



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap

Anpassningsbara kycklingar

Den tidiga utvecklingens betydelse för att minska stress hos värphöns

Adaptive chicks

The importance of early development for reducing stress in laying hens



Veronika Winnberg

Uppsala

2021

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

Anpassningsbara kycklingar

Den tidiga utvecklingens betydelse för att minska stress hos värphöns

Adaptive chicks

The importance of early development for reducing stress in laying hens

Veronika Winnberg

Handledare: Linda Keeling, Institutionen för husdjurens miljö och hälsa, SLU

Biträdande handledare: Lena Skånberg, Institutionen för husdjurens miljö och hälsa, SLU

Examinator: Anette Wichman, Institutionen för husdjurens miljö och hälsa, SLU

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0869

Kursansvarig institution: Institutionen för kliniska vetenskaper

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2021

Elektronisk publicering: <https://stud.epsilon.slu.se>

Omslagsillustration: Fotografi taget av Lena Skånberg.

Nyckelord: värphöns, stress, anpassning, tonic immobility, H/L ratio

Key words: laying hens, stress, adaptability, tonic immobility, H/L ratio

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för husdjurens miljö och hälsa

SAMMANFATTNING

Syftet med mitt arbete är att undersöka hur kycklingars tidiga uppväxtmiljö påverkar deras förmåga att anpassa sig och hantera stress. Djur som lever i en berikad miljö får större möjlighet att lära sig hantera fler utmaningar vilket kan leda till att de blir bättre på att hantera förändringar i miljön senare i livet. Det leder potentiellt att de upplever mindre rädsla och stress vilket skulle kunna främja djurvälståndet i en produktionsmiljö med många potentiella stressorer och utmaningar. Minskning av stress leder även till minskad sjukdom och ökad produktion vilket skulle gynna industrin på kort och lång sikt (Black, 1994). Arbetets hypotes är att kycklingar som under de 4 första veckorna i livet får större valmöjligheter i miljön kommer att ha lägre stressnivå och rädsla än de kycklingar som har haft färre valmöjligheter. Detta tankesätt grundar sig i att djur som får fler valmöjligheter även möter fler utmaningar och därför lättare kan anpassa sig till utmaningar (exempelvis stressfyllda situationer) senare i livet. Hypotesen baseras på predictive adaptive response (PAR) hypotesen som utgår ifrån att den tidiga utvecklingen är en möjlighet för individen att anpassa sig till den framtida levnadsmiljön. Unga (eller ofödda) individer kan på så sätt anpassa sin fenotyp för den framtida miljön baserat på indikationer från omgivningen. Anpassningen kan vara fysiologisk eller beteendemässig (Bateson *et al.*, 2014).

Kycklingarna i studien bodde i 16 boxar med 22-23 fåglar i varje box. Hälften av fåglarna fick tillgång till en sorts sittpinne och en sorts strö (denna inredningsvariant benämns nedan no choice – NC) under livets första 4 veckor medan den andra hälften fick kontinuerlig tillgång till fyra sorters sittpinnar och fyra sorters strö under livets 4 första veckor (denna inredningsvariant benämns nedan choice – C). Varje sort som presenterades i C fanns representerade i två boxar av NC-variant. Därefter byttes inredningen i hälften av boxarna från choice till no choice (CN) eller från no choice till choice (NC). Kycklingarnas långvariga stressnivåer utvärderades genom att de utsattes för ett standardiserat beteendetest som anses mäta rädsla (tonic immobility test) samt ett immunologiskt test (heterofil/lymfocyt ratio). Tonic immobility test utfördes på hälften av fåglarna i varje box vid 4 och 7 veckors ålder (före och efter att hälften av fåglarna fick en miljöförändring). Blodprovstagning för uträkning av heterofil/lymfocyt ratio utfördes på hälften av fåglarna i varje box vid 6 veckors ålder (efter förändringen). Samma individer användes för TI- test och blodprovstagning. På grund av tidsbrist kunde denna studie enbart inkludera hälften av boxarna i studie av heterofil/lymfocyt ratio (box 9-16).

Resultat

Det fanns signifikanta skillnader gällande parametrar i tonic immobility test (duration av immobilitet, tid till första vokalisering, tid till första huvudrörelse och antal induktionsförsök) för alla behandlingsgrupper mellan de två testtillfällena. Resultaten visar på att fåglarna är mindre rädda och stressade vid det andra testtillfället än vid det första testtillfället. Det fanns inga signifikanta skillnader vid parametrar i tonic immobility tester i jämförelse mellan behandlingsgrupperna.

Gällande H/L ratio sågs ingen signifikant skillnad mellan fåglar beroende på vilken inredning de haft under försökets tid. Det fanns ingen signifikant skillnad mellan behandlingsgrupper gällande andel heterofiler i blodet. Beträffande andel lymfocyter i blodet sågs en tendens till skillnad mellan behandlingsgrupper. Behandlingsgrupp C hade den högsta andelen lymfocyter i blodet och behandlingsgrupp N hade den lägsta andelen lymfocyter i blodet.

Ingen korrelation sågs på individnivå mellan TI-test och H/L-ratios.

Denna studie kan inte visa att nivån av valmöjligheter under livets fyra första veckor har betydelse för kycklingars stressnivå senare i livet.

SUMMARY

The aim of this paper is to investigate how the habitat of chickens influences their adaptive plasticity and stress handling capability. Animals that live in a more diverse environment will be exposed to a wider array of experiences and challenges and therefore may have a greater ability to tackle challenges with less stress later in life. This is based on the predictive adaptive response (PAR) hypothesis which is based on the possibility that early development is an adaptation possibility to future environment conditions. Juvenile animals have the opportunity to adapt their phenotype to the future environment based on indications from the present environment. Adaptions can be both physiological and behavioural (Bateson *et al.*, 2014). An increased ability to cope with challenges improves animal welfare because it reduces stress and fear, especially during environmental changes. Reducing stress also reduces disease and increases production which is beneficial in a short- and long-term financial perspective (Black, 1994). The working hypothesis of this paper is that chicks that had a choice of litter and perches in their pens for the first 4 weeks of life will have greater adaptability later in life and as a result feel less stress and fear.

The chicks in this study were housed in 16 pens with 22-23 birds in each pen. Half of the birds only had access to one type of perch and one type of litter during the first 4 weeks of life (treatment no choice – NC). The other half had access to 4 types of litter and 4 types of perches during the same time period (treatment choice – C). When the chick was 4 weeks old the environment was changed in half of the pens with choice and half of the pens with no choice. This consisted of changing the choice environment to no choice or vice versa. The rest of the pens had some environmental change but not by changing the treatment. Stress levels of the chicks were evaluated by a standardised behavioural test designed to measure fear, tonic immobility (TI), and an immunological test, heterophil/lymphocyte (H/L) ratio. TI tests were performed on half of the birds from each pen when the chicks were 4 and 7 weeks old (before and after half of the chicks had a change in the environment). Blood sampling and H/L ratio were performed when the chicks were 6 weeks old (after a change in the environment for half of the chicks). Because of lack of time only half of the birds from half of the pens could be included in the study regarding H/L ratio (pen numbers 9-16). The same birds were tested each time.

Results

When comparing the results of the two TI sessions, there was a significant decrease in duration of TI, time to first vocalisation and time to first head movement. This is indicative of that the chicks were less afraid and stressed during the second TI-test. No significant differences were found between the different treatments in the two sessions.

There was no significant difference between treatment groups regarding H/L ratio. No difference was seen regarding the percentage of heterophils in the blood. There was a tendency to a difference between treatment groups regarding the percentage of lymphocytes in the blood.

No correlation was found between individual TI tests and H/L ratios.

This study could not show that the early environment had an impact on the chick's levels of stress later in life.

INNEHÅLL

INLEDNING	1
LITTERATURÖVERSIKT	3
<i>Rädsla och stress</i>	3
<i>Stressfysiologi</i>	3
HPA-axeln	3
Kortikosteron	3
Heterofiler	4
<i>Den tidiga utvecklingen</i>	4
<i>Resurser med betydelse för utförande av naturliga beteenden</i>	5
<i>Mått på stress och rädsla</i>	5
Beteendetester	6
Open field/novel arena test	6
Approach test	6
Tonic immobility	6
Fysiologiska tester	8
Heterofil/lymfocyt ratio	8
Heat shock proteins (HSP)	9
Kortikosteron	9
<i>Anpassningsbara kycklingar</i>	10
MATERIAL OCH METOD	11
<i>Fåglarna</i>	11
<i>Skötseln</i>	11
<i>Boxarna</i>	11
<i>Behandlingarna</i>	11
<i>Försök</i>	13
TI	13
H/L ratio	14
Statistisk analys	15
RESULTAT	16
<i>TI-resultat</i>	16
TI-testtillfälle 1	16
Testtillfälle 2	17
Effekt av större valfrihet under uppfödningssperiod 1	17
Effekt av behandlingsbyte	18
Testtillfällets betydelse	18
Skillnadens storlek	20
<i>H/L ratio-resultat</i>	21
Heterofiler	22

Lymfocyter	22
Samband mellan TI-test och H/L ratio för individuella fåglar	22
DISKUSSION	23
POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING	27
REFERENSER	29

INLEDNING

Den tidiga utvecklingen är viktig för hur individen senare är kapabel att möta utmaningar och svårigheter. Predictive adaptive response (PAR) hypotesen utgår ifrån att den tidiga utvecklingen är en möjlighet för individen att anpassa sig till den framtida levnadsmiljön. Unga (eller ofödda) individer kan på så sätt anpassa sin fenotyp till den framtida miljön baserat på indikationer från omgivningen. Exempel på detta finns från ett flertal arter, insekter, fiskar och däggdjur. Anpassningen kan vara fysiologisk eller beteendemässig (Bateson *et al.*, 2014).

Unghöns ska födas upp i ett inhysningssystem som förbereder dem för det inhysningssystem som de sedan ska leva i som vuxna (2 kap. 3 § Statens jordbruksverks föreskrifter och allmänna råd [SJVFS 2019:23] om fjäderfåhållning inom lantbruket m.m., saknr L 111). I de allmänna råden till 2 kap. 3 § (SJVFS 2019:23) specificeras att värphöns som föds upp i bursystem respektive frigående system ska vara uppfödda i samma inhysningssystem samt att unghöns som är uppfödda i bursystem inte bör hållas som frigående värphöns. Även om man följer dessa regler skiljer sig dagens uppfödning av värphöns många gånger markant från den miljö som djuren ska leva i som vuxna. Under uppfödningstiden hålls kycklingar ofta i delar av den miljö de sedan ska leva i som unghöns, till exempel genom att endast en våning används som sedan öppnas upp till ett flervåningssystem i takt med att djuren växer och behöver mer plats. Härtill flyttar unghönsen oftast vid 15 veckors ålder från uppfödningssmiljö till produktionsmiljö. Det finns därför potential till förbättring gällande hur man förbereder kycklingar och unghöns för den miljö de ska bo i som vuxna samt för att minska stress i samband med påfrestningen det innebär för fåglarna då miljön förändras. Om anpassningsförmågan hos individerna ökar kan stressen vid dessa perioder minskas.

Syftet med mitt arbete är att undersöka hur kycklingars uppväxtmiljö påverkar deras förmåga till anpassning och att hantera stress.

Dagsgamla kycklingar inhystes i 16 boxar med 11 kycklingar i varje box. Hälften av boxarna var inredda med en sorts strö och en sorts sittpinne (inredningsvarianten kallas nedan no choice – NC). Den andra hälften av boxarna inreddes med 4 sorters strö och 4 sorters sittpinnar. Då kycklingarna var 4 veckor gamla ändrades inredningen i hälften av boxarna från choice (C) till no choice (NC) eller från no choice (NC) till choice (C). Resterande boxar fick ingen förändring i inredning efter 4 veckor. För att utvärdera kycklingarnas stressnivåer användes ett standardiserat beteendetest som mäter rädsla (tonic immobility test) samt ett immunologiskt test (heterocyt/lymfocyt ratio). Tonic immobility test utfördes vid två tillfällen, före och efter att hälften av boxarna fick förändrad inredning. Heterocyt/lymfocyt ratio utfördes efter eventuell förändring i boxarnas inredning.

Arbetets hypotes är att kycklingar som under de 4 första veckorna i livet får möjlighet att utforska flera olika sorters sittpinnar och strömaterial kommer att ha lägre stressnivå och rädsla än de kycklingar som enbart haft tillgång till en sorts strö och sittpinnar. Hypotesen baseras på PAR hypotesen och teorin att kycklingar som har större valfrihet får större möjlighet att anpassa sig till sin omgivning då de får möjlighet att undersöka flera strömaterial och flera sorters sittpinnar.

Arbetets hypotes är att kycklingar som under de 4 första veckorna i livet får möjlighet att uppvisa en större variation i beteenden kommer att ha en lägre stressnivå och rädsla.

LITTERATURÖVERSIKT

Rädsla och stress

Inom djurvälståndsforskning kan rädsla definieras som fysiologiska och beteendemässiga reaktioner på en faktisk fara medan ängslighet är reaktion på en potentiell fara (Forkman *et al.*, 2007). Stress kan definieras som disharmoni eller hot om störd homeostas orsakad av psykologiska, miljöbetingade eller fysiologiska stressfaktorer (Black, 1994).

