



Premedicinering via nebulisering för human koldioxidbedövning

Premedication through nebulization for humane
carbon dioxide stunning

Sofia Sigerhed

Examensarbete/Självständigt arbete • 30 HP
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Institution för kliniska vetenskaper
Agronomprogrammet - Husdjur
Uppsala 2024



Premedicinering via nebulisering för human koldioxidbedövning.

Premedication through nebulization for human carbon dioxide stunning.

Sofia Sigerhed

Handledare: Patricia Hedenqvist, SLU, institution för kliniska vetenskaper
Bitr. handledare: Vanessa Bettembourg, SLU, institution för kliniska vetenskaper
Examinator: Karl Ljungvall, SLU, institution för kliniska vetenskaper

Omfattning: 30 HP
Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E
Kurstitel: Självständigt arbete i husdjursvetenskap, A2E
Kurskod: EX0872
Program/utbildning: Agronomprogrammet Husdjur
Kursansvarig inst.: Institutionen för husdjursgenetik (HGEN)
Utgivningsort: Uppsala
Utgivningsår: 2024
Omslagsbild: Jenny Svennås-Gillner
Upphovsrätt: Alla bilder används med upphovspersonens tillstånd.

Nyckelord: Koldioxidbedövning, slakt, fjäderfä, gris, flödes hastighet, fyllnadsgrad, human slakt, nebulisering, läkemedel

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institution för kliniska vetenskaper

Sammanfattning

I den här pilotstudien har beteendeobservationer gjorts på möss och råttor vid nebulisering av läkemedel samt vid efterföljande exponering för koldioxid (CO₂). Syftet med studien var att utvärdera ett nytt tillvägagångssätt för att minska stress, smärta och obehag vid bedövning med koldioxid vid slakt av livsmedelsproducerande djur. Vid exponering för koldioxid induceras intracellulär acidosis som innebär att pH-värdet i cellerna sjunker. Vidare minskar grundläggande nervaktivitet och responsen på yttre stimuli. Koldioxid stimulerar smärtnerver i andningsvägarna och skapar andnöd, vilket kan vara ångestfyllt. Studiens hypotes var att premedicinering med lugnande eller smärtstillande läkemedel via nebulisering före bedövning med koldioxid reducerar beteende relaterat till smärta, stress och obehag.

Som modell användes möss av stammarna BALB/c och CBB samt råttor av stammen Wistar. Under studiens gång undersöktes ett avlivningsmedel (pentobarbitalnatrium), ett lokalbedövningsmedel (prokain), ett anestesimedel (ketamin), ett lugnande läkemedel (medetomidin), en kombination av medetomidin och ketamin, samt koksalt (NaCl) som kontroll. En mus respektive råtta placerades en i taget i en plexiglaskammare som var kopplad till en nebulisator där djuret exponerades för läkemedel. Därefter flyttades djuret till en större kammare tillsammans med en obehandlad burkamrat och båda exponerades för koldioxid i syfte att avlivas. Djuren filmades under nebulisering och exponering för koldioxid och beteenden som kan kopplas till stress och obehag registrerades från filmerna: lokomotion, resa sig på bakbenen (rearing), skaka på sig, klättra/krafsa, hoppa, tvätta sig.

Vid nebulisering uppvisade BALB/c-möss en hög frekvens av beteenden vid exponering för ketamin och pentobarbitalnatrium. Under nebulisering med koksalt var frekvensen lägre än vid exponering för läkemedel. CBB-möss uppvisade lägre frekvens av beteenden i jämförelse med BALB/c-möss. Wistar-råttor visade låg frekvens av beteenden under exponering för alla läkemedel. Pentobarbitalnatrium tog cirka sju minuter att nebulisera medan resterande läkemedel tog cirka fyra minuter. Samtliga läkemedel och NaCl, inducerade vinglighet på BALB/c-möss medan Wistar-råttor inte visade vinglighet under behandling med något läkemedel eller NaCl.

Av mössen och råttorna visade BALB/c högst frekvens av de olika beteenden när de exponerades för koldioxid. BALB/c-mössen som fått ketamin enbart eller i kombination med medetomidin varken hoppade, klättrade/krafsade eller visade rearing under CO₂-exponering. På CBB-möss sågs en lägre frekvens av beteenden under koldioxidexponering efter nebulisering med ketamin-medetomidin, pentobarbitalnatrium, ketamin och prokain samt en högre frekvens efter exponering för medetomidin. Frekvensen av beteenden var generellt låga under koldioxidexponering av Wistar-råttor. Däremot uppmärksammades en ökad lokomotion och frekvens av ”klättra/krafsa” efter ketamin. Den totala tiden för nebulisering och koldioxidexponering varade några minuter. Tiden varierade beroende på läkemedel och stam. En gemensam nämnare för alla stammar var att nebulisering med ketamin-medetomidin medförde att medvetslöshet inducerades snabbare vid CO₂-exponering.

Slutsatsen är att nebulisering med en kombination av medetomidin och ketamin har störst potential att minska lidande vid koldioxidbedövning.

Nyckelord: Nebulisering, koldioxid, medvetslöshet, intracellulär acidosis, premedicinering

Abstract

In this pilot study, behavioral observations were made on mice and rats during nebulization of drugs and subsequent exposure to carbon dioxide. The aim of the study was to evaluate a new approach to reduce stress, pain, and discomfort during stunning with carbon dioxide before slaughter of food producing animals. When exposed to carbon dioxide, intracellular acidosis is induced, which means that the pH value in the cells drops. Furthermore, basic nerve activity and the response to external stimuli decrease. Carbon dioxide stimulates pain receptors in the respiratory tract and causes shortness of breath, which can induce anxiety. The study hypothesis was that premedication with sedative and analgesic drugs via nebulization before stunning with carbon dioxide reduces behaviors related to pain, stress, and discomfort.

As models, mice of the strains BALB/c and CBB and rats of the strain Wistar were used. During the study, a euthanasia agent (pentobarbital sodium), a local anesthetic (procaine), an anesthetic (ketamine), a sedative drug (medetomidine), a combination between medetomidine and ketamine, and saline (NaCl) as a control were investigated. A mouse and a rat respectively, was placed one at a time in a plexiglas chamber connected to a nebulizer where the animal was exposed to the drug. Next, the animal was moved to a larger chamber with an untreated cagemate, and both were exposed to carbon dioxide for euthanasia. The animals were filmed during nebulization and carbon dioxide exposure and behaviors related to stress and discomfort were registered from the videos: locomotion, rearing, wet-dog shaking, climbing/digging, jumping and grooming.

During nebulization, BALB/c mice exhibited a high frequency of behaviors when exposed to ketamine and pentobarbital sodium. During NaCl administration, the frequency of behaviors was lower than during drug exposure. CBB mice showed a lower frequency of behaviors compared to BALB/c mice. Wistar rats showed a low frequency of behaviors during exposure to all drugs.

Pentobarbital sodium took about seven minutes to nebulize, while the remaining drugs took about four minutes. All drugs and NaCl caused wobbling in the BALB/c mice, while the Wistar rats showed no wobbling during treatment with the different drugs or NaCl.

Of the mice and rats, BALB/c mice showed the highest frequencies of the different behaviors when exposed to carbon dioxide. The BALB/c mice administered ketamine alone or in combination with medetomidine neither jumped, climbed/digged, nor showed rearing during carbon dioxide exposure. In CBB mice, a lower frequency of behaviors during carbon dioxide was seen after nebulization with ketamine-medetomidine, pentobarbital sodium, ketamine and procaine, and a higher after treatment with medetomidine. The frequency of behaviors was generally low during carbon dioxide exposure of Wistar rats. However, increased locomotion and frequency of climbing/digging were noticed after ketamine. The total time of nebulization and carbon dioxide exposure lasted a few minutes. The time varied depending on the drug and the strain. A common denominator for all strains was that nebulization with ketamine-medetomidine resulted in faster induction of unconsciousness upon carbon dioxide exposure.

The conclusion is that the nebulization with a combination of medetomidine and ketamine has the greatest potential to reduce suffering during carbon dioxide stunning.

Keywords: Nebulization, carbon dioxide, unconsciousness, intracellular acidosis, premedication.

Innehållsförteckning

Tabellförteckning	7
Figurförteckning.....	8
Förkortningar.....	9
1. Introduktion	10
1.1 Syfte och hypotes	11
2. Litteraturgenomgång.....	12
2.1 Human slakt.....	12
2.2 Koldioxidbedövning av gris	13
2.3 Koldioxidbedövning vid slakt av fjäderfä.....	14
2.4 Effekter av koldioxidbedövning	15
2.4.1 Tid till medvetslöshet	16
2.5 Gaskoncentration inom en sluten behållare	17
2.6 Avlivning av gnagare med koldioxid	18
2.6.1 Smärta och obehag	19
2.7 Nebulisator för behandling med läkemedel	19
2.7.1 Läkemedel med potential att minska stress och/eller smärta inför koldioxidbedövning	21
3. Material och metod	22
3.1 Val av koldioxidflöde	22
3.2 Djur.....	22
3.3 Experimentell studie.....	23
3.3.1 Exponering av möss	23
3.3.2 Exponering av råttor	24
3.4 Utvärdering av beteenden.....	25
3.5 Behandling av data	26
4. Resultat	27
4.1 Flöde	27
4.2 Nebulisering	28
4.2.1 Beteendeobservationer.....	28
4.2.2 Tid för nebulisering	30
4.3 Koldioxidavlivning	31

4.3.1 Beteendeobservationer.....	31
4.3.2 Tid till medvetslöshet och andningsuppehåll.....	33
5. Diskussion	35
5.1 Nebulisering	35
5.2 Koldioxidavlivning	36
5.3 Kunde hypotesen styrkas?.....	37
5.4 Applicering på gris och fjäderfä.....	37
5.5 Styrkor och svagheter	38
5.6 Etiska och sociala aspekter	39
5.7 Slutsats	40
Referenser.....	41
Populärvetenskaplig sammanfattning	44
Tack.....	46
Bilaga 1 – Beteendeobservation vid nebulisering	47
Bilaga 2 – Beteendeobservation vid koldioxidexponering	48

Tabellförteckning

Table 1. Använda läkemedel (koncentration) till mus. Rekommenderad injektionsdos och beräknad volym som användes för nebulisering.....	23
Table 2. Använda läkemedel (koncentration) till råtta. Rekommenderad injektionsdos och beräknad volym som användes för nebulisering.....	24
Table 3. Etogram med beteenden som observerades under exponering av läkemedel. .	25
Table 4. Etogram med beteenden som observerades under exponering av koldioxid.....	26
Table 5. Tid för nebulisering av läkemedel	30
Table 6. Påverkan på djurens balans vid nebulisering. Skattning skedde genom blindad observation från film. Förklaring: +: vinglig, -: ej vinglig, +/-: ett djur vingligt , ett djur ej vingligt, 0: data saknas.....	30
Table 7. Tiden i sekunder det tog för stammen BALB/c att uppnå medvetslöshet och andningsuppehåll där röd = minst 5 sekunder långsammare än kontrollen och grön = minst 5 sekunder snabbare än kontrollen.	33
Table 8. Tiden i sekunder det tog för stammen CBB att uppnå medvetslöshet och andningsuppehåll där röd = minst 5 sekunder långsammare än kontrollen och grön = minst 5 sekunder snabbare än kontrollen.	34
Table 9. Tiden i sekunder det tog för stammen Wistar att uppnå medvetslöshet och andningsuppehåll där röd = minst 5 sekunder långsammare än kontrollen och grön = minst 5 sekunder snabbare än kontrollen.	34

Figurförteckning

Figure 1. Grafisk representation av införande samt avlägsnande av gas i en kammare	Fel!
Bokmärket är inte definierat.	7
Figure 2. Frekvens av olika beteenden hos 4 BALB/c- och 4 CBB-möss vid koldioxidbedövning med ett flöde på 2 respektive 4L/min motsvarande 30 resp 70% fyllnadsgrad av kammarens volym per min med koldioxid	27
Figure 3. Frekvens av beteenden hos BALB/c-honor (en per behandling) under nebulisering med olika läkemedel	28
Figure 4. Frekvens av beteenden hos CBB-hanar (en per behandling) under nebulisering med olika läkemedel	29
Figure 5. Frekvens av beteenden hos Wistar av bägge könen (en per behandling) under nebulisering med olika läkemedel	29
Figure 6. Frekvens av beteenden hos BALB/c-honor under koldioxidavlivning efter behandling med läkemedel (n=1 per läkemedel) jämfört med en obehandlad kontroll	31
Figure 7. Frekvens av beteenden hos CBB-hanar under koldioxidavlivning efter behandling med läkemedel (n=1 per läkemedel) jämfört med en obehandlad kontroll	32
Figure 8. Frekvens av beteenden hos Wistar av bägge kön under koldioxidavlivning efter behandling med läkemedel (n=1 per läkemedel) jämfört med en obehandlad kontroll	32

Förkortningar

NaCl	natriumklorid
g	gram
CO ₂	koldioxid
ml	milliliter
Med	medetomidin
Ket	ketamin
Pento	pentobarbitalnatrium

1. Introduktion

Bedövning med koldioxid (CO₂) är en vanlig metod som används för att bedöva djur innan slakt (Steiner et al. 2019). Vid exponering för höga koldioxidkoncentrationer minskar hjärnaktivitet och medvetslöshet inträder (Rodríguez et al. 2008). Genom denna metod möjliggörs effektiv bedövning av flera djur samtidigt, vilket är särskilt fördelaktigt i situationer där ett stort antal djur behöver bedövas. Mindre manuell hanteringen av djuren krävs än vid andra bedövningsmetoder, vilket kan vara mindre stressande för både djur och personal (Steiner et al. 2019).

En idealisk bedövningsmetod ska innebära att djuret förlorar medvetandet snabbt utan att skapa någon form av stress eller smärta (Steiner et al. 2019). Dessutom bör den valda bedövningsmetoden vara kompatibel med avlivningens syfte, alltså ska bedövningsmetoden inte lämna kvar några substansrester vid avlivning inför köttkonsumtion (Steiner et al. 2019). Utöver detta bör metoden vara fysiskt säker, lätt att använda, kostnadseffektiv samt inte påverkas av den mänskliga faktorn. Användning av koldioxid före avlivning är den vanligaste bedövningsmetoden såväl i experimentell djurforskning som vid slakt av djur. De används för möss (*Mus musculus*), råttor (*Rattus norvegicus*), grisar (*Sus scrofa domestica*) och fjäderfä (*Gallinae*) (Steiner et al. 2019).

Vid exponering för koldioxid induceras en intracellulär acidosis som betyder att pH-värdet i kroppens celler sjunker (Steiner et al. 2019). Vidare minskar både den grundläggande nervaktiviteten och responsen på yttre stimuli, som därigenom leder till medvetslöshet av det exponerade djuret. Steiner et al. (2019) nämner att beroende på vilken CO₂-koncentration och metod som används, samt djurart, inträffar medvetslösheten olika snabbt. Medvetslöshet inträffar inom en tidsram av 20 till 150 sekunder.

Vid bedövning med koldioxid kan smärta och obehag orsakas djuren på tre olika sätt; När koldioxiden andas in bildas kolsyra på luftvägarnas slemhinnor vilket orsakar smärta och obehag. Koldioxiden skapar andnöd eller en känsla av andfäddhet och jonkanaler i hjärnans amygdala stimuleras, vilket kan orsaka rädsla. Detta betyder att djuret som andas in koldioxid kan orsakas kraftig stress (Leary et al. 2020).

1.1 Syfte och hypotes

Syftet med denna studie är att utvärdera ett nytt tillvägagångsätt för att minska stress, smärta och rädsla vid bedövning med koldioxid. En sådan förändring kan möta ökande etiska krav inom livsmedelsproduktionen. Som modell används mus och råtta.

Hypotesen är att premedicinering med läkemedel via nebulisering före bedövning med koldioxid reducerar beteenden relaterade till smärta, stress och rädsla.

2. Litteraturgenomgång

2.1 Human slakt

Vid human slakt syftar man främst till att minska onödigt lidande och smärta genom att genomföra slaktprocesser på ett sätt som respekterar och beaktar djurens välbefinnande (Browning & Veit 2020).

Ett etiskt dilemma som finns inom djuruppfödning, skötsel och jordbruk är djurens välfärd vid slaktningsprocessen (Browning & Veit 2020). I artikeln av Browning & Veit (2020) nämns det att över 65 miljoner lantbruksdjur slaktas varje år globalt och antalet ökar. Forskning om djurens välfärd har mestadels fokuserat på förbättringar för djurens levnadsvillkor och inte lagt stor fokus på välfärden vid transport och slakt (Browning & Veit 2020). Med tiden har uppmärksamheten på att utveckla humana sätt att slakta och transportera djur ökat och därmed forskning om det. Ett exempel är användandet av bedövningsmetoder före själva slakten för att minska smärta, stress och därmed förbättra välfärden hos lantbruksdjuren (Browning & Veit 2020). Ett införande av ett poängsystem för djurskyddet i slakterier har även uppmärksamats, varvid främst effektiviteten av bedövningsmetoden bedöms, vilket kan leda till en ökning av djurens välfärd.

De primära bedövningsmetoder som används före slakt är bultpistol, elektrisk bedövning samt atmosfärisk bedövning i form av koldioxid (Browning & Veit 2020). Bedövning med bultpistol är mest lämplig på större lantbruksdjur som nötkreatur. Med denna metod förstörs områden i hjärnan som gör att djuret blir medvetslöst direkt vid korrekt utförande, och därefter kan avblodas. Elektrisk bedövning är vanligt förekommande på fjäderfä. Fåglarna hängs upp i fötterna och sedan doppas huvudet i ett elbad, som oftast innehåller salt för att effektivisera ledningsförmågan. Detta leder till medvetslöshet inför avblodning (Browning & Veit 2020). Den sista bedövningsmetoden är atmosfärisk bedövning i form av koldioxid (Steiner et al. 2019; Browning & Veit 2020). Denna metod innebär att djuren utsätts för en hög koncentration av koldioxid vilket leder till kvävning och medvetslöshet (Browning & Veit 2020).

2.2 Koldioxidbedövning av gris

Första steget i grisslakt inför human konsumtion är bedövning genom att exponeras för koldioxid (Raj & Gregory 1995). Efter bedövningen måste grisarna avblodas för att säkerställa en säker död och för köttets kvalitet. Bedövning med koldioxid är en av de vanligaste metoder som används på grisar i större delar av världen (Sindhøj et al. 2021). Höga koncentrationer av koldioxid inför slakt kan inducera smärta, rädsla samt stress hos grisar, vilket har en stor påverkan på välfärden (Sindhøj et al. 2021). I artikeln av Raj & Gregory (1995) nämns att koncentrationen av koldioxid bör vara minst 70 % för att säkerställa tillräcklig bedövning. En anledning till att koldioxidbedövning används är att flera grisar kan bedövas samtidigt vilket minskar ångest hos grisarna då de är flockdjur. Vidare minskar hantering av enskilda djur vid användning av koldioxid eftersom djuren inte behöver fixeras på samma sätt som för andra bedövningsmetoder (Steiner et al. 2019; Sindhøj et al. 2021). En tillräckligt hög koncentration av koldioxid under en tillräcklig exponeringstid kommer att inducera medvetslöshet och död (Leary et al. 2020).

Användning av koldioxid har fler fördelar, exempelvis är det billigt och inte brandfarligt eller explosivt, vilket gör det till en säker metod att jobba med (Leary et al. 2020). Vidare finns begränsningar som till exempel att det krävs utrustning för exponering och personal som är utbildad för att administrera koldioxid på ett säkert sätt, att systemet inte ska inducera hypotermi hos djuren vid exponering och därför måste vara korrekt byggt, samt att efter bedövning med koldioxid så måste döden verifieras på varje djur med hjälp av avblodning. Det sistnämnda gäller för alla bedövningsmetoder (Leary et al. 2020).

Det har observerats att användning av koldioxid för att bedöva grisar inför slakt inte är den mest lämpliga metoden ur ett djurvälståndsperspektiv. Studier har visat att grisar som kunde röra sig fritt visade en flyktreaktion genom att springa omkring under de första 15 sekunderna vid exponering av koldioxid (Blomquist 1957, se Raj & Gregory 1995). I en studie av Dodman (1977) observerades varierande beteenden under exponering av koldioxid, till exempel kunde vissa grisar reagera aggressivt oberoende av vilken koncentration de utsattes för. Ur kommersiell synvinkel bör alternativa bedövningsformer inte leda till sämre köttkvalité än efter koldioxidbedövning och ur välfördssynpunkt borde bedövning med andra metoder inför slakt ge mindre- eller inget av det obehag som förknippas med koldioxidexponering (Raj & Gregory 1995).

2.3 Koldioxidbedövning vid slakt av fjäderfä

Vilka bedövningsmetoder som bör användas till fjäderfä före slakt är inte självklart. År 1982 förslög FAWC (Farm Animal Welfare Committee) i Storbritannien att byta ut elektrisk bedövning och istället undersöka användningen av koldioxid till fjäderfä, eftersom denna bedövningsmetod användes till gris (Raj 2006). Syftet var att hitta en metod som eliminerar behovet av att hänga upp levande fåglar i fötterna, vilket kan orsaka stress, obehag och smärta. Koldioxid ansågs kunna vara mer gynnsamt för fåglarnas välfärd eftersom elektrisk bedövning kunde vara förknippat med ojämn ström i vattenbadet, vilket orsakade onödigt lidande för fåglarna (Raj 2006). Vidare ansågs bedövning med koldioxid kunna vara mer humant eftersom koncentrationen kan ökas gradvis.

Slakt av fjäderfä sker inte enbart på slakterier utan även i uppfödningstillarna. Vid utbrott av sjukdomar som exempelvis Newcastlesjuka brukar de infekterade djuren avlivas på plats (Gerritzen et al. 2004). Avlivning på gård används för att motverka att sjukdomar sprids och det kan vara stora flockar på flera tusen individer som avlivas. Ur epidemiologisk synvinkel är hantering och transport av infekterade djur något som i alla högsta grad ska undvikas för att stoppa spridningen (Gerritzen et al. 2004). Vid avlivning på gård av infekterade djur är bruk av gas som koldioxid den säkraste metoden eftersom hantering av djuren minskar (Gerritzen et al. 2004).

Den vanligaste bedövningsmetoden på fjäderfä idag är att använda koldioxid (Leary et al. 2020). För tillfället finns det inga speciella krav på hur hög koncentrationen bör vara. Nyligen kläckta kycklingar kan behöva en betydligt högre koncentration än vuxna djur av samma art. Koncentrationen bör vara mellan 80 och 90% (Leary et al. 2020). Exponering för höga koldioxidkoncentrationer kan orsaka ofrivilliga rörelser hos fåglar som exempelvis flaxande med vingarna eller andra motoriska rörelser, vilket kan förstöra vävnader (Leary et al. 2020). Det har även beskrivits att exponering av koldioxid i höga halter kan orsaka skakning på huvudet och flämtande (Raj et al. 2006). Dock kan lägre koncentrationer av koldioxid ge mindre rörelser såsom flaxning (Leary et al. 2020). Fortsättningsvis nämns det att flaxning med vingarna minskar vid exponering av koldioxid än vid argon och kväve.

Exponering för koldioxid har visat sig ge bättre köttkvalité i jämförelse med elektricitet. Det har också visats att fåglarna uppvisar färre brutna ben jämfört med vid elektrisk bedövning (Raj et al. 1991).

Fjäderfä är utrustade med nociceptorer, även kallad sensoriska nervceller som finns i huden och signalerar på faktiskt eller potentiell vävnadsskada (Gentle 2011). Det finns även sensoriska nervceller i andningsvägarna som aktiveras på förhöjd nivå av ammoniak och koldioxid. Det följer därför att om dessa substanser skulle nå skadliga nivåer skulle det vara smärtsamt för fåglarna (Gentle 2011).

2.4 Effekter av koldioxidbedövning

Inandning av koldioxid kan inducera medvetslöshet och död (Leary et al. 2020). Vid användning av koldioxid som bedövning inför slakt behöver koncentrationen nå en nivå av 30 % eller högre. Vidare finns skillnader mellan arter och för olika gnagstammar, vid exponering för koldioxid. Vid exponering för 100 % orsakas andningspaus på grund av en tillfällig reflexapné hos bland annat råttor (Leary et al. 2020). Syftet med reflexen tros vara att förhindra att ämnen som potentiellt orsakar skada inhaleras (Leary et al. 2020). Vid lägre koncentrationer av koldioxid (10-50%) inträffar inte andningsuppehåll (Leary et al. 2020).

Även om koldioxid har potential att utlösa en stressreaktion, är tolkningen av djurens subjektiva upplevelser komplex (Leary et al. 2020). Incidenter kopplade till omedelbar risk för livet, såsom låg syrehalt och hög koldioxidhalt, överförs sannolikt direkt från hjärnstammen. Gris och fjäderfä har rapporterats visa tecken på stress och obehag vid exponering för koldioxid i vissa studier medan i andra studier har det inte observerats (Leary et al. 2020). Anledningen kan vara variationer i metoderna för gasexponering, vilka beteenden som observeras samt variation mellan raser. Till exempel har studier visat att kycklingar och kalkoner frivilligt kan gå in i en kammare som innehåller 60% koldioxid för att komma åt foder eller social kontakt (Leary et al. 2020). Beteendeobservationer visade exempelvis andning med öppen näbb och skakning av huvudet. Detta behöver inte betyda att djuret känner stress eller obehag eftersom de inte flyttar sig ifrån kammaren med koldioxid. Vidare nämner Leary et al. (2020) att fåglar visar större tolerans att utsätta sig för höga koncentrationer av koldioxid än till exempel gnagare och att medvetslöshet inträder senare.

Genetik kan ha en betydande roll för hur djurarten reagerar på koldioxid (Leary et al. 2020). Olika grisraser är mer eller mindre känsliga för koldioxid, exempelvis är Hampshire och Tysk Lantras känsligare än Yorkshire och Holländsk Lantras. I en undersökning av Duroc och Yorkshire tolererade dessa raser en koldioxidkoncentration på 30% om de fick belöning i form av mat, men undvek koncentrationer på 90% även om de inte fått foder på 24 timmar (Leary et al. 2020). Detta tyder på att exponering för koldioxid av en viss koncentration kan vara en human form av bedövning för en del raser medan andra raser kan uppleva stress och obehag.

I nyligen genomförda studier på möss har områden i amygdala, som kan kopplas till rädsla, aktiverats vid exponering för koldioxid (Leary et al. 2020). Beteenden kopplade till stress och obehag, som exempelvis rädsla eller aversion minskade om relevanta receptorer i amygdala hämmades eller eliminerades. Detta kan betyda att negativa reaktioner på koldioxidexponering hos gnagare och potentiellt andra arter, delvis kan bero på medfödda egenskaper (Leary et al. 2020).

