



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

Beteendeförändringar vid användning av opioiden butorfanol till friska getter

Behavioral changes when using the opioid butorphanol in
healthy goats

Josefine Amnesten

Beteendeförändringar vid användning av opioiden butorfanol till friska getter

Behavioral changes when using the opioid butorphanol in healthy goats

Josefine Amnesten

Handledare: Eva Sandberg, SLU, Sveriges Lantbruksuniversitet,
Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

Examinator: Kristina Dahlborn, SLU, Sveriges Lantbruksuniversitet,
Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad E-nivå

Kurstitel: Examensarbete i Husdjursvetenskap

Kurskod: EX0560

Program/utbildning: Husdjursagronom

Utgivningsort: Uppsala

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

Nyckelord: beteende, biverkningar, butorfanol, get, smärta, smärtlindring, stress.



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Abstract	2
Inledning	3
Bakgrund	4
<i>Butorfanol</i>	4
<i>Getters beteende</i>	5
<i>Stressrelaterade blodvariabler</i>	6
Material och metoder	8
<i>Pilotstudie</i>	8
<i>Huvudförsök och upplägg</i>	8
<i>Beteendeprotokoll</i>	9
<i>Farmakokinetiska och fysiologiska studier</i>	12
<i>Statistisk analys</i>	12
Resultat	13
<i>Beteende</i>	13
<i>Fysiologiska förändringar</i>	23
<i>Butorfanol, kinetik och halveringstid</i>	23
Diskussion	24
Slutsats	27
Tack till	27
Referenser	28
Bilