul-Murphy 2007). Förhöjt blodglukos till följd av endokrina sjukdomar är ovanligt hos djurslaget (Melillo 2007).

Referensintervallet för normal blodglukos hos kaniner faller inom intervallet 4.2-8.2 mmol/L (Gillett 1994; Campbell 2004; Jenkins 2006; Varga & Harcourt-Brown

2014). Efter intravenös glukosinjektion uppnås maxkoncentration efter ca 5 minuter och sjunker gradvis med en halveringstid på 57.5 ± 16.2 minuter (20–95 min) (Dimitrova *et al.* 2008).

I en omfattande studie som ägde rum mellan 2007–2011 mättes blodglukos hos totalt 922 kaniner i samband med klinikbesök inför normalkastration, hälsoundersökning och klinisk sjukdom (Harcourt-Brown & Harcourt-Brown 2012). Glukoskoncentrationen analyserades med hjälp av en Accu-Chek Aviva (Roche) med blod från *v. auricula marginalis*. Oberoende av kön demonstrerades en kliniskt signifikant effekt av reducerat födointag och förhöjd stressnivå. Stressnivån baserades på beteendeanalys i samband med provtagningen. Hos kliniskt friska kaniner utan tecken på stress varierade glukoskoncentrationen mellan 4.3–15 mmol/L (n=126) och hade medelvärdet 7.76 (SD 2.4). I motsvarande kategori men där 112 kaniner med tecken på stress varierade glukosvärdena mellan 4.3–18.5 mmol/L (n=238) och hade medelvärdet 8.28 mmol/L (SD 2.39).

Glukos kan snabbt och enkelt mätas med hjälp av portabla glukometrar (PGBM) (Selleri *et al.* 2014). Däremot existerar ingen variant framtagen för djurslaget kanin. Selleri *et al* utvärderade mätinstrumentets tillförlitlighet för kaniner genom test av två olika PGBM för humant respektive veterinärt bruk samt en bänkanalysator. Bänkanalysatorn använde samma analysmetod som studiens referensanalysator; en laborieteknisk automatiserad biokemisk analysator med bestämning av glukoskoncentrationen genom enzymatisk hexokinas-oxidas-reaktion. Sammantaget kom studien fram till att den humana varianten och bänkanalysatorn betryggande kan utnyttjas för djurslaget. I studier där olika märken av humana PGBM jämförts för andra husdjur har Accu-Check bedömts mest tillförlitligt (Cohen *et al.* 2009; Johnson *et al.* 2009; Dobromylskyj & Sparkes 2010).

Andningsfrekvens

Normal andningsfrekvens hos kanin är 30–60 andetag per minut (Meredith 2014). Kaniner är obligata näsandare och andningen är huvudsakligen diafragmatisk. Hos en frisk kanin är bröstutvidgningen vid inhalation knappt synlig. Under stress sker ökning av andningsfrekvens från påverkan av katekolaminer (Pekow 2005; Fink 2016). Effekten är bland annat demonstrerad hos juvenila kaniner där bedömning av andningsfrekvensen fastställdes vara en ekonomisk, icke invasiv och tillförlitlig parameter för bedömning av stressnivå (Baías *et al.* 2012).

2.3.4. Beteendetest

Approach-test

Principen för approach-test är bedömning av djurets rädsla för människan utifrån beteendet under närmande av människan. Testet har använts i flertal studier med syftet att utvärdera resultatet av hantering av kaniner (Pongrácz & Altbäcker 1999, 2003; Bilko & Altbacker 2000; Pongrácz *et al.* 2001; Csatádi *et al.* 2005, 2007; Dúcs *et al.* 2009; Verwer *et al.* 2009b; Ersbring 2021). Metoden innebär att en människa närmar sig buren och sträcker ut en hand så att den kommer inom synfält och räckhåll för kaninen, till exempel placerad på burväggen med personen stående på en armlängds avstånd. Därefter beräknas tidsdurationen fram till kaninen initierar första kontakt samt antal kontakter inom en viss tid. Kortare latens och flera kontakter indikerar minskad rädsla. Vid bedömning har i vissa fall procentuell tid spenderad i respektive uppdelad zon av buren tagits i beaktande (Ersbring 2021). Lokalisation i avdelningar under sitthyllan eller bakre burhalvan tolkades som skyddsökande eller undvikande handlingar. Snarlika experiment har utformats genom att armen sträckts in till buren till armbågen varvid kaninernas momentana reaktion bedömts utifrån etogram (Krall *et al.* 2019). Testet har också tillämpats för grupper av kaniner i gemensamma hagar genom liknande metod (Verwer *et al.* 2009b).

Det har förekommit att kaniner tar kontakt genom beröring trots att de tidigare bedömts vara rädda (Csatádi *et al.* 2005). Vid dessa tillfällen har det däremot rört sig om enstaka kontakt. I en studie erhöles motstridande resultat när ohanterade kaniner initierade kontakt tidigare än hanterade, vilket diskuterades kunde förklaras av nyfikenhet (Csatádi *et al.* 2007).

2.4. Effekt av socialisering och beskrivning av träningsprogrammet på S:t Eriks Ögonsjukhus

2.4.1. Bakgrund

Flertal studier har bevisat att systematisk exponering för människor resulterar i reducerad rädsla hos kaniner. Majoriteten har undersökt effekten hos kaniner före avvänjning (Anderson *et al.* 1972; Kersten *et al.* 1989; Jezierski & Konecka 1996; Pongrácz & Altbäcker 1999, 2003; Pongrácz *et al.* 2001; Csatádi *et al.* 2005, 2007; Pritt *et al.* 2008; Dúcs *et al.* 2009; Verwer *et al.* 2009b; Zucca *et al.* 2012) då kaninen är som mest känslig för socialisering (Pongrácz & Altbäcker 1999; Bilko & Altbacker 2000). Effekten har bidragit till enklare hantering och varit befrämjande ur ett välfärdsperspektiv. Positiv påverkan har även observerats på fysiolo-

giska parametrar så som kroppsvikt och minskad variation i kroppstemperaturer under blodprovstagning (Verwer *et al.* 2009a), samt mortalitet (Jeziarski & Konecka 1996). Oavsett utformningen av beprövade socialiseringsprotokoll har samtliga försök varit framgångsrika. Habituering, klassisk betingning och motbetingning är exempel på strategier som ingått. För en närmare beskrivning av de respektive programmen hänvisas läsaren till Ersbring 2021.

För att uppnå motsvarande resultat som vid träning av yngre kan träningsprogram för äldre kaniner kräva större omfattning (Swennes *et al.* 2011). Effekten hos denna åldersgrupp har utforskats genom olika protokoll där samtliga utfall har indikerat en motsvarig framgångspotential (Podberscek *et al.* 1991; Swennes *et al.* 2011; Öhrman 2017; Ersbring 2021). Ersbring och Öhrman belyser däremot bristen på evidens för ett effektivt ändamålsenligt träningsprogram för vuxna kaniner. Motiveringen bakom ett sådant beskrivs bland annat i Podberscek *et al.* 1991, där ökad djurvälstånd och säkrare forskningsresultat tas upp (Podberscek *et al.* 1991).

På Karolinska institutet i Stockholm bedrivs sedan flera år tillbaka ett socialiseringsprogram för vuxna kaniner med syftet att gradvis vänja kaniner vid hantering och experimentella procedurer inför medicinska försök. Personalens subjektiva upplevelse är att kaninerna efter träningen är mindre stressade och mer lätt-hanterliga. I syfte att stärka evidensen bakom effekten genomförde Ersbring 2021 en primärt deskriptiv studie av programmets utförande och resultat. Bedömningen involverade 6 hankaniner av rasen NZW i cirka 4 månaders ålder under träning i hantering och oral substansgiva. Med hjälp av värden för andningsfrekvens, beteendeanalys samt approach-test jämfördes kaninernas skattade rädsla före och efter träning, över en 12-dagarsperiod. Approach test genomfördes 30 minuter före och efter träningssessionerna. Parametrar som inkluderades i testet var tid till kontakt, antal kontakter, antal närmanden <5cm till handen samt procentuell tid spenderad i burens respektive zoner. Andningsfrekvensen beräknades under både approach-test och träning. Utifrån resultat drogs slutsatsen att kaninernas rädsla för människor reducerades. Det faktum att studien saknade kontrollgrupp gjorde däremot att andra oidentifierade men möjliga faktorer bakom den studerade effekten ej gick att utesluta. Ytterligare svagheter i studien var att träningens duration, frekvens och tidsintervall ej redovisades fullständigt vilket komplicerar programmets replikerbarhet. Begränsat antal individer i studiepopulationen samt bedömningens icke-blindade och delvis subjektiva art poängterades också. I diskussionen kring vidare forskningsområden berördes därav dessa punkter samt bland annat förslaget om invägning av ytterligare fysiologiska variabler för stress i analysen.

2.4.2. Innehåll och utförande

Träningsprogrammet på S:t Eriks karakteriseras av dess flexibilitet och enkla struktur vilket gör det lätt att implementera i flera typer av verksamheter. Ofta kan delar av träningen utföras i samband med rutinmässiga sysslor av personal med olika kompetensbakgrunder. Ytterligare en fördel är programmets formbarhet för olika sorters planerade procedurer där oral giva med substans, blodprovstagning och ögontrycksmätning ingår.

För en kortfattad träningsmanual hänvisas läsaren till en beskrivning författad av personalen på Karolinska sjukhuset i bilaga 1. För en mer utförlig beskrivning av programmet i sin helhet samt utförandet av träning inför hantering och oral substansgiva hänvisas läsaren till Ersbring 2021.

3. Material och metod

3.1. Kaninerna

I studien ingick 6st 16 veckor gamla specifikt patogenfria (SPF) kaniner av rasen NZW av hankön. Kaninerna köptes in från Charles River Laboratories i Frankrike och anlände till Sveriges lantbruksuniversitet (SLU) den 9:e september 2021, efter en ca 54 timmar lång lastbilstransport. Inför installning utfördes ID-kontroll, klinisk undersökning samt vägning. Viktmässigt varierade kaninerna mellan 2890–3551 gram.

På Charles River Laboratories inhystes kaninerna i plast-och metallburar försedda med sitthylla. Genom veckovis alternering gavs tillgång till berikning bestående av bland annat hö-block, cellulosaollar och tuggpinnar. Efter födseln förvarades kullarna med honor i särskilda burar med bolådor. Följt av avvänjning delades avkommorna upp efter storlek och antal. Så länge som ingen aggression uppstod sinsemellan bodde kaninerna gruppvis fram till att de såldes, vanligen vid 12 veckors ålder. Kaninerna hanterades inte förutom i samband med avvänjning och öronmärkning.

På SLU stallades kaninerna en och en i konventionella burar (Scanbur EC2, Scanbur, Sollentuna) tillgodoseende Jordbruksverkets utrymmeskrav (golvyta 4300 cm²) i ett grisstall på Kliniska Vetenskaper (se bild 2). Burarna var identiska med burar vid S:t Eriks Ögonsjukhus och försedda med sitthylla, autoklaverad halm och vattenflaska med nippel. De var även utrustade med var sin hängande höhäck i metall på utsidan och som berikning fanns bitpinnar i trä. Stallet gav insläpp av dagsljus genom ett centralt placerat takfönster. Temperaturen uppmättes vid ett tillfälle till 18 grader C. Kaninerna förvarades i samma burar under studiens fulla duration. Rengöring och påfyllning av halm, hö, 1 dL pelleterat helfoder (Lactamin KI special, Lantmännen, Stockholm) och vatten utfördes dagligen.



Figur 2. Kaninernas inhysning i burar på SLU.

Vid ankomst delades kaninerna in i två jämna grupper med hjälp av slantsingling. Grupp A (testgruppen) fick påbörja träningsprogrammet i förberedelse för hantering och blodprovstagning direkt efter acklimatiseringen medan Grupp B (kontrollgruppen) inte hanterades under den första perioden. I period två påbörjades träningsprogrammet för Grupp B varvid A-gruppens träning upphörde. Dock fortskred gruppens dagliga socialisering.

3.2. Socialiserings- och träningsprogrammet

3.2.1. Utgångspunkt

Socialisering och träning utgick efter manualen författad av personalen på S:t Eriks Ögonsjukhus i bilaga 1, samt beskrivningen av metoden i Ersbring 2021. Även filminspelningar från S:t Erik togs del av inför studien i syfte att efterlikna det ursprungliga genomförandet. Av praktiska skäl gjordes mindre anpassningar i antal dagar för respektive delmoment av träningen, men vilka trots det bedömdes som inom ramen för programmet i linje med dess flexibla struktur.

För tillträde till stallet passerades en hygienbarriär med skobyte och påtagning av skyddsrock och handskar. Samtlig personal hade sedan tidigare erfarenhet av djurslaget kanin och var välinformerade om studiens upplägg. Den rutinmässiga tillsynen och skötseln ägde rum två gånger dagligen; strax efter 7 på morgonen samt kring 15:00-16:00 på eftermiddagen. Dagtid hölls lampor tända och radio var på.

De primära träningstillfällena ägde rum klockan 09:00-09:30 och utfördes av studiens författare; en 30-årig kvinnlig veterinärstudent med erfarenhet av kanin som husdjur. Beroende på de dagsaktuella schemalagda momenten tog vardera kanin 2.5–5 minuter i anspråk. Den kompletterande socialiseringen utfördes av stallpersonalen i anslutning till eftermiddagens arbetsuppgifter och varade i 2–3 minuter per kanin. Samtliga sessioner inleddes med att kaninerna pratades till innan buren närmades och öppnades med lugna rörelser. Sitthyllan lyftes upp. Kaninen smektes över huvud och kinder och successivt in i träningsveckan över öron och kropp. Därefter fälldes hyllan åter ned. Ofta täcktes kaninens ögon för med handen då den ovanifrån fallande hyllan kunde verka skrämmande. I belönings syfte avslutade samtliga förmiddagspass med att höhäckar fylldes på. Även kontrollgruppen fick påfyllnad efter att testgruppens träning var avklarad.

3.2.2. Acklimatisering

Acklimatiseringsperioden varade i drygt 3 dygn. Under acklimatiseringen utsattes kaninerna ej för någon fysisk kontakt men blev talade till med lugn röst av personalen i samband med utförande av de dagliga sysslorna. Interaktionen pågick inte längre än några minuter per grupp. Under acklimatiseringen behandlades bägge grupperna lika.

3.2.3. Lyft och förflyttning

Vid lyft från buren greppades kaninens nackskinn med den icke dominanta handen med kaninens framparti vänd mot buröppningen. Den dominant hand användes för att stödja kaninens bakdel. Kaninens huvud fördes sedan in under den dominant armen och kroppen stabiliserades mot bröstkorgen. Vid förflyttning kunde den icke dominant hand vid behov behålla greppet om nackskinet. Vid tilbaksättning i buren lyftes kaninen in med bakdelen först och huvudet riktat mot öppningen innan greppet lossades. Tekniken nyttjades med avseende att förebygga skada vilket kunde befaras om kaninen gavs tillfälle att hastigt ta ansats in mot buren. Inför varje lyft och efter nedsläpp smektes kaninen lätt över huvud- och ansiktsregionen.