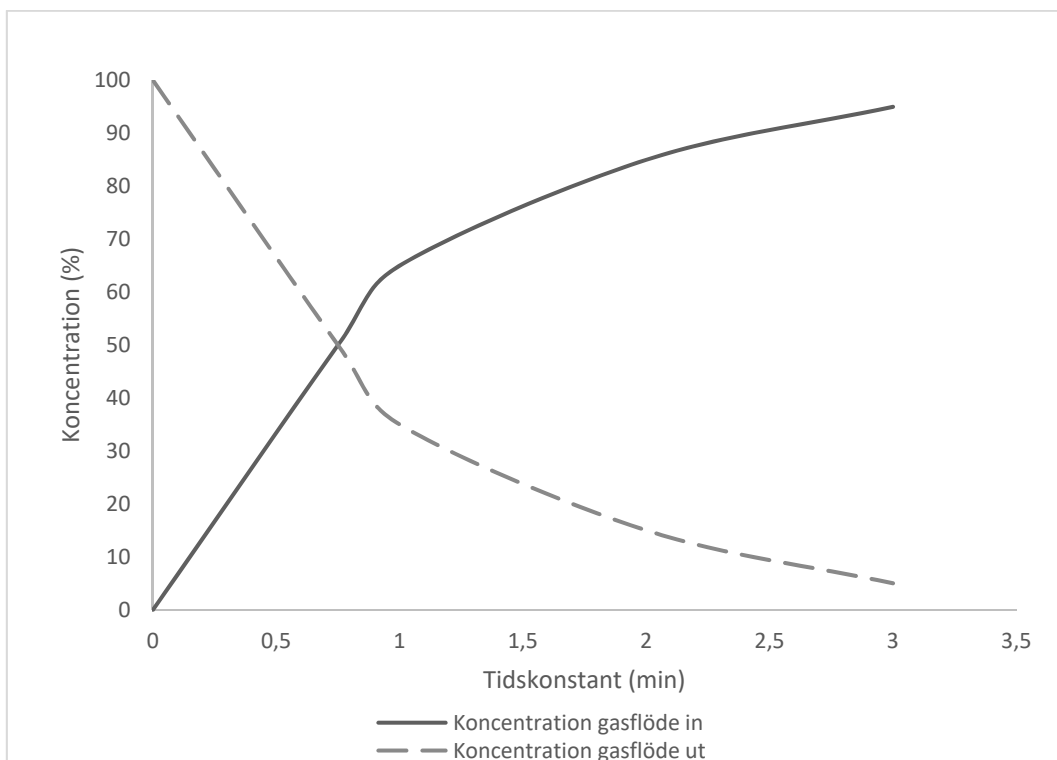
2.4.1 Tid till medvetslöshet

Tid till medvetslöshet kan variera mellan djurarter och koldioxidkoncentrationer (Leary et al. 2020). Råttor som exponeras för minst 80% koldioxid blir medvetslösa efter 12 till 33 sekunder. När koldioxidkoncentrationen minskar till 70%, induceras medvetslöshet efter 40 till 50 sekunder. På samma sätt leder en snabb ökning av koncentrationen (fyllnadsgrad > 50% av kammarens volym/minut) till medvetslöshet inom 26 till 48 sekunder (Leary et al. 2020). På grisar har studier visat att exponering för 60% till 90% koldioxid inducerar medvetslöshet efter 14 till 30 sekunder. Avlivning genom exponering för koldioxid har studerats på enskilda fåglar. Sju dagar gamla kycklingar av rasen Leghorn har observerats vid en koldioxidkoncentration på 97%, vilket resulterade i medvetslöshet inom 12 sekunder (Leary et al. 2020). Slaktkycklingar i fem veckors ålder blev medvetslösa inom 17 sekunder vid en koldioxidkoncentration på 60%. En lägre koldioxidkoncentration kan vara acceptabelt eftersom det ger lindrigare reaktioner, även om det tar längre tid till medvetslöshet.

En generell regel är att en skonsam avlivningsmetod som tar längre tid är att föredra före en snabb men plågsam (Leary et al. 2020). En gradvis ökning av koldioxidkoncentrationen orsakar mindre smärta på grund av lägre aktivering av smärtreceptorerna. Det är därför sannolikt att smärtnerverna inte hinner signalera innan medvetslöshet inträffar om rekommendationen för laboratoriedjur följs om en fyllnadsgrad mellan 30% och 70% av kammarvolymen per minut (Leary et al. 2020). Koldioxid och blandningar måste tillföras på ett sätt där koncentrationen är noggrant reglerad och gasen är renad från föroreningar och tillsatser (Leary et al. 2020).

2.5 Gaskoncentration inom en sluten behållare

Det finns två huvudsakliga processer inom förändringar i gaskoncentrationer inom en sluten behållare som är; införandet av en ny gas eller avlägsnande av redan en befintlig gas i behållare och den tidsmässiga faktorn det tar för att gaskoncentrationen ska förändras i behållaren (Leary et al. 2020). Hastigheten av en förändringen av gaskoncentrationen i ett slutet system sker i form av en icke-linjär förändring, så kallad exponentiell process (Leary et al. 2020). Kortfattat, när en ny gas ska införas i en behållare kommer hastigheten av koncentrationsökningen att minska när den börjar närma sig gränsvärdet. Detta medför att koncentrationen aldrig når 100% av gasen i behållaren, se figur 1. Vid avlägsnande av en redan befintlig gas gäller samma regel. Gasens koncentration kommer att minska men vid närmande av gränsvärdet kommer den exponentiella kurvan att plana ut och kommer därför aldrig att uppnå noll. Tiden det tar för att åstadkomma en ändring i koncentration beror på vilket flöde (l/min) av gas man tillför samt koncentrationen av detta, se figur 1 (Leary et al. 2020).



Figur 1: Grafisk representation av införande samt avlägsnande av gas i en kammare (Leary et al. 2020).

2.6 Avlivning av gnagare med koldioxid

De flesta djur i laboratorier är små gnagare som exempelvis möss och råttor (Leary et al. 2020). På laboratorier är det vanligt att möss och råttor används som modeller i olika forskningsprojekt. Det är mer förekommande att djur i forskning avlivs än djur som inte används som modeller i forskning (Conlee et al. 2005). På en stor försöksdjursavdelning avlivs djur kontinuerligt och det finns behov av att hitta mer humana sätt att bedöva och avliva dessa djur. Den vanligaste metoden för avlivning av gnagare är användning av koldioxid (Conlee et al. 2005), eftersom det är effektivt och kräver minimal hantering av djuren.

Exempel på tillåtna bedövningsmedel på möss och råttor är gas i form av koldioxid (Leary et al. 2020). Komprimerad koldioxid i flaskor är den rekommenderade källan eftersom inflödet av gasen i en sluten kammare kan regleras till exakt nivå. En optimal fyllnadsgrad för gnagare som ska bedövas i ett koldioxidsystem är utbyte av luften med koldioxid mellan 30 % och 70 % av kammarens volym per minut, oberoende av kammarens volym (Leary et al. 2020). Vid långsammare fyllnad upplever gnagarna andnöd under längre tid, vilket riskerar orsaka mer obehag. Trots dessa rekommendationer finns det inga studier som säkert visar vilken fyllnadsgradshastighet som är optimal för djur av olika arter, kön och genetisk bakgrund för att minska stress och smärta. På grund av detta måste personal använda sin bedömning för att avgöra vilken hastighet inom det rekommenderade intervallet som är mest lämplig i just deras system (Leary et al. 2020). Vidare är det inte enligt Jordbruksverkets föreskrifter och allmänna råd (SJVFS 2019:9) om försöksdjur, saknr L 150 rekommenderat att förfylla kammaren med koldioxid, eftersom inandning av ren koldioxid kan orsaka smärta. Vid avlivning av gnagare med koldioxid bör kammarens volym fyllas med minst 80 %.

2.6.1 Smärta och obehag

Smärta är väldigt relevant när det gäller hälsa samt välfärd, men det är också ett ämne som har blivit allt mer utforskat (Mogil 2009). Att inducera smärta på försökspersoner är en stor utmaning och etiskt självbegränsande. Därför har forskning om smärta i stor utsträckning utförts på djurmodeller (Mogil 2009). Forskare har länge insett att smärta, stress samt ångest har en negativ inverkan på välbefinnandet hos försöksdjur (Carstens & Moberg 2000). När djur utsätts för smärta eller stress så kan det orsaka ångest hos djuret och detta kan sedan resultera i negativa biologiska effekter (Moberg 1999, se Carstens & Moberg 2000). På grund av dessa anledningar strävar forskare att minska på smärta och stress vid forskning på djur. Smärta är en skyddande funktion som varnar djuret för potentiell fara, vilket gör att den betraktas som fördelaktig för överlevnad och hälsa (Carstens & Moberg 2000). Smärta hos djur är inte alltid uppenbart synlig utan istället kan noga observationer av förändringar i beteendet samt utseendet behövas (Carstens & Moberg 2000).

I artikeln av Wright-Williams et al. (2007) nämns beteenden som observeras hos möss som upplever smärta eller obehag men även beteenden som indikerar smärtfrihet. Exempel på beteenden som indikerar smärta är att slicka på sår, hoppa, skaka och rycka, medan exempel på beteenden hos möss utan smärta är normal hållning i form av huk-/sittställning och en normal gång (Wright-Williams et al. 2007).

Gnagare som exempelvis råttor och möss uttrycker smärtan vid olika ansiktsuttryck som signalerar olika nivåer av smärta beroende på vilken nivå de utsätts för (Sotocina et al. 2011). Denna observation har motiverat forskare att utveckla olika metoder för objektiv bedömning av smärta hos djur. Genom denna forskning har man skapat en skala för ansiktsuttryck, så kallad "Mouse Grimace Scale" (MGS) (Langford et al. 2010, se Sotocina et al. 2011). På skalan nämns fyra ansiktsuttryck som kan visas om djuret känner smärta; sammandragning av ögonlocken, näs- och kindbulning (näsans ovansida buktar ut och kinderna buktar ut), öronposition, samt förändring av morrhår (Sotocina et al. 2011).

2.7 Nebulisator för behandling med läkemedel

Nebulisator används ofta vid behandling av olika sjukdomar, t ex astma och lunginflammation (Chang et al. 2019). Nebulisering är en metod varvid vätskor omvandlas till aerosolform och därigenom kan läkemedel effektivt nå luftvägarna direkt (Goralski & Davis 2014; Chang et al. 2019). Det finns olika varianter av nebulisatorer som exempelvis använder jet-luftflöde, ultraljud eller vibrerande nätmembran. Nebuliserade läkemedel kan vara effektiva för patienter även med lågt inandningsflöde eller volym (Goralski & Davis 2014). Begränsningar vid

användning av nebulisator är att det krävs en längre behandlingstid i jämförelse med andra administreringsmetoder samt att nebulisatorn behöver rengöras efter varje användning (Goralski & Davis 2014). För att uppnå effektiv behandling krävs att nebulisatorn är kapabel att många gånger leverera tillräckligt med läkemedel i en hög frekvens, samt med minimalt slöseri av läkemedel (O'Callaghan & Barry 1997).

Under de senaste åren har ett växande intresse för alternativa former av läkemedelsadministration vuxit fram (Dale et al. 2002; Manral et al. 2009). Studier har gjorts där möss har exponerats för fentanylaerosol genom en "head on" nebulisator, vilket är en exponeringsenhet för endast huvudet (Manral et al. 2009). I studien av Manral et al. (2009) uppmärksammades att effekten av fentanyl var koncentrationsberoende. En lägre koncentration ($2.7 \mu\text{g}/\text{m}^3$) visade att mössen hade en snabb återhämtning och att inget djur avled, medan en högre koncentration ($23,6 \mu\text{g}/\text{m}^3$) orsakade 100% dödlighet. Vidare nämns det att ingen irritation i luftvägarna observerades hos mössen under exponering av fentanyl och döden inträffade troligtvis på grund av andningsdepression (Manral et al. 2009). Nebulisering av lugnande medel eller smärtlindring inför koldioxidbedövning skulle kunna minska de negativa effekterna av koldioxid utan att djuren behöver fixeras.

I översiktsartikeln skriven av Turner et al. (2020) utvärderades fysiologiska parametrar hos möss vid exponering av lugnande medel innan koldioxidavlivning. Läkemedlen hos mössen gavs oralt eller via injektion. De medel som användes var acepromazin eller midazolam och det som uppmärksammades var att tiden till medvetslöshet eller bedövning inte förkortades vid exponering för koldioxid. Utöver exponering av lugnande medel utsattes mössen för olika flödes hastigheter av koldioxid och detta var mellan 15 och 100% (Turner et al. 2020). Det som uppmärksammades var att hjärtfrekvenser och medelblodtryck ökade under exponering och att det inte sågs någon skillnad mellan de olika flödes hastigheterna (15–100%).

Utvärdering av fysiologiska parametrar hos råttor gjordes under exponering av olika flödes hastigheter av koldioxid (Turner et al. 2020). Läkemedlen till råttorna gavs oralt eller via injektion. De olika flödes hastigheter som testades var mellan 10 och 100%. Det observerades att det fanns en generell minskning av både hjärtfrekvens och medelblodtryck från deras ursprungliga värden vid de olika flödes hastigheterna. Då elektroencefalografi (EEG) utvärderades, var tiden till döden kortast för de råttor som exponerades för en flöde motsvarande 20% av kammarvolymen per minut eller mer. Dessutom fanns det ingen skillnad för råttor som hade fått en premedicinering med antingen acepromazin eller pentobarbitalnatrium i jämförelse med de som bara fick koldioxid. Vidare nämns det att medvetslöshet inducerades snabbast när råttorna placerades i en kammare som var förfylld med 100% koldioxid (Turner et al. 2020).

2.7.1 Läkemedel med potential att minska stress och/eller smärta inför koldioxidbedövning

Det finns flera läkemedel som verkar lugnande på djur. Pentobarbitalnatrium användes förr som sömnmedel och för att inducera anestesi (Clarke et al. 2014). Pentobarbitalnatrium består av en blandning av två enantiomerer av natrium 5-etyl-5-(1-metylbutyl) barbiturat och kan ges via oral eller rektal väg till människor men det är också ett medel som används i injektionsform till laboratoriedjur (Clarke et al. 2014). Pentobarbitalnatrium används också i mycket koncentrerade former för avlivning av djur.

Prokain tillhör läkemedelsklassen lokalbedövningsmedel och har en smärtlindrande effekt som används vid operationer (Sheikh & Dua 2024). Läkemedel som används till lokalbedövning kallas även lokalanestetika, dessa består av tre beståndsdelar: en lipofil aromatisk ring, en terminal amin och slutligen en ester- eller amidgrupp (Sheikh & Dua 2024). Läkemedlets fettlöslighet förbättras av den aromatiska ringen, terminalaminen ger läkemedlet dess aktiva/inaktiva tillstånd och den intermediära länken avgör hur läkemedlet ska metaboliseras i kroppen, antingen som en aminogrupp eller en estergrupp (Sheikh & Dua 2024). Prokain valdes på grund av att karenstiden är noll dagar vid andra administreringsvägar för gris (FASS Djurläkemedel 2024a).

Ketamin är ett bedövningsmedel som började användas på 1970-talet (Nowacka & Boreczyk 2019). Det har ett brett spektrum av farmakologiska effekter. Exempel är sedering, hypnos och stimulering av det sympatiska nervsystemet vilket ger en ökad hjärtfrekvens samt höjer blodtrycket (Barash 2009). Vidare kan ketamin användas till en snabb inducering av anestesi, vilket gör det till ett lämpligt alternativ för olika situationer inom anestesi och akutvård. Ketamin valdes på grund av att karenstiden är noll dagar vid andra administreringsvägar för gris (FASS Djurläkemedel 2024b).

Medetomidin är ett lugnande medel med en smärtstillande effekt som används till bl.a. hundar och katter (Cullen 1996). Medetomidin är en potent s.k. alfa-2-adrenoceptoragonist, som aktiverar samma receptorer som adrenalin och noradrenalin. Aktivering av dessa receptorer leder till att frisättning av noradrenalin hämmas (Haenisch et al. 2010). Förutom den smärtstillande och lugnande effekten minskar andningsfrekvensen.

För att utvärdera potentialen av dessa läkemedel för sedering och/eller smärtlindring inför koldioxidavlivning gjordes en pilotstudie på möss och råttor. Djuren utgjorde modeller för avlivning av grisar och fjäderfä

3. Material och metod

3.1 Val av koldioxidflöde

Denna studie gjordes under våren 2024. Initialt utvärderades två olika flöden av koldioxid. Enligt rekommendationer för avlivning av gnagare ska fyllnadsgraden vara mellan 35 % till 71 % av kammarens volym per minut (Leary et al. 2020). Fyra vuxna möss, två honor av stammen BALB/c samt två hanar av en korsning mellan BALB/c och C57Bl6 (CBB) avlivades med koldioxid med fyllnadsgraden 35 % av volymen per min, vilket motsvarades en flödes hastighet på 2 L CO₂/min till den kammaren som användes i studien, en makrolon III (M3), med en volym på 5,6 L. Därefter avlivades fyra möss, två BALB/c-honor och två CBB-hanar med fyllnadsgraden 71 % CO₂ per minut, vilket motsvarades en flödes hastighet som avrundades till 4 L CO₂/min.

3.2 Djur

I studien användes mushonor av stammen BALB/c och mushanar av stammen CBB samt råttor av bägge kön av stammen Wistar. CBB är en stam som har avlats fram för att träna studenter vid hantering av djur då det är en lugnare stam. Ålder varierade mellan fem månader och ett år för mössen medan råttorna var tre månader. Totalt användes 24 antal möss och 10 antal råttor, som alla hade använts till hanteringsövningar för studenter på SLU och som skulle avlivas. Ingen svanslyftning av möss förekom på djuravdelningen. Mössen i studien hölls i grupper om två till fyra individer och under studien blandades aldrig dessa grupper. Mössen huserades i Green Line IVC GM 500 från Techniplast i ett separat rum under studieperioden. I rummet var temperaturen 20–22 °C och luftfuktigheten var mellan 55 och 65%. Ljuscykeln i rummet var ljus på från klockan 06:00 till 18:00 och ljus av från klockan 18:00 till 06:00. Råttorna i studien hölls i par och dessa blandades aldrig. Råttorna huserades i IVC GR1800 DOUBLE DECKER från Techniplast i ett separat rum under studieperioden. I det rummet var temperaturen 20–22 °C och luftfuktigheten var mellan 55 och 65%. Ljuscykeln i rummet var ljus på från klockan 06:00 till 18:00 och ljus av från klockan 18:00 till 06:00. Under hela studieperioden hade djuren fri tillgång till vatten från flaska och pelleterat foder (Labfor R36, Lactamin AB, Stockholm). Det fanns även personal som utförde daglig tillsyn, skötsel och byte av burar enligt avdelningens rutiner.

3.3 Experimentell studie

I studien undersöktes ett anestesimedel som används till avlivning (pentobarbitalnatrium), ett lokalbedövningsmedel (prokain), ett anestesimedel (ketamin) och ett sederande läkemedel (medetomidin). Förutom att varje läkemedel undersöktes var för sig, utvärderades även en kombination av ketamin och medetomidin. Innan mössen eller råttorna skulle exponeras för läkemedel eller ej (kontrolldjur), vägdes de och märktes på svansen med en märkpena för individuell märkning. En mus respektive råtta i taget placerades i en plexiglaskammare med en volym på 1,5L, som var kopplad till en nebulisator (Beurer Medical IH55), se figur 1. I kammaren exponerades djuret för ett av läkemedlen eller NaCl 0,9% (kontroll). Därefter flyttades djuret till en större kammare, tillsammans med burkamraten som inte utsatts för nebulisering (kontroll) och båda exponerades för koldioxid tills andningen upphörde. I rummet för vägning, nebulisering och koldioxidexponering var ljusstyrkan 21 lux och temperaturen 21 °C. I kammaren för nebulisering uppmättes temperaturen till 19,8 °C under nebulisering.

Vid nebulisering och koldioxidexponering blev djuren filmade. Dessa filmer utvärderades senare till en etologisk del. Filmerna observerades av författaren som var blindad för behandling genom att filmerna kodats och numrerats i en randomiserad ordning.

3.3.1 Exponering av möss

Inför försöket tränades mössen för hantering vid ett tillfälle. Dosen av läkemedel beräknades på en genomsnittlig vikt av 30 g och inandad volym under 2 minuter, samt kammarens volym, se tabell 1. Läkemedlet späddes med koksaltlösning (NaCl) till en volym av 2 ml, om läkemedlets volym var lägre.

Tabell 1. Använda läkemedel (koncentration) till mus. Rekommenderad injektionsdos och beräknad volym som användes för nebulisering.

	Pentobarbital- natrium (60mg/ml)	Prokain (20 mg/ml)	Ketamin (50 mg/ml)	Medetomidin (1 mg/ml)	Ketamin + Medetomidin
Rekommenderad dos vid injektion (mg/kg)	60	50	100	1	100 + 1
Total dos (mg)	30	24	50	0,45	50 + 0,45
Läkemedel (ml)	0,5	1,2	1,0	0,45	1,0 + 0,45
NaCl (ml)	1,5	0,8	1,0	1,55	0,55
Total volym (ml)	2	2	2	2	2

3.3.2 Exponering av råttor

Inför försöket med råttorna genomfördes tre separata hanteringsomgångar. Under en av dessa hanteringsomgångar vägdes råttorna för att beräkna ett genomsnitt och därmed beräkna doseringen av läkemedel, vilket redovisas i tabell 2. Hanarna vägde i genomsnitt 260 gram medan honorna vägde 170 gram. Läkemedelsvolymen beräknades från rekommenderad dos för injektion, råttans inandade volym under 2 minuter och kammarens volym. Läkemedlet späddes med NaCl till en volym av 2 ml. Om mängden läkemedel överskred 2 ml tillsattes inget NaCl, se tabell 2.

Tabell 2. Använda läkemedel (koncentration) till råttor. Rekommenderad injektionsdos och beräknad volym som användes för nebulisering.

	Pentobarbital- natrium* (60mg/ml)	Prokain** (20 mg/ml)	Ketamin* (50 mg/ml)	Medetomidin* (1 mg/ml)	Ketamin+ Medetomidin*
Rekommenderad dos vid injektion (mg/kg)	50	50	75	0,5	75 + 0,5
Total dos (mg)	54	54	85	0,55	85 + 0,55
Läkemedel (ml)	0,9	2,7	1,7	0,55	1,7 + 0,55
NaCl (ml)	1,1	0	0,3	1,45	0
Total volym (ml)	2	2,7	2	2	2,25

* Råtthanar ** Råtthonor

3.4 Utvärdering av beteenden

I studien genomfördes beteendeobservationer vid exponering för läkemedel respektive koldioxid. Observationerna gjordes genom att titta på filmer som var kodade och numrerade i en randomiserad ordning för att observatören skulle vara blindad för typ av behandling. Observatören visste inte heller vilket djur som behandlat med läkemedel och vilket som var kontroll. Beteendeobservationerna varade under nebuliseringen och exponeringen för koldioxid tills andningen upphört.

Till hjälp för beteendebedömningen utformades ett etogram med beteenden som kan kopplas till smärta och obehag, se tabell 3 och 4. Vid beteendeobservationerna bedömdes frekvenser av beteenden respektive om ett beteende förekom eller inte samt hur lång tid det tog till medvetlöshet och upphörd andning. Benämning ”aktivitet” nämns under studien vilket innebär summa av alla beteenden.

Tabell 3. Etogram med beteenden som observerades under exponering av läkemedel.

Beteende	Beskrivning
Lokomotion*	Korsningar över mittlinjen av kammaren.
”Rearing”*	Står på bakbenen.
”Wet dog response”*	Huvudet och kroppen skakas kraftigt, liknar när en hund skakar av sig vatten (Collier & Lee 1963).
Tvättar sig*	Skötsel av vilket område på kroppen som helst.
Klättrar/krafsar*	Griper tag i ytor och försöker fly uppåt/Använder sina framtassar för att göra snabba rörelser mot en yta.
Nos i öppningen till nebulisator*	Stoppar nosen i öppningen där läkemedel kommer in från nebulisator.
Vinglig**	Djuret rör sig med en instabil och svajande rörelse.
Tid för behandling***	Anges i sekunder

* Frekvenser av beteendet. **Förekomst (ja/nej). ***Totalt tid från start till slut av nebulisering

Tabell 4. Etogram med beteenden som observerades under exponering av koldioxid.

Beteende	Beskrivning
Hoppar*	Lyfter sig snabbt och kraftfullt från marken.
Lokomotion*	Korsning över mittlinjen i kammaren.
”Rearing”*	Står på bakbenen.
Klättrar/krafsar*	Griper tag i ytor och försöker fly uppåt/Använder sina framtassar för att göra snabba rörelser mot en yta.
Vinglig**	Djuret rör sig med en instabil och svajande rörelse.
Tid från start till medvetlöshet	Tiden det tar från att djuret exponeras för koldioxid till dess den ligger ner avslappnad. Anges i sekunder.
Tid från start till andningsuppehåll	Tiden det tar från att djuret exponeras för koldioxid tills andningen upphör. Anges i sekunder.

* Frekvenser av beteendet. **Förekomst (ja/nej).

3.5 Behandling av data

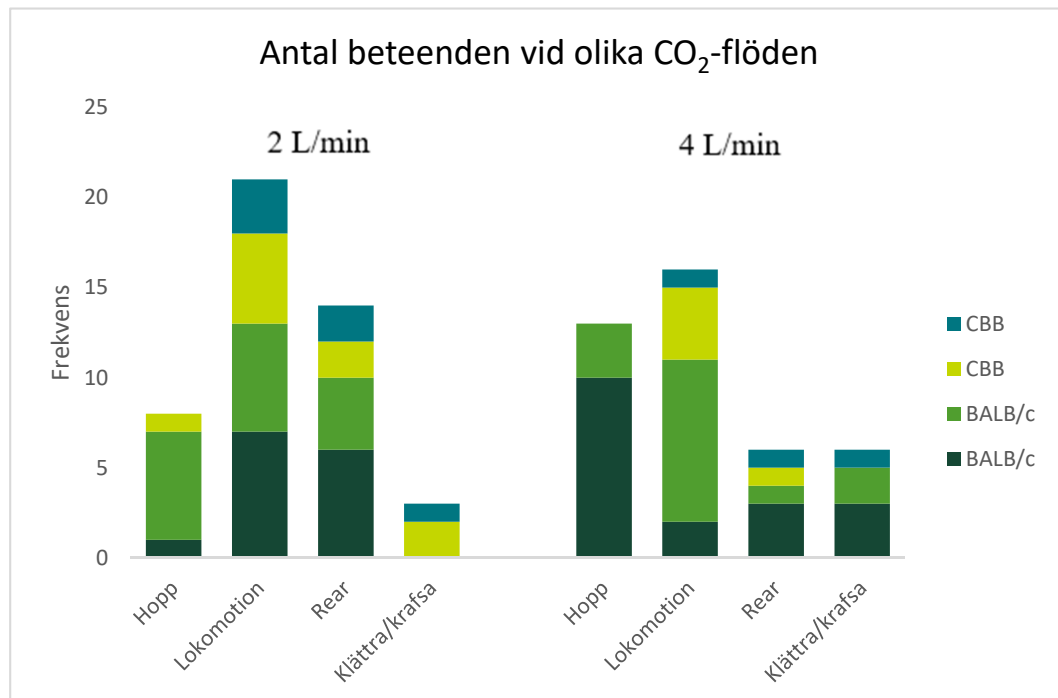
Beteendeobservationer gjordes med hjälp av programmet BORIS, där varje individ observerades var för sig.

Resultaten från beteendeobservationerna redovisades med hjälp av tabeller och figurer. Microsoft Excel användes för att sammanställa data.