Rädsla är en av de mest väl undersökta känslorna hos våra husdjur och har en viktig evolutionär funktion. Det är en känsla som utlöser en mängd fysiologiska och beteendemässiga responser. Den evolutionära funktionen är att ta djuret från den farliga situationen. Individer med tillbörlig respons på rädsla har en ökad förväntad livslängd i dess naturliga miljö. Trots att en av konsekvenserna av domesticering är minskad rädsla för människan reagerar flera av våra husdjur med rädsla på människor. Trots den starka fördelen som rädsla ger individen kan den även vara till nackdel. Då människor håller husdjur är det i onaturliga förhållanden där djuret inte kan ge en passande respons på stimuli som orsakar rädsla. Rädslan består då och kan leda till kronisk stress och nedsatt produktivitet (Forkman *et al.*, 2007).

Stressreaktioner påverkar kroppen både centralt och perifert. Centralt orsakar neurala signaler ökad upphetsning, vakenhet, uppmärksamhet och aggression samtidigt som beteenden som foderintag, reproduktion och tillväxt minskar. Perifert omdistribuerar kroppen resurser för att vara beredd på "fight-or-flight" genom bland annat ökad hjärtfrekvens och ökat blodtryck (Black, 1994).

Stressfysiologi

Stressfysiologi är ett omfattande och komplext område. Nedan har jag tagit upp fysiologiska stressmekanismer hos fåglar som har direkt betydelse för mitt arbete.

HPA-axeln

HPA-axeln (hypothalamus pituitary adrenal axel) är ett samlingsnamn för den endokrina kedja som leder till att bland annat kortisol och kortikosteron utsöndras. Hypothalamus utsöndrar flera reglerande bioaktiva molekyler som kontrollerar utsöndring av hormon från hypofysen. Hypofysen utsöndrar ett flertal hormon, bland annat adrenokortikotropiskt hormon (ACTH) som utsöndras i ökad mängd vid stress och stimulerar utsöndring av kortikosteron från binjuren. Nervsystemets påverkan på immunfunktioner går till stor del via HPA-axeln. Hypothalamus har mycket kontakt med det limbiska systemet, som styr anpassning och känslor, samt mycket kontakt med övriga kroppen. Hypothalamus styr via HPA-axeln bland annat tillväxt, reproduktion, thyroideas funktion, aptit och sömn (Black, 1994).

Kortikosteron

Kortikosteron, eller 17-deoxykortisol, är den viktigaste glukokortikoiden hos fåglar. Receptorer för kortikosteron finns i nästan alla kroppens celler. Efter bindning av receptor-kortikosteron i cytosolen förflyttar sig komplexet in i cellkärnan där kortikosteron utövar sin effekt genom att stimulera eller inhibera transkription av ett stort antal gener. Dess främsta verkan är på mottagarecellers kolhydrat- och proteinmetabolism. Kortikosteron påverkar kolhydrat-metabolismen

genom att stimulera glukoneogenes samt inhibera upptag och nyttjande av glukos i många vävnader, dock inte hjärnan. Detta resulterar i ökade nivåer av glukos i blodet. Fett- och proteinmetabolism influeras genom ökad nedbrytning vilket leder till ökade nivåer av fettsyror och aminosyror i blodet. DNA-syntes inhiberas vid kroniskt höga nivåer av kortikosteron vilket tillsammans med den ökade nedbrytningen av protein leder till reducerad tillväxt. Kortikosteron verkar även immunosuppressivt.

Heterofiler

En av de leukocytcellinjer som ingår i däggdjurs immunförsvar men som fåglar saknar är neutrofiler. Deras funktion utförs istället heterofiler. Det är ännu okänt om heterofiler är en celltyp eller om begreppet omfattar ett flertal celltyper som är funktionellt lika. Heterofiler är granulocyter, utvecklas i benmärgen och ingår i det medfödda immunförsvaret. De har en särskilt viktig funktion i det respiratoriska immunförsvaret till följd av att det i luftsäckar och lungor inte finns några makrofager. Vid akut inflammation ökar koncentrationen av heterofiler fort och maximal koncentration nås efter cirka 12 timmar (Harmon, 1998).

Den tidiga utvecklingen

Predictive adaptive response (PAR) hypotesen utvecklades ursprungligen inom humanmedicin för att förklara hur upplevelser under barndomen kunde vara kopplade till utvecklingen av icke-överförbara sjukdomar senare i livet. Då PAR hypotesen kopplades till näringstillstånd tänktes den kunna förklara livsstilssjukdomar till följd av exempelvis fetma. Inom humanmedicinen har denna förklaringsmodell bevisats helt eller delvis felaktig för flera sjukdomar från denna grupp (Wells, 2012). Inom djurvälståndsforskning har hypotesen dock visat sig ha betydelse, kanske eftersom våra husdjur har kortare livslängd och mindre komplexa sociala och psykologiska förhållanden. Grundtanken är att influenser från miljön kan ge information om hur den framtida miljön kommer att se ut. Individens anpassning till dessa influenser kan därför ge ökad överlevnad och fortplantning i den framtida miljön (Bateson *et al.*, 2014).

Den tidiga utvecklingen hos kycklingar påverkas av genetisk information (i form av både DNA och epigenetisk förändringar i uttrycket av DNA), maternell information samt individens upplevelser efter kläckning. Allt detta påverkar individens stressnivå. Modern för över information till avkomman genom fostran (om kycklingen får gå tillsammans med modern) samt via hormonnivåer i äggulan. Stress kan dessutom påverka hönans fysiska kondition (vikt och äggvikt) vilket påverkar kycklingens utveckling. Hormonnivån i ägg påverkas av stressfyllda miljöförhållanden. En studie av de Haas *et al.* (2014) visade att hönans plasmanivåer av kortikosteron och serotonin har positiv korrelation med hormonnivåer i äggulan vilket sedan får signifikant betydelse för avkommans känslighet för stress. Samma studie fann även att genetisk information hade betydelse för inverkan på avkomman då dessa skillnader sågs hos avkomma efter en föräldralinje av white leghorn medan en andra föräldralinje (rhode island red x rhode island white) inte visade en tydlig överförbar effekt på avkomman. Föräldralinjen rhode island red x rhode island white hade en generellt lägre stressnivå än föräldralinjen av white leghorn (de Haas *et al.*, 2014).

Resurser med betydelse för utförande av naturliga beteenden

Att sandbada är ett viktigt naturligt beteende för hönor som utförs oavsett om omgivningen tillhandahåller ett lämpligt substrat eller inte. Beteendet syftar till att sköta om fjäderskruden och har därför en direkt påverkan på fåglarnas fysiska välbefinnande. De substrat som används för sandbadning används även av fåglarna till att picka och krafsa i då substratet även stimulerar födosöksbeteende. Olika substrat stimulerar dessa beteenden i olika grad. I en studie av Skånberg *et al.* (2021) sandbadade kycklingar mer i sand och torv jämfört med spån av trä eller hampa samt pellets. Kycklingarna utförde mer födosöksbeteende i spån av trä och hampa samt sand jämfört med torv och pellets (Skånberg *et al.*, 2021). En variation av bottenströ skulle därmed ge fåglarna möjlighet att utföra en mängd naturliga beteenden som är viktiga för djurens välbefinnande.

Under vila föredrar hönor och kycklingar att befinna sig högt upp. Beteendet syftar ursprungligen till att undkomma rovdjur på marken genom att placera sig i buskar eller träd. I dagens djurhållning kan detta beteende tillgodoses genom att exempelvis sittpinnar tillhandahålls. I en studie (Skånberg *et al.*, 2021) där man jämförde kycklingars användning av sex olika sorters sittpinnar (tunna och breda varianter av rep samt platta och runda sittpinnar av trä) fann man att sittpinnars bredd och form påverkade hur de användes av fåglarna. Breda sittpinnar av rep användes tidigare än andra materialtyper samt användes mer som viloplats än andra typer. Det var större sannolikhet att landningar var välbalanserade om de utfördes på platta sittpinnar av trä eller breda rep än andra typer av sittpinnar. Fler fåglar observerades fjäderputsa sig sittandes på platta sittpinnar av trä jämfört med andra typer av sittpinnar (Skånberg *et al.*, 2021).

Unga kycklingar som tidigt får tillgång till sittpinnar börjar använda dessa i tidigare ålder och har sedan en högre användning av sittpinnar i vuxen ålder än fåglar som inte haft tillgång till sittpinnar tidigt. Även tillgång på strömaterial under uppfödningen är viktigt för fåglarnas födosöksbeteende i vuxen ålder. Om kycklingar får tillgång till strö under uppfödning leder det till förbättrad kvalitet på fjäderdräkten, minskad rädsla (mätt genom tonic immobility test) samt minskad fjäderplockning i vuxen ålder (Janczak & Riber, 2015).

Värphöns ska hållas så att de har tillgång till rede att värpa i, sandbada samt sitta upphöjt (2 kap. 1 § Svensk författningssamling [SFS 2019:66] Djurskyddsförordning, saknr L 2).

Genom att utforma omgivningen så att djur kan utföra naturliga beteenden förbättras deras välbefinnande. Detta tar sig uttryck i att djuren uppvisar färre stereotypier vilket tyder på att deras stressnivåer är lägre (Newberry, 1995).

Mått på stress och rädsla

Forskare har använt flertalet sätt att försöka mäta djurs nivåer av stress och rädsla. Lämpligheten av de olika testerna bestäms ofta av i vilket syfte undersökningen görs. Olika metoder har både svagheter och styrkor. En av de faktorer som påverkar testerna är social isolering som är vanligt förekommande vid beteendemässiga stresstester. Isolering är troligen en av de mest stressande situationerna för flockdjur att befinna sig i. Domesticerade arter har en stark social drivkraft och därför kan detta utlösa starkare rädsla än det utförda testet. Man bör ta hänsyn till detta då man utformar test för att mäta rädsla eller stress (Forkman *et al.*, 2007).

Beteendemässiga och fysiologiska reaktioner på test eller händelser kan vara indikatorer på rädsla och kan inte ses som ett direkt mått på rädsla. Individens svar på rädsla är komplext och det är därför inte möjligt att koppla ett visst beteende till en specifik känsla. I många fall har beteendetest utformats på laboratoriedjur för att sedan användas på fler arter. För att test ska kunna användas på en annan art bör man ta i beaktande skillnaderna mellan arterna. Generellt producerar plötsliga, oväntade och/eller oförutsägbara händelser rädsla hos flertalet djurslag. En rovdjursattack delar dessa karaktäristika. Det är svårt att utvärdera upprepbarheten hos rädslobaserade tester eftersom individer reagerar olika samt att det kan finnas en habituering-process. Habituering innebär att djuren vänjer sig vid testsituationen och därför reagerar med mindre och mindre rädsla då testet upprepas. Det finns dock individer som reagerar på motsatt sätt, dvs visar mer och mer rädsla då testet upprepas. Det beror på sensitisering inför testet och därför byggs en starkare rädsloreaktion upp (Forkman *et al.*, 2007).

Beteendetester

Open field/novel arena test

Open-field/novel area är ett test som har använts i ett flertal studier, framför allt på gnagare. Testet utförs genom att djuret placeras i en stor bur som inte är känd för djuret. Därefter tolkas frekvensen av defekering och aktivitet som ett mått på stress/rädsla. Förutom utrymmet påverkar även avsaknad av gömställen, social isolation, att inte veta var man är och starkare belysning djurets reaktioner. Det är känt att reaktioner från individen vid novel arena test influeras av rädsla och social isolering (Forkman *et al.*, 2007).

Emergence test

Emergence test är en variant på open field/novel arena test. Testet utförs genom att djuret placeras i en känd miljö eller gömställe samt ger de tillgång till ett obekant utrymme. Därefter registreras tiden till djuren går ut i det obekanta utrymmet (Miller *et al.*, 2005). Exakt utförande varierar mellan olika försök. Testet anses mäta rädsla och ge ungefär samma information som open field/novel arena test (Forkman *et al.*, 2007).

Approach test

Rädsla för människan har testats på två sätt: forced approach test (FAT) och voluntary approach test (VAT). Problem med dessa test är att det är mer sannolikt att få aktiva reaktioner av djuret vid FAT samtidigt som det är mer sannolikt att få fler inaktiva reaktioner vid utförande av VAT (Forkman *et al.*, 2007).

Novel object test

Novel object test innebär att man introducerar ett nytt föremål för försöksdjuren. Det är ett snabbt och praktiskt test att använda då fåglarna lever i burar. Djur som lever i berikade burar närmar sig objektet snabbare (Forkman *et al.*, 2007).

Tonic immobility

Tonic immobility (TI), även kallat hypnos eller immobilitet, är ett icke-inlärt beteende som kännetecknas av ett katatoni-liknande tillstånd som varar i sekunder upp till timmar. Det har kunnat utlösas hos flera djurslag (bland annat fågel, kanin och råtta) (Koolhaas *et al.*, 1999).