3.2.4. Träningen

Dag 5 (Grupp A) bestod träningen av att kaninerna klappades och talades till i 2–3 minuter per kanin. Dag 6 och 7 upprepades proceduren samt utökades med att kaninerna lyftes upp och blev burna till en intilliggande plats för vägning. Vågen stod placerad på ett undersökningsbord varpå kaninen sattes ned i en plastlåda. Dag 8 inkluderade proceduren att kaninen innan vägning sattes ned på en handduk på undersökningsbordet där den smektes i cirka 1 minut, särskilt fokus lades på beröring vid huvud och öron. Dag 9 sveptes handduken omlott över kaninen följt av hantering av öron efterliknande förfarandet vid blodprovstagning. Dag 10 och 11 spändes handduken åt och den bakre änden stoppades in under kaninen. En peang nyttjades för att säkra handdukens fäste över nacken (se bild 3). Dag 12 påbörjade träningsschemat för Grupp B medan förmiddagspassen för Grupp A upphörde. Eftermiddagens kompletterande socialiseringen fortgick däremot enligt tidigare för bägge grupperna.



Figur 3. Fixering av kanin med hjälp av inlindning i handduk under blodprovstagning.

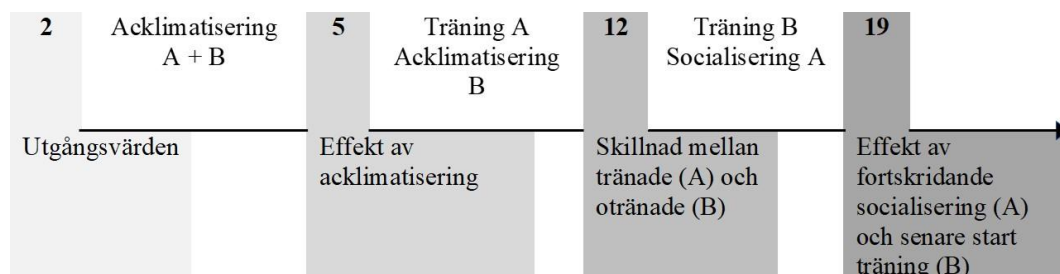
3.3. Studiedesign

3.3.1. Överblick

Följt av mottagningen dag 1 följde en aklimatiseringsperiod fram till dag 5 (se tabell 1). Tränings- och socialiseringsprogrammet ägde rum mellan dag 5 till 12 för testgruppen och dag 12 till 19 för kontrollgruppen. För testgruppen fortgick den

kompletterande socialiseringen under kontrollgruppens träningsfas. Tester genomfördes dag 2, 5, 12 samt 19, med syftet att jämföra dels effekter före och efter acklimatisering respektive före och efter träning (Grupp A+B), dels effekt av fortskridande socialisering efter träning (endast Grupp A), och dels effekt av fördröjd start av träning (endast Grupp B). Enligt ursprunglig planering hade de första testerna genomförts redan dag 1 men senarelades till dagen därpå eftersom kaninernas transport till SLU blivit gravt försenad. Efter studiens fullföljande ingick kaninerna i en farmakokinetisk forskningsstudie avseende plasmahalter efter subkutan och intravenös administration av fentanyl. Resultaten från farmakokinetiken redovisas ej i denna rapport.

Tabell 1. Tidslinje över studiens delmoment och frågeställningar i dagar efter ankomst.



3.3.2. Dokumentation av träningsprogrammet

Med några få undantag spelades träningsessionerna in med mobilkamera på ett kamerastativ. Stativet placerades på förmarkerade ytor och manövrerades med försiktighet för att inte skrämna kaninerna. Vid några tillfällen togs även foton. Efter varje tillfälle dokumenterades utförda sysslor samt allmänna eller specifika observationer. För inspelning och fotografering användes en Samsung Galaxy Smartphone (Samsung, Seoul).

3.3.3. Andningsfrekvens

Andningsfrekvensen beräknades manuellt under samtliga approach-tester samt under träningsessionerna dag 2, 5, 12 och 19.

3.3.4. Blodprovstagning

Blodprovstagning genomfördes dag 12 och 19 då respektive grupp genomgick träningsprogrammet. Samtliga kaniner provtogs bägge tillfällena i syfte att utvärdera träningseffekten genom analys av glukos och kortisol. Ca 45 minuter före planerad provtagning smörjdes ett tunt lager EMLA-kräm på båda öronens *v. auricularis marginalis* samt *a. auricularis centralis*. Provtagningen utfördes sedan med kaninen fixerad i handduk som i träningsprogrammet.

Blodprov togs från *v. auricularis marginalis* eller *a. auricularis centralis*. Vid behov klipptes pälsen inför sticket med hjälp av en klippmaskin. Huden rengjordes med klorhexidinlösning och örat värmdes med handen för att åstadkomma vasodilatation. Om nödvändigt snärtades artären med fingrarna för att öka vasodilatationen ytterligare. Inför venöst prov stasades venen proximalt nära öronbasen. För stick nyttjades främst en nål med 0,8 mm diameter vilken klippts av till cirka 3 cm längd för att förebygga koagulation till följd av lågt tryck och långsamt blodflöde. Uppsamlingen skedde genom att blodet fick flöda fritt ned i provröret (1,3 mL EDTA-rör). Följt av nålens avlägsnade applicerades tryck med kompress under minst 1 minut för ven och ca 2,5 minuter för artär. När blödningen hade upphört klistrades en bit kirurgisk tejp fast på huden. Efter att kaninen åter placerats i buren kontrollerades blödningstendens under ca 5 minuter.

Totalt samlades blod vid 3 tidpunkter per dag och kanin; vid 0, 30 samt 120 minuter efter den första fixeringen och förberedelsen. Prover togs alternerande mellan höger och vänster öra. Proceduren journalfördes löpande med inkludering av tid, glukosvärden samt generella observationer.

3.3.5. Blodglukos

Blodglukosen mättes med hjälp av en PBGM för humanbruk av märket Accu-Chek® Aviva. Analysen påbörjades i regel direkt efter blodsvar erhållits innan blodprovsvärdet började fyllas.

3.3.6. Plasmakortisol

Inför bestämning av plasmakortisol centrifugerades och alikvoterades proverna, samt förvarades i -80°C. För analys nyttjades ett validerat kommersiellt icke-djurslagsspecifikt ELISA kit (DetectX® Cortisol Enzyme Immunoassay Kit (Arbor Assays, Michigan) för kvantitativ skattning av totalkoncentrationen.

3.3.7. Approach-test

Tillvägagångssättet för approach-testet utgick från den modifierade metoden i Ersbring 2021 och genomfördes dag 2, 5, 12 och 19. Turordningen vilken grupperna testades i varierade mellan dagarna; Grupp B testades först dag 2, 5 och 19, medan Grupp A var först dag 12. Dag 12 tränades och testades Grupp A innan blodprovstagningen medan Grupp B tränades och testades efter. Dag 19 tränades Grupp B och testades bägge grupperna innan blodprovstagningen. Resterande testtillfällen ägde rum i samband med förmiddagssessionens träning. Filmningen utfördes för att möjliggöra blindad utvärdering, vilket gjordes av författaren och författarens handledare. Medelvärdet av poängsättningen användes för analys.

Dag 2 testades bägge grupperna i syfte att bedöma kaninernas rädsla för människor före acklimatisering och träning. Dag 5 repeterades proceduren för utvärdering av påverkan av acklimatiseringen. Dag 12 och 19 utfördes testerna för att utvärdera effekten av träning samt utforska skillnader mellan grupperna. Från och med att grupperna inlett träningen fick dessa genomgå testet två gånger, 15–20 minuter innan och 15–20 minuter efter träningsessionerna. Avsikten var att utvärdera effekter i nära anslutning till träningen.

Testet påbörjades genom att testledaren försiktigt öppnade buren och ställde sig på 0.5 meters avstånd. Därefter placerades handen halvvägs in över burens främre kant så att den var inom syn-och räckhåll från burens samtliga vinklar. Inom loppet av 60 sekunder registrerades sedan ”tid till första kontakt”, ”antal kontakter” och ”närmanden till <5 cm från handen”. Kontakt innebar att kaninen berörde människans hand med nosen och om kontakt uteblev noterades ”tid till första kontakt” som 60 sekunder.

Liksom i Ersbring 2021 beräknades även kaninens lokalisation i buren under testet genom uppdelning av ytan i fyra olika zoner (se figur 4) och registrering av durationen inom respektive avdelning. Faktorn inkluderades med avseende på att vistelse i burens bakre halva kunde indikera skyddsökande respektive undvikande beteende.

Zon A Burens bakre halva Under sithyllan	Zon B Burens bakre halva Utanför sithyllan
Zon C Burens främre halva Under sithyllan	Zon D Burens främre halva Utanför sithyllan

Figur 4. Burens zonindelning.

3.3.8. Subjektiv beteendeanalys

Även en subjektiv beteendeanalys utfördes i samband med approach-testet och utgjorde den sista bedömningsparametern. Med hjälp av dubbla kameror kunde kaninen filmas även på nära håll för senare blindad utvärdering. Beteendet poängsattes utifrån siffror om 0–3 där stigande värde representerade minskad rädsla (se tabell 2).

Tabell 2. Skattning av kaninbeteenden.

0	1	2	3
Orörlig och rädd	Avvaktande	Nyfiken men rädd	Nyfiken och orädd eller ointresserad och avslappnad

3.4. Databearbetning

För att utröna skillnader mellan gruppernas resultat nyttjades InVivoStat (<https://invivostat.co.uk/>) för statistiska beräkningar. Grafer gjordes i Excel och InVivoStat. Mann-Whitney test tillämpades för jämförelse mellan grupper vid varje tidpunkt för kortisol och beteende. För jämförelser inom grupperna över tid användes Friedmans test, dag 12 och 19 var för sig. Glukosvärdena jämfördes mellan grupperna dag 12 och 19 var för sig med repeated measures ANOVA med grupp och tid som faktor. Inom grupperna användes ANOVA med tid och dag som faktor och namn som blockande faktor. Som gräns för signifikans sattes $p < 0,05$.

4. Resultat

4.1. Andningsfrekvens

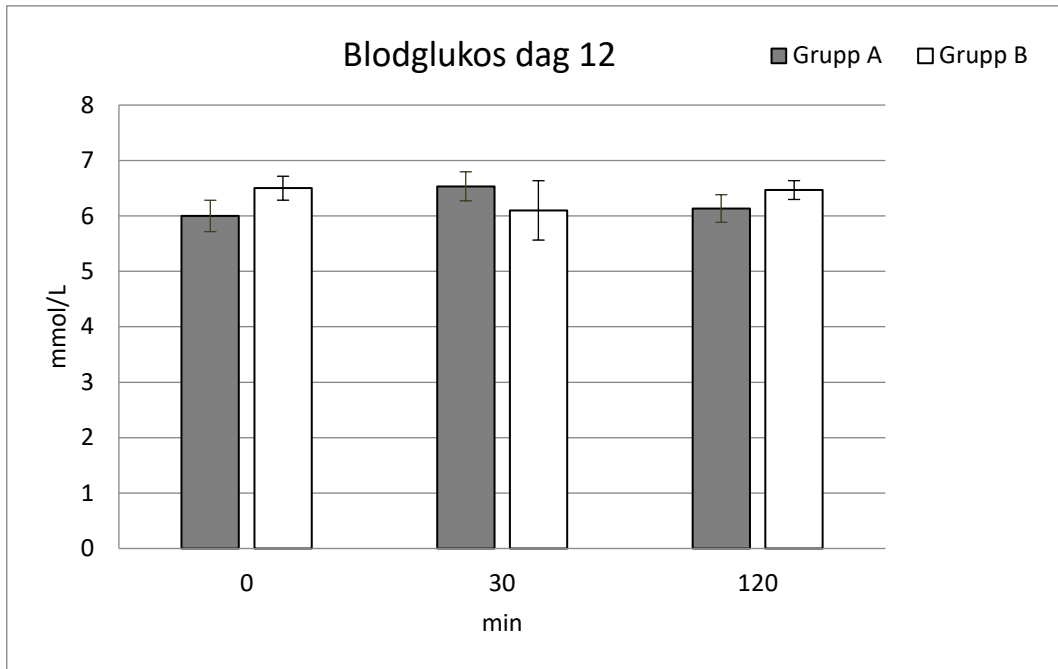
På grund av svårighet med manuell bedömning av andningsfrekvensen erhöles under studiens gång ej tillräckligt många värden för analys. Komplicerande faktorer för parameterens uppskattning var att kaninerna andades mycket snabbt eller oregelbundet, förflyttade sig med snabba rörelser, eller andades med knappt skönjbara bröstutvidgningar.

4.2. Blodprovstagning

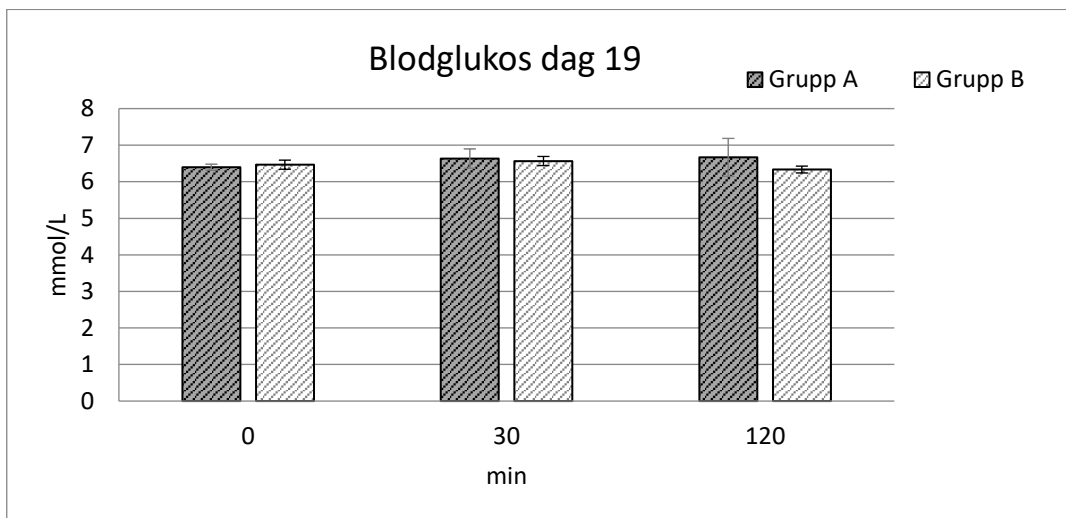
Inför det första provtagningstillfället applicerades EMLA enligt beskriven metod. Därefter observerades ett flertal kaniner sporadiskt upptagna med putsning av öronen och krämen. Hantering, förflyttning samt fixering i handduk accepterades av samtliga kaniner och förlöpte lugnt. Från de två första kaninerna samlades venöst blod. Blodsvar erhöles vid sticken och ingen smärtreaktion från kaninerna iaktogs. Dock var flödena från kärnen mycket långsamt och blodet koagulerade innan provrören var fullständigt fyllda och kärnen fick punkteras på nytt. För att kunna samla blod snabbare beslutades att byta strategi till artärstick, vilket tillämpades vid resterande provtagningar. De flesta kaninerna reagerade inte vid provtagning tid 0 och 30 min, medan flera reagerade på provtagning vid 120 min med att rycka till.