4. Resultat

4.1 Flöde

Utvärderingen av beteendet vid olika flöde presenteras i figur 2, där skillnad mellan stammar visas. Det subjektiva intrycket var att 2L/min var värre för djuren eftersom det tog längre tid än 4 L/min och den totala aktiviteten var högre. För vidare försök valdes 2 L/min. En av BALB/c-mössen uppvisade högre lokomotion vid 4 L/min och den andra BALB/c-musen hade en ökad benägenhet att hoppa och klättra/krafsa, medan övriga beteenden visade en lägre frekvens än vid 2 L/min. CBB-mössen hade generellt lägre frekvenser än BALB/c-mössen. Vid jämförelse med 2L/min och 4L/min fanns en högre frekvens av olika beteenden vid 2L/min. Vid 2L/min tog det längre tid för mössen att somna än vid 4L/min.



Figur 2 Frekvens av olika beteenden hos 4 BALB/c- och 4 CBB-möss vid koldioxidbedövning med ett flöde på 2 (n=4) respektive 4 L/min (n=4) motsvarande 30 resp 70% fyllnadsgrad av kammarens volym per min med koldioxid.

4.2 Nebulisering

Resultatet från behandlingen med prokain av stammen BALB/c har utelämnats eftersom nebuliseringen inte blev korrekt utförd. För stammen CBB saknas en NaCl-kontroll. Två CBB-möss behandlades med pentobarbitalnatrium och resultaten presenteras var för sig.

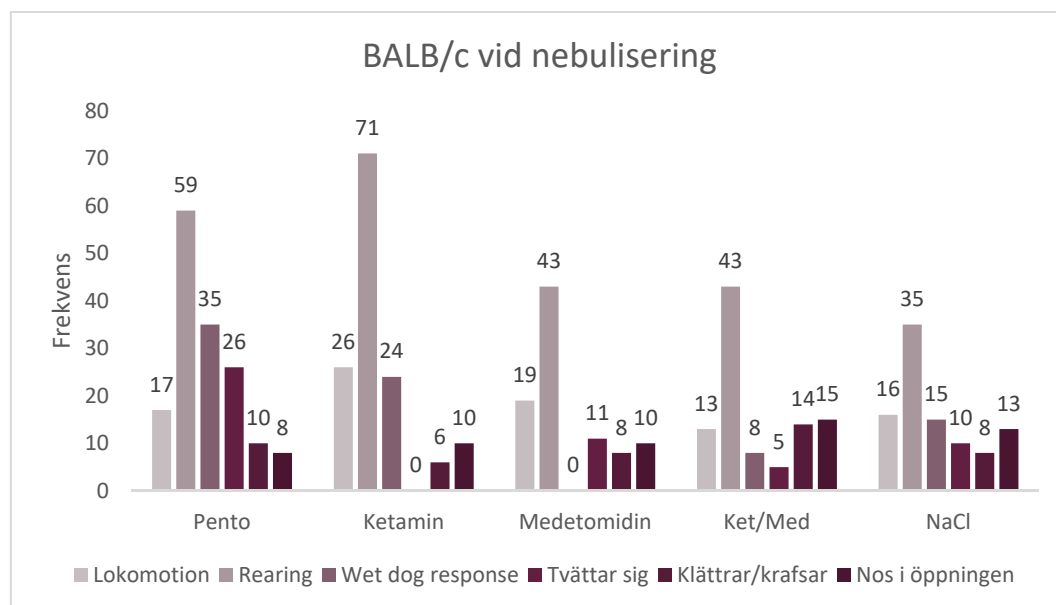
4.2.1 Beteendeobservationer

Utvärderingen av beteendet under nebulisering presenteras i figur 3, 4, 5 samt bilaga 1.

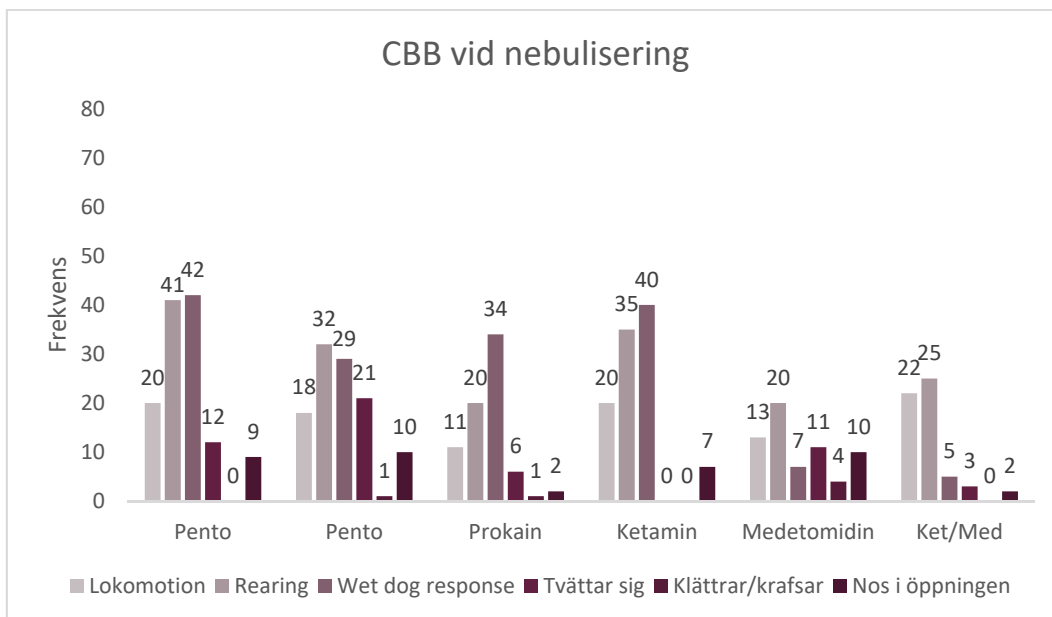
BALB/c-möss uppvisade hög frekvens av rearing och wet dog response vid exponering för pentobarbitalnatrium och ketamin. Frekvensen av att tvätta sig var högst för pentobarbitalnatrium. Vid exponering av BALB/c-mössen för NaCl var aktiviteten lägre än vid exponering för läkemedel.

CBB-möss uppvisade en lägre nivå av aktivitet i jämförelse med BALB/c. Frekvensen för wet dog response var lägre för medetomidin ensamt och i kombination med ketamin jämfört med övriga läkemedel. Frekvensen av rearing var lägre för medetomidin och prokain jämfört med ketamin och pentobarbitalnatrium. Skillnaden i frekvens för att tvätta sig skiljde sig mest mellan ketamin (0) och den ena pentobarbitalnatrium (21).

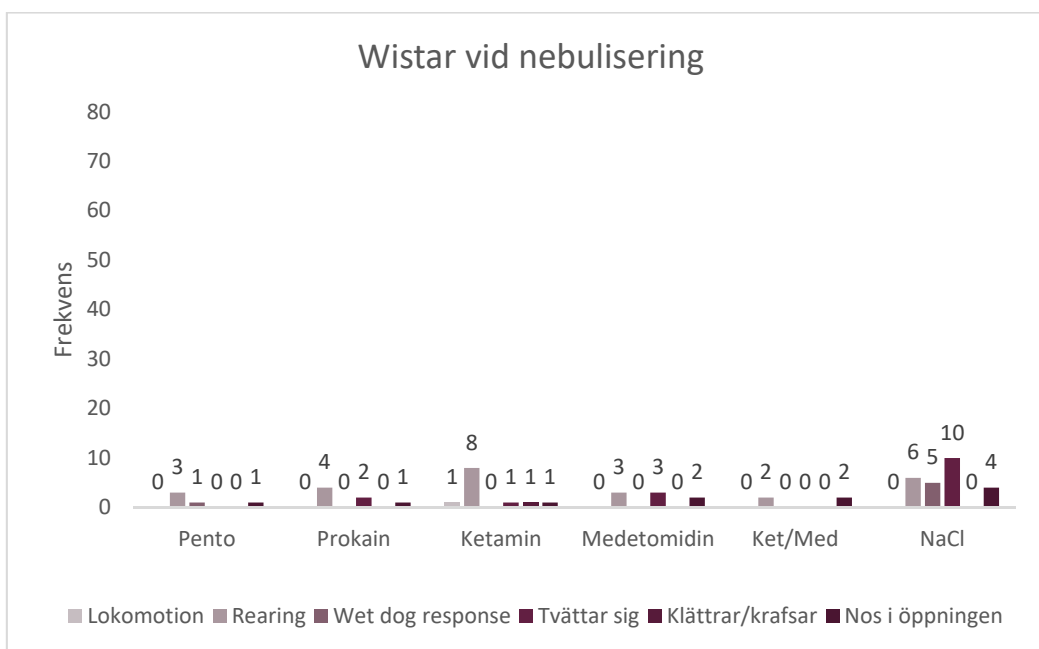
Vid jämförelse med NaCl, uppvisade råttorna låg aktivitet under exponering för alla läkemedel. Frekvensen för nosen i öppningen var högre för NaCl än för läkemedel. Frekvensen av rearing var hög med ketamin.



Figur 3 Frekvens av beteenden hos BALB/c-honor (en per behandling) under nebulisering med olika läkemedel



Figur 4 Frekvens av beteenden hos CBB-hanar (en per behandling) under nebulisering med olika läkemedel



Figur 5 Frekvens av beteenden hos Wistar av bägge kön (en per behandling) under nebulisering med olika läkemedel

4.2.2 Tid för nebulisering

Tiden för nebulisering respektive förekomsten av vinglighet presenteras i tabell 5 och 6, och visar en skillnad mellan läkemedlen. Pentobarbitalnatrium var en trögflytande substans och tog därför lång tid att nebulisera, cirka sju minuter. De resterande läkemedlen tog cirka fyra minuter. Medetomidin var läkemedlet som nebuliserades snabbast.

Tabell 5 Tid för nebulisering av läkemedel

Läkemedel	Tid för behandling
Pentobarbitalnatrium	06:48 - 07:56
Prokain	04:14 – 04:42
Ketamin	03:57 - 05:36
Medetomidin	02:18 – 03:53
Ketamin och medetomidin	03:57 - 04:31
NaCl	03:10 - 03:52

Behandling med alla läkemedel och NaCl resulterade i vinglighet för stammen BALB/c. För CBB-mössen uppstod vinglighet under nebulisering med medetomidin, ketamin-medetomidin och pentobarbitalnatrium. För stammen Wistar påvisande ingen vinglighet under behandling med de olika läkemedlen eller NaCl.

Tabell 6 Påverkan på djurens balans vid nebulisering. Skattning skedde genom blindad observation från film. Förklaring: +: vinglig, -: ej vinglig +/-: ett djur vinglig, ett djur ej vingligt, 0: data saknas.

Läkemedel	BALB/c	CBB	Wistar
Pentobarbitalnatrium	+	+ / -	-
Prokain	0	-	-
Ketamin	+	-	-
Medetomidin	+	+	-
Ketamin och medetomidin	+	+	-
NaCl	+	0	-

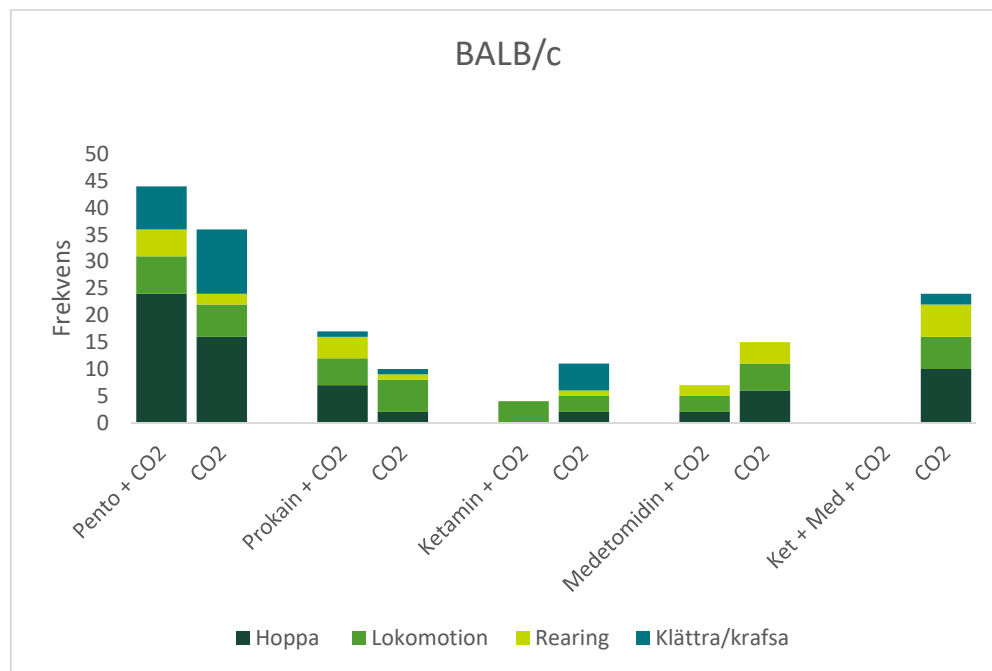
4.3 Koldioxidavlivning

Av mössen och råttorna visade stammen BALB/c högst frekvenser av de olika beteenden när de exponerades för koldioxid.