Ett försök av Jones och Faure (1981) som utfördes på vuxna höns undersökte sex olika induktionsmetoder och drog slutsatsen att följande induktion gav bäst möjlighet att inducera TI. Varje fågel testades endast en gång med varje induktionsmetod. Fågeln lades på rygg i en "vagga" av trä täckt av en filt. Därefter immobiliserades fågeln genom att en hand placerades på sternum i 15 sekunder. Handen togs därefter bort och personen som utförde experimentet tog försiktigt ett steg i riktning från fågeln. Då handen släpptes från sternum började tidtagningen. Om durationen av TI (tiden till dess att fågeln tar sig upp ur liggande läge) var mindre än 10 sekunder räknades det som att TI inte kunnat induceras. Om tiden var längre än 10 sekunder räknades det som en positiv TI och tiden för duration av TI antecknades. Man antecknade även tid till första huvudrörelse och antal huvudrörelser under TI. Huvudrörelse definierades som rörelse av huvudet i syfte att undersöka omgivningen. Om durationen av TI var längre än 20 minuter rättades fågeln av observatören och maxtid (1200 sekunder) antecknas. Fåglarna som användes var cirka 7 månader gamla och av rasen white leghorn. Vid användning av denna metod lyckades induktion av TI vid alla försök, därmed kunde stressen för fåglarna minimeras då de behövde hanteras så lite som möjligt. Jones och Faure (1981) gjorde tolkningen att TI förstärktes då fåglarna blev mer mekaniskt immobiliserade av "vaggans" sidor.

Ett uppföljande experiment (Jones & Faure, 1981) där ovanstående induktionsmetod testades på 4 månader gamla fåglar av raserna brown leghorn, white leghorn och en korsning mellan rhode island red och light sussex visade att tuppar hade signifikant längre tider än honor gällande tid till första huvudrörelse. Honor hade även fler huvudrörelser innan rättning än tuppar. Tuppar hade en tendens att rätta sig själv utan att först utfört huvudrörelser. Det fanns dock ingen könsberoende skillnad gällande duration av TI. De signifikanta könsskillnaderna gällande huvudrörelser innebar att Jones och Faure (1981) föreslog att TI har två faser, en katatoni-liknande fas och en fas där fågeln ser sig omkring innan den slutligen rättar sig. Jones och Faure (1981) föreslog även att termen "tonic immobility" enbart ska gälla den första fasen då fågeln ligger helt stilla. Fortsatt visade försöket att korsningarna hade signifikant kortare duration av TI och tid till första huvudrörelse.

Faktorer som påverkar TI

Personen som utför experimentet har stor betydelse vid utförande av TI-test. Gallup *et al.* (1972) fann att kycklingar som inducerades då personen som utförde experimentet inte fanns i synfältet hade signifikant kortare duration av TI än kycklingar som inducerades på konventionellt sätt där personen som utförde experimentet fanns i kycklingens synfält. Ett uppföljande experiment resulterade i längre perioder av TI om personen som utförde induktionen tittade på kycklingen på nära håll (Gallup *et al.*, 1972). Personen som utför experimentet kan anses spela rollen av ett rovdjur och på så sätt förlänga tiden för TI genom ögonkontakt. I ett försök på vuxna honor fann man däremot att huruvida fågeln hade personen som utförde försöket i synfältet eller inte på inget sätt påverkade tid till rättning efter TI. En av hypoteserna bakom varför man i detta försök inte fann en skillnad är att vuxna fåglar har mer erfarenhet av människor och att de därför är mindre rädda (Jones, 1989).

I ett försök av Hrabcakova *et al.* (2012) som gjordes på fasaner fann man att honor i berikade burar (sittpinnar samt gömställe) hade signifikant kortare duration av TI än de som levde i konventionella burar (gallerburar i två våningar). En annan studie fann ingen signifikant skillnad

gällande duration av TI mellan hönor boende i bursystem jämfört med frigående hönor vid TI test gjorda på fåglarna vid 30 veckors ålder. Då samma test upprepades vid 70 veckors ålder fann man dock att hönor boende i bursystem hade en signifikant längre duration av TI än frigående hönor. Alla fåglar föddes upp i samma miljö fram till 15 veckor då de flyttades till bursystem respektive frigående inhysning (Hansen *et al.*, 1993).

Validering

Validering av tester kan göras genom att jämföra det med andra utförda tester på individnivå. Man har funnit positiv korrelation mellan TI-test och andra rädslobaserade tester, som open-field och emergence. De två vanligaste testerna för att utvärdera rädsla hos höns är TI och novel arena test. Andra tester som används är novel object, human approach och emergence test (Forkman *et al.*, 2007).

Det finns starka bevis för att duration av TI är ett mått på rädsla. Det finns även bevis på att duration av TI är ett mer sensitivt mått på rädsla än antal induktioner. Obehagliga händelser innan testet ökar durationen. Regelbunden hantering minskar durationen av TI. TI test är ett väl validerat test. Eftersom det även finns bevis för att flera omständigheter påverkar testet bör hantering före testet och observatörens närvaro vara standardiserad (Forkman *et al.*, 2007).

Bakgrunden till TI

Teorin bakom varför flertalet djurslag reagerar med TI då de blir fasthållna i ryggläge är att det är evolutionärt fördelaktigt för bytesdjur. Rovdjur aktiveras i jakten av bytesdjurets flyktbeteende. Genom att istället vara helt stilla kan bytesdjuret få en chans att komma undan om rovdjuret släpper koncentrationen på jakten. Ögonkontakt under inducering av TI förlänger tiden till rättning vilket indikerar att TI stimuleras när rovdjuret har sin uppmärksamhet på bytesdjuret (Gallup *et al.*, 1971, Gallup *et al.*, 1972).

Det finns bevis för att kortikosteron har en viktig roll vid inducering av rädsleorsakad immobilitet. Studier på råttor har visat att adrenalectomi leder till minskad duration av immobilitet. Administrering av kortikosteron återställde beteendets längd. En annan studie på råttor visade att behandling med metyrapone, en inhibitor av kortikosteroidsyntesen, leder till att durationen av rädsleorsakad immobilitet minskar. Mineralkortikoidreceptorer i limbiska systemet har 10 gånger så hög affinitet till kortikosteron som glukokortikoidreceptorer. Detta kan vara orsaken till att immobilitetsreaktioner kan uppstå mycket snabbt i en rovdjursrelaterad situation (Koolhaas *et al.*, 1999).

Fysiologiska tester

Heterofil/lymfocyt ratio

Flera försök har visat att det finns ett samband mellan stress och heterofil/lymfocyt (H/L) ratio (Gross & Siegel, 1983). H/L ratio räknas ut genom att i blodutstryk räkna antalet heterofiler och dividera det med antalet lymfocyter räknade i samma blodutstryk. Då fågeln utsätts för stress ökar denna kvot vilket beror på samtidig heterofilos (högt antal heterofiler i blodet) och lymfopeni (lågt antal lymfocyter i blodet). Lymfopenin orsakas av att lymfocyter omdistribueras i kroppen. De förflyttas från cirkulationen till vävnad som till exempel lymfoida organ.

Ökning av H/L ratio till följd av stress beror åtminstone delvis på ökning av kortikosteron. Vanligen följer ökningen av H/L ratio ökning av kortikosteron i blodet vid stress. Det finns dock studier som har visat att detta inte alltid stämmer (Scanes, 2016). Kortikosteroider mäts hos flertalet djurslag som ett mått på stress. Detta har även gjorts på fjäderfä. Det har dock visats att H/L ratio är ett mer pålitligt mått på stress än nivån av kortikosteroider i blodet. Orsaken till detta är multifaktoriell. Nivån av kortikosteroider i blodet är beroende av flera faktorer och fluktuerar över tid medan antalet cirkulerande heterofiler och lymfocyter är en mer stabil fysiologisk företeelse. Kortikosteroider indikerar främst kortvarig stress medan H/L ratio är ett bättre mått för stressnivån över ett längre tidsperspektiv (Gross och Siegel, 1983).

En studie av tre veckor gamla kycklingar visade att leukocytsvaret efter en enskild injektion av ACTH visade sig vara bifasiskt. Initialt sågs en leukocytopeni (lågt antal leukocyter i blodet) som övergick i leukocytos (høgt antal leukocyter i blodet) efter 4-6 timmar. Leukocytos fanns även vid provtagning 12 timmar efter administrering av ACTH. Normala nivåer av leukocyter är återställda 24 timmar efter ACTH-injektion. Vid differentialräkning (räkning av olika typer av leukocyter) sågs att andelen lymfocyter var tillbaka inom normalvariation 1-2 timmar efter ACTH-administration. Den leukocytos som följde berodde på att antalet heterofiler ökade. Ökningen av heterofiler kvarstod 24 timmar efter ACTH-administrering. Antalet stora mononukleära celler (stora lymfocyter och monocyter), eosinofiler och basofiler påverkades inte signifikant av injektionen av ACTH. Injektionen av ACTH inducerade en signifikant högre plasmakoncentration av kortikosteron än injektion av steril koksaltlösning. Intramuskulär injektion av steril koksaltlösning ökade plasmakoncentrationen av kortikosteron med det dubbla efter 2 timmar och koncentrationen var tre gånger så stor efter 12 timmar (Davison & Flack, 1981).

Heat shock proteins (HSP)

Heat shock proteiner (HSP) är cytoprotektiva akutfasproteiner som börjar produceras då cellen utsätts för stress av olika slag, exempelvis värmestress, toxicitet eller infektion. De uttrycks dock även under normala förhållanden, bland annat under inverkan av prostaglandiner (Santoro, 2000). Det finns tecken på att ökningen medieras av HPA-axeln (Zulkifli *et al.*, 2014). HSP inordnas i grupper utifrån molekylernas storlek, dessa är hsp100, hsp90, hsp70, hsp60, hsp40 och små hsp. De olika varianterna syntetiseras till följd av olika former av cellulär stress eller under normala förhållanden. I däggdjursceller fungerar HSP som chaperoner vilka ansvarar för att proteiner sätts ihop och viks på korrekt sätt samt att de förflyttas till rätt del av cellen. I denna funktion är de cytoprotektiva och skyddar cellen från skadliga effekter av stress (Santoro, 2000).

En studie av Zulkifli *et al.* (2014) visade att HSP, trots förhöjda nivåer av kortikosteron i blodet, återgick till normala nivåer 4 dagar efter avslutade kortikosteron-injektioner. En form av HSP återgick dock inte till normala nivåer ens 24 dagar efter avslutandet. Studien visar på att akutfasproteiner kan användas som en indikator på stress hos kycklingar (Zulkifli *et al.*, 2014).

Kortikosteron

Kronisk stress inducerad av ett oregelbundet utfodringsschema (nutritionell stress förelåg ej då hönorna utfodrades ad libitum) resulterade i att plasmakoncentrationen av kortikosteron och HSP samt H/L ratio ökade. Två grupper av hönor (white respektive brown leghorn) som hade

signifikant skilda resultat vid inducering av TI hade inte skillnader i plasmakoncentration av kortikosteron efter stressperioden. Detta kan bero på att de höner med längre duration av TI trots en större höjning av kortikosteron vid akut stress får en lägre långsiktig ökning vid kronisk stress då negativa feedbacksystem i HPA-axeln reagerar (Pusch *et al.*, 2018).

Anpassningsbara kycklingar

Att minska stress hos våra livsmedelsproducerande djur är en prioritet för alla som är inblandade i livsmedelskedjan. För att förebygga stress är det viktigt att tillgodose fåglarnas naturliga behov som sandbadning, födosöksbeteende och möjlighet att sitta upphöjt. Om dessa beteenden inte tillgodoses leder det till rädsla och stress. Detta kan leda till problembeteenden som exempelvis fjäderplockning som är ett lidande för individen och att äggläggning sker på fel plats i miljön (så kallade golvägg) vilket skapar stora merkostnader för äggindustrin. Mindre stressade fåglar leder även till minskad sjukdom och ökad produktion vilket ger en bättre hållbarhet för industrin (Black, 1994). Det är väl känt att uppfödningssmiljön har betydelse för värphöns välmående i vuxen ålder (Janczak & Riber, 2015). Ett steg i detta arbete är att undersöka hur viktig den tidiga utvecklingen är för hur djuren senare i livet klarar att anpassa sig till stress vid till exempel hantering och transporter.

Denna studie ingår i ett större projekt vilket har till syfte att undersöka hur upplevelser under den tidiga utvecklingen har betydelse i vuxen ålder. För att utvärdera hur miljön under kycklingens 4 första veckor påverkar dess långvariga stressnivå har jag inom ramen av detta arbete valt att använda mig av ett beteendetest, TI, och ett immunologiskt test, H/L ratio. Dessa två test är valda då de är väl använda inom forskningen och visat sig vara stabila mått på rädsla/stress. Vid 4 veckors ålder bytte hälften av fåglarna inredning i boxen till en inredningsvariant som gav fler eller färre valmöjligheter medan den andra hälften av fåglarna fortsatte ha samma sorts inredning även under resten av uppfödningssperioden som är totalt 15 veckor. Därefter flyttas fåglarna till ett värphönsstall och följs till 26 veckors ålder. Detta arbete fokuserar på data som insamlats då kycklingarna varit i ålder 0-7 veckor.

Hypotesen är att de kycklingar som får tillgång till en mer komplex miljö får fler möjligheter att anpassa sig till sin miljö och därför kan hantera stress bättre. Varierande strömedel och typer av sittpinnar stimulerar beteenden på skilda sätt och i olika grad. En mer komplex miljö ger därför fåglarna möjlighet att ha ett mer komplext beteendemönster. Arbetets hypotes är att den mer komplexa beteendepertoaren leder till att fåglarna upplever en lägre nivå av stress, och därför kan hantera tillfälliga stressorer med lägre nivåer av stress och rädsla, än fåglar som lever i en mindre komplex miljö.

Om hypotesen stämmer bör uppfödning av värphöns ses över så att miljön förbereder kycklingarna på den miljö de ska leva i som vuxna i syfte att minska stress hos djuren.

MATERIAL OCH METOD

Fåglarna

De 364 fåglarna som ingick i projektet var höns av en vanligt förekommande värphönshybrid ”Bovans Robusta”. De kom till försöksanläggningen direkt från kläckeriet den första oktober 2019. Fåglarna blev då ringmärkta med individuellt nummer och inhystes gruppvis i boxar (245x120x180 cm). Gruppindelning skedde slumpvis med hänsyn till att fåglarnas totala vikt var ungefär densamma i varje box. Box 1-4 innehöll 22 kycklingar var medan box 5-16 innehöll 23 kycklingar var.

Skötseln

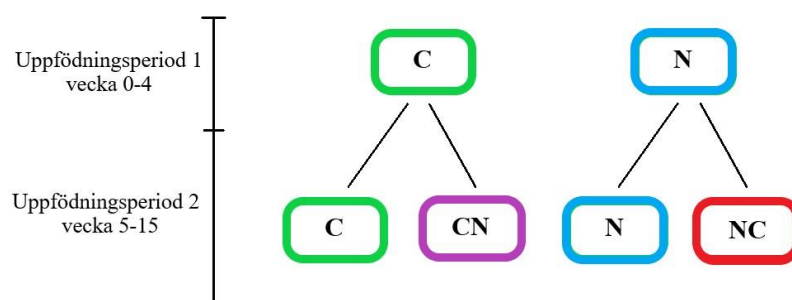
Lokalen där fåglarna levde under uppfödningstiden (0-15 veckor) var fullt belyst 20 h den första dagen, 18 h den andra dagen och 16 h under resten av den första veckan. Därefter hade fåglarna ljus enligt följande: andra veckan 14 h/dag, tredje veckan 13 h/dag, fjärde veckan 12 h/dag, femte veckan 11 h/dag och därefter 10 h/dag. Foder och vatten tillhandahölls ad lib. Tillsyn av fåglarna skedde minst 2 gånger/dag (morgon och eftermiddag).

Boxarna

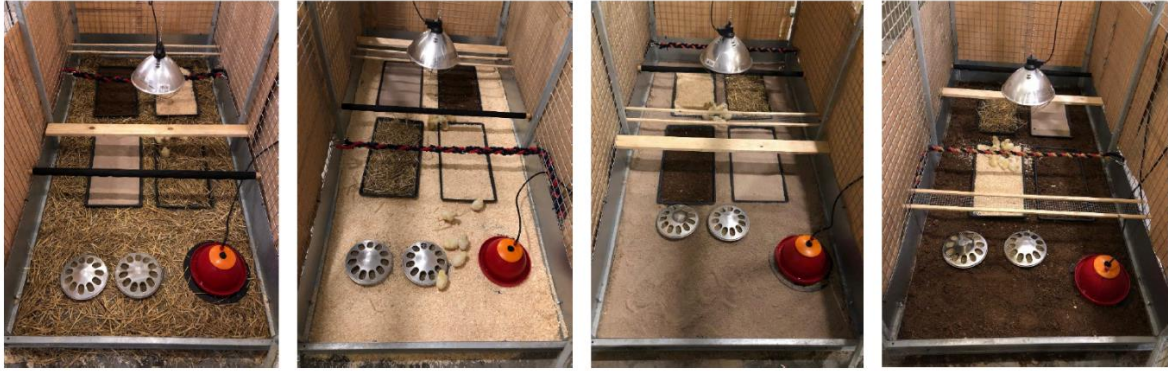
Alla boxar placerades i samma lokal. Inredningen i boxarna bestod av bottenströ (0-4 veckor), 4 lådor med strö, 4 sittpinnar samt foder, vatten och värmelampa (vecka 1-4). Den nedre delen av boxarnas väggar täcktes för att förhindra att fåglar i olika boxar såg varandra.

Behandlingarna

Under uppfödningsperiod 1 (0-4 veckor) tilldelades hälften av fåglarna (182 fåglar fördelade i 8 boxar) behandling C (choice) och den andra hälften (182 fåglar fördelade i 8 boxar) tilldelades behandlingen NC (no choice) (bild 1). Behandling C (choice) innebär att fåglarna har tillgång till 4 sorters strö (torv, sand, spån och halm) och 4 sorters sittpinnar (rund pinne, platta sittpinnar av trä, träram med hönsnät och flätat rep). Behandling N (no choice) innebär att fåglarna har tillgång till en sorts strö och en sorts sittpinne. Inredningen är kombinerad i åtta varianter (bild 2-9). Kombinationerna av strömaterial och sittpinnar i boxar med behandling N har valts ut på basis av ett pilotprojekt där olika strö och sittpinnar graderats i enlighet med fåglarnas preferenser. Det mest prefererade bottenströet har kombinerats med den minst prefererade varianten av sittpinne osv.



Figur 1. Schema över behandlingsgrupper. C= Choice. N = No choice. CN = Choice-no choice. NC = No choice-choice.



Figur 2-5. Visar choice-inredning under uppfödningensperiod 1. Alla varianter av inredning ger fåglarna tillgång till alla sorters strö och sittpinnar. Bottenströ består av en av de fyra strösorterna. Foto: Lena Skånberg.



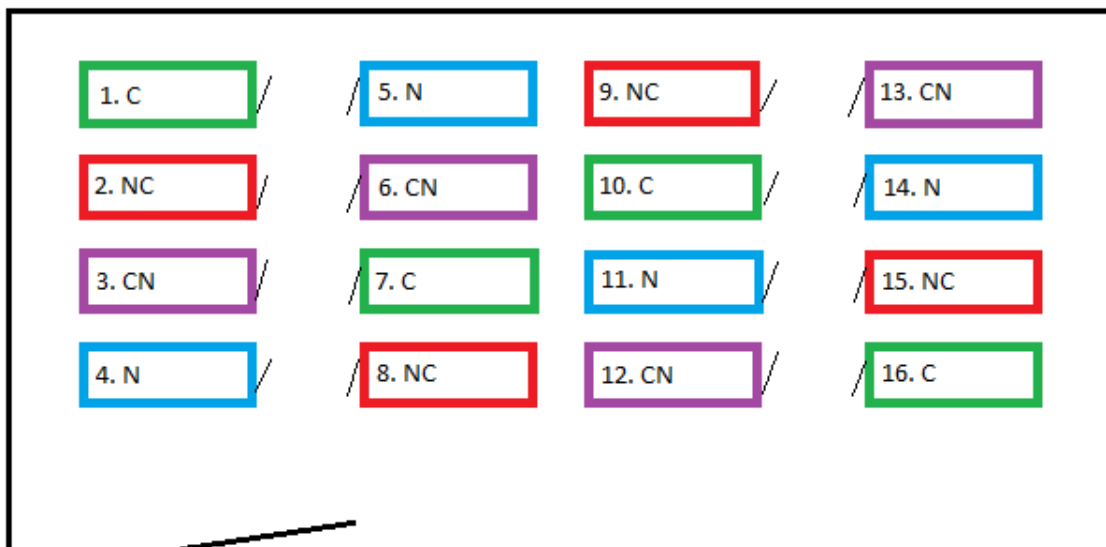
Figur 6-9. Visar "no choice"-inredning under uppfödningensperiod 1. Från vänster: runda sittpinnar kombineras med halm, sittpinnar av rep kombineras med spån, platta sittpinnar av trä kombineras med sand och sittpinnar av stål nät med ram av trä kombineras med torv. Foto: Lena Skånberg.

Efter 4 veckor anpassas inredningen till fåglarnas ålder samtidigt som de 4 boxarna i behandlingsgrupp CN byter från C-inredning till N-inredning och de 4 boxarna i behandlingsgrupp NC byter från N- till C-inredning (bild 1). Lådorna med strö byts ut mot djupare lådor (78x56x18 cm, 55 L) och boxarna har inte längre något bottenströ (bild 10-11). Choice-boxarna ser hädanefter likadana ut medan no choice-boxarna även fortsättningsvis finns i fyra varianter.



Figur 10-11. Då fåglarna är 4 veckor förändras inredningen i boxarna genom att bottenströ tas bort och ströet erbjuds i större plastlådor än tidigare. Bild 10 föreställer en variant av no choice-inredning där fåglarna erbjuds torv och sittpinnar av stål nät i träram. Bild 11 föreställer choice-inredning. Foto: Lena Skånberg.

Vilken box som får vilken behandling tilldelades på ett balanserat sätt för att få en jämn rumslig påverkan mellan behandlingsgrupperna.



Figur 12. Boxarnas placering i inhysningslokalen. Ingången till lokalen är markerad i nederkant.

Försök

TI

TI-test utfördes vid två tillfällen på 11 fåglar i varje box. Urval av vilka individer som testades gjordes slumpmässigt vid det första testtillfället. Dessa fåglar märktes med en röd benring. Vid det andra tillfället testades samma fåglar som vid det första testet. Vid det första testtillfället var

fåglarna 4 veckor och vid det andra testtillfället var fåglarna 7 veckor. Vid det andra TI-testet hade en av fåglarna tagits ur studien på grund av att det visat sig vara en tupp. Denna fågels resultat från det första TI-testet används inte i statistiken. Antal testade fåglar i box 1 är av detta skäl 10.

Fåglarna infångades enligt en metod som är gemensam för alla testutförare samt alla infångningstillfällen. En kartong försedd med lufthål användes för förflyttning och förvaring av fåglarna. Vid det första testtillfället utfördes infångningen av fåglarna av två personer och vid det andra testtillfället utfördes infångningen av en person. Vid första tillfället utfördes infångningen av andra personer än testutföraren. Vid det andra testtillfället var det samma person som utförde testet och fångade in fåglarna. Innan infångning av fåglar togs den andra sittpinnen från dörren bort och kartongen placerades till vänster i boxen. Infångaren satte sig på huk till höger om kartongen och fångade in alla 11 fåglar som skulle testas. Kartongen med fåglar flyttades sedan till testplatsen där fåglarna plockades upp en och en för testning. TI-testen utfördes i samma lokal som fåglarna inhystes i, men utanför boxarna.

Inför TI-testet fångades en slumpmässig fågel in från kartongen på ett så lugnt sätt som möjligt för att minska stressen för fåglarna. Fågeln hölls mot kroppen med båda händerna medan den bars till test-bordet. Inför TI-testet hölls fågeln med båda händerna. Huvudet är riktat bort från testutföraren. Därefter roterades fågeln åt vänster och placerades i dorsalt läge i vaggan. Höger hand hölls lätt på sternum och vänster hand hölls framför huvudet utan att röra fågeln. Denna ställning hölls i 15 sekunder. Testutföraren tittade inte på fågelns huvud under hela testets utförande. Om fågeln inte kunde hållas i dorsalläge under 15 sekunder samt 3 sekunder efter att händerna flyttats bort räknades det som ett misslyckat induktionsförsök. Maximalt tre försök till inducering av immobilitetsreaktion gjordes. I de fall inducering av TI inte lyckades efter tre försök registrerades talet 1 för tid till första huvudrörelse, tid till första vokalisation och duration av TI, talet 4 registrerades för antal induktioner.

Maximal tid för ett djur att vara immobil sattes till 300 sekunder. Om fågeln inte rättade sig inom 300 sekunder avbröts testet och tiden 300 sekunder registrerades som duration av TI. I de fall fågeln inte vokaliserade under den tid de är i TI registrerades tiden 300 sekunder. Om fågeln inte rörde på huvudet innan den rättade sig registrerades tiden för duration av TI även för tid till huvudrörelse.

Kontroll och registrering av fågelns identitetsnummer, boxnummer, testutförare, testordning inom box (1-11) samt start och sluttid för boxen gjordes efter TI-testets slutförande. Den testade fågeln fördes tillbaka till sin box innan en ny fågel togs från kartongen för att påbörja ett nytt test.

H/L ratio

Blodprov togs från fåglarna vid 6 veckors ålder. Fåglarna fångades av en person enligt en förutbestämd metod. Alla personer som fångade in fåglar använde samma metod. Denna metod är densamma som användes för infångning inför TI-test. Proceduren beskrivs ovan.

En person tog blodprov och en andra person gjorde blodutstryk omedelbart efter blodprovstagningen. Blodprov togs från vena jugularis dextra från samma individer som man tidigare TI-testat (10 eller 11 fåglar) Under blodprovstagning hölls fågeln i lateralt läge med höger kroppssida uppåt. Fågelns hals hölls mellan vänster pek- och långfinger samtidigt som venen stasades med vänster tumme. Fjädrarna blöttes med sprit för att underlätta visuell kontakt med blodkärlet. Blodprovet togs därefter med höger hand. Sprutor (2 ml) prepreparerade med EDTA användes. Maximalt 1,5 ml blod togs från varje fågel. Individnummer och boxnummer samt utförare av blodprov och utstryk kontrollerades och registrerades efter att blodprovet tagits.

Därefter gjordes blodutstryk lege artis (Walberg, 2001). Objektglas med blodutstryk märks med fågelns identitetsnummer samt boxnummer och datum. Dessa torkades på plats och färgades vid ett senare datum.

Färgning gjordes genom att blodutstryken nedsänktes 3 minuter i May-Grünwald-färgvätska, därefter cirka 1 minut i kranvatten och sist i Giemsa-färgvätska i 18 minuter. Därefter fick blodutstryken torka. En person hanterade blodutstryken och en andra person var ansvarig för att tiderna hölls.

Differentialräkning av leukocyter inkluderade i detta arbete är utförda av en person. På grund av tidsbegränsning inkluderar detta arbete data från avläsning av utstryk från fåglar i box 9-16 (87 fåglar), dvs. hälften av de fåglar som man provtagit vid detta tillfälle. Avläsning gjordes vid 100x förstoring med användning av olja. Avläsning påbörjades genom att blodutstryk placerades med den ursprungliga bloddroppen till vänster om avläsningsstället. Därefter förflyttades synfältet till höger tills det att ett lämpligt avläsningsställe hittades. För korrekt avläsning ska cellerna inte röra vid varandra. När lämplig plats hittades påbörjades avläsning samtidigt som synfältet flyttas från avläsaren. Avläsning fortsatte tills 100 leukocyter räknats. Cellerna registrerades som lymfocyter (L), heterofiler (H), monocyter, eosinofiler eller basofiler.

Därefter räknades H/L ratio ut för varje fågel genom att heterofilantalet dividerades med lymfocytantalet.

Statistisk analys

Data från försöken registrerades i Excel och analyserades i R med hjälp av testen LMM (Linear mixed models) för normalfördelade data (boxnummer som "random effect", behandling som "fixed effect") och Kruskal-Wallis för icke normalfördelade data. LMM användes för att analysera duration av TI, tid till första huvudrörelse vid TI test (testtillfälle 1) samt individuell skillnad för samtliga parametrar (duration av TI, tid till första huvudrörelse vid TI test och tid till första vokalisering vid TI test) mellan testtillfälle 1 och testtillfälle 2. Kruskal-Wallis användes för analys av tid till första vokalisering vid TI test, antal induktionsförsök vid TI test, tid till första huvudrörelse vid TI test (testtillfälle 2) samt samtliga analyser av H/L ratio.

RESULTAT

Syftet med detta arbete är att undersöka om det finns skillnader i stressnivå mellan de olika behandlingsgrupperna. Hypotesen är att de kycklingar som haft tillgång till choice-inredning under livets 4 första veckor har en lägre stressnivå än fåglar som haft tillgång till no choice-inredning under samma period. För att undersöka fåglarnas stressnivåer har jag använt mig av TI-test då fåglarnas ålder var 4 och 6 veckor samt blodprov och uträkning av H/L ratio då fåglarna var 7 veckor.

TI-resultat

Vid initiala tester sågs att vilken ordning fåglarna testades i påverkade testresultatet i flertalet analyser. Ordningen som fåglarna testades i togs med för variabler analyserade med LMM. I Kruskal Wallis-test användes genomsnitt per bur, och testordningen anses härmed utjämnas då alla boxar hade samma genomsnittliga testtid. Eftersom fåglar i samma box påverkar varandra korrigerades resultatet även för vilken box den testade fågeln tillhörde. Inga interaktioner hittades mellan vilken person som utförde testet och resultatet.

TI-testtillfälle 1

Vid testtillfälle 1 (4 veckors ålder) har de fåglar som haft choice-inredning kortare genomsnittlig tid för duration, genomsnittlig tid till första vokalisering, genomsnittlig tid till första huvudrörelse samt genomsnittligt antal induktionsförsök än de fåglar som levt i no choice-inredning (tabell 1).

Tabell 1. Tabell över korrigerade medelvärden samt standardfel gällande tid till första vokalisering, tid till första huvudrörelse, duration av TI och antal induktionsförsök vid testtillfälle 1 (fåglarnas ålder 4 veckor). Tabellen visar även antal testade fåglar

	Medelvärde av tid till första vokalisering (sekunder)	Medelvärde av tid till första huvudrörelse (sekunder)	Medelvärde av duration av TI (sekunder)	Medelvärde av antal induktionsförsök	Antal testade fåglar
Testtillfälle 1	86.3 ± 8.6	110.7 ± 6.9	164 ± 7.7	1.10 ± 0.02	175
C	83.9 ± 3.9	104.0 ± 14.3	161 ± 14.8	1.05 ± 0.03	87
N	89.4 ± 19.1	121.0 ± 14.2	174 ± 14.6	1.14 ± 0.04	88

Skillnaden mellan behandlingsgrupper gällande duration av TI var inte signifikant ($F_{1,14}=0.37$, $p=0.55$, LMM).

Skillnaden mellan behandlingsgrupper gällande tid till första vokalisering var inte signifikant ($\chi^2 = 1.59$, $df=1$, $P=0.21$, Kruskal-Wallis test) (tabell 1).

Skillnaden mellan behandlingsgrupper gällande tid till första huvudrörelse var inte signifikant ($F_{1,14}=0.37$, $p=0.55$, LMM).

Skillnaden var inte signifikant gällande genomsnittligt antal induktionsförsök per fågel ($\chi^2 = 2.4$, $df=1$, $p=0.12$, Kruskal-Wallis test) (tabell 1).

Testtillfälle 2

Vid testtillfälle 2 har fåglarna gått in i uppfödningens period 2 vilket innebär att alla boxar har fått djupare strölådor och saknar nu bottenströ. Hälften av boxarna har bytt inredning (från choice till no choice eller tvärt om). Den andra hälften av boxarna har samma sorts strömedel och sittpinnar som de haft tidigare. Fåglarna är från och med nu uppdelade i fyra behandlingsgrupper (C, CN, N och NC).

Tabell 2. Tabell över medelvärde och standardfel vid testtillfälle 2 för respektive behandlingsgrupp gällande tid till första vokalisering, tid till första huvudrörelse, duration av TI och antal induktionsförsök. Inkluderar även antal testade fåglar per behandlingsgrupp

	Medelvärde av tid till första vokalisering (sekunder)	Medelvärde av tid till första huvudrörelse (sekunder)	Medelvärde av duration av TI (sekunder)	Medelvärde av antal induktionsförsök	Antal testade fåglar
Testtillfälle 2	133.4 ± 8.4	64.4 ± 6.8	121 ± 7.6	1.09 ± 0.03	175
C	115.0 ± 17.0	57.9 ± 4.7	117 ± 16.0	1.10 ± 0.05	43
CN	136.4 ± 18.2	57.4 ± 5.5	115 ± 15.8	1.09 ± 0.04	44
N	136.7 ± 17.0	78.1 ± 11.2	128 ± 15.8	1.09 ± 0.07	44
NC	145.2 ± 17.1	66.3 ± 7.4	125 ± 15.8	1.05 ± 0.03	44

Skillnaden mellan behandlingsgrupper gällande duration av TI ($F_{1,14}=0.13$, $p=0.94$, LMM), tid till första vokalisering ($\chi^2=2.32$, $df=3$, $p=0.51$, Kruskal-Wallis test), tid till första huvudrörelse ($\chi^2=3.79$, $df=3$, $p=0.28$, Kruskal-Wallis test) och genomsnittligt antal induktionsförsök ($\chi^2=1.07$, $df=3$, $p=0.79$, Kruskal-Wallis test) var inte signifikanta (tabell 2).

Effekt av större valfrihet under uppfödningens period 1

De behandlingsgrupper som haft choice-inredning under de 4 första veckorna (C och CN) har lägre genomsnitt för duration av TI, tid till första vokalisering och tid till första huvudrörelse än de behandlingsgrupper som haft no choice-inredning under dessa veckor (N och NC) (tabell 3). Det finns dock inga statistiskt signifikanta skillnader för duration av TI ($F_{1,14}=0.43$, $p=0.52$, LMM), tid till första vokalisering ($\chi^2=1.43$, $df=1$, $p=0.23$, Kruskal-Wallis test), tid till första huvudrörelse ($\chi^2=0.50$, $df=1$, $p=0.48$, Kruskal-Wallis test) samt antal induktionsförsök per fågel ($\chi^2=2.04$, $df=1$, $p=0.15$, Kruskal-Wallis test) mellan behandlingsgrupperna för det andra testtillfället (tabell 3).

Tabell 3. Tabell över medelvärde och standardfel vid testtillfälle 2 för respektive behandlingsgrupper gällande tid till första vokalisering, tid till första huvudrörelse, duration av TI och antal induktionsförsök. Inkluderar även antal testade fåglar

	Medelvärde av tid till första vokalisering (sekunder)	Medelvärde av tid till första huvudrörelse (sekunder)	Medelvärde av duration av TI (sekunder)	Medelvärde av antal induktionsförsök	Antal testade fåglar
Testtillfälle 2	133.4 ± 8.4	64.4 ± 6.8	121 ± 7.6	1.09 ± 0.03	175
C och CN	125.9 ± 12.3	57.6 ± 3.6	115 ± 11.7	1.10 ± 0.03	87
N och NC	141.0 ± 11.8	72.2 ± 6.7	126 ± 11.7	1.07 ± 0.04	88

Effekt av behandlingsbyte

Fåglar från de boxar som bytt inredning vid 4 veckors ålder (CN och NC) hade något lägre genomsnittlig duration av TI, genomsnittlig tid till första huvudrörelse och genomsnittligt antal induktionsförsök än de grupper som fått en förändring i inredningen men inte bytt vilka strömedel och sittpinnar de haft tillgång till (C och N). Behandlingsgrupper C och N hade lägre genomsnittlig tid till första vokalisering än behandlingsgrupper CN och NC (tabell 4).

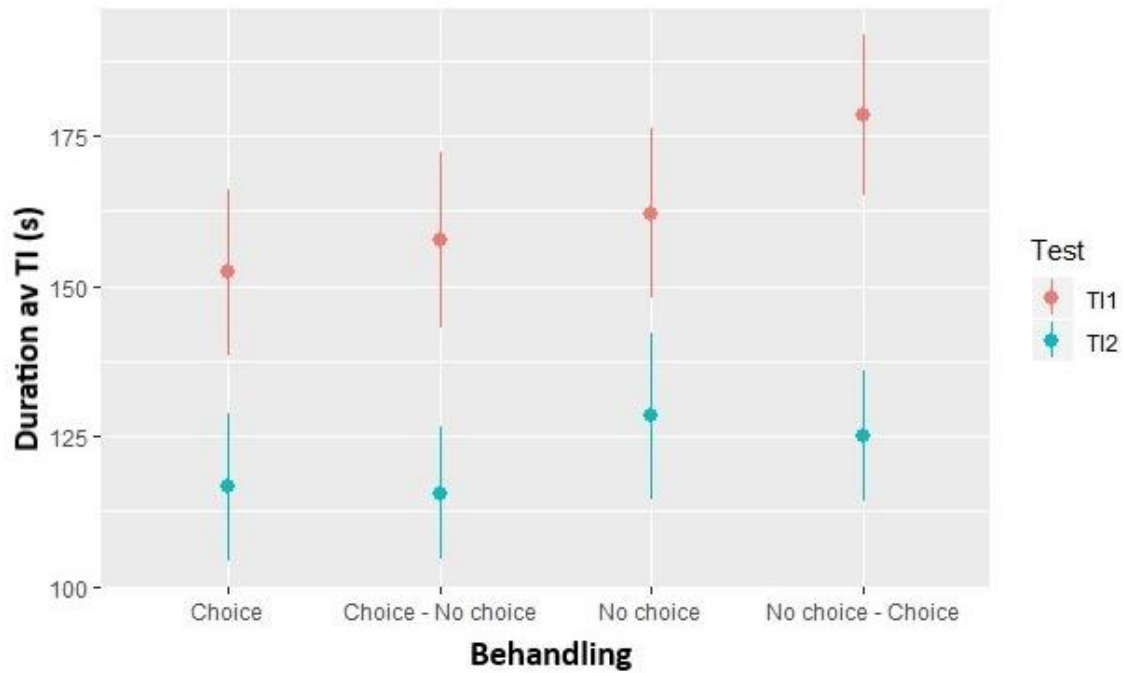
Skillnaden gällande duration av TI ($F_{1,14}=0.01$, $p=0.92$, LMM), tid till första vokalisering ($\chi^2=0.50$, $df=1$, $p=0.48$, Kruskal-Wallis test), tid till första huvudrörelse ($\chi^2=0.03$, $df=1$, $p=0.86$, Kruskal-Wallis test) och antal induktionsförsök ($\chi^2=0.53$, $df=1$, $p=0.47$, Kruskal-Wallis test) var inte signifikanta (tabell 4).