4.3. Blodglukos

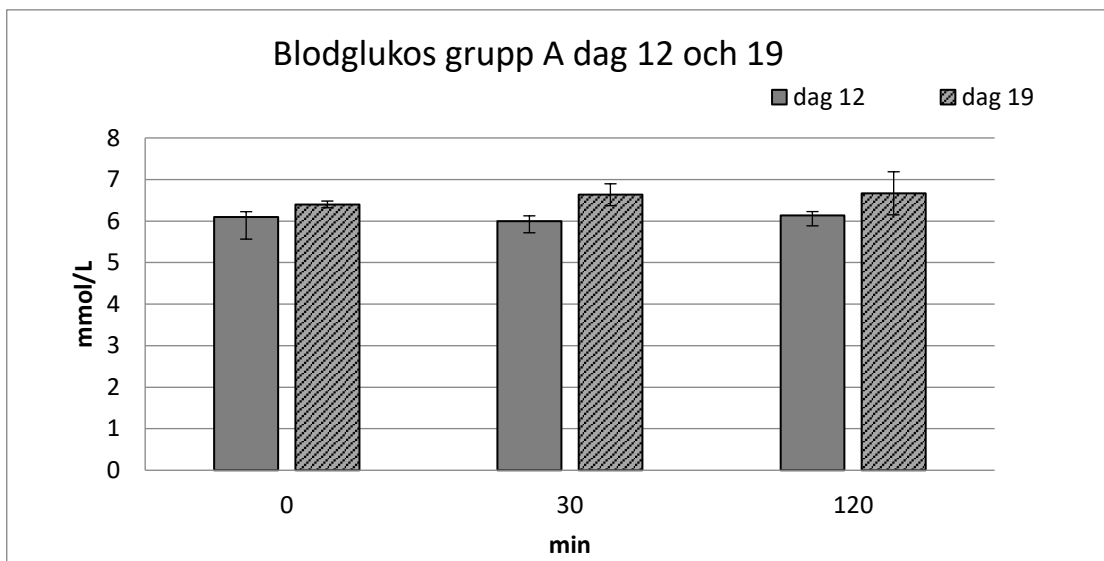
Vare sig dag 12 eller 19 fanns någon signifikant effekt av grupp eller tidpunkt, och ingen interaktion mellan faktorerna, och någon tendens till skillnader (se figur 5–8). I Grupp A fanns en signifikant effekt av dag; medelvärdet var högre dag 19 ($6,6 \pm 0,4$ mmol/L) än dag 12 ($6,1 \pm 0,4$ mmol/L, $p=0.03$, parat t-test).



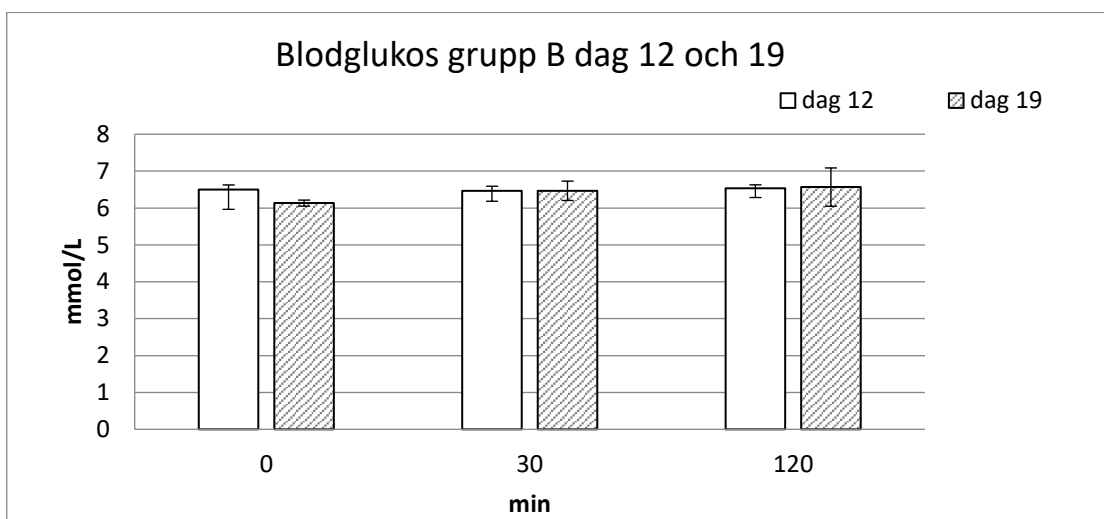
Figur 5. Blodglukos dag 12. Data utgörs av medel \pm SD. Grupp A hade genomgått socialisering och träning i en vecka medan Grupp B var kontroll. Grupperna skiljde sig inte åt vid någon tidpunkt och det var ingen skillnad mellan tiderna i någon grupp. Dag 12: effekt av grupp: $p=0,21$; effekt av tid: $0,68$, interaktion: $p=0,94$. Repeated measures ANOVA.



Figur 6. Blodglukos dag 19. Data utgörs av medel \pm SD. Bägge grupper hade genomgått en veckas socialisering och träning och Grupp A dessutom ytterligare en veckas socialisering. Grupperna skiljde sig inte åt vid någon tidpunkt och det var ingen skillnad mellan tiderna i någon grupp. Dag 19: effekt av grupp: $p=0,32$; effekt av tid: $p=0,72$; interaktion; $p=0,62$. Repeated measures ANOVA.



Figur 7. Blodglukos Grupp A dag 12 och 19. Data utgörs av medel \pm SD. Signifikant effekt av dag: $p=0,02$ men inte av tid: $p=0,77$ och ingen interaktion ($p=0,72$). ANOVA med tid och dag som faktorer och namn som blockfaktor.

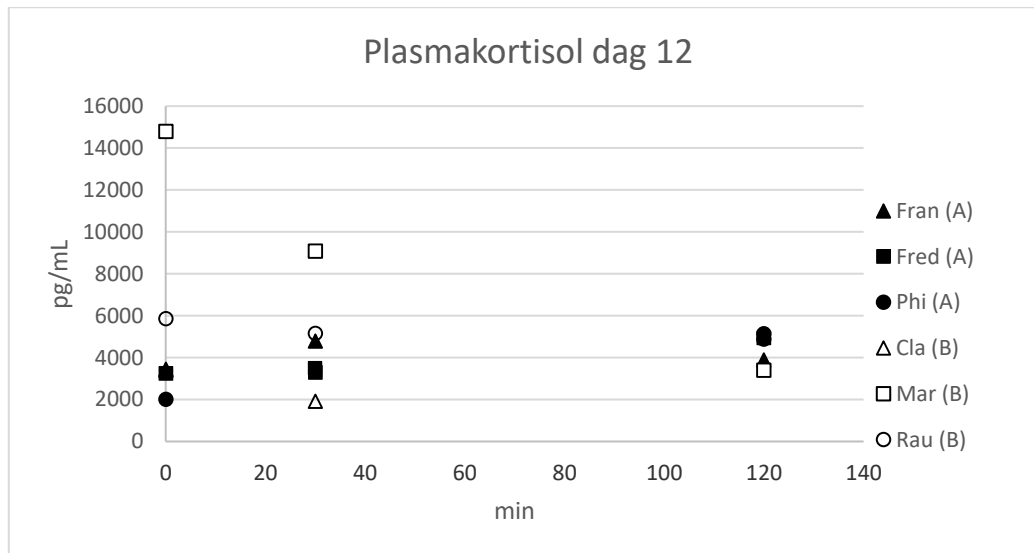


Figur 8. Blodglukos Grupp B dag 12 och 19. Data utgörs av medel \pm SD. Ingen effekt av dag: $p=0,064$, tid: $p=0,77$, och ingen interaktion ($p=0,45$). ANOVA med tid och dag som faktorer och namn som blockfaktor.

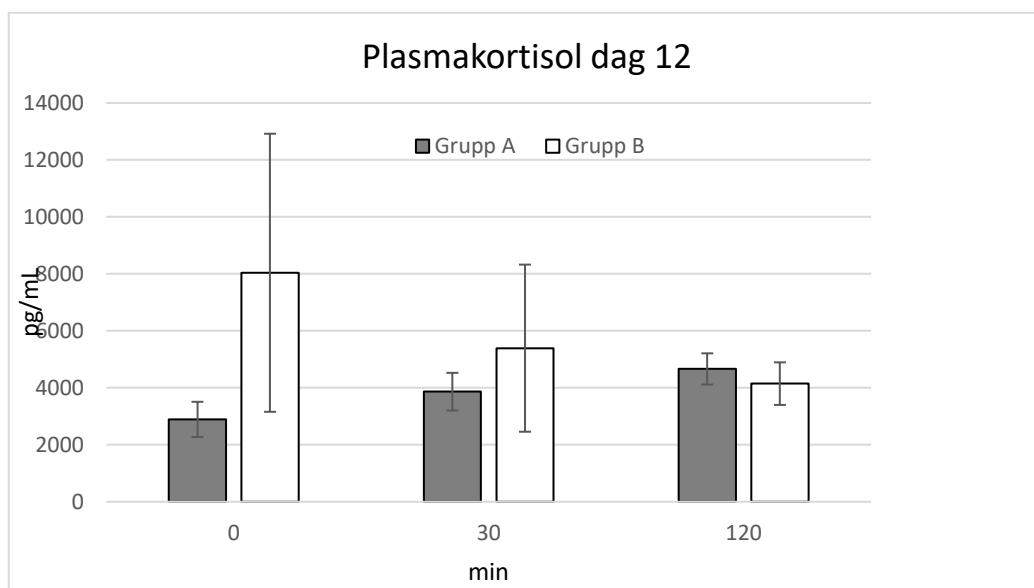
4.4. Plasmakortisol

Liksom för blodglukos sågs ingen signifikant skillnad för kortisol mellan Grupp A och B dag 12 eller dag 19, eller någon tendens till skillnad (se figur 9–12). Något samband mellan tid och koncentration kunde heller fastställas. Dock erhöles inga data från B-gruppens 30 min-prov dag 19 på grund av ett analytiskt fel.

Dag 12 sågs mindre variation hos Grupp A och en stigande trend i koncentrationerna över tid. Grupp B uppvisade i sin tur större variation vid de två första tidpunkterna och en nedåtgående trend. Bland 0-proven uppmättes ett avvikande högt värde från kaninen Marcel.

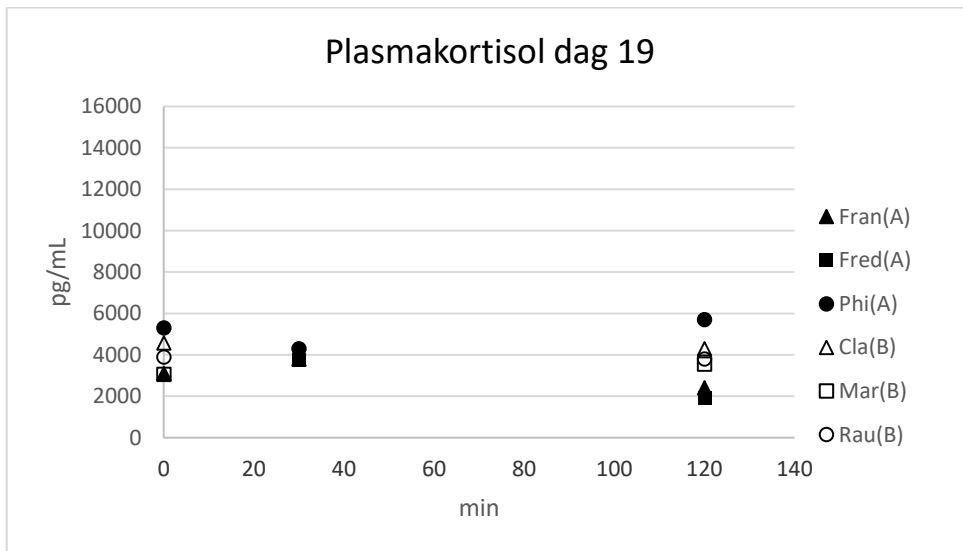


Figur 9. Individuella plasmakortisolvärden dag 12.

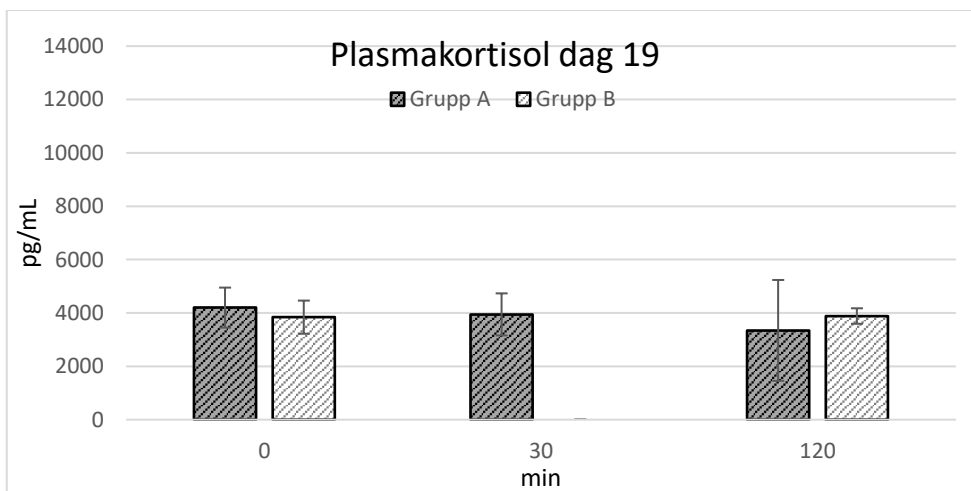


Figur 10. Plasmakortisol dag 12. Data utgörs av medel \pm SD. Skillnad mellan grupper; tidpunkt 0: $p=0,1$; tidpunkt 30: $p=0,7$; tidpunkt 120: $p=0,4$ (Mann-Whitney test). Grupp A över tid: $p=0,097$ (Friedmans test). Grupp B över tid: $p=0,11$ (ANOVA med rank transformation av data, tid som faktor och namn som blockfaktor).

Dag 19 detekterades större variation hos Grupp A och en svagt fallande trend i koncentrationerna över tid. Eftersom data för B-gruppen 30-prov ej kunde fastslås var trend över tid inte möjlig att analysera.

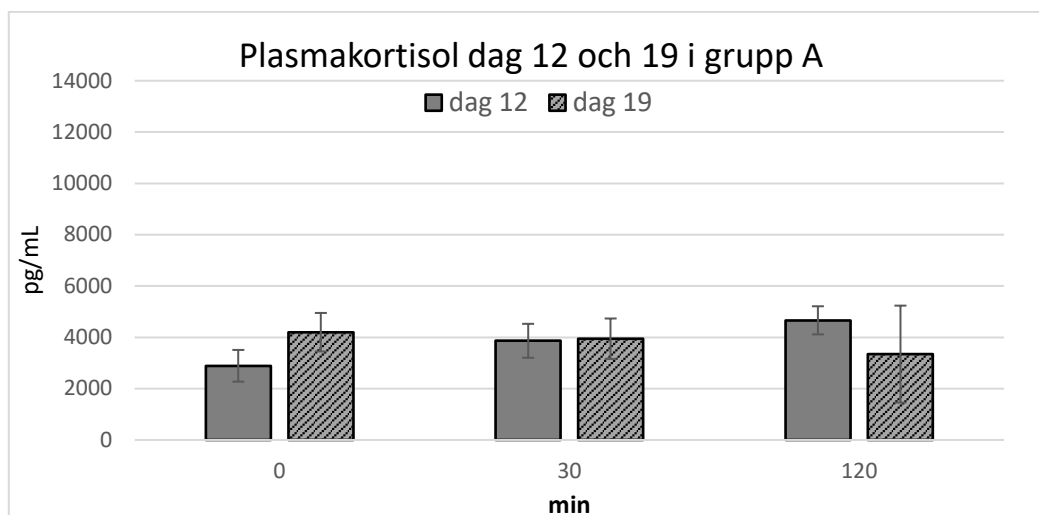


Figur 11. Individuella plasmakortisolvärden dag 19.

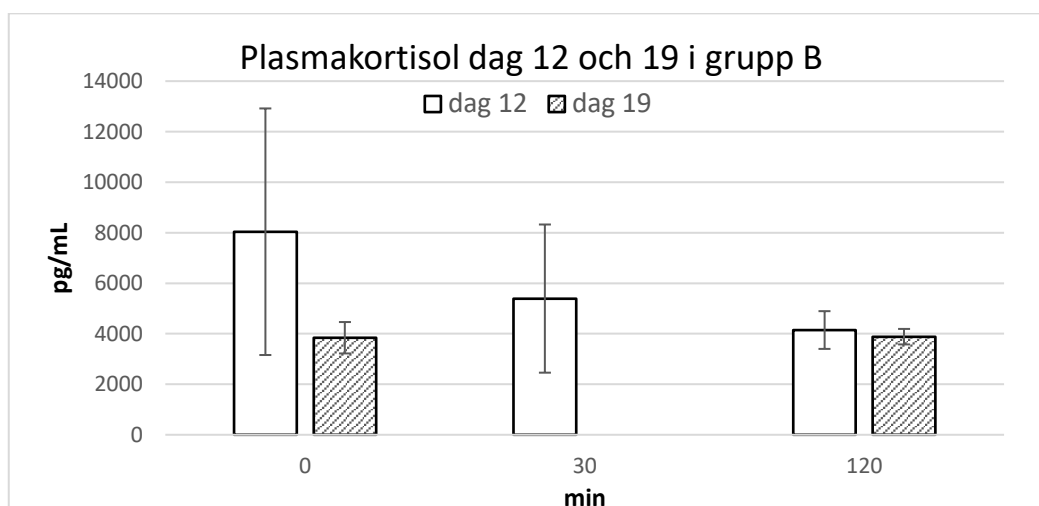


Figur 12. Plasmakortisol dag 19. Data utgörs av medel \pm SD. Skillnad mellan grupper; tidpunkt 0: $p=0,8$; tidpunkt 120: $p=0,7$ (Mann-Whitney test). Grupp A över tid: $p=0,65$ (Friedmans test). Grupp B över tid: $p=0,56$ (ANOVA med rank transformation av data, tid som faktor och namn som blockfaktor).

Inga skillnader förelåg i någon grupp vid någon tidpunkt, någon dag. Fig. 13 och 14 visar halterna per grupp och tid.



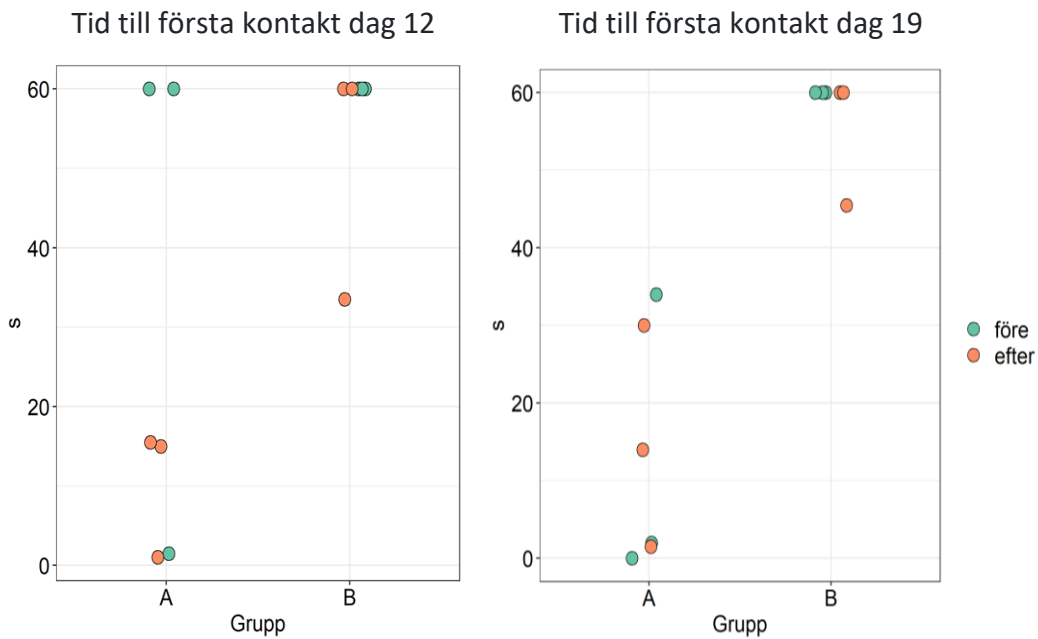
Figur 13. Plasmakortisol dag 12 och 16 i Grupp A. Data utgörs av medel \pm SD. Skillnad mellan dagar; tidpunkt 0: en datapunkt fattas; tidpunkt 30: $p=0,56$; tidpunkt 120: $p=0,56$.



Figur 14. Plasmakortisol dag 12 och 19 i Grupp B. Data utgörs av medel \pm SD. Skillnad mellan dagar för tidpunkt 0: $p=0,56$; tidpunkt 30: inga data dag 19, tidpunkt 120: en datapunkt saknas.

4.5. Approach-test

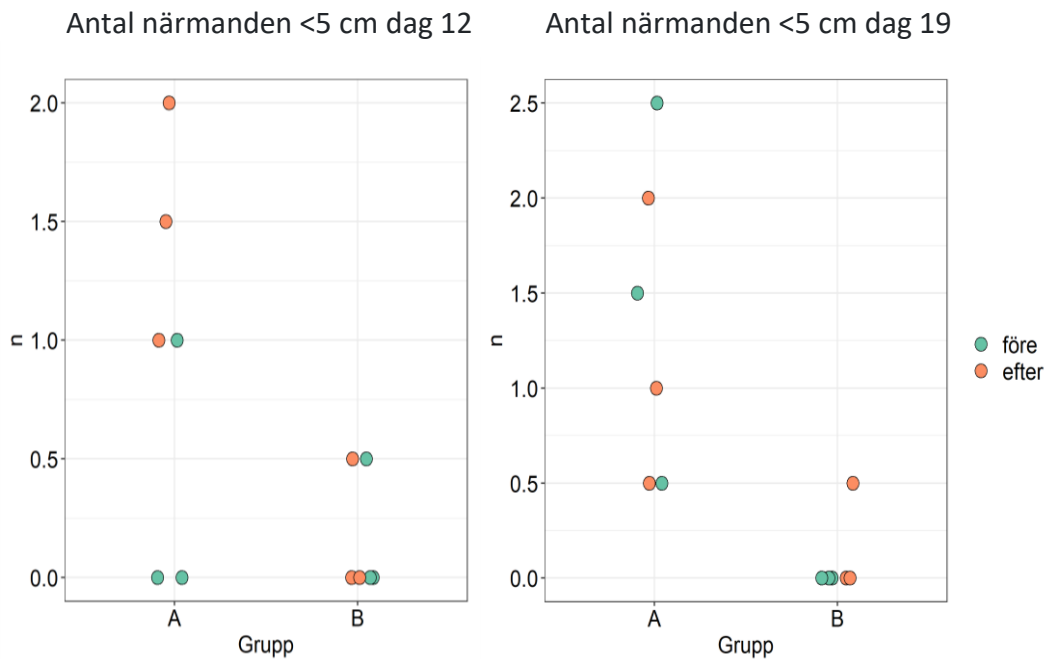
Sammantaget förekom ingen statistisk signifikant skillnad inom de olika testparametrarna mellan grupperna. Dock sågs trender då Grupp A hade totalt kortare tid till första kontakt, fler antal kontakter och antal närmanden <5 cm från handen samt mer spenderad tid i burens främre zoner samt utanför sitthyllan än Grupp B under samtliga testtillfällen efter aklimatiseringen. På motsvarande sätt demonstrerade i allmänhet bägge grupperna mindre rädsla under approach-testen efter träning i jämförelse med före.



Figur 15. Tid till första kontakt under approach-test dag 12 och 19. Data utgörs av medelvärden av två blindade personers poäng. Dag 12: $p=0,5$ och $0,076$ före resp. efter träning mellan grupperna. Dag 19: $p=0,06$ och $0,08$ före resp. efter träning mellan grupperna. Mann-Whitney test.

4.5.3. Antal närmanden <5 cm från handen

Redan före acklimatisering dag 2 gjordes ett närmande <5 cm från handen av en enstaka kanin i Grupp A (Frédéric). Första träningsdagen (d 5) gjordes efter träning ytterligare ett närmande från samma kanin. Dag 12 gjorde alla kaniner i Grupp A närmanden efter träningen (se figur 17). I Grupp B gjorde endast en kanin (Marcel) närmande före och efter träning dag 12. Dag 19 gjorde alla kaniner i Grupp A närmanden både före och efter träning, medan endast en kanin i Grupp B (Claude) närmade sig.

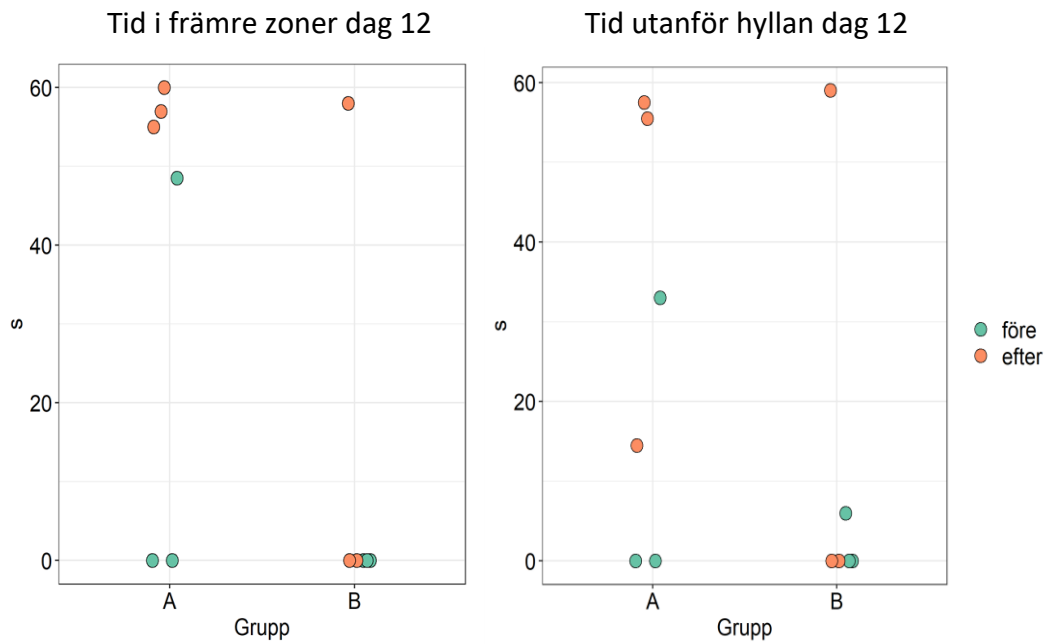


Figur 16. Antal närmanden <5 cm från handen under approach-test dag 12 och 19. Data utgörs av medelvärden av två blindade personers poäng. Dag 12: $p=1$ och $0,076$, före resp. efter träning mellan grupperna. Dag 19: $p=0,06$ och $0,07$ före resp. efter träning mellan grupperna. Mann-Whitney test.

4.5.4. Lokalisation i buren

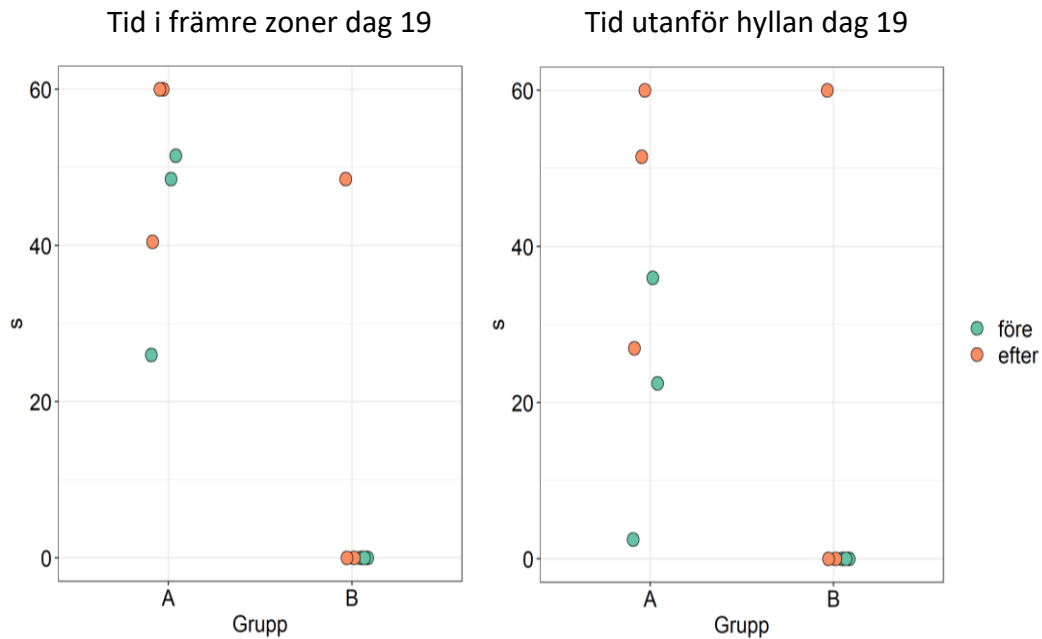
Tid spenderad i burens zoner följde i allmänhet samma mönster som resultaten från approach-testen. Alla kaniner i Grupp A spenderade tid i burens främre zoner respektive utanför hyllan dag 19 före och efter träning medan endast en kanin i grupp B var i de främre zonerna respektive utanför hyllan dag 19, efter träning.

Under testet dag 2 befann sig samtliga kaniner under sitthyllan i burens bakre del. Dag 5 spenderade Philippe (Grupp A) 5s utanför sitthyllan innan träning respektive 32s totalt i burens främre del samt utanför sitthyllan efter träning. Övriga kaniner i Grupp A och alla i B-gruppen var kvar i zon A. Dag 12 vistades Philippe totalt >30s i burens främre delar och utanför sitthyllan innan träning (se figur 18). Alla kaniner i A-gruppen spenderade >50s i burens främre och >10s utanför hyllan efter träning. En tendens i ökning sågs efter träning mellan dag 5 och 12 i Grupp A ($p=0,08$, Friedmans rank sum test). I Grupp B vistades en kanin 6s utanför hyllan innan träning och >55s i de främre delarna och utanför hyllan efter träning dag 12.



Figur 17. Tid i burens främre zoner och utanför hyllan dag 12. Data utgörs av medelvärden av två blindade personers poäng. Tid i främre zoner: $p=0,51$ före och $p=0,31$ efter träning mellan Grupp A och B. Tid utanför hyllan: $p=1$ och $0,66$ före resp. efter träning mellan grupperna. Mann-Whitney test.

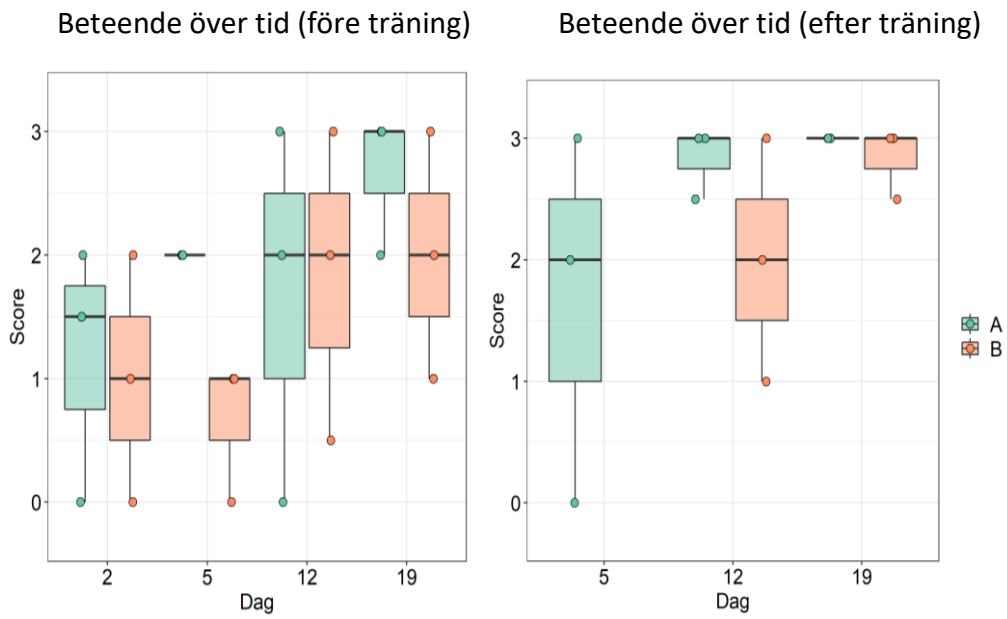
Dag 19 var alla kaniner i Grupp A i burens främre delar och utanför hyllan, både före och efter träning (se figur 19). En tendens till ökning sågs mellan dag 12 och 19 för tid spenderad utanför hyllan ($p=0,08$, Friedman rank sum test). Grupp B demonstrerade inte motsvarande effekt av sin fullföljda träningsvecka. I stället vistades ingen kanin i de främre zonerna eller utanför hyllan innan träning och endast en kanin efter träning.



Figur 18. Tid i burens främre zoner och utanför hyllan dag 19. Data utgörs av medelvärden av två blindade personers poäng. Tid utanför hyllan: $p=0,06$ och $0,5$ före resp. efter träning mellan grupperna. Mann-Whitney test.

4.6. Subjektiv beteendeanalys

Gruppernas beteende över tid följde en mer likartad trend då bägge två i ett parallellt mönster erhöll höge score (=minskad rädsla) under studiens gång (se figur 20). En skillnad förelåg mellan dag 2 och dag 19 före träning för alla kaniner sammantaget ($p=0,03$, Friedman rank sum test). Generellt var poängen högre i testen efter träningssessionerna. Ett observandum var att Grupp A innan träning dag 5 uppvisade större effekt av aklimatiseringen med ett högre score än grupp B, trots dittills likvärdig behandling ($p=0,059$).



Figur 19. Resultat av subjektiv beteendeanalys under approach-test (före resp. efter träning) under studiens fulla duration. Ingen skillnad mellan grupperna förelåg någon av dagarna. Skillnad mellan dag 2 och dag 19 för samtliga kaniner: $p=0,03$, Friedman rank sum test.

5. Diskussion

Denna studie hade för avsikt att utvärdera effekten av ett socialiserings- och träningsprogram som utvecklats och används på S:t Eriks Ögonsjukhus i Stockholm. Två grupper om tre kaniner fick genomgå protokollet efter varandra och utvärderas vid flera tillfällen under studiens gång genom dels mätning av blodglukos och plasmakortisol, dels blindad subjektiv beteendeanalys inklusive approach-tester. Inga signifikanta effekter detekterades på de fysiologiska parametrarna, dock sågs en tendens till skillnad mellan tränade och otränade kaniner i approach-testen. Tendensen kvarstod efter två veckor, då bägge grupper genomgått träning. Även inom grupperna observerades effekt av träning varav tydligast i Grupp A, i likhet med resultaten i Ersbring 2021. P.g.a. ekonomiska skäl kunde grupperna inte vara större, vilket gav en låg statistisk power. Studien är att betrakta som en pilot.

5.1. Utförande av socialisering och träningen

Träningens strategi byggde till stor del på habituering men kan ha förstärkts av klassisk betingning genom påfyllnaden av hö efter träning. Även träningen i sig kan ha upplevts som positiv. Kaninernas varierande intresse för hö och kel och därmed effekt av dem berodde sannolikt på individuella preferenser. Ur stallpersonalens och författarens subjektiva perspektiv var träningen och socialiseringen okomplicerad att verkställa. Vidare upplevdes det som ett trevligt moment och ett tillfälle att knyta an till kaninerna och lära känna deras särskilda personligheter.

5.2. Effekt av träningsprogrammet

5.2.1. Omedelbara effekter

Generellt visade bägge grupperna minskade tecken på rädsla under testen efter träning i jämförelse med innan, vilket också samstämmer med fynden i Ersbring 2021. Skillnaden i beteendescore innan och efter träning detekterades först dag 12

medan antal kontakter, antal närmanden <5 cm från handen samt lokalisation i burens främre delar samt utanför sitthyllan förändrades redan efter första tränings-tillfället (d 5). Skillnaden dag 5 kan representera att kaninerna redan efter en kort period av interaktion med människor blir mindre rädda vilket även Ersbring 2021 hypotiserar. Till skillnad från Ersbring 2021 demonstrerades däremot störst skillnad mellan innan och efter träningen vid testgruppens sista träningsdag (d 12) och inte vid den första. Diskrepansen strider mot teorin att träningen har flera omedelbara effekter i början, men kan inte motbevisa antagandet med anledning av det låga antalet djur. Orsaker bakom skillnaden skulle kunna vara att kaninerna i Ersbrings studie testades under träningsprogrammets andra dag och inte den första som i den föreliggande studien, att beteende analyserades utifrån ett annorlunda etogram, eller att kaninernas olika bakgrunder eller personligheter påverkade. Även den som utför testen kan ha betydelse för resultatet. Oavsett tyder bägge studier på att träning snabbt leder till mindre rädsla och ökat lugn vilket skulle kunna motivera ett protokoll där kaniner hanteras genom socialisering i buren enligt beskriven metod kort inpå start av försök.

5.2.2. Effekter efter programmets fullföljande

De största tendenserna till skillnad mellan grupperna påvisades under approach-testen medan resultaten av blodglukos, plasmakortisol och subjektiv beteendeanalys inte visade någon effekt av programmet. En förklaring till att blodglukos inte visade effekt av träning skulle kunna vara att träningsmomenten avsedda för blodprovstagningen inte var tillräckligt effektiva eller skulle behöva utföras med ökad frekvens och/eller under längre tid. Andra skäl kan vara att acklimatisering har motsvarande effekt som träning, eller att blodglukosen inte påverkas av någotdera. Teoretiskt kan även provtagningarnas olika duration spelat roll för kaninernas stress och blodglukos och således dolt eventuella effekter av träning. Slutligen kan variation i foderintag också ha påverkat analysen. Dock var spridningen i blodglukos låg, vilket gör det senare mindre troligt. Kaniners blodsockernivåer är normalt ganska stabila över dygnet (Varga & Harcourt-Brown 2014). I jämförelse med referensintervallet för blodglukos hos kaniner av varierande ras, kön och ålder (4.2–8.2 mmol/L) (Gillett 1994; Campbell 2004; Jenkins 2006; Varga & Harcourt-Brown 2014) befann sig värdena inom det högre spannet men fortfarande inom normalvariation.

Upprepad blodprovstagning från *v. auricularis marginalis* hos kaniner har resulterat i signifikant hyperglykemi med stigningar mellan 24-120 % enligt en översiktsstudie (Balcombe *et al.* 2004), vars data baserats på studier där kaniner agerat egna kontroller. Dock var de högsta koncentrationerna (~8.5–9.3 mmol/L) baserade på 24-timmars fastande vilket gör det osäkert att direkt dra paralleller till denna

studies resultat. I en annan studie där blodglukos analyserades från 10 kaniner genom arteriell provtagning från örat vid 0, 10, 30, 60, 120 minuter samt 24 timmar låg koncentrationerna vid 0, 30 och 120 på 4.3 ± 1.1 , 5.7 ± 0.7 respektive 4.4 ± 1.2 mmol/L (Illera *et al.* 2000). Dessa kaniner hade också fastats, men i 12 timmar. Möjligen är det av den anledningen bättre att jämföra resultaten i den föreliggande studien med resultaten från studien av Harcourt-Brown. I studien erhöles medelvärdet 7.76 mmol/L (SD 2.4) för blodglukos hos kliniskt friska kaniner utan tecken på stress under provtagning medan det hos kaniner med tecken på stress uppgick till 8.28 mmol/L (SD=2.39). Faktum att både dessa värden är högre än medelvärdet i den föreliggande studien skulle kunna tyda att både test-och kontrollgruppen av olika skäl inte upplevde motsvarande stressnivåer.

Att plasmakortisol inte heller uppvisade några tydliga skillnader mellan tränade och otränade skulle kunna ha samma förklaring som för blodglukos. Studiens två högsta uppmätta plasmakortisolkoncentrationer vid 0-provtagningen (Marcel: 14 800 pg/mL respektive Raul: 5860 pg/mL) gav indikation på att provtagningens duration och/eller komplikationsgrad var en väsentlig faktor då dessa erhöles från studiens längsta provtagningar (ca 20 minuter respektive 15 minuter) och krävde två stick vardera. Alternativt kan tidsfaktorn allena orsakat de högre koncentrationerna eftersom koncentrationerna för de andra kaninerna efter 15–20 min var okända. Dock var koncentrationen avsevärt högre än övriga även vid 30 min för Marcel, vilket talar mot att tidsfaktorn skulle vara det avgörande.

I relation till koncentrationerna i Szeto *et al.* 2004 där hormonets naturliga cirkadiska rytmen fastslogs (4400–9200 pg/mL) låg en dryg majoritet av den föreliggande studiens värden i det lägre spannet eller under. Värdena kan betraktas relativt jämförbara då studiepopulationen i Szeto *et al* också bestod av hankaniner i åldrarna 4.5–5 månader varav 6 av rasen NZW och 6 av Watanabe Heritable Hyperlipidemic (WHHL). Vidare inhystes dessa kaniner också i individuella burar med liknande ljus och temperatur i stallet samt utfodrades en pelleterad diet. Huruvida kaninerna genomgått någon form av tillvänjning eller socialisering framgår inte.

Med undantag från det högsta värdet från Marcel låg värdena därmed inte heller i närheten av koncentrationerna vilka påvisats som resultat av värmestress och social stress (14 600 pg/mL respektive 25 000 pg/mL, Szeto *et al.* 2004; de la Fuente *et al.* 2007). Däremot var koncentrationerna högre i förhållande till resultaten i Illera *et al.* (2000) där förutom blodglukos även plasmakortisol analyserades hos honkaniner i okända åldrar av rasen NZW. I den studien fick samtliga 10 kaniner ospecificerad hantering i en vecka inför provtagningen och var fastade 12 timmar, vilket resulterade i 0-, 30-och 120 minuters koncentrationer 1840 ± 280 pg/mL, 2120 ± 340 pg/mL respektive 1660 ± 210 pg/mL. Slutligen kan resultaten jämföras med en

studie där 29 kastrerade hon- och hankaniner av olika raser i åldrarna 1–6 år ingick och inhystes i burar individuellt, i par, eller i grupp. Kaninerna var inte fastade och provtogs en enstaka gång från örats artär efter subkutan administration av acepromazinmaleat, vilket resulterade i koncentrationer om 7280 ± 400 pg/mL (Fecteau *et al.* 2007). Alltså var även dessa generellt högre än koncentrationerna uppmätta i den föreliggande studien.

Sammanfattningsvis var studiens plasmakortisolkoncentrationer relativt låga i förhållande till referenslitteraturen vilket kan representera en lägre stressnivå hos kaninerna. En annan teori är att provtagnings-schemat inte lyckades fånga upp högre koncentrationer vilka hade kunnat detekteras med tätare provtagningsintervall eller andra tidpunkter. Vidare hade det varit intressant att erhålla värden innan socialisering och träning påbörjades, men vilket hade kunnat påverka träningens avsiktliga effekt. Slutligen väckte studiens plasmakortisolkoncentrationer frågan kring dess eventuella samband med duration av fixering vilket hade varit intressant att undersöka.

Approach-testen gav till skillnad från övriga analyser indikation på programmets effekter. En tendens till skillnader mellan grupperna ($p=0,076$) sågs vid jämförelser av antal kontakter, tid till första kontakt samt antal närmanden <5 cm från handen efter träning dag 12. Dag 19 var tendensen till skillnad mellan grupperna i stället störst före träningen och nästintill signifikant ($p=0,06$). I Grupp A förekom även tendens till skillnad vid jämförelse av vistelse i främre delen av buren dag 5 och 12 ($p=0,08$). I Ersbring 2021 jämfördes resultat från approach-testen endast för samma kaniner innan och efter programmets fullföljande vilket visade signifikanta skillnader i antal kontakter och spenderad tid i burens främre del. Med lika stora grupper (6 kaniner) hade sannolikt även denna studie kunnat åstadkomma statistiskt säkra resultat.

Avseende den subjektiva beteendeanalysen sågs en signifikant ökning av poängen hos alla kaniner sammantagna mellan dag 2 och 19, däremot ingen tydlig skillnad mellan grupperna vid de olika testtillfällena. En nästan signifikant skillnad sågs dag 5 mellan grupperna, före träning av Grupp A ($p=0,059$). Detta tyder på att kaninerna i Grupp A skilde sig redan från start. Bristen på skillnad mellan grupperna efter socialisering och träning kan ha berott på att etogrammet inte var tillräckligt nyanserat, eller att det var för få djur. Det kan även inneburit att kaninerna från bägge grupperna var lika orädda och avslappnade under approach-testen, men för Grupp B generellt från platsen i trygghet under sitthyllan och med mindre kontakt med handen än Grupp A.

5.2.3. Bibehållna effekter av träningsprogrammet vid fortskridande socialisering

Utifrån den subjektiva beteendeanalysen och approach-testet minskade generellt A-gruppens rädsla ytterligare efter perioden med kompletterande socialisering. Resultaten kan indikera att en veckas träning är tillräcklig för att starta en positiv utveckling tillsammans med uppföljande socialisering för att minska kaninens rädsla för människan. I fråga om blodglukos steg dock medelvärdet något för Grupp A, vilket därmed inte följde samma trend. Inte heller i plasmakortisol detekterades någon generell minskning. Förutom de tänkbara orsakerna bakom koncentrationsvariationerna vilka diskuteras i rubriker ovan, skulle ett annat skäl kunna vara att momenten i träningen efterliknande blodprovstagning upphörde, till skillnad från kontakt med människan vilket trots i lägre grad fortskred under socialiseringen. För att uppnå en bibehållen eller ytterligare reducerad stressnivå i samband med provtagning kan i så fall liknande aktivitet behöva upprätthållas efter en veckas träning till skillnad från försöket.

5.2.4. Effekter av fördröjd påbörjad träning

Efter B-gruppen fullföljt träningsprogrammet sågs inte lika stor effekt på kaninerna i majoriteten av testerna i jämförelse med Grupp A. Detta skulle kunna tyda på att träningseffekten är störst då den påbörjas efter en kortare acklimatiseringsfas liksom för Grupp A. Alternativt skulle det kunna bero att träningsprogrammet hade en sämre effekt på grund av blodprovstagningen före träningens start.

5.3. Felkällor

På grund av det begränsade antalet kaniner i test-och kontrollgrupp innehöll studiens resultat en ofrånkomlig grad av osäkerhet. Vidare inkluderades inga kaniner av honkön vilket försvårar resonemang gällande hela populationer och könsskillnader.

Fåtalet kaniner bidrog sannolikt också till att grupp fördelningen av särskilda personlighetsdrag kunde ha en väsentlig betydelse. I Grupp A identifierades till exempel en kanin (Philippe) med utmärkande nyfikenhet och socialt intresse och som konsekvent erhöll höga poäng i approach-testen.

Vidare kan resultaten också ha påverkats av att grupperna testades i olika turordning, vilket gav den grupp som testades sist i tur extra tid att vänja sig vid människans närvaro innan testen började.

Troligtvis kan även uppstådda variationer mellan blodprovstagningarna utgjort en faktor för testresultaten avseende plasmakortisol och blodglukos. Skillnaderna förekom dels mellan provtagningshastigheter, dels från antal stick, och dels från smärtreaktioner vid stick. Till exempel erhöles studiens i särklass högsta plasmakortisolvärde på 14 800 pg/mL från kaninen vecka 1 vars provtagning var överlägset mer tidskrävande och krävde två stick. Motsvarande prov vecka 2 från samma kanin låg på 3055 pg/mL.

Slutligen kan också urvalet av tester samt ej erhållna data påverkat studiens resultat. Däribland nyttjandet av ett icke validerat etogram för poängsättning av beteende. Metoden valdes först efter att ett beprövat etogram (Ersbring 2021 baserat på Podberscek *et al.* 1991; Chu *et al.* 2004; Krall *et al.* 2019) hade testats vilket upplevdes för komplext och inte i tillfredsställande korrelation med kaninernas stressnivå. Vidare hade andningsfrekvens varit en intressant fysiologisk parameter att ta i beräkning då den till skillnad från plasmakortisol och blodglukos inte krävde invasiv mätning. Förlusten av B-gruppens 30-minuters plasmakortisol-koncentrationsresultat hade förmodligen ingen avgörande konsekvens för studien men adderade till slutsatsens osäkerhet.

6. Konklusion

Sammantaget tyder pilotstudiens resultat på att tränings- och socialiseringsprogrammet utvecklat på S:t Eriks Ögonsjukhus har effekt på beteende, med reducerad rädsla som följd. Den observerade effekten var större då programmet inleddes efter en kort acklimatiseringsperiod och innan blodprovstagning ägde rum. Dock iaktogs ingen påverkan på de fysiologiska stressparametrarna, möjligtvis på grund av låg stress över lag, inadekvata mätintervaller, eller att acklimatisering hade samma påverkan på dessa som träning och socialisering.

Beteendebaserade resultat gav även indikation på att träning och socialisering har vissa omedelbara effekter vilket skulle kunna utnyttjas i anslutning till experimentella procedurer. Vidare sågs tecken på att en veckas daglig socialisering efter en veckas träning har kumulativ effekt, vilket kan motivera en utökad period av träning före experimentet påbörjas.

Avslutningsvis stödjer studien tidigare forskningsrön inom ämnet, men det krävs vidare studier på fler kaniner för att säkerställa resultaten.

Referenser

- ALURES Statistical EU Database (2020-08-09). *ALURES - European Commission. EU statistics database on the use of animals for scientific purposes under directive 2010/63/EU*.
https://webgate.ec.europa.eu/envdataportal/content/alures/section2_number-of-uses.html [2021-10-12]
- Anderson, C.O., Denenberg, V.H. & Zarrow, M.X. (1972). Effects of handling and social isolation upon the rabbit's behaviour. *Behaviour*, 43 (1), 165–175.
<https://doi.org/10.1163/156853973x00526>
- Andersson, A., Laikre, L. & Bergvall, U.A. (2014). Two shades of boldness: novel object and anti-predator behavior reflect different personality dimensions in domestic rabbits. *Journal of Ethology*, 32 (3), 123–136. <https://doi.org/10.1007/s10164-014-0401-9>
- Baias, A., Bodnariu, A., Nichita, I. & Cristina, R.T. (2012). Stress in laboratory juvenile rabbits: Physiological indicators. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies 1221-5287*, 45 (2), 142–145.
- Balcombe, J., Barnard, N. & Sandusky, C. (2004). Laboratory routines cause animal stress. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science / American Association for Laboratory Animal Science*, 43, 42–51.
- Bayne, K., Morris, T.H. & France, M.P. (2010). Legislation and oversight of the conduct of research using animals: A global overview. I: Hubrecht, R. & Kirkwood, J. (red.) *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals*. 8. uppl. John Wiley & Sons, Ltd, 107–123.
<https://doi.org/10.1002/9781444318777.ch8>
- Bentley, P.J. (1998). *Comparative Vertebrate Endocrinology*. 3. uppl. Cambridge: Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9780511804021>
- Bilko, A. & Altbacker, V. (2000). Regular handling early in nursing period eliminates fear response toward human beings in wild and domestic rabbits. *Developmental Psychology*, 36, 78–87. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2302\(200001\)36:1<78::AID-DEV8>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2302(200001)36:1<78::AID-DEV8>3.0.CO;2-5)
- Brewer, N.R. (2006). Biology of the rabbit. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*, 45 (1), 8–24.
- Brown, M.J. & Smiler, K.L. (2012). Chapter 1 - Ethical considerations and regulatory issues. I: Suckow, M.A., Stevens, K.A., & Wilson, R.P. (red.) *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*. Boston: Academic Press, 3–31.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380920-9.00001-8>

- Buijs, S. & Tuytens, F.A.M. (2015). Evaluating the effect of semi-group housing of rabbit does on their offspring's fearfulness: can we use the open-field test? *Applied Animal Behaviour Science*, 162, 58–66.
<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2014.11.008>
- Burkholder, T.H., Linton, G., Hoyt, R.F. & Young, R. (2012). Chapter 18 - The rabbit as an experimental model. I: Suckow, M.A., Stevens, K.A., & Wilson, R.P. (red.) *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*. Boston: Academic Press, 529–560. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380920-9.00018-3>
- Campbell, T.W. (2004). Clinical chemistry of mammals: laboratory animals and other species. I: Thrall, M.A. (red.) *Veterinary Haematology and Clinical Chemistry*. Maryland, USA: Lippincott, Williams and Wilkins, 463–478.
- Chu, L., Garner, J.P. & Mench, J.A. (2004). A behavioral comparison of New Zealand White rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) housed individually or in pairs in conventional laboratory cages. *Applied Animal Behaviour Science*, 85 (1), 121–139.
<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2003.09.011>
- Cohen, T.A., Nelson, R.W., Kass, P.H., Christopher, M.M. & Feldman, E.C. (2009). Evaluation of six portable blood glucose meters for measuring blood glucose concentration in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 235 (3), 276–280. <https://doi.org/10.2460/javma.235.3.276>
- Csatádi, K., Bilko, A. & Altbacker, V. (2007). Specificity of early handling: Are rabbit pups able to distinguish between people? *Applied Animal Behaviour Science*, 107, 322–327. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.10.013>
- Csatádi, K., Kustos, K., Eiben, C., Bilko, A. & Altbacker, V. (2005). Even minimal human contact linked to nursing reduces fear responses toward humans in rabbits. *Applied Animal Behaviour Science*, 95, 123–128.
<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2005.05.002>
- Davis, H. & Gibson, J. (2000). Can rabbits tell humans apart?: Discrimination of individual humans and its implications for animal research. *Comparative Medicine*, 50, 483–5.
- Diehl, K.H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J.M., van de Vorstenbosch, C., & European Federation of Pharmaceutical Industries Association and European Centre for the Validation of Alternative Methods (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology*, 21 (1), 15–23.
<https://doi.org/10.1002/jat.727>
- Dimitrova, S., Georgiev, I., Kanelov, I., Iliev, Y., Tanev, S. & Georgieva, T. (2008). Intravenous glucose tolerance test and glucose kinetic parameters in rabbits. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 11 (3), 161–169.
- Dobromylskyj, M.J. & Sparkes, A.H. (2010). Assessing portable blood glucose meters for clinical use in cats in the United Kingdom. *Veterinary Record*, 167 (12), 438–442.
<https://doi.org/10.1136/vr.c4260>

- Doenecke, D. & Beato, M. (1980). Metabolic effects and modes of action of glucocorticoids. I: Chester Jones, I. and Henderson, I.W. (red.). *General Comparative and Clinical Endocrinology of the Adrenal Cortex*. 1. uppl. 117–181.
- Dúcs, A., Bilkó, Á. & Altbäcker, V. (2009). Physical contact while handling is not necessary to reduce fearfulness in the rabbit. *Applied Animal Behaviour Science*, 121 (1), 51–54. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2009.07.005>
- Ersbring, L. (2021). *Socialisering och träning av kaniner i medicinsk forskning*. (Avancerad nivå, A2E) Sveriges lantbruksuniversitet. Veterinärprogrammet. <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:slu:epsilon-s-16523> [2021-09-04]
- Fazio, F., Casella, S., Giudice, E., Giannetto, C. & Piccione, G. (2015). Evaluation of secondary stress biomarkers during road transport in rabbit. *Livestock Science*, 173, 106–110. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.01.006>
- Fecteau, K.A., Deeb, B.J., Rickel, J.M., Kelch, W.J. & Oliver, J.W. (2007). Diagnostic endocrinology: blood steroid concentrations in neutered male and female rabbits. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 16 (4), 256–259. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2007.09.003>
- Fenske, M. (1996). Saliva cortisol and testosterone in the guinea pig: Measures for the endocrine function of adrenals and testes? *Steroids*, 61 (11), 647–650. [https://doi.org/10.1016/S0039-128X\(96\)00185-7](https://doi.org/10.1016/S0039-128X(96)00185-7)
- Fink, G. (2016). Stress, definitions, mechanisms, and effects outlined: Lessons from anxiety. I: Fink, G. (red.) *Stress: Concepts, Cognition, Emotion, and Behavior*. (Handbook of Stress). 1. uppl. San Diego: Academic Press, 3–11.
- de la Fuente, J., Diaz, M., Ibañez, M. & Gonzalez de Chavarri, E. (2007). Physiological response of rabbits to heat, cold, noise and mixing in the context of transport. *Animal Welfare*, 16, 41–47.
- Giannico, A.T., Lima, L., Lange, R.R., Froes, T.R. & Montiani-Ferreira, F. (2014). Proven cardiac changes during death-feigning (tonic immobility) in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Journal of Comparative Physiology A*, 200 (4), 305–310. <https://doi.org/10.1007/s00359-014-0884-4>
- Gillett, C.S. (1994). Selected drug dosages and clinical reference data. *The Biology of the Laboratory Rabbit*. 2. uppl. San Diego: Academic Press, 468–471.
- Gunn, D. & Morton, D.B. (1995). Inventory of the behaviour of New Zealand White rabbits in laboratory cages. *Applied Animal Behaviour Science*, 45 (3), 277–292. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(95\)00627-5](https://doi.org/10.1016/0168-1591(95)00627-5)
- Hamilton, G.D. & Weeks, H.P., Jr. (1985). Glucocorticoids in eastern cottontail rabbits (*Sylvilagus floridanus*). *Journal of Mammalogy*, 66 (1), 85–88. <https://doi.org/10.2307/1380959>
- Harcourt-Brown, F.M. & Harcourt-Brown, S.F. (2012). Clinical value of blood glucose measurement in pet rabbits. *Veterinary Record*, 170 (26), 674–674. <https://doi.org/10.1136/vr.100321>

- Hawkins, P., Hubrecht, R., Buckwell, A., Cubitt, S., Howard, B., Jackson, A. & Poirier, G. (2008). *Refining rabbit care: A resource for those working with rabbits in research*. The UFAW/RSPCA Rabbit Behaviour and Welfare Group.
- Heding, L.G. & Anderson, H. (1973). Increased serum immunoreactive insulin in rabbits fed a protein- and mineral-rich diet. *Diabetologia*, 9 (4), 282–286.
<https://doi.org/10.1007/BF01221855>
- Henry, J.P. (1986). Chapter 2 - Neuroendocrine patterns of emotional response. I: Plutchik, R. & Kellerman, H. (red.) *Biological Foundations of Emotion*. Academic Press, 37–60. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-558703-7.50008-5>
- Henry, J.P. (1992). Biological basis of the stress response. *Integrative Physiological and Behavioral Science*, 27 (1), 66–83. <https://doi.org/10.1007/BF02691093>
- von Holst, D. (1998). The concept of stress and its relevance for animal behavior. I: Møller, A.P., Milinski, M., & Slater, P.J.B. (red.) *Advances in the Study of Behavior*. Academic Press, 1–131. [https://doi.org/10.1016/S0065-3454\(08\)60362-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3454(08)60362-9)
- Humphreys, R.K. & Ruxton, G.D. (2018). A review of thanatosis (death feigning) as an anti-predator behaviour. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 72 (22), 2.
<https://doi.org/10.1007/s00265-017-2436-8>
- Illera, J., Gonzalez Gil, A., Silvan, G. & Illera, M. (2000). The effects of different anaesthetic treatments on the adreno-cortical functions and glucose levels in NZW rabbits. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 56, 329–36.
<https://doi.org/10.1007/BF03179801>
- Illera, J.C., Silvan, G., Portela, A., Illera, M.J., Illera, M., Garcia Alonso, L., Cornélissen, G. & Halberg, F. (1993). Circadian cortisol rhythm of rabbits kept on different lighting regimens. *Chronobiologia*, 20 (3–4), 219–232.
- Irene Olivás & Arantxa Villagrà (2012). Assessing fear in rabbits. Preliminary results. *Proceedings of 2012 IX International Livestock Environment Symposium (ILES IX)*, 2012. American Society of Agricultural and Biological Engineers.
<https://doi.org/10.13031/2013.41600>
- Jenkins, J.R. (2006). Clinical pathology. *BSAVA Manual of Rabbit Medicine and Surgery*. (BSAVA British Small Animal Veterinary Association). 2. uppl. Quedgeley, Gloucester: Blackwell Publishers, 45–51.
- Jeziarski, T.A. & Konecka, A.M. (1996). Handling and rearing results in young rabbits. *Applied Animal Behaviour Science*, 3–4 (46), 243–250.
- Johnson, B., Fry, M., Flatland, B. & Kirk, C. (2009). Comparison of a human portable blood glucose meter, veterinary portable blood glucose meter, and automated chemistry analyzer for measurement of blood glucose concentrations in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 235, 1309–13.
<https://doi.org/10.2460/javma.235.11.1309>
- Jordbruksverket (2021-08-24). *Det här är 3R*. [text].
<https://jordbruksverket.se/djur/ovriga-djur/forsoksdjur-och-djurforsok/sveriges-3r-center/det-har-ar-3r> [2021-09-17]