4.3.1 Beteendeobservationer

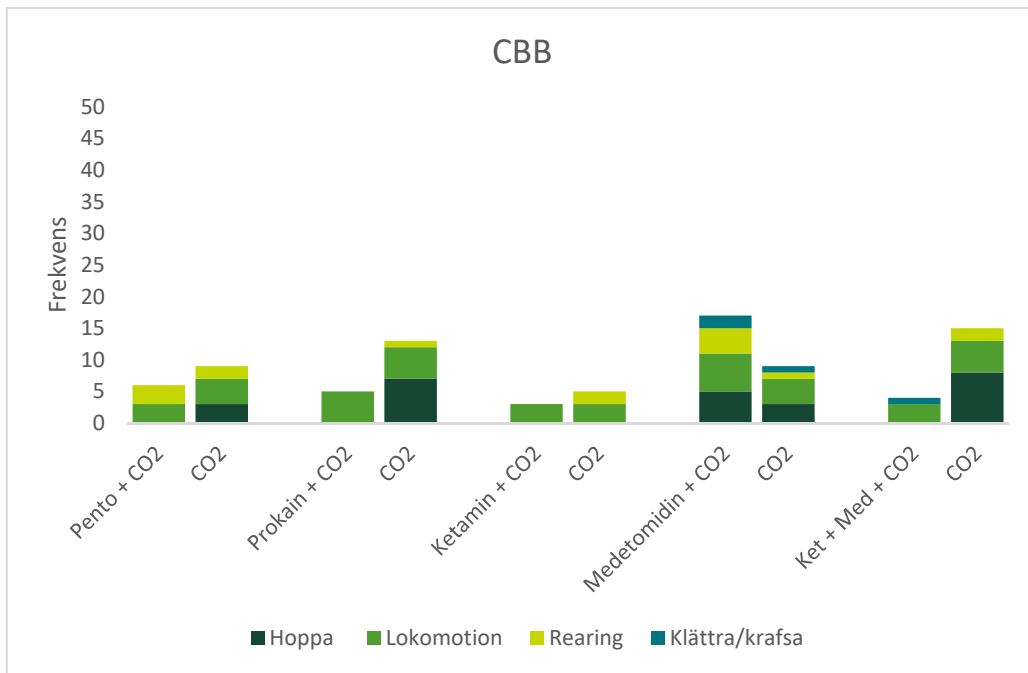
Frekvenser av beteenden under koldioxidexponering presenteras i figur 6, 7, 8 samt bilaga 2.

Efter nebulisering av BALB/c med ketamin-medetomidin var den frekvensen av beteenden 0 under koldioxidexponering. Efter ketamin och medetomidin var för sig var den sammanlagda frekvensen lägre än för kontrollerna. Efter behandling med prokain och pentobarbitalnatrium var frekvensen högre än för kontrollerna. BALB/c-mössen som fått ketamin ensamt eller i kombination med medetomidin varken hoppade, klättrade/krafsade eller visade rearing, se figur 6.



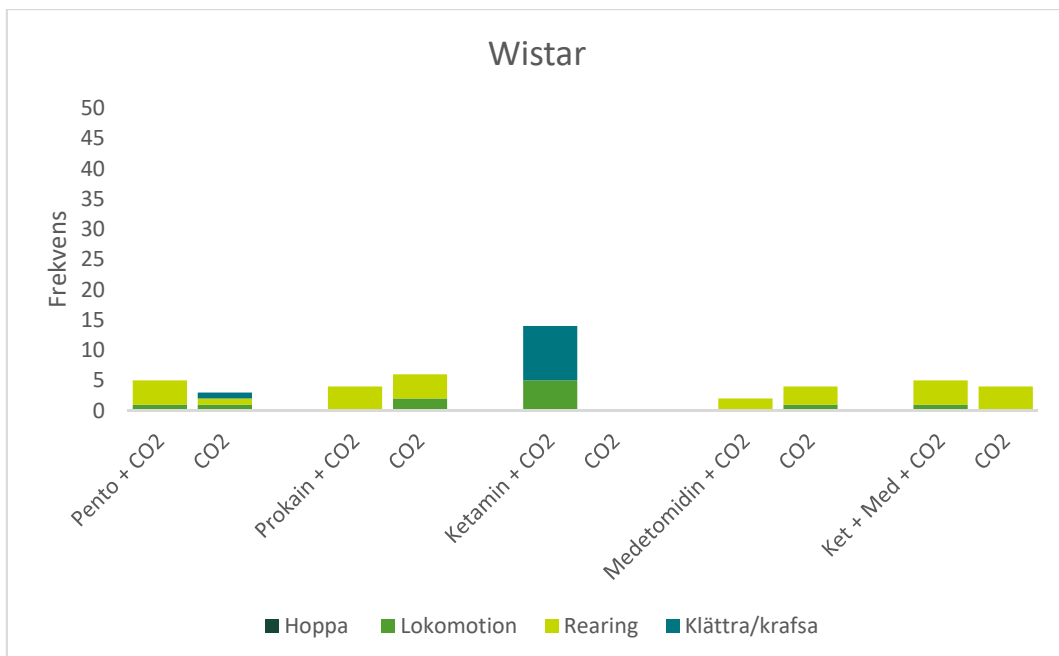
Figur 6 Frekvens av beteenden hos BALB/c-honor under koldioxidavlivning efter behandling med läkemedel ($n=1$ per läkemedel) jämfört med en obehandlad kontroll.

För stammen CBB sågs en lägre frekvens av beteenden efter nebulisering med pentobarbitalnatrium, prokain, ketamin och ketamin-medetomidin jämfört med kontroll, samt en högre frekvens efter nebulisering med medetomidin, av vilken största skillnaden mot kontroll bestod av rearing, se figur 7.



Figur 7 Frekvens av beteenden hos CBB-hanar under koldioxidavlivning efter behandling med läkemedel (n=1 per läkemedel) jämfört med en obehandlad kontroll.

Frekvensen av beteenden var generellt låga under koldioxidexponering av Wistar. Däremot uppmärksammades en högre frekvens av lokomotion och klättra/krafsa hos en råtta under koldioxidexponering efter premedicinering med ketamin. Kontrollen uppvisade ingen aktivitet, se figur 8



Figur 8 Frekvens av beteenden hos Wistar av bägge kön under koldioxidavlivning efter behandling med läkemedel (n=1 per läkemedel) jämfört med en obehandlad kontroll.

4.3.2 Tid till medvetslöshet och andningsuppehåll

Den totala tiden för nebulisering och koldioxidexponering var några minuter. Tiden varierade beroende på läkemedel och stam. Utöver beteendeobservationer mättes tid till förlorad rättningsreflex och upphörd andning, se tabell 7, 8 samt 9.

Medvetslöshet uppstod efter nebulisering med pentobarbitalnatrium snabbare jämfört med kontroll för stammen BALB/c. Medvetslöshet inträffade långsammare efter nebulisering med medetomidin, se tabell 7.

För stammen CBB inducerades medvetslöshet och andningsuppehåll långsammare jämfört med kontroll efter nebulisering med medetomidin och pentobarbitalnatrium, se tabell 8.

Wistar var den enda stam för vilken medvetslöshet och andningsuppehåll inträffade snabbare jämfört med kontroll efter premedicinering med medetomidin, se tabell 9.

Tabell 7. Tiden i sekunder det tog för möss av stammen BALB/c att uppnå medvetslöshet och andningsuppehåll där röd = minst 5 sekunder långsammare än kontroll och grön = minst 5 sekunder snabbare än kontroll

	Medvetslöshet		Andningsuppehåll	
	Läkemedel	Kontroll	Läkemedel	Kontroll
Prokain	51	49	113	99
Pentobarbitalnatrium	75	96	139	137
Medetomidin	82	77	124	117
Ketamin	26	67	96	107
Med + Ket	30	59	130	113

Prokain påverkade inte tid till medvetslöshet för BALB/c och Wistar, dessutom inducerades andningsuppehåll senare jämfört med kontroll för BALB/c. För stammen CBB inducerades medvetslöshet och andningsuppehåll snabbare jämfört med kontroll.

Tabell 8. Tiden i sekunder det tog för möss av stammen CBB att uppnå medvetslöshet och andningsuppehåll där röd = minst 5 sekunder långsammare än kontroll och grön = minst 5 sekunder snabbare än kontroll.

	Medvetslöshet		Andningsuppehåll	
	Läkemedel	Kontroll	Läkemedel	Kontroll
Prokain	46	58	99	113
Pentobarbitalnatrium	59	53	123	90
Medetomidin	71	55	129	92
Ketamin	27	59	110	116
Med + Ket	25	57	139	97

En gemensam nämnare för BALB/c, CBB och Wistar var att nebulisering med ketamin-medetomidin ledde till att medvetslösheten inducerades snabbare jämfört med kontroll, dock uppstod andningsuppehåll senare. Ytterligare sågs det att nebulisering med ketamin medförde att medvetslöshet inducerades snabbare för båda musstammarna. Dessutom inträffade andningsuppehåll tidigare än kontrollen.

Tabell 9. Tiden i sekunder det tog för råttor av stammen Wistar att uppnå medvetslöshet och andningsuppehåll där röd = minst 5 sekunder långsammare än kontroll och grön = minst 5 sekunder snabbare än kontroll

	Medvetslöshet		Andningsuppehåll	
	Läkemedel	Kontroll	Läkemedel	Kontroll
Prokain	59	56	148	149
Pentobarbitalnatrium	72	80	230	208
Medetomidin	60	72	155	239
Ketamin	78	77	209	165
Med + Ket	45	78	149	134

5. Diskussion

Syftet med pilotstudien var att utvärdera ett nytt tillvägagångssätt för att minska stress, smärta och rädsla vid bedövning med koldioxid. Försöket gjordes på möss och råttor som modell för djur som bedövas med koldioxid före slakt. En sådan förändring kan möta de etiska kraven för livsmedelsproduktion. Studiens hypotes var att premedicinering med läkemedel via nebulisering skulle reducera beteenden relaterade till smärta, stress och rädsla under bedövning med koldioxid. Råttor och möss användes som modell för fjäderfä och gris. Gnagare och gris är däggdjur och har samma typ av smärtreceptorer i andningsvägarna och reagerar likartat vid exponering för koldioxid med lufthunger och stress. Även fjäderfä reagerar avvärjande där smärtsamma tillstånd uppstår som exempelvis koldioxidexponering (Gentle 2011). Mössen och råttorna som användes i denna studie var överblivna som skulle avlivas.

Nebulisering med läkemedel före koldioxidbedövning har aldrig studerats tidigare vilket gör det omöjligt att jämföra med andra studier.

5.1 Nebulisering

Genom behandling via nebulisering före koldioxidbedövning får djuret genomgå en längre process vid avlivning vilket kan resultera i en förlängd stress. Man kan fundera över om det är värt att utsätta djuret för en extra process innan avlivning. Men som tidigare nämnt finns det en generell princip, att en skonsam avlivningsmetod som tar längre tid är att föredra före en snabb men plågsam (Leary et al. 2020). Eftersom kombinationen med ketamin och medetomidin gav positiva resultat i form av att medvetlöshet inträffade tidigare för alla stammarna, och att frekvensen av beteenden under CO₂-bedövning var lägre jämfört med kontroll för båda musstammarna, kan den behandlingen vara en fördel för djuren att genomgå. Dessutom fanns det ingen märkbar högre aktivitet under nebuliseringen, vilket kan betyda att exponeringen inte tillförde obehag. Vid nebulisering användes en separat kammare som var mindre än kammaren för koldioxidexponering. Råttornas rörelseutrymme vid nebulisering var begränsat eftersom samma kammare (1,5L) som för mössen användes. Utrymmet var så pass begränsat att det var svårt för dem att utföra ”rearing” eftersom kammarens tak var strax ovanför deras huvud. Detta kan ha påverkat bedömningen av t ex vinglighet på råttorna. Även utrymmet för lokomotion var begränsat, vilket försvårade möjligheten att upptäcka om de blev vingliga.

Få studier har hittats som visar hur djur reagerar när de utsätts för behandling med olika läkemedel via nebulisering. Arbetet tog delvis inspiration från en

publikation där möss hade exponerats för fentanylaerosol. Dock användes en ”head on” nebulisator vilket innebar att djuret var tvungen att fixeras under behandlingen. I studien kunde man se att fentanyl orsakade 100% dödlighet och att djuren inte visade tecken på någon irritation under inandningen (Manral et al. 2009). Eftersom fentanyl är beroendeframkallande och kan missbrukas av människan har det inte ingått i den föreliggande studien. Dessutom är fixering något som man vill undvika då det kan tillföra stress. I den föreliggande studien användes helkroppsexponering och inte noseponering, vilket medför en större åtgång av läkemedel, vilket resulterar i ett dyrare system. En hög kostnad kan motverka användning av nebulisering. Ett mål var att undersöka ett läkemedel som inte är beroendeframkallande (prokain). Övriga läkemedel kan potentiellt missbrukas av människan.

5.2 Koldioxidavlivning

Val av koldioxidflöde som gjordes efter subjektiv bedömning, stärktes av den blindade bedömningen av filmerna. Den visade att mössen som exponerades för ett flöde på 2 L/min hade en högre frekvens av beteenden än möss som exponerades för 4 L/min. Möss som utsattes för 4 L/min hade en lägre frekvens av lokomotion och rearing, dock hoppade de mer. I studien valdes ett flöde med hög aktivitet för att enklare kunna upptäcka förändringar efter exponering av läkemedel.

Vid koldioxidexponering av råttor och möss användes samma kammare (5,6 L). Detta innebar att råttorna hade mindre plats att röra sig på än vad mössen hade. Detta kan ha resulterat i att det blev en lägre frekvens av beteenden hos råttorna eftersom de var begränsade att utföra vissa rörelser. Till exempel hade råttorna inte plats att hoppa eftersom de nådde taket när de utförde rearing. På grund av detta hade försök på råttorna i en större kammare kunnat visa om det finns tendenser till att hoppa även hos råttor. Dessa resultat ger en inblick i hur olika stammar av möss kan svara olika på koldioxidexponering, vilket kan vara viktigt att beakta i framtida studier.

Tidigare undersökningar som uppmärksammades i artikeln skriven av Turner et al. (2020) har utvärderat effekten av lugnande medel som gavs oralt eller via injektion. Till skillnad från den föreliggande studien, minskade inte tiden till medvetslöshet vid exponering av koldioxid. Liknande resultat visades på råttor som fått premedicinering med acepromazin eller pentobarbitalnatrium som gavs oralt eller via injektion, det var ingen skillnad i tid till medvetslöshet på råttor som premedicinerats före koldioxidexponering eller inte. I den föreliggande studien visades att premedicinering med läkemedel ledde till att medvetslöshet inducerades snabbare under exponering av koldioxid i de flesta fallen.