Tabell 4. Tabell över medelvärde och standardfel vid testtillfälle 2 för respektive behandlingsgrupper gällande tid till första vokalisering, tid till första huvudrörelse, duration av TI och antal induktionsförsök. Inkluderar även antal testade fåglar

	Medelvärde av tid till första vokalisering (sekunder)	Medelvärde av tid till första huvudrörelse (sekunder)	Medelvärde av duration av TI (sekunder)	Medelvärde av antal induktionsförsök	Antal testade fåglar
Testtillfälle 2	133.4 ± 8.4	64.4 ± 6.8	121 ± 7.6	1.09 ± 0.03	175
C och N	126.0 ± 11.7	68.1 ± 6.2	121 ± 11.9	1.10 ± 0.04	87
CN och NC	140.8 ± 12.4	61.9 ± 4.6	120 ± 11.8	1.07 ± 0.03	88

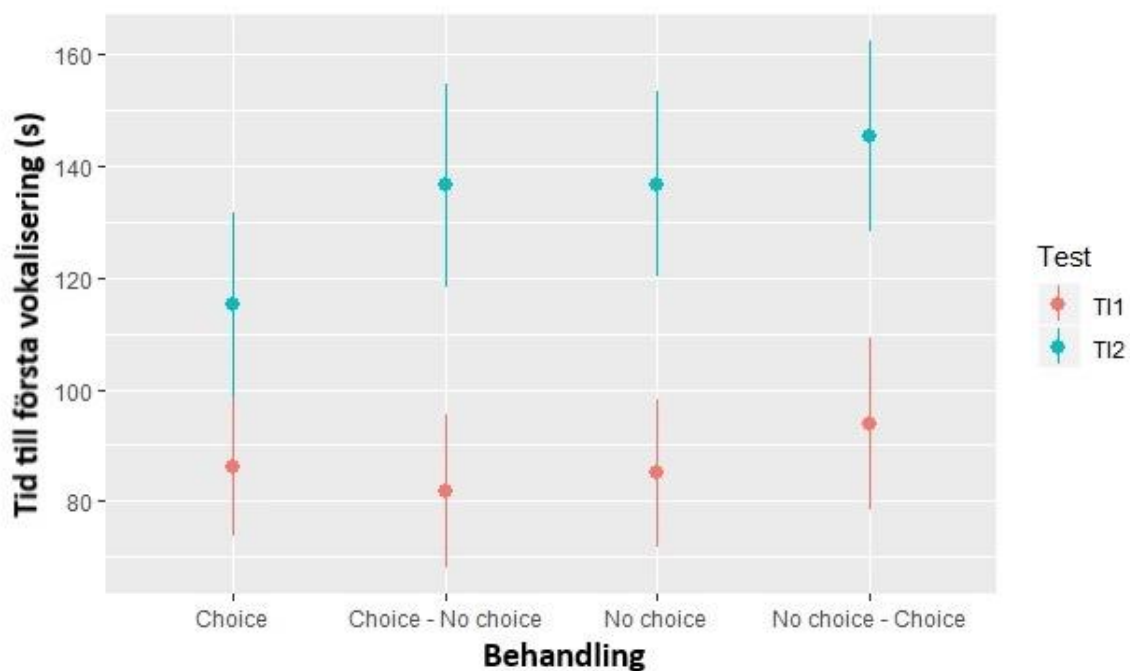
Testtillfällets betydelse

Alla fyra behandlingsgrupper har i genomsnitt kortare duration av TI vid det andra testtillfället än vid det första testtillfället (p-värde för grupp C = 0.04, p-värde för grupp CN = 0.01, p-värde för grupp N = 0.05, p-värde för grupp NC = 0.003). Skillnaden är statistiskt signifikant ($F_{1,320}=22.4$, $p<0.0001$, LMM) (bild 12).



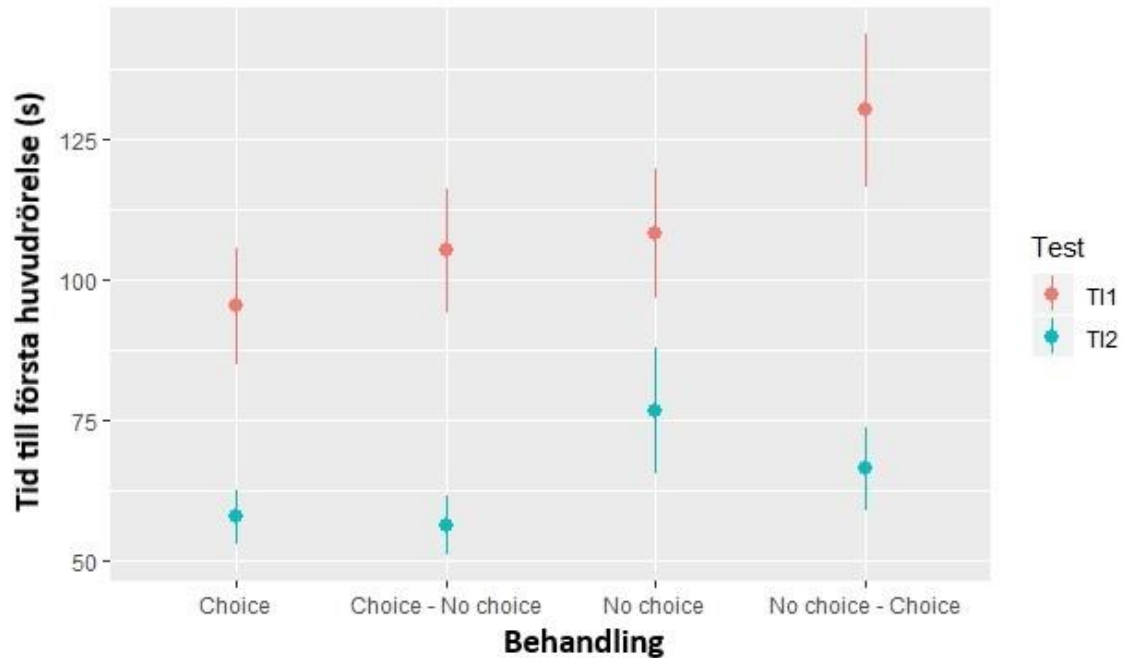
Figur 12. Grafen visar skillnad i duration av TI mellan behandlingar och uppdelat på de två testtillfällena. Grafen är baserad på korrigerade medelvärden och standardfel.

Vad gäller vokalisering har alla behandlingsgrupper i genomsnitt kortare tider till vokalisering vid det andra testtillfället än vid det första testtillfället (bild 13). Skillnaden är statistiskt signifikant för behandlingsgrupper CN ($p=0.01$), N ($p=0.02$) och NC ($p=0.02$) ($F_{3,320}=18.2$, $p<0.0001$, LMM). Även behandlingsgrupp C har i genomsnitt en kortare duration av TI vid testtillfälle 2 än vid testtillfälle 1 men skillnaden är inte statistiskt signifikant ($p=0.18$).



Figur 13. Grafen visar skillnad i tid till vokalisering mellan behandlingar och uppdelat på de två testtillfällena. Grafen är baserad på korrigerade medelvärden och standardfel.

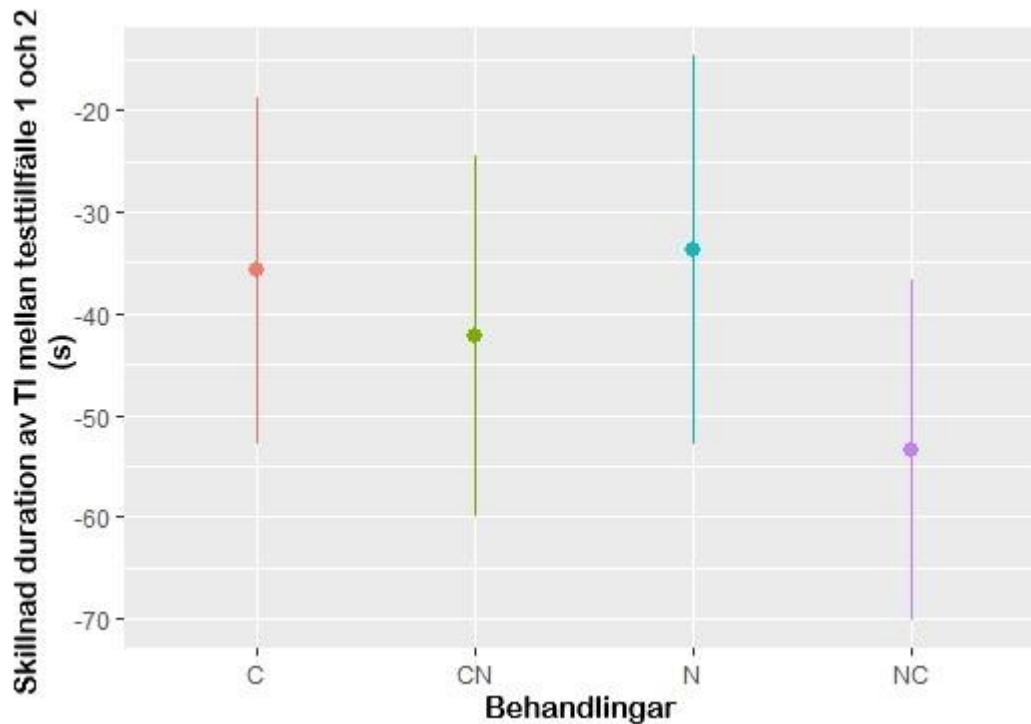
Alla behandlingsgrupper hade i genomsnitt kortare tider vid testtillfälle 2 än vid testtillfälle 1 (bild 14). Skillnaden är statistiskt signifikant för alla behandlingsgrupper ($F_{1,320}=46.8$, $p<0.0001$, LMM). P-värde för behandlingsgrupp C är 0.005. P-värde för behandlingsgrupp CN är 0.0002. P-värde för behandlingsgrupp N är 0.02. P-värde för behandlingsgrupp NC är <0.0001 .



Figur 14. Grafen visar tid till första huvudrörelse för alla behandlingsgrupper uppdelat på testtillfälle 1 resp. 2. Grafen är baserad på korregerade medelvärden och standardfel.

Skillnadens storlek

Behandlingsgrupp C hade en genomsnittlig sänkning av duration av TI som var 35.8 (± 17.0) sekunder. Behandlingsgrupp CN hade en genomsnittlig sänkning som var 42.2 (± 17.7) sekunder. Behandlingsgrupp N hade en genomsnittlig sänkning som var 33.8 (± 19.2) sekunder. Behandlingsgrupp NC hade en genomsnittlig sänkning som var 53.5 (± 16.7) sekunder. Det fanns ingen signifikant skillnad mellan behandlingsgrupper gällande hur stor sänkningen av duration var mellan testtillfälle 1 och 2 ($F_{3,12}=0.07$, $p=0.97$, M).



Figur 15. Grafen visar skillnad gällande duration av TI från testtillfälle 1 och testtillfälle 2. Grafen är baserad på korrigerade medelvärden och standardfel.

De behandlingsgrupper som fått en förändrad miljö efter 4 veckor (CN och NC) hade en genomsnittlig sänkning av duration av TI på $-47.8 (\pm 21.4)$ sekunder och de behandlingsgrupper som inte fått förändrad miljö (C och N) hade en genomsnittlig sänkning av duration som var $-35.1 (\pm 21.4)$ sekunder. Skillnaden var dock inte signifikant ($F_{1,14}=0.18$, $p=0.68$, LMM).

H/L ratio-resultat

De olika behandlingsgrupperna hade små skillnader gällande genomsnittligt H/L ratio (tabell 5). Det fanns dock ingen signifikant skillnad mellan behandlingsgrupper ($\chi^2=1.6$, $df=3$, $p=0.66$, Kruskal-Wallis test).

Tabell 5. Visar medelvärde och standardfel av H/L ratio samt % av heterofiler och lymfocyter vid differentialräkning för respektive behandlingsgrupp

Behandlingsgrupp	Medelvärde av H/L ratio	Medelvärde av antal heterofiler	Medelvärde av antal lymfocyter	Antal testade fåglar
C	0.20 ± 0.02	14.9 ± 0.85	77.5 ± 0.78	21
CN	0.21 ± 0.02	15.5 ± 0.65	75.5 ± 0.92	22
N	0.22 ± 0.02	15.8 ± 0.51	74.5 ± 0.83	22
NC	0.21 ± 0.02	15.1 ± 0.74	75.8 ± 0.74	22

Heterofiler

De olika behandlingsgrupperna har små skillnader i genomsnittlig % av heterofiler (tabell 5). Den största skillnaden sågs mellan behandlingsgrupper C och N. Skillnaden var inte statistiskt signifikant ($\chi^2 = 2.64$, $df=3$, $p=0.45$, Kruskal-Wallis test).