- Jordbruksverket (2021-09-16). *Försöksdjur*. [text]. <https://jordbruksverket.se/djur/ovriga-djur/forsoksdjur-och-djurforsok/forsoksdjur> [2021-09-17]
- Kersten, A.M.P., Meijsser, F.M. & Metz, J.H.M. (1989). Effects of early handling on later open-field behaviour in rabbits. *Applied Animal Behaviour Science*. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Effects+of+early+handling+on+later+open-field+behaviour+in+rabbits&author=Kersten%2C+A.M.P.&publication_year=1989 [2021-10-07]
- Knudtzon, J. (1984). Plasma levels of glucagon, insulin, glucose and free fatty acids in rabbits during laboratory handling procedures. *Zeitschrift für Versuchstierkunde*, 26 (3), 123–133.
- Kozma, C., Macklin, W., Cummins, L.M. & Mauer, R. (1974). Anatomy, physiology, and biochemistry of the rabbit. I: Weisbroth, S.H., Floatt, R.E., & Kraus, A.L. (red.) *Biology of the Laboratory Rabbit*. 1. uppl. New York: Academic Press, 59–64. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-11681-9> [2021-09-24]
- Krall, C., Glass, S., Dancourt, G., Adams, M., Koenig, K. & Hutchinson, E. (2019). Behavioural anxiety predisposes rabbits to intra-operative apnoea and cardiorespiratory instability. *Applied Animal Behaviour Science*, 221, 104875. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2019.104875>
- Lasson, E.D. (2004). Laboratory evaluation of the endocrine pancreas and of glucose metabolism. *Veterinary Haematology and Clinical Chemistry*. 1. uppl. Lippincott Williams & Wilkins, 431–444.
- Lidfors, L., Edström, T. & Lindberg, L. (2007a). The welfare of laboratory rabbits. I: Kaliste, E. (red.) *The Welfare of Laboratory Animals*. Dordrecht: Springer Netherlands, 211–243. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2271-5_10
- Ljung, P.E., Udén, E., Johannes Van Den Wegh, & Cecilia Bornestaf (2020). *Användning av försöksdjur i Sverige*. (5.2.17-17593/2019). Jordbruksverket.
- Marik, P.E. & Bellomo, R. (2013). Stress hyperglycemia: an essential survival response! *Critical Care*, 17 (2), 305. <https://doi.org/10.1186/cc12514>
- Mason, J.W. (1968). *Organization of Psychoendocrine Mechanisms*. Hoeber Medical Division, Harper & Row.
- Massányi, M., Kohút, L., Argente, M.-J., Halo, M., Kováčik, A., Kováčiková, E., Ondruška, L., Formicki, G. & Massányi, P. (2020). The effect of different sample collection methods on rabbit blood parameters. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27 (11), 3157–3160. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.07.016>
- Mcbride, A. (2017). Small prey species' behaviour and welfare: Implications for veterinary professionals. *The Journal of Small Animal Practice*, 58 (8), 423–436. <https://doi.org/10.1111/jsap.12681>
- McGuill, M.W. & Rowan, A.N. (1989). Biological effects of blood loss: Implications for sampling volumes and techniques. *ILAR Journal*, 31 (4), 5–20. <https://doi.org/10.1093/ilar.31.4.5>

- Melillo, A. (2007). Rabbit clinical pathology. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 16 (3), 135–145. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2007.06.002>
- Meredith, A. (2014). Biology, anatomy and physiology. *BSAVA Manual of Rabbit Medicine*. 2. uppl. Quedgeley, Gloucs, United Kingdom: British Small Animal Veterinary Association, 8.
https://documentcloud.adobe.com/gsuiteintegration/index.html?state=%7B%22ids%22%3A%5B%221U5nVaPr5DafB9_QETsdl8R23OjxNtT0y%22%5D%2C%22action%22%3A%22open%22%2C%22userId%22%3A%22116305420479927885224%22%2C%22resourceKeys%22%3A%7B%7D%7D [2021-09-11]
- Meredith, A. (2015). *BSAVA Small Animal Formulary Part B: Exotic Pets*. 9. uppl. Quedgeley, Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.
<https://www.bsavalibrary.com/content/formulary/exotic-pets> [2021-09-17]
- Mohr, B.J., Fakoya, F.A., Hau, J., Souilem, O. & Anestidou, L. (2017). The governance of animal care and use for scientific purposes in Africa and the Middle East. *ILAR Journal*, 57 (3), 333–346. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilw035>
- Morgan, K. & Tromborg, C. (2006). Sources of stress in captivity. *Applied Animal Behaviour Science*, 102 (3-4), 262-302. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.05.032>
- Mormède, P., Andanson, S., Aupérin, B., Beerda, B., Guémené, D., Malmkvist, J., Manteca, X., Manteuffel, G., Prunet, P., van Reenen, C.G., Richard, S. & Veissier, I. (2007). Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiology & Behavior*, 92 (3), 317–339.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.12.003>
- Morton, D.B., Abbot, D., Close, B.S., Ewbank, R., Gask, D., Heath, M., Mattic, S., Poole, T., Seamer, J., Southee, J., Trussell, B., West, C. & Jennings, M. (1993). Removal of blood from laboratory mammals and birds: First Report of the BVA/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Laboratory Animals*, 27 (1), 1–22. <https://doi.org/10.1258/002367793781082412>
- Mullan, S.M. & Main, D.C.J. (2007). Behaviour and personality of pet rabbits and their interactions with their owners. *Veterinary Record*, 160 (15), 516–520.
<https://doi.org/10.1136/vr.160.15.516>
- Munck, A., Guyre, P. & Holbrook, N. (1984). Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrine Reviews*, 5, 25–44.
<https://doi.org/10.1210/edrv-5-1-25>
- Naff, K.A. & Craig, S. (2012). Chapter 6 - The domestic rabbit, *Oryctolagus cuniculus*: Origins and history. I: Suckow, M.A., Stevens, K.A., & Wilson, R.P. (red.) *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*. Boston: Academic Press, 157–163. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380920-9.00006-7>
- Nagarajan, P., Ramachandra, S.G. & S, R. (red.) (2021). *Essentials of Laboratory Animal Science: Principles and Practices*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-16-0987-9>
- National Centre for the Replacement Refinement & Reduction of Animals in Research (2021). *Rabbit: Marginal ear vein/artery (non-surgical)*. NC3Rs.
<https://nc3rs.org.uk/rabbit-marginal-ear-veinartery-non-surgical> [2021-09-17]

- National Research Council (US) Committee for the update of the guide for the care and use of laboratory animals (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8. uppl. Washington (DC): National Academies Press (US).
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/> [2021-10-07]
- Oelkers, W., Boelke, T. & Bähr, V. (1988). Dose-response relationships between plasma adrenocorticotropin (ACTH), cortisol, aldosterone, and 18-hydroxycorticosterone after injection of ACTH-(1-39) or human corticotropin-releasing hormone in man. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 66 (1), 181–186.
<https://doi.org/10.1210/jcem-66-1-181>.
- Olivier, B., Zethof, T., Pattij, T., van Boogaert, M., van Oorschot, R., Leahy, C., Oosting, R., Bouwknicht, A., Veening, J., van der Gugten, J. & Groenink, L. (2003). Stress-induced hyperthermia and anxiety: pharmacological validation. *European Journal of Pharmacology*, 463 (1), 117–132. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01326-8](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01326-8)
- Papaoiannou, A., Gerozissis, K., Prokopiou, A., Bolaris, S. & Stylianopoulou, F. (2002). Sex differences in the effects of neonatal handling on the animal's response to stress and the vulnerability for depressive behaviour. *Behavioural Brain Research*, 129 (1), 131–139. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00334-5](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00334-5)
- Parasuraman, S., Raveendran, R. & Kesavan, R. (2010). Blood sample collection in small laboratory animals. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 1 (2), 87. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.72350>
- Paul-Murphy, J. (2007). Critical care of the rabbit. *The Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice*, 10 (2), 437–461.
<https://doi.org/10.1016/j.cvex.2007.03.002>
- Pekow, C. (2005). Defining, measuring, and interpreting stress in laboratory animals. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, 44 (2), 41-45.
<https://www.ingentaconnect.com/content/aalas/jaalas/2005/00000044/00000002/art00007> [2021-09-26]
- Pekow, C.A. (2012). Chapter 10 - Basic experimental methods in the rabbit. I: Suckow, M.A., Stevens, K.A., & Wilson, R.P. (red.) *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*. Boston: Academic Press, 243–258.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380920-9.00010-9>
- Podberscek, A.L., Blackshaw, J.K. & Beattie, A.W. (1991). The effects of repeated handling by familiar and unfamiliar people on rabbits in individual cages and group pens. *Applied Animal Behaviour Science*, 28 (4), 365–373.
[https://doi.org/10.1016/0168-1591\(91\)90168-W](https://doi.org/10.1016/0168-1591(91)90168-W)
- Pongrácz, P. & Altbäcker, V. (1999). The effect of early handling is dependent upon the state of the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) pups around nursing. *Developmental Psychobiology*, 35 (3), 241–251. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2302\(199911\)35:3<241::AID-DEV8>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2302(199911)35:3<241::AID-DEV8>3.0.CO;2-R)
- Pongrácz, P. & Altbäcker, V. (2003). Arousal, but not nursing, is necessary to elicit a decreased fear reaction toward humans in rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) pups. *Developmental Psychobiology*, 43 (3), 192–199. <https://doi.org/10.1002/dev.10132>

- Pongrácz, P., Altbäcker, V. & Fenes, D. (2001). Human handling might interfere with conspecific recognition in the european rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Developmental Psychobiology*, 39 (1), 53–62. <https://doi.org/10.1002/dev.1028>
- Price, E.O. (1984). Behavioral aspects of animal domestication. *The Quarterly Review of Biology*, 59 (1), 1–32. <https://doi.org/10.1086/413673>
- Pritt, S., Wood, J., Fetter, B. & Kline, B. (2008). Socialization of Dutch belted rabbits for use in research: preliminary outcomes. I: Xicato, G., Trocino, A., & Lukefahr, S. (red.) *Proceedings of 9th World Rabbit Congress*, Verona, Italy, juni 2008. 1229–1232. Verona, Italy: World Rabbit Science Association. <https://www.semanticscholar.org/paper/Socialization-of-Dutch-belted-rabbits-for-use-in-Pritt-Wood/334cde47bc53ae91c59ac9455fa46daa67111300> [2021-10-07]
- Riad-Fahmy, D., Read, G.F., Walker, R.F. & Griffiths, K. (1982). Steroids in saliva for assessing endocrine function. *Endocrine Reviews*, 3 (4), 367–395. <https://doi.org/10.1210/edrv-3-4-367>
- Richmond, J. (2010). The three Rs. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals*. John Wiley & Sons, Ltd, 3–22. <https://doi.org/10.1002/9781444318777.ch2>
- Selleri, P., Di Girolamo, N. & Novari, G. (2014). Performance of two portable meters and a benchtop analyzer for blood glucose concentration measurement in rabbits. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 245 (1), 87–98. <https://doi.org/10.2460/javma.245.1.87>
- SFS 2018:1192. *Djurskyddsålag*. Stockholm: Näringsdepartementet. https://www.riksdagen.se/sv/dokument-lagar/dokument/svensk-forfattningssamling/djurskyddsålag-20181192_sfs-2018-1192 [2021-09-17]
- Swennes, A.G., Alworth, L.C., Harvey, S.B., Jones, C.A., King, C.S. & Crowell-Davis, S.L. (2011). Human handling promotes compliant behavior in adult laboratory rabbits. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 50 (1), 41–45.
- Szeto, A., Gonzales, J.A., Spitzer, S.B., Levine, J.E., Zaias, J., Saab, P.G., Schneiderman, N. & McCabe, P.M. (2004). Circulating levels of glucocorticoid hormones in WHHL and NZW rabbits: circadian cycle and response to repeated social encounter. *Psychoneuroendocrinology*, 29 (7), 861–866. [https://doi.org/10.1016/S0306-4530\(03\)00153-7](https://doi.org/10.1016/S0306-4530(03)00153-7)
- Tannenbaum, J. (1995). *Veterinary Ethics: Animal Welfare, Client Relations, Competition, and Collegiality*. 2. uppl. St. Louis: Mosby. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Veterinary+ethics%3A+animal+welfare%2C+client+relations%2C+competition%2C+and+collegiality&author=Tannenbaum%2C+J.&publication_year=1995 [2021-10-07]
- Trocino, A., Filiou, E., Tazzoli, M., Bertotto, D., Negrato, E. & Xicato, G. (2014). Behaviour and welfare of growing rabbits housed in cages and pens. *Livestock Science*, 167, 305–314. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.05.035>
- Universities Federation for Animal Welfare (u.å). *About UFAW*. <https://www.ufaw.org.uk/about-ufaw/introduction> [2021-09-17]

- Varga, M. & Harcourt-Brown, F. (2014). *Textbook of Rabbit Medicine: Revised and Edited*. 2nd ed. Edinburgh ; New York: Elsevier.
- Vasbinder, M. & Locke, P. (2016). Introduction: Global laws, regulations, and standards for animals in research. *ILAR Journal*, 57, 261–265.
<https://doi.org/10.1093/ilar/ilw039>
- Veissier, I., van Reenen, C.G., Andanson, S. & Leushuis, I.E. (1999). Adrenocorticotrophic hormone and cortisol in calves after corticotropin-releasing hormone. *Journal of Animal Science*, 77 (8), 2047–2053.
<https://doi.org/10.2527/1999.7782047x>
- Verwer, C.M., van Amerongen, G., van den Bos, R. & Hendriksen, C.F.M. (2009a). Handling effects on body weight and behaviour of group-housed male rabbits in a laboratory setting. *Applied Animal Behaviour Science*, 117 (1), 93–102.
<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2008.12.004>
- Verwer, C.M., van der Ark, A., van Amerongen, G., van den Bos, R. & Hendriksen, C.F.M. (2009b). Reducing variation in a rabbit vaccine safety study with particular emphasis on housing conditions and handling. *Laboratory Animals*, 43 (2), 155–164.
<https://doi.org/10.1258/la.2008.007134>
- Vining, R., McGinley, R. & Symons, R.G. (1983). Hormones in saliva: mode of entry and consequent implications for clinical interpretation. *Clinical Chemistry*, 29 (10), 1752-6.
<https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.945.8722&rep=rep1&type=pdf> [2021-09-24]
- Wade, S.E. (1991). An optimized method for measurement of salivary corticosteroids. *Assessment of Hormones and Drugs in Saliva in Biobehavioral Research*. Seattle, WA: Hogrefe & Huber, 3–17.
- Wechsler, B. (1995). Coping and coping strategies: a behavioural view. *Applied Animal Behaviour Science*, 43 (2), 123–134. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(95\)00557-9](https://doi.org/10.1016/0168-1591(95)00557-9)
- Zhang, S.H., Hennessy, D.P. & Cranwell, P.D. (1990). Pituitary and adrenocortical responses to corticotropin-releasing factor in pigs. *American Journal of Veterinary Research*, 51 (7), 1021–1025
- Zucca, D., Redaelli, V., Marelli, S., Bonazza, V., Heinzl, E., Verga, M. & Luzi, F. (2012). Effect of handling in pre-weaning rabbits. *World Rabbit Science*, 20.
<https://doi.org/10.4995/wrs.2012.1083>
- Öhrman, H. (2017). *Kan tämjning och träning förebygga att kaniner blir stressade och svårhanterade?* (Grundnivå, G2E) Sveriges lantbruksuniversitet. Djursjukskötare - kandidatprogram. <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:slu:epsilon-s-6791> [2021-09-11]

Tack

Ett stort tack riktas först och främst författarens huvudhandledare Patricia Hedenqvist för hennes stöd, engagemang och uppmuntran genom hela processen. Tack riktas även till biträdande handledare Elin Manell för inledande hjälp med planering och blodprovstagning.