I tidigare studier har medvetslöshet efter exponering av koldioxid inträffat efter 30 till 150 sekunder på råttor och 51 till 75 sekunder på möss (Steiner et al. 2019).

På BALB/c-mössen i den föreliggande studien, inducerades medvetslöshet inom denna tidsram, med undantag för den mus som hade premedicerats med medetomidin, samt de två kontrollmössen vid pentobarbitalnatrium och medetomidin (77–96 sekunder). Denna skillnad kan bero på att de mössen var väldigt aktiva. För CBB-möss och Wistar-råttor inträffade medvetslöshet inom publicerad tidsram.

5.3 Kunde hypotesen styrkas?

Nebulisering med kombinationen av ketamin och medetomidin resulterade i en tydlig förändring för tiden till medvetslöshet, då denna kombination inducerade medvetslöshet snabbare för alla stammar. Dessutom uppvisade djuren lägre frekvenser av beteenden under nebulisering. Resterande läkemedel resulterade i olika reaktion beroende på stam. Exempelvis reagerade BALB/c-mössen kraftigt på nebulisering med pentobarbitalnatrium och efterföljande koldioxidexponering. Men CBB-mössen reagerade betydligt mer under koldioxidexponeringen efter exponering för medetomidin. Råttorna däremot hade en låg aktivitet under nebulisering av alla läkemedlen men reagerade kraftigt under exponering för koldioxid efter exponering för ketamin.

Sammanfattningsvis resulterade nebulisering med pentobarbitalnatrium i en ökad frekvens av de flesta beteenden på BALB/c-mössen och ketaminexponering ledde till minskad frekvens av alla beteenden hos BALB/c- och CBB-möss men inte Wistaråttor. Slutligen visar resultaten att kombinationen av medetomidin och ketamin ledde till minskad frekvens av beteenden på alla djur.

5.4 Applicering på gris och fjäderfä

Koldioxid för bedövning vid slakt är en vanlig metod som används både för gris och fjäderfä. Koldioxid är en gas som inducerar smärta och stress hos djur (Leary et al. 2020). På grund av detta letar forskare efter bättre metoder.

Att använda möss och råttor som djurmodeller för fjäderfä och gris kan ifrågasättas. Men motiveringen till att använda gnagare som modell är att de har samma typ av smärtreceptorer och liksom grisar uppvisar andnöd vid exponering för koldioxid. Däremot kan det finnas svårigheter att översätta reaktioner på gnagare till fjäderfä då fåglar och däggdjur skiljer sig åt mer i anatomi och fysiologi. Koldioxid kan orsaka rörelser hos fåglar som exempelvis flaxande av vingarna eller andra motoriska rörelser (Leary et al. 2020), vilket kan tolkas som tecken på stress. Det har även beskrivits att exponering av koldioxid kan orsaka skakning på huvudet och flämtande andning (Raj et al. 2006), vilket liknar det beteende som kan ses på möss som börjar flämta vid exponering av koldioxid. På grund av dessa liknelser är

förhoppningen att kunna använda gnagare som djurmodeller för undersöka generella reaktioner och utveckla skonsammare metoder som kan appliceras på gris och fjäderfä.

Denna studie var en pilot för att undersöka vilka läkemedel som skulle kunna vara intressanta för vidare och större försök på gnagare. Därefter kan undersökningar på fåglar och grisar utföras, för att se hur de olika läkemedlen påverkar beteenden vid koldioxidbedövning på de djurslagen.

5.5 Styrkor och svagheter

En betydande styrka av denna studie är att den undersökt ett nytt sätt att tillföra läkemedel inför koldioxidbedövning. Studien kan fungera som en katalysator för framtida forskning inom området.

En svårighet vid användning av läkemedel hos djur inför slakt är karenstider, vilket innebär att en tid måste passeras innan djuret kan slaktas och köttet kan konsumeras. Två av läkemedlen (prokain och ketamin) valdes pga. att karenstiden är noll dagar vid andra administreringsvägar för gris (FASS Djurläkemedel 2024a; FASS Djurläkemedel 2024b). För att läkemedlen ska kunna användas via nebulisering i samband med slakt måste studier göras för att undersöka om rester kan finnas kvar i köttet.

Doser för nebulisering baserades på doser som används för injektion av läkemedlen och vilken volym djuren andas in under 2 minuter. Trots det blev djuren inte så påverkade som förväntat. En förklaring kan vara att läkemedlen inte tas upp lika bra via lungorna som vid injektion. Om högre doser måste användas blir behandlingen ännu mer kostsam.

En svaghet är antalet djur som har används i studien. Eftersom studien var en pilot, kan inga resultat med statistisk säkerhet fås.

Studien har inte heller undersökt hur obehagligt djuren upplever nebulisering. För att ta reda på det behöver djuren ha en möjlighet att lämna kammaren där nebulisering sker. Man kan även undersöka om en belöning i nebuliseringskammaren påverkar om djuren stannar.

I studien observerades att det fanns en variation för den tid det tog att nebulisera de olika läkemedlen. Pentobarbitalnatrium stack ut med en märkbar lång tid, mellan sju och åtta minuter, medan de övriga läkemedlen tog cirka tre till fem minuter. Pentobarbitalnatrium är mycket trögflytande, vilket troligtvis förklarar den långa tiden för nebulisering. En acceptabel tid för nebulisering ansågs vara maximalt fem minuter. En längre tid skulle kunna orsaka mer stress för djuren då kammaren är relativt liten. Djuren blev även fuktiga under nebulisering, vilket kan resultera i nedkylning. Dessutom noterades det att pentobarbitalnatrium ledde till en ökad frekvens av "rearing" vid CO₂-exponering hos alla stammar som användes i studien. Pentobarbitalnatrium inducerade medvetlöshet snabbare hos BALB/c-

mössen jämfört med kontroll, men under beteendeobservationerna noterades det att de hade väldigt höga frekvenser av beteenden. Dock behöver en snabbare medvetlöshet inte betyda att det är mer skonsamt.

Under denna studie användes två olika stammar av möss och en stam av råttor. Under studiens gång märktes stora skillnader på aktiviteten mellan stammarna vilket resultaten visar. CBB-mössen var betydligt lugnare och mer lätthanterliga än BALB/c-mössen, vilket kan bero på att de hade hanterats betydligt mycket mer av personal och elever innan studien började. Denna skillnad går att se tydligt under beteendeobservationerna då BALB/c-möss hade högre frekvenser av de olika beteendena i jämförelse med CBB-möss.

Utöver skillnaderna mellan musstammarna fanns det skillnad mellan mössen och råttorna. En betydande skillnad var att inte bägge kön var representerade hos musstammarna, vilket var fallet hos råttorna. Av stammen CBB användes bara hanar, BALB/c-mössen var honor och Wistar-råttorna var både honor och hanar. Utöver att Wistar-råttorna var betydligt lugnare än vad mössen var, varierade det mellan råttorna. Under studien användes åtta hanar och fyra honor och vid hantering upplevdes hanarna lugnare än honorna. Wistar-råttorna hade en låg frekvens under de flesta behandlingar förutom vid ketamin-nebulisering under CO₂-exponering, som en hane fick. I studien fanns inte tillgång till tillräckligt med hanar eller honor för att kunna använda endast ett kön.

Under försöksperioden på mössen genomfördes ett burbyte av personal som ansvarade för skötsel av burarna på avdelningen. Samma dag sågs en ökad aktivitetsnivå hos mössen jämfört med övriga dagar. Det var denna dag en BALB/c-mus fick pentobarbitalnatrium. En skillnad sågs trots det mellan behandlad mus och kontroll.

5.6 Etiska och sociala aspekter

Med fokus på sociala och etiska aspekter finns det fördelar med att använda premedicinering med lugnande eller lokalbedövande medel innan djur slaktas, eftersom en human slakt där djuret upplever minimal smärta och stress är ett mål som måste strävas mot. Det är en viktig drivkraft för att utforska och utveckla mer effektiva och skonsamma metoder för bedövning vid slakt. Att ha möjlighet att minimera lidande och stress hos djuren förbättrar inte bara djurens välbefinnande utan också leder sannolikt till en bättre kvalitet på köttprodukterna och ett mer hållbart jordbruk. Detta främjar också ekonomisk hållbarhet genom att minska stressrelaterade biologiska effekter som kan försämra köttkvaliteten. Därför är det av yttersta vikt att fortsätta forskningen och utvecklingen av metoder som kan säkerställa en mer human slaktprocess för alla djurslag.

Det finns dock betydande risker för personalens säkerhet och hälsa vid hantering av stora mängder läkemedel i slaktmiljön. Det är viktigt att utvärdera hur dessa

läkemedel kan hanteras för att minimera på eventuella risker för olyckor eller långsiktiga hälsoproblem. Åtgärder som strängare personalutbildning, säkerhetsprotokoll och undersökning av alternativa metoder kan behövas för att säkerställa en trygg arbetsmiljö.

Olika utrymmen som djur placeras i kan kopplas till etiska frågor om hur miljö i form av begräsningar kan påverka hur ett djur beter sig och vilka beteenden kopplade till smärta och stress som döljs på grund av att de inte har tillräckligt med utrymme. Ur socialt perspektiv skulle det kunna vara relevant att överväga hur olika djurarter och stammar påverkas av sin omgivning och tillgång till utrymme under bedövning och slakt. Exempel från denna studie är om man genom att ge råttorna mer utrymme vid nebulisering och koldioxidexponering skulle kunna observera om det finns ett behov att utföra rearing eller att hoppa i större utsträckning än vad denna pilotstudie visade.

Funderingar kring varför man inte använder en fysisk metod som nackdislokation för att avliva möss har framkommit under studien. Även om koldioxidavlivning betraktas som obehagligt för gnagare kan det finnas etiska dilemman kring att låta personal upprepa en traumatisk handling genom att dra nacken av ett stort antal djur. Eftersom ett stort antal möss behöver avlivas är det mer tidseffektivt att använda sig av koldioxidavlivning, dessutom blir det en minskad påfrestning på personalen.

5.7 Slutsats

Slutsatsen är att kombinationen av medetomidin och ketamin har störst potential att minska lidande vid koldioxidavlivning för alla djur som användes under studien. Reaktionen under nebulisering visade inte på ökad aktivitet och under påföljande koldioxidexponering var djuren lugna. Utöver det behöver individuella val göras för varje stam då de reagerar olika beroende på läkemedel. Större studier behöver utföras med fler djur för att hitta skillnader med statistisk signifikans.

Referenser

- Barash, P.G. (2009). *Clinical Anesthesia*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Blomquist S M (1957) The carbon dioxide method of stunning pigs for slaughter. *Food Manufacture* 32: 230-233
- Browning, H. & Veit, W. (2020). Is Humane Slaughter Possible? *Animals*, 10 (5), 799. <https://doi.org/10.3390/ani10050799>
- Carstens, E. & Moberg, G.P. (2000). Recognizing Pain and Distress in Laboratory Animals. *ILAR Journal*, 41 (2), 62–71. <https://doi.org/10.1093/ilar.41.2.62>
- Chang, K.H., Moon, S.-H., Oh, J.Y., Yoon, Y.-S., Gu, N., Lim, C.-Y., Park, B.J. & Nam, K.C. (2019). Comparison of Salbutamol Delivery Efficiency for Jet versus Mesh Nebulizer Using Mice. *Pharmaceutics*, 11 (4), 192. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11040192>
- Clarke, K.W., Trim, C.M. & Hall, L.W. (red.) (2014). Chapter 6 - General pharmacology of the injectable agents used in anaesthesia. I: *Veterinary Anaesthesia (Eleventh Edition)*. W.B. Saunders. 135–153. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-2793-2.00006-2>
- Collier, H.O.J. & Lee, I.R. (1963). Nociceptive Responses of Guinea-Pigs to Intradermal Injections of Bradykinin and Kaludin-10. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 21 (1), 155–164. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1963.tb01511.x>
- Colorado State University. (2006). <http://csu-cvmb.colostate.edu/Documents/anesthesia-painmanagement-2011-02-pain-score-handout-feline.pdf> använd [2024-01-16]
- Cullen, L.K. (1996). Medetomidine sedation in dogs and cats: A review of its pharmacology, antagonism and dose. *British Veterinary Journal*, 152 (5), 519–535. [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(96\)80005-4](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(96)80005-4)
- Dale, O., Hjortkjær, R. & Kharasch, E.D. (2002). Nasal administration of opioids for pain management in adults. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 46 (7), 759–770. <https://doi.org/10.1034/j.1399-6576.2002.460702.x>
- Dodman, N.H. (1977). Observations on the Use of the Wernberg Dip-Lift Carbon Dioxide Apparatus for Pre-Slaughter Anaesthesia of Pigs. *British Veterinary Journal*, 133 (1), 71–80. [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(17\)34190-8](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(17)34190-8)
- FASS Djurläkemedel. (2024b). *Ketador* vet. <https://www.fass.se/LIF/product?userType=1&nplId=20111216000082#linkwithdrawal-period> [2024-05-08]
- FASS Djurläkemedel. (2024a). *Procamidor* vet. <https://www.fass.se/LIF/product?userType=1&nplId=20130612000076#linkwithdrawal-period> [2024-05-08]
- Gentle, M.J. (2011). Pain issues in poultry. *Applied Animal Behaviour Science*, 135 (3), 252–258. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2011.10.023>
- Gerritzen, M.A., Lambooi, B., Reimert, H., Stegeman, A. & Spruijt, B. (2004). On-farm euthanasia of broiler chickens: effects of different gas mixtures on behavior and brain activity. *Poultry Science*, 83 (8), 1294–1301. <https://doi.org/10.1093/ps/83.8.1294>