Lymfocyter

Gällande % av lymfocyter i blodutstryken fanns en tendens till skillnader mellan behandlingsgrupperna ($\chi^2 = 6.88$, $df=3$, $p=0.076$, Kruskal-Wallis test). Den största skillnaden fanns mellan behandlingsgrupper C och N, där behandlingsgrupp C hade högst % lymfocyter i blodet medan behandlingsgrupp N hade lägst nivå (tabell 5).

Samband mellan TI-test och H/L ratio för individuella fåglar

I jämförelse mellan parametrar som registrerades under det andra TI-testtillfället och H/L ratio för individuella fåglar sågs inga samband. Inget samband fanns mellan duration av TI och H/L ratio ($t=0.01$, $df=85$, $p=0.99$, Kruskal-Wallis test), mellan tid till första vokalisering och H/L ratio ($p=0,64$) eller mellan tid till första huvudrörelse och H/L ratio ($p=0,30$).

I jämförelse mellan skillnad i duration av TI mellan TI-testtillfälle 1 och 2 och H/L ratio sågs inget samband ($t=-0,51$, $df=85$, $p=0,61$, Kruskal-Wallis test).

DISKUSSION

Syftet med arbetet var att undersöka om fåglar som haft fler valmöjligheter under livets fyra första veckor var mindre stressade än fåglar som haft färre valmöjligheter. För att undersöka fåglarnas stressnivå valdes två test som har god evidens för att visa på rädsla/stress. En längre duration av TI, tid till första vokalisering, tid till första huvudrörelse och antal induktionsförsök visar på en högre nivå av rädsla (Forkman *et al.*, 2007). En högre nivå av rädsla påverkar stressnivån och därför valdes detta test. En högre H/L ratio visar på en högre stressnivå (Gross & Siegel, 1983, Davis *et al.*, 2008). Trots att både TI-test och H/L ratio anses indikera rädsla/stress hos höns finns det studier som i linje med detta försök visat att de två testen inte alltid korrelerar (Campo *et al.*, 2005, Prieto, 2010).

En signifikant skillnad sågs för alla behandlingsgrupper mellan testtillfälle 1 och 2 gällande duration av TI, tid till första huvudrörelse och tid till första vokalisering (förutom tid till första vokalisering gällande behandlingsgrupp C). Efter differentialräkning sågs en tendens till skillnad mellan behandlingsgrupper gällande antal lymfocyter. Ingen annan skillnad sågs mellan behandlingsgrupper för någon av de registrerade parametrarna vid TI-testen eller H/L ratio. Inget samband fanns mellan resultat från TI-test och H/L ratio för enskilda fåglar.

PAR hypotesen kan användas för att hypotisera kring hur fåglarnas första 4 veckor (den tidiga utvecklingen) påverkar senare stressnivåer. Grunden i PAR hypotesen är att kycklingarna förändrar sin fenotyp beroende på hur dess miljö påverkar dem under den tidiga utvecklingen. Genom att få indikationer från miljön under den tidiga utvecklingen har kycklingarna en chans att anpassa sig till en framtida miljö. Om den fenotyp som kycklingarna utvecklar överensstämmer med den framtida miljön får djuren en ökad överlevnad jämfört med om detta inte överensstämmer. För individen kan en diskrepans innebära ökad stress (Bateson *et al.*, 2014). Grundtanken i PAR hypotesen kan appliceras på detta projekt på ett flertal sätt för att utveckla hypoteser och tolka resultat. Hypotesen i detta projekt är att de kycklingar som fått tillgång till en mer komplex miljö utvecklar större förmåga till anpassning eftersom den komplexa miljön tillåter fåglarna att ha en större diversitet i sin beteendepertoar. Denna förmåga till anpassning kommer innebära en lägre stressnivå oavsett om de får en förändrad miljö eller inte vid 4 veckors ålder. De fåglar som haft en mer enformig miljö under vecka 1-4 kommer ha en lägre förmåga till anpassning och därför kommer de bli mer stressade vid förändrad miljö vid 4 veckors ålder. Förmågan till anpassning påverkar även TI-testsituationerna. Hypotesen är att kycklingarna kommer att reagera med mindre rädsla/stress ju högre förmåga till anpassning de har. Vidare hypotiseras att anpassningsförmågan påverkar fåglarnas grundnivå av stress (mäts med hjälp av H/L ratio) där de kycklingar som har en högre förmåga till anpassning kommer vara mindre stressade.

Det fanns en statistiskt signifikant sänkning av duration av TI, tid till första vokalisering och tid till första huvudrörelser mellan TI-testtillfällen 1 och 2 för alla behandlingsgrupper (förutom tid till första vokalisering gällande behandlingsgrupp C). Detta betyder att fåglarna har en lägre nivå av rädsla vid testtillfälle 2 än vid testtillfälle 1. Sänkningen beror troligen på habituering. Eftersom fåglarna är äldre har de även haft mer kontakt med människor och har därför en mins-

kad rädsla för testpersoner. Fåglarna hade vid testtillfälle 2 upplevt testsituationen en gång tidigare och reagerar därför med en lägre nivå av rädsla. Hur fåglarnas ålder i övrigt påverkar TI-test är oklart (Forkman *et al.*, 2007, Prieto & Campo, 2010).

Även om behandlingseffekten på skillnad i sänkning mellan TI-test 1 och 2 inte är signifikant finns det en skillnad i genomsnittlig sänkning. De grupper som fått en förändring i miljön (CN och NC) hade större sänkningar av duration av TI än de grupper som inte fått en förändring i miljön. Detta kan bero på att dessa grupper fått en anpassningsmöjlighet extra, dvs. förändringen i miljön, jämfört med andra behandlingsgrupper och därför bättre klarade av att anpassa sig till testsituationen vid det andra testtillfället. Detta i enlighet med PAR hypotesen.

Enligt hypotesen bör de kycklingar som haft fler valmöjligheter under vecka 1-4 ha större förmåga till anpassning och därför reagera med lägre stress vid byte av miljö efter 4 veckor. De test som utförts inom detta projekt har inte gett några signifikanta resultat gällande detta. Behandlingsgrupperna C och CN har dock lägre genomsnittlig duration av TI vid testtillfälle 2 än behandlingsgrupperna N och NC (tabell 3).

Det fanns inte någon effekt av behandling på H/L ratio. Studier som undersökt hur miljöberikning påverkar H/L ratio har fått motstridiga resultat (Jones & Waddington, 1992, Yan *et al.*, 2013, Matur *et al.*, 2015, Campderrich *et al.*, 2019). Det kan bero på att studierna utformats på olika sätt där berikad miljö och icke berikad miljö varit mer eller mindre lika varandra. Denna studie hade fokus på valfrihet som skillnad mellan de olika behandlingarna. Då alla fåglar haft tillgång till sittpinnar och strömmaterial är det inte stor skillnad mellan de olika behandlingarna. En del studier har jämfört berikade miljöer med icke-berikade miljöer där fåglar i icke-berikade miljöer inte haft möjlighet att utföra naturliga beteenden som att bada i strömmaterial eller användning av sittpinnar (Yan *et al.*, 2013, Matur *et al.*, 2015). Denna studie visar ingen effekt av att vissa behandlingsgrupper inte haft möjlighet att utföra naturliga beteenden då alla behandlingsgrupper haft möjlighet att bada i strömmaterial och att använda sittpinnar. Då H/L ratio bygger på differentialräkning av immunförsvarsceller kan omgivningens påverkan på immunförsvaret ge effekt på resultatet. Detta område är väldigt komplext och innefattar bland annat mikroorganismer som fåglarna kommer i kontakt med via strömmaterial eller inredning. Det finns därför uppenbara svårigheter med att jämföra resultat från olika studier.

En studie som testade kycklingar vid 4, 6 och 12 veckors ålder visade att ålder inte hade en effekt på H/L ratio (Yan *et al.*, 2013). Det finns ingen anledning att anta att ålder skulle påverka resultaten av H/L ratio så att falskt höga eller falskt låga värden skulle erhållas.

Andelen lymfocyter i blod visar att det fanns en tendens till att fåglar från behandlingsgrupp N hade lägre andel lymfocyter i blodet än fåglar från behandlingsgrupp C. Detta tyder på att behandlingsgrupp N var mer stressade än fåglar från behandlingsgrupp C. Fåglar från grupp C hade även det lägsta genomsnittet av heterofiler av alla behandlingsgrupper medan grupp N hade det högsta genomsnittet. Orsaken bakom att H/L ratio ökar vid stress beror på att antalet heterofiler i blodet ökar samtidigt som antalet lymfocyter minskar vilket kan ses även i detta försök. En lägre lymfocytandel i blodet indikerar att de är omdistribuerade till större del vilket kan vara till följd av stress. Att det fanns en tendens att fåglar som haft mindre valfrihet har

lägre lymfocytandel i blodet indikerar att de eventuellt är mer stressade än fåglar med större valfrihet. Kanske var antalet fåglar för litet för att visa på en effekt eller så hade miljön inte hunnit påverka fåglarna nog länge för att leda till en signifikant effekt.

Sambandet mellan stress och H/L ratio är starkare än sambandet mellan stress och andelen lymfocyter eller heterofiler i blodet. Att det fanns en tendens till att fåglar ur behandlingsgrupp C hade högre lymfocytandel i blodet ger därför inte samma möjligheter att dra slutsatser om fåglarnas stressnivå som en tendens till skillnad i H/L ratio skulle ha gett.

Att man i denna studie inte såg någon skillnad i H/L ratio efter differentialräkning av blodutstryken kan bero på ett misstag som gjordes vid utförande av blodutstryken. För att undvika att många celler går sönder på grund av för högt tryck ska man ta av kanylen från sprutan innan man placerar bloddroppen på objektsglasat (Samour, 2006). Detta gjordes inte vid utförande av blodutstryk vid detta försök. I de blodutstryk som differentialräknades i detta försök sågs väldigt många trasiga celler. Detta kan ha påverkat antal heterofiler och lymfocyter som räknades och därför påverkat H/L ratio. Eftersom blodutstryken gjordes av ovana personer blev de även tjockare än vad som är optimalt. Även om differentialräkning kunde genomföras kan även detta ha påverkat resultatet.

En möjlig slutsats att dra av detta försök är att arbetets initiala hypotes är felaktig, dvs att kycklingarnas tidiga utveckling inte har någon betydelse för deras senare utveckling. Att den tidiga utvecklingen inte har någon betydelse för individen senare i livet är inte troligt. Det är dock möjligt att betydelsen inte är så stor att signifikanta skillnader kan ses med detta projekts utformning. En annan möjlighet är att projektets grundhypotes är korrekt men att det inte kunnat mätas med de tester som använts i detta arbete, dvs. att den tidiga utvecklingen har betydelse för individen men att det tar sig uttryck på andra beteendemässiga och fysiologiska sätt än genom rädsla/stress.

Ett annat skäl till att signifikanta resultat inte kunnat ses med projektets nuvarande utformning kan vara att antalet fåglar som testats varit för få. Tester har genomförts på endast hälften av fåglarna i varje box och på grund av tidsbrist har endast hälften av alla blodutstryk har differentialräknats (dvs cirka en fjärdedel av det totala antalet fåglar).

Om försöket utformats med en större skillnad i miljön mellan behandlingsgrupperna C och NC hade chanserna att se signifikanta skillnader varit större. Till exempel hade sittpinnar och strö helt kunnat elimineras för behandlingsgrupp NC. Detta hade dock försämrat fåglarnas välfärd avsevärt och inte varit applicerbart på svensk djurhållning då värphöns ska ha tillgång till sittpinnar och strö (SFS 2019:66).

De fåglar som testats i detta försök kommer att följas fram till 26 veckors ålder. Därför finns en möjlighet att se om de resultat som redovisas här är en början till en signifikant behandlingseffekt eller om det helt enkelt inte finns någon effekt av behandling så som detta försök är utarbetat.

För att minska social stress för fåglarna i deras boendemiljö har grupperna hållits små och papper satts upp runt boxarna för att fåglar i olika boxar inte ska kunna se varandra. Berikning av

boxarna (sittpinnar samt strö) leder till mindre stress då fåglarna får möjlighet att utföra naturliga beteenden. Testsituationerna inom detta forskningsprojekt leder oundvikligen till obehag för försöksdjuren. Blodprovstagning leder till smärta för djuret och ett beteendetest som TI som mäter rädsla innebär att fåglarna utsätts för obehag. För att minska obehag vid testtillfällena är ett standardiserat och lugnt uppträdande från personer som fångat in och utfört testen viktigt. Det leder till kortare testtider samt bättre djurvälstånd på grund av lägre stressnivåer men ger även jämförbara testresultat.