Vidare tackas de duktiga, hjälpsamma och pedagogiska kollegorna på KV-lab, Haleh Yazdan Panah och Anna Svensson, för deras hjälp med kaninernas kortisolanalyser.

Tack riktas även till alla kunniga, engagerade och hjälpsamma kollegor på KV-stall vilka framför allt tagit hand om kaninernas omvårdnad, men även assisterat vid provtagningar. Ett särskilt tack till Mari Wallbring och Carola Jansson vilka varit främst delaktiga.

Slutligen tackas Torvald och Britta Gahlins stiftelse för dess ekonomiska bidrag vilket möjliggjorde studien, och kan medverka till att förfina, minska och ersätta djurförsök.

Populärvetenskaplig sammanfattning

Bakgrund

2018 var kaninen det tredje vanligaste försöksdjuret inom EU och en betydelsefull resurs inom forskning rörande bland annat ortopedi, antikroppsproduktion samt ögonsjukdomar. Förutom de samvetsfrågor som ofta väcks kring djurhållningens syfte uppstår ett ytterligare dilemma kring kaniner i försök på grund av deras naturliga rädsla för människan. Rädslan har i sin tur inte bara negativ inverkan på djurens välmående men riskerar också äventyra forskningsresultaten. Till exempel har det visats att stress kan påverka läkemedelsreaktioner genom förändringar i flera kroppsliga processer.

Inom EU ställs krav att alla försöksdjursverksamheter ska eftersträva god djurväl-färd och för att uppfylla det kravet har tre nyckelstrategier definierats. Vanligen förkortas dessa tillsammans med ”3R”, vilka på svenska ger översättningen be-gränsa, förfina och ersätta (*eng* reduce, replace, refine). I korthet handlar princi-perna om att försök på djur endast får äga rum i brist på alternativa försöksmodeller och med så få djur som möjligt, samt genom den mest skonsamma tekniken. Genom att minska stress hos försökskaniner kan potentiellt både förfining och begränsning åstadkommas, dels genom mer skonsam djurhållning, dels då behovet av antal djur kan minska när forskningen effektiviseras. Standardiserade protokoll eller riktlinjer för hur minskning av stress ska uppnås saknas däremot i dagsläget. Dock finns forskningsunderlag för verk samma metoder varav majoriteten baseras på studier på kaninungar under dioperioden.

På S:t Eriks Ögonsjukhus i Stockholm bedrivs sedan flera år tillbaka ett tränings- och socialiseringsprogram för vuxna kaniner vilket av personalen upplevs göra kaninerna mindre stressade och mer lätthanterliga. Metoden som baseras på gradvis tillvänjning av mänsklig hantering beskrevs och utvärderades av Ersbring 2021, vars resultat gav vetenskapligt stöd för programmets effekt. I studien undersöktes däremot endast träningens påverkan på en grupp där alla genomgått träning vilket gjorde att andra faktorer än träning teoretiskt hade kunnat orsaka den påvisade effekten.

Denna uppföljande studie avsåg stärka beviset för träningens effekt ytterligare genom att dels utföra fler typer av tester för att mäta stress, dels jämföra resultat med en grupp kaniner som inte tränas, och dels föra detaljerad journal över alla träningens moment. Studiens målsättning var att lägga grund för ett vetenskapligt bevisat effektivt tränings- och socialiseringsprogram för kaniner i medicinsk forskning.

Studiens tillvägagångssätt och teoretiska underlag

6 hankaniner av rasen New Zealand White köptes in till universitetet och delades upp i en testgrupp (Grupp A) och en kontrollgrupp (Grupp B). Efter några dagars tillvänjning i den nya miljön fick Grupp A påbörja träning och socialisering medan Grupp B inte fick mänsklig kontakt utöver den vid städning och utfodring. Träningen och socialiseringen pågick dagligen under en veckas tid uppdelade i ett förmiddags- och ett eftermiddagspass. Veckan därpå när Grupp A fullföljt programmet socialiserades och tränades i stället Grupp B. Under denna fas fick Grupp A ingen träning men bibehöll det dagliga passet med socialisering. Momenten tog omkring 2,5–5 minuter i anspråk för varje kanin där träning innefattade hantering och successiv tillvänjning vid en procedur efterliknande blodprovstagning. Socialiseringen bestod av att kaniner klappades och talades till. Vid fyra tillfällen under studieperioden utvärderades bägge grupperna för att skillnader mellan tränade och otränade kaniner, såväl som skillnader inom grupperna innan och efter träning.

För att mäta stressen undersöktes både beteendemässiga tecken samt blodprov. Detta då stress kan uttryckas olika mellan olika individer beroende på bland annat kön, arvsanlag och personlighet, trots att de grundläggande mekanismerna är de samma. Bland annat ökar blodsocker för att ge snabb energitillgång. Dessa processer styrs i sin tur av nervsignaler och hormoner vilka även ger upphov till förändringar i beteende, till exempel skyddssökande.

Beteendeanalysen i denna studie utfördes under ett så kallat ”approach-test” baserat dels på kaninernas kroppsspråk vid människans närmande, dels på kontaktsökande. Även kaninens placering i buren undersöktes. Testen ägde rum vid kaninernas ankomst, efter några dagars tillvänjning till miljön samt innan och efter träningsprogrammets början och slut. Vidare genomfördes varje test innan och efter den dagliga socialiseringen för analys av socialiseringens omedelbara effekter. Resterande markörer analyserades i blodet och bestod av analys av blodsocker (glukos) och stresshormon (kortisol) i blodplasma. Blodprovstagningen ägde rum vid två tillfällen efter respektive grupps fullföljande av träningsprogrammet. Bedömning av beteende utfördes enligt en blindad metod, det vill säga att bedömaren inte hade

kännedom om vilken grupp kaninen tillhörde. Blindningen av beteendetesten möjliggjordes genom filminspelning.

Resultat och slutsats

Ingen statistisk signifikant skillnad påvisades mellan tränade och otränade kaniner. Däremot sågs flera tecken på programmets stressreducerande effekt från approach-testen, dels genom mera kontaktsökande beteende från de tränade kaninerna, dels genom längre tid spenderad i burens främre delar och utanför sitthyllan vid mänsklig närvaro. Störst effekt demonstrerades av gruppen som påbörjade träning efter ett fåtal dagar av aklimatisering, vilket tydde på att protokollet inte var lika effektivt vid senare start. En orsak till det kan ha varit att kontrollgruppen till skillnad från testgruppen fick genomgå en blodprovstagning innan deras träning påbörjades vilket kan ha givit en sämre utgångspunkt.

Den subjektiva beteendeanalysen visade i sin tur inga särskilda skillnader mellan grupperna. I stället tolkades rädslan minska successivt för bägge grupperna allt eftersom studien fortskred. Anledningen kan ha varit att bedömningsmallen för beteendet inte var tillräckligt nyanserad, eller att den otränade gruppen var lika avslappnad fast ned tendens till längre avstånd i buren från människan.

Blodglukos och plasmakortisol visade inte några samband med träning. I jämförelse med normalvärden för kaniner var värdena relativt låga vilket skulle kunna indikera att momentet inte var så stressande oavsett om kaninerna var tränade inför proceduren eller ej. Ett mönster som däremot kunde anas i värdena för plasmakortisol var att kaniner vars provtagningar tagit längre tid var högre. Variationer i kaninernas foderintag i relation till provtagningstillfällena är också en potentiellt påverkande faktor.

Vidare sågs vid jämförelse av resultat före och efter socialisering tydliga tecken på vissa omedelbara effekter, dels genom snabbare och fler antal initierade kontakter, dels längre vistelse i burens främre del och utanför sitthyllan. Iakttagelsen stödjer ett protokoll där kaniner hanteras genom socialisering i buren enligt beskriven metod kort inpå att de utsätts för försök.

Slutligen gav studien indikation på att daglig socialisering efter en veckas fullföljd träning har kumulativ effekt. Detta demonstrerades genom att gruppen som tränats den första veckan fortsatte öka sina interaktioner med människan och poäng i beteendeanalysen i slutet av studien. Resultatet kan motivera extra resurser tilläggad träning under en kort inledande period.

Sammanfattningsvis stödjer studien tidigare forskningsrön inom ämnet och ger tydlig indikation på att tränings-och socialiseringsprogrammet utvecklat på S:t Eriks Ögonsjukhus har effekt på beteende, med minskad rädsla som följd. För att vetenskapligt säkerställa effekten krävs däremot undersökning av ett större antal kaniner, där inkluderande av bägge könen skulle öka resultatens relevans för hela populationen.

Bilaga 1

Inskolning/hantering/övning av kaniner på St Eriks Ögonsjukhus djuravdelning

Ankomst:

När kaninen anländer och packas upp vägs den, kontrolleras yttre hälsostatus, kön, tandställning, örontatuering och om den är kloklippt. All data skrivs in i journalen, noterar även om kaninen känns rädd, stressad el liknande.

Buren är förberedd med vatten, normal giva av lusern/hö, mindre giva av pellets (= 2 första dagarna för att vänja magen), bitpinne och halm el liknande.

Första dagarna: (Acklimatiseringstid 7-10 dagar)

De 2 första dagarna får kaninen vara i fred, kontrolleras visuellt och personalen pratar med kaninen + att radio är på dagtid. Extra viktigt första dygnet att se till att kaninen dricker ur nippel, bajsar och kissar(kan ta lite längre tid- upp till 36 timmar)

Dag 3-6 börjar personal hantera kanin, börjar med att ”prata med” och känna på kaninen inne buren tills de känner sig lugna med det. Sen lyfts de ut/in i buren med nosen mot burens öppning hela tiden. De hanteras av personal med kaninen i position under hanterarens arm. De får succesivt vara med om de ”normala” procedurerna såsom vägning, palpering, **kontroll ögon**, öron, nos/mun, tassar. Kan upprepas under dagen.

Dag 7-10 (längre vid behov)

Lika som ovan men nu adderas att öva den procedur kaninen ska genomgå upprepat i forskningsprojektet ex. oral giva, blodprovtagning, ögontrycksmätning mm. Kan upprepas under dagen.

Det ovan nämnda är också det vi lär ut på vår LAS-kurs för nya forskare.

Nedan exempel på procedurer vi övar regelbundet i våra forskningsprojekt

Övning av oral giva med substans

Dag 6-7 Kaninen lyfts ur buren och bärs i position till avsedd plats för oral giva, sätts i avsedd bur- vi använder MAKIII på vågen. Kaninen får känna sig trygg på platsen och hanteraren pratar, smeker kaninen över huvud/nos, kan upprepas under dagen.

Dag 7-8 (9-10) Lika som ovan men nu läggs till att hanteraren övar att hålla kaninen stilla och röra mun/nos, efter upprepade sessioner adderas att visa spruta och föra den mot mun. När kaninen känns trygg med denna behandling förs sprutan in i munnen och när kanin känns lugn med det får kaninen en ”dos” med NaCl(0.1-0.2 ml). Om kaninen känns trygg med denna behandling kan försöket börja, om inte övas flera gånger.

Blodprovtagning

Dag 6 Kaninen lyfts ur buren i position under armen till avsedd plats för provtagning sätts där ned på retrainduk och hanteraren pratar med kanin och smeker hela kaninen och extra tid vid huvud/öron. Kan upprepas under dagen.

Dag 7 lika som ovan men nu läggs duken runt kaninen och öronen hanteras som vid provtagning

Dag 8-9 lika som ovan men nu spänns duken åt och när kaninen känns trygg med det så sätts duken fast. Under övningen hanteras öronen på kaninen som vid provtagning, när kaninen känns lugn och trygg kan försöket börja, om inte övas flera gånger.

Vid blodprovtagning i diabetesförsök och blodglukosvärde ska tas vid flera tidpunkter gör vi lika som ovan förutom att kaninen då sitter ”lös” i vågskålen.

Ögontrycksmätning (behövs 2 stycken hanterare)

Dag 6-7 Kaninen lyfts ur buren och bärs i position under armen till avsedd plats för mätning. Hanterare 1 sätter ned kaninen på platsen och håller kaninen stilla endast med lugna händer så kaninen sitter stilla. Hanterare 2 håller i mätinstrumentet runt kaninen. Kan upprepas under dagen.

Dag 8-9 Lika som ovan men nu närmar sig hanterare 2 huvudet på kaninen med mätinstrumentet. När kaninen är lugn med det närmar sig hanterare 2 ögat med instrumentet, detta upprepas flera gånger och kan upprepas under dagarna.

Dag 10 Lika som ovan och nu adderas testmätningar. Kan upprepas under dagen. När kaninen känns lugn och trygg kan försöket börja.

På samma sätt jobbar vi vid andra procedurer för att få en lugn och harmonisk forskning!

I forskningen är det viktigt med kontinuitet men då många projekt kräver många mätpunkter, varje dag mm kan det bli så att flera hanterare måste hantera kaninen under försöket men vi försöker minimera detta och att personalen på djuravdelningen gör så mycket som möjligt.