- Goralski, J.L. & Davis, S.D. (2014). Breathing easier: Addressing the challenges of aerosolizing medications to infants and preschoolers. *Respiratory Medicine*, 108 (8), 1069–1074. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2014.06.004>
- Haenisch, B., Walstab, J., Herberhold, S., Bootz, F., Tschaikin, M., Ramseger, R. & Bönisch, H. (2010). Alpha-adrenoceptor agonistic activity of oxymetazoline and xylometazoline. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 24 (6), 729–739. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2009.00805.x>
- Langford, D.J., Bailey, A.L., Chanda, M.L., Clarke, S.E., Drummond, T.E., Echols, S., Glick, S., Ingrao, J., Klassen-Ross, T., LaCroix-Fralish, M.L., Matsumiya, L., Sorge, R.E., Sotocinal, S.G., Tabaka, J.M., Wong, D., van den Maagdenberg, A.M.J.M., Ferrari, M.D., Craig, K.D. & Mogil, J.S. (2010). Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nature Methods*, 7 (6), 447–449. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1455>
- Leary, S., Pharmaceuticals, F., Underwood, W., Anthony, R., Cartner, S., Johnson, C.L. & Patterson-Kane, E. (2020). AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition.
- Manral, L., Muniappan, N., Gupta, P.K., Ganesan, K., Malhotra, R.C. & Vijayaraghavan, R. (2009). Effect of exposure to fentanyl aerosol in mice on breathing pattern and respiratory variables. *Drug and Chemical Toxicology*, 32 (2), 108–113. <https://doi.org/10.1080/01480540802587214>
- Moberg GP (1999). When does stress become distress? *Lab Anim* 28: 422 – 426.
- Mogil, J.S. (2009). Animal models of pain: progress and challenges. *Nature Reviews Neuroscience*, 10 (4), 283–294. <https://doi.org/10.1038/nrn2606>
- Nowacka, A. & Borczyk, M. (2019). Ketamine applications beyond anesthesia – A literature review. *European Journal of Pharmacology*, 860, 172547. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172547>
- O’Callaghan, C. & Barry, P.W. (1997). The science of nebulised drug delivery. *Thorax*, 52 (Suppl 2), S31–S44
- Raj, A.B.M. (2006). Recent developments in stunning and slaughter of poultry. *World’s Poultry Science Journal*, 62 (3), 467–484. <https://doi.org/10.1017/S0043933906001097>
- Raj, A.B.M. & Gregory, N.G. (1995). Welfare Implications of the Gas Stunning of Pigs 1. Determination of Aversion to the Initial Inhalation of Carbon Dioxide or Argon. *Animal Welfare*, 4 (4), 273–280. <https://doi.org/10.1017/S096272860001798X>
- Raj, A.B.M., Gregory, N.G. & Wotton, S.B. (1991). Changes in the somatosensory evoked potentials and spontaneous electroencephalogram of hens during stunning in argon-induced anoxia. *British Veterinary Journal*, 147 (4), 322–330. [https://doi.org/10.1016/0007-1935\(91\)90004-7](https://doi.org/10.1016/0007-1935(91)90004-7)
- Raj, A.B.M., Sandilands, V. & Sparks, N.H.C. (2006). Review of gaseous methods of killing poultry on-farm for disease control purposes. *The Veterinary Record*, 159 (8), 229–235. <https://doi.org/10.1136/vr.159.8.229>
- Rodríguez, P., Dalmau, A., Ruiz-de-la-Torre, J.L., Manteca, X., Jensen, E.W., Rodríguez, B., Litvan, H. & Velarde, A. (2008). Assessment of unconsciousness during carbon dioxide stunning in pigs. *Animal Welfare*, 17 (4), 341–349. <https://doi.org/10.1017/S0962728600027834>
- Sheikh, N.K. & Dua, A. (2024). Procaine. I: *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551556/> [2024-02-22]
- Sindhøj, E., Lindahl, C. & Bark, L. (2021). Review: Potential alternatives to high-concentration carbon dioxide stunning of pigs at slaughter. *Animal*, 15 (3), 100164. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2020.100164>
- Sotocina, S.G., Sorge, R.E., Zaloum, A., Tuttle, A.H., Martin, L.J., Wieskopf, J.S., Mapplebeck, J.C., Wei, P., Zhan, S., Zhang, S., McDougall, J.J., King, O.D. & Mogil, J.S. (2011). The Rat Grimace Scale: A Partially Automated Method for Quantifying Pain in the Laboratory Rat via Facial Expressions. *Molecular Pain*, 7, 1744-8069-7–55. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-7-55>

- Statens Jordbruksverkets föreskrifter och allmänna råd (SJVFS 2019:8) om slakt och annan avlivning av djur; saknr L 22
- Steiner, A.R., Axiak Flammer, S., Beausoleil, N.J., Berg, C., Bettschart-Wolfensberger, R., García Pinillos, R., Golledge, H.D.R., Marahrens, M., Meyer, R., Schnitzer, T., Toscano, M.J., Turner, P.V., Weary, D.M. & Gent, T.C. (2019). Humanely Ending the Life of Animals: Research Priorities to Identify Alternatives to Carbon Dioxide. *Animals: an Open Access Journal from MDPI*, 9 (11), 911. <https://doi.org/10.3390/ani9110911>
- Turner, P.V., Hickman, D.L., van Luijk, J., Ritskes-Hoitinga, M., Sargeant, J.M., Kurosawa, T.M., Agui, T., Baumans, V., Choi, W.S., Choi, Y.-K., Flecknell, P.A., Lee, B.H., Otaegui, P.J., Pritchett-Corning, K.R. & Shimada, K. (2020). Welfare Impact of Carbon Dioxide Euthanasia on Laboratory Mice and Rats: A Systematic Review. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00411>
- Wright-Williams, S.L., Courade, J.-P., Richardson, C.A., Roughan, J.V. & Flecknell, P.A. (2007). Effects of vasectomy surgery and meloxicam treatment on faecal corticosterone levels and behaviour in two strains of laboratory mouse. *PAIN*, 130 (1), 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2006.11.003>

Populärvetenskaplig sammanfattning

Bedövning med koldioxid är en vanlig metod som används för att bedöva grisar och fjäderfä innan de slaktas för human konsumtion. Vid exponering av höga koncentrationer av koldioxid minskar hjärnaktiviteten och medvetlöshet inträffar. En idealisk bedövningsmetod ska innebära att djuret förlorar medvetandet utan att skapa någon form av stress eller smärta. Användning av koldioxid är även en vanlig metod för avlivning av möss och råttor i experimentell forskning. Syftet med denna studie var att utvärdera ett nytt tillvägagångssätt för att försöka minska stress, smärta och rädsla vid bedövning med koldioxid. Som modell användes mus och råtta. Studiens hypotes var att premedicinering med läkemedel via nebulisering före med koldioxid kan minska beteenden som är relaterade till smärta, stress och rädsla. Nebulisering är en metod varvid vätskor omvandlas till aerosolform (dimma) och därigenom kan läkemedel effektivt nå luftvägarna direkt. Den används vid behandling av sjukdomar, till exempel astma och lunginflammation.

Denna studie gjordes under våren 2024. Två olika flöden av koldioxid utvärderades på åtta möss av två olika stammar. Två honor av stammen BALB/c och två hanar av stammen CBB avlivades med koldioxid av fyllnadsgrad motsvarande 35 % av kammarens volym per min, vilket avrundades till ett flöde på 2 L CO₂/min. Därefter avlivades två BALB/c-honor och två CBB-hanar med fyllnadsgraden 71 % CO₂ per minut, avrundades till ett flöde på 4 L CO₂/min. Det subjektiva intrycket var att 2 L/min orsakade mer obehag under längre tid än 4 L/min. För vidare försök valdes därför 2 L/min.

Till andra delen av studien användes mushonor av stammen BALB/c och mushanar av stammen CBB samt råttor av bägge kön av stammen Wistar. För premedicinering via nebulisering användes ett avlivningsmedel (pentobarbitalnatrium), ett lokalbedövningsmedel (prokain), ett anestesimedel (ketamin) och ett lugnande läkemedel (medetomidin). Förutom att varje läkemedel nebuliserades var för sig, gavs även en kombination av ketamin och medetomidin. En mus respektive råtta i taget placerades i en plexiglaskammare, där de exponerades för ett läkemedel eller koksalt (kontroll). Därefter flyttades djuret till en större kammare, tillsammans med en obehandlad burkamrat och båda exponerades för koldioxid tills andningen upphörde. Nebulisering och koldioxidexponering filmades för senare utvärdering av beteenden. Filmerna var

kodade och numrerade i en randomiserad ordning för att observatören skulle vara blindad för om djuren fått läkemedel och i så fall vilket läkemedel, eller koksalt eller inte utsatts för nebulisering. Beteenden som tolkas som tecken på stress och obehag kvantifierades.

Resultaten från nebulisering visade att BALB/c-möss uppvisade hög frekvens av rearing (stå på bakbenen) och wet dog response (skaka kraftigt på kroppen som en blöt hund) vid exponering för ketamin och pentobarbitalnatrium. Frekvensen av att tvätta sig var som högst för pentobarbitalnatrium. Vid exponering för koksalt var BALB/c-mössens aktivitet (sammanlagda beteenden) lägre än vid exponering för läkemedel. CBB-möss och Wistar-råttor uppvisade en lägre nivå av aktivitet i jämförelse med BALB/c-möss. Alla läkemedel och koksalt resulterade i vinglighet på BALB/c-möss. För CBB-mössen uppstod vinglighet av medetomidin, ketamin-medetomidin och pentobarbitalnatrium. Wistar-råttorna uppvisade ingen vinglighet under nebulisering.

Av möss och råttor visade BALB/c-möss högst frekvenser av olika beteenden när de exponerades för koldioxid. Den totala tiden för nebulisering och koldioxidexponering varade några minuter. En gemensam nämnare för alla djur var att nebulisering med ketamin-medetomidin gjorde att medvetlöshet inducerades snabbare jämfört med kontroll, dock uppstod andningsuppehåll senare än för kontrollerna.

Slutsatsen är att nebulisering med kombinationen av medetomidin och ketamin leder till mindre stress och obehag vid bedövning med koldioxid på mus och råtta. Innan det skulle kunna användas på livsmedelsproducerande djur vid slakt måste effekten utvärderas på slaktdjur och undersökningar visa att köttet inte blir farligt att konsumera. Metoden kräver en stor mängd läkemedel vilket skulle vara kostsamt och läkemedlen kan dessutom missbrukas.

Tack

Vill tillägna ett stort tack till mina handledare Patricia Hedenqvist och Vanessa Bettembourg som har svarat på många av mina frågor under arbetets gång. Vill även rikta ett stort tack till Patricia för din positivitet och ditt stöd som har betytt mycket för mig.

Vill även tacka min familj för ert stöd under dessa fem år av studier. Tack för att ni alltid ha trott på mig!

Bilaga 1 – Beteendeobservation vid nebulisering

Film	Stam	Behandling	Lokomotion	Rearing	Wet dog response	Tvätta r sig	Klättrar/krafsar	Nos i öppninge n
1	Wistar	Ket/Med	0	2	0	0	0	2
3	CBB	Medetomidin	13	20	7	11	4	10
4	BALB/c	NaCl	16	35	15	10	8	13
5	Wistar	Prokain	0	4	0	2	0	1
7	BALB/c	Medetomidin	19	43	0	11	8	10
8	BALB/c	Ketamin	26	71	24	0	6	10
9	BALB/c	Pentobarbit alnatrium	17	59	35	26	10	8
10	BALB/c	Ket/Med	13	43	8	5	14	15
11	Wistar	Medetomidin	0	3	0	3	0	2
12	Wistar	Pentobarbit alnatrium	0	3	1	0	0	1
13	CBB	Pentobarbit alnatrium	20	41	42	12	0	9
14	BALB/c	Prokain	28	95	25	46	16	9
15	CBB	Ket/Med	22	25	5	3	0	2
16	Wistar	NaCl	0	6	5	10	0	4
17	Wistar	Ketamin	1	8	0	1	1	1
18	CBB	Pentobarbit alnatrium	18	32	29	21	1	10
19	CBB	Prokain	11	20	34	6	1	2
20	CBB	Ketamin	20	35	40	0	0	7

Bilaga 2 – Beteendeobservation vid koldioxidexponering

Hoppa					
	Prokai n	Pentobarbit al natirum	Medetomidi n	Ketami n	Med + Ket
BALB/c	7	24	2	0	0
BALB/c kontroll	2	16	6	2	10
CBB	0	0	5	0	0
CBB kontroll	7	3	3	0	8
Wistar	0	0	0	0	0
Wistar kontroll	0	0	0	0	0
Lokomotion					
	Prokai n	Pentobarbit al natirum	Medetomidi n	Ketami n	Med + Ket
BALB/c	5	7	3	4	0
BALB/c kontroll	6	6	5	3	6
CBB	5	3	6	3	3
CBB kontroll	5	4	4	3	5
Wistar	0	1	0	5	1
Wistar kontroll	2	1	1	0	0

"Rearing"					
	Prokai	Pentobarbit	Medetomidi	Ketami	Med +
	n	alnatirum	n	n	Ket
BALB/c	4	5	2	0	0
BALB/c kontroll	1	2	4	1	6
CBB	0	3	4	0	0
CBB kontroll	1	2	1	2	2
Wistar	4	4	2	0	4
Wistar kontroll	4	1	3	0	4
Klättra/Krafsa					
	Prokai	Pentobarbit	Medetomidi	Ketami	Med +
	n	alnatirum	n	n	Ket
BALB/c	1	8	0	0	0
BALB/c kontroll	1	12	0	5	2
CBB	0	0	2	0	1
CBB kontroll	0	0	1	0	0
Wistar	0	0	0	9	0
Wistar kontroll	0	1	0	0	0

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. Även om du inte publicerar fulltexten kommer den arkiveras digitalt. Om fler än en person har skrivit arbetet gäller krysset för samtliga författare. Du hittar en länk till SLU:s publiceringsavtal på den här sidan:

- <https://libanswers.slu.se/sv/faq/228316>.

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.