Industrin kan göra vinster genom att djurvälstånden förbättras, samtidigt som samhället har ett ansvar att upprätthålla en hög djurvälstånd för att våra tamdjur ska må så bra som möjligt. Stress hos värphöns leder till ett flertal negativa konsekvenser både för individen och produktionen. Ett första steg för att minska fåglarnas stress är att tillgodose deras behov av att utföra naturliga beteenden som sandbadning, födosöksbeteende och att kunna sitta upphöjt. Om dessa beteenden inte tillgodoses leder det till rädsla och stress vilket i sin tur leder till negativa konsekvenser för djurvälstånd och produktion, som exempelvis ökad frekvens av fjäderplockning. Mindre stress leder även till minskad sjukdom och ökad produktion (Black 1994). Uppfödningssmiljön har betydelse för stressnivån hos vuxna värphöns (Janczak & Riber, 2015). Mer forskning krävs för att utreda i vilken utsträckning uppfödningssmiljön påverkar hur väl värphöns hanterar utmaningar i miljön under uppfödning och produktion. Förhoppningsvis kan man genom forskning på detta område öka välfärden och minska stress för värphöns under hela deras liv.

POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING

Den tidiga utvecklingen är viktig för hur individen senare är kapabel att möta utmaningar och svårigheter. Predictive adaptive response (PAR) hypotesen används inom djurvälståndsforskning och utgår ifrån att den tidiga utvecklingen är en möjlighet för individen att anpassa sig till en framtida levnadsmiljö. Unga (eller ofödda) individer kan enligt denna hypotes anpassa sig till den miljö och de utmaningar de kommer att möta i sitt vuxna liv utifrån hur deras levnadsmiljö ser ut under deras tidiga utveckling. Exempel på detta finns från ett flertal arter, insekter, fiskar och däggdjur. Anpassningen kan vara fysiologisk eller beteendemässig (Bateson *et al.*, 2014). Kycklingar påverkas på så sätt av miljön de växer upp i, men även av genetisk information från föräldraren och information från modern i form av bland annat hormonnivåer i ägget. Alla dessa faktorer påverkar individens stressnivå (de Haas *et al.*, 2014). Det är väl känt att uppfödningssmiljön har påverkan på värphöns stressnivåer upp i vuxen ålder (Janczak & Riber, 2015). Stress leder bland annat till minskad produktion och högre frekvens av stereotyper som fjäderplockning och har därför direkt påverkan på djurvälståndet (Black, 1994).

Unghöns ska födas upp i ett inhysningssystem som förbereder dem för det inhysningssystem som de sedan ska leva i som vuxna (2 kap. 3 § Statens jordbruksverks föreskrifter och allmänna råd [SJVFS 2019:23] om fjäderfåhållning inom lantbruket m.m., saknr L 111). I de allmänna råden till 2 kap. 3 § (SJVFS 2019:23) specificeras att värphöns som föds upp i bursystem respektive frigående system ska vara uppfödda i samma inhysningssystem samt att unghöns som är uppfödda i bursystem inte bör hållas som frigående värphöns. Detta visar att man idag ser individens uppväxt som viktig för hur de i vuxen ålder kan använda i sin omgivning. Dagens uppfödning av värphöns skiljer sig dock många gånger markant från den miljö som djuren ska leva i som vuxna. Unga kycklingar hålls ofta instängda i delar av värphönshuset. De får sedan tillgång till större delar av miljön i takt med att de växer.

Mitt arbete är en del i ett större projekt där värphöns följs från 0-26 veckors ålder. Syftet är att undersöka hur kycklingars uppväxtmiljö påverkar deras förmåga till anpassning och att hantera stress. Detta arbete fokuserar på data som insamlats då kycklingarna varit i ålder 0-7 veckor.

Kycklingarna i studien indelades i 16 boxar med 22-23 fåglar i varje box. Hälften av boxarna, 8 st, gav fåglarna tillgång till 4 sorters sittpinnar och 4 sorters strömmaterial. Den andra hälften av boxarna, 8 st, innehöll endast en sorts strömmaterial och en sorts sittpinne. Då fåglarna var 4 veckor gamla byttes inredningen i hälften av boxarna i respektive grupp. 4 av boxarna som tidigare innehållit 4 sorters strömmaterial och sittpinnar fick nu enbart en sorts strömmaterial och en sorts sittpinne. 4 av boxarna som innehållit ett strömmaterial och en sorts sittpinne fick nu tillgång till 4 sorters strömmaterial och 4 sorters sittpinnar. Resterande boxar förändrades inte.

Kycklingarnas nivåer av rädsla/stress utvärderades genom ett beteendetest (tonic immobility test) samt ett immunologiskt test (heterofil/lymfocyt ratio). Tonic immobility test gjordes vid 4 och 7 veckors ålder (före och efter att hälften av fåglarna fick en miljöförändring). Heterofil/lymfocyt ratio gjordes vid 6 veckors ålder (efter miljöförändringen).

Arbetets hypotes är att kycklingar som under de 4 första veckorna i livet får möjlighet att utforska flera olika sorters sittpinnar och strömaterial kommer att få en större variation i sitt beteende. Detta ska enligt PAR hypotesen leda till en lägre stressnivå än hos de kycklingar som enbart haft tillgång till en sorts strö och sittpinnar. Hypotesen baseras på PAR hypotesen och teorin att fåglar som har större valmöjligheter under den tidiga utvecklingen får större möjlighet att anpassa sig till sin omgivning.

Då jämförelser gjordes mellan de två testtillfällena av tonic immobility sågs en signifikant sänkning av flera parametrar mellan testtillfälle 1 och 2. Detta beror troligen på att fåglarna upplevt testsituationen tidigare och därför blir mindre rädda/stressade vid det andra testtillfället. Äldre fåglar har även fler erfarenheter av människor och kan därför reagera med mindre rädsla vid kontakt med testutförare.

Hur stora valmöjligheter fåglarna haft under de första fyra veckorna sågs inte ha någon signifikant effekt på hur stor förändringen mellan testtillfälle 1 och 2 var. Genomsnittlig sänkning av TI-duration visar dock att de grupper som fått en förändring i sin miljö vid 4 veckors ålder hade en större genomsnittlig sänkning av sina resultat. Detta kan bero på att de fått en extra anpassningsmöjlighet och därför kan anpassa sig bättre till den andra TI-testsituationen.

Inget samband mellan de två olika testen, tonic immobility och heterofil/lymfocyt ratio, sågs på individnivå. Dessa två tester är välanvända inom forskning på höns och förväntas båda visa på fåglarnas nivå av rädsla/stress. Det finns dock flera studier som i likhet med denna visat att de två testen inte alltid korrelerar (Campo *et al.*, 2005, Prieto, 2010).

Detta arbete är del i ett större forskningsprojekt som kommer följa dessa fåglar till vuxen ålder. Båda tester som detta projekt baseras på, tonic immobility och heterofil/lymfocyt ratio, kommer att upprepas. Eventuellt ser man större skillnader senare i projektet.

Det behövs mer forskning på i vilken utsträckning uppfödningssmiljön påverkar stress hos värp-höns. Förhoppningsvis kan en väl utformad uppfödningssmiljö sänka stressen hos fåglarna genom hela deras liv.

REFERENSER

- Bateson, P., Gluckman, P. & Hanson, M. (2014). The biology of developmental plasticity and the Predictive Adaptive Response hypothesis. *Journal of Physiology*, 592:2357–2368.
- Black, P.H. (1994). Central nervous system-immune system interactions: psychoneuroendocrinology of stress and its immune consequences. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38:1–6.
- Campderrich, I., Nazar, F.N., Wichman, A., Marin, R.H., Estevez, I. & Keeling, L.J. (2019). Environmental complexity: A buffer against stress in the domestic chick. *PLoS ONE*, 14:e0210270.
- Campo, J.L., Gil, M.G., Dávila, S.G. & Muñoz, I. (2005). Influence of perches and footpad dermatitis on tonic immobility and heterophil to lymphocyte ratio of chickens. *Poultry Science*, 84:1004–1009.
- Scanes, C.G. (2016). Biology of stress in poultry with emphasis on glucocorticoids and the heterophil to lymphocyte ratio. *Poultry Science*, 95:2208–2215.
- Davis, A. K., Maney, D. L. & Maerz, J. C. (2008). The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology*, 22:760–772.
- Davison, T.F. & Flack, I.H. (1981). Changes in the peripheral blood leucocyte populations following an injection of corticotrophin in the immature chicken. *Research in Veterinary Science*, 30:79–82.
- Forkman, B., Boissy, A., Meunier-Salaün, M.C., Canali, E. & Jones, R.B. (2007). A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses. *Physiology & Behavior*, 92:340–374.
- Gallup, G.G., & Nash, R.F. (1971). Tonic immobility as a reaction to predation: Artificial eyes as a fear stimulus for chickens. *Psychonomic Science*, 23:79–80.
- Gallup, G.G., Cummings, W.H., & Nash, R.F. (1972). The experimenter as an independent variable in studies of animal hypnosis in chickens (*Gallus gallus*). *Animal Behaviour*, 20:166–169.
- Gross, W.B. & Siegel, H.S. (1983). Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian Diseases*, 27:972–979.
- Haas, de, E.N., Bolhuis, J.E., Kemp, B., Groothuis, T.G.G. & Rodenburg, T.B. (2014). Parents and early life environment affect behavioral development of laying hen chickens. *PLoS ONE*, 9:e90577.
- Hansen, I., Braastad, B.O., Storbråten, J. & Tofastrud, M. (1993). Differences in fearfulness indicated by tonic immobility between laying hens in aviaries and in cages. *Animal Welfare*, 2:105–112.
- Harmon, B.G. (1998). Avian heterophils in inflammation and disease resistance. *Poultry Science*, 77:972–977.
- Hrabcakova, P., Bedanova, I., Voslarova, E., Pistekova, V. & Vecerek, V. (2012). Evaluation of tonic immobility in common pheasant hens kept in different housing systems during laying period. *Archives Animal Breeding*, 55:626–632.
- Janczak, A.M. & Riber, A.B. (2015). Review of rearing-related affecting the welfare of laying hens. *Poultry Science*, 94:1454-1469.
- Jones, R.B. (1989). Experimenter visibility, spectacles and tonic immobility in the domestic fowl. *Applied Animal Behaviour Science*, 22:371–375.
- Jones, R.B. & Faure, J.M. (1981). Sex and strain comparisons of tonic immobility ('Righting time') in the domestic fowl and the effects of various methods of induction. *Behavioural Processes*, 6:47–55.
- Jones, R.B., Waddington, D. (1992). Modification of fear in domestic chicks, *Gallus gallus domesticus*, via regular handling and early environmental enrichment. *Animal Behaviour*, 43:1021–33.

- Koolhaas, J.M., Korte, S.M., De Boer, S.F., Van Der Vegt, B.J., Van Reenen, C.G., Hopster, H., De Jong, I.C., Ruis, M.A.W. & Blokhuis, H.J. (1999). Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 23:925–935.
- Matur, E., Eraslan, E., Akyazi, I., Ergul Ekiz, E., Eseceli, H., Keten, M., Metiner, K. & Aktaran Bala, D. (2015). The effect of furnished cages on the immune response of laying hens under social stress. *Poultry Science*, 94:2853–2862.
- Miller, K.A., Garner, J.P. & Mench J.A. (2005). The test–retest reliability of four behavioural tests of fearfulness for quail: a critical evaluation. *Applied Animal Behaviour Science*, 92:113–127.
- Newberry, R.C. (1995). Environmental enrichment: Increasing the biological relevance of captive environments. *Applied Animal Behaviour Science*, 44:229–243.
- Prieto, M. T. & Campo, J. L. (2010). Effect of heat and several additives related to stress levels on fluctuating asymmetry, heterophil:lymphocyte ratio, and tonic immobility duration in White Leghorn chicks. *Poultry Science*, 89:2071–2077.
- Pusch, E.A., Bentz, A.B., Becker, D.J. & Navara, K.J. (2018). Behavioral phenotype predicts physiological responses to chronic stress in proactive and reactive birds. *General and Comparative Endocrinology*, 255:71–77.
- Samour, J. (2006) Diagnostic value of hematology I: Harrison, G.J. & Lightfoot, T. (red), *Clinical Avian Medicine II*. Palm beach, USA: Spix Publishing, 587-610. Tillgänglig: http://avianmedicine.net/wp/publication_cat/clinical-avian-medicine/
- Santoro, M.G. (2000). Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochemical Pharmacology*, 59:55–63.
- Skånberg, L., Bramgaard Kjaersgaard Nielsen, C. & Keeling, L.J. (2021). Litter and perch type matter already from the start: exploring preferences and perch balance in laying hen chicks. *Poultry Science*, 100:431-440.
- Walberg, James (2001). White blood cell counting techniques in birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 10:72–76.
- Wells, J.G.K. (2012). A critical appraisal of the predictive adaptive response hypothesis. *International Journal of Epidemiology*, 41:229–235.
- Yan, F.F., Hester, P.Y., Enneking, S.A. & Cheng, H.W. (2013). Effects of perch access and age on physiological measures of stress in caged White Leghorn pullets. *Poultry Science*, 92:2853–2859.
- Zulkifli, I., Najafi, P., Nurfarahin, A.J., Soleimani, A.F., Kumari, S., Anna Aryani, A., O'Reilly, E.L. & Eckersall, P.D. (2014). Acute phase proteins, interleukin 6, and heat shock protein 70 in broiler chickens administered with corticosterone. *Poultry Science*, 93:3112–3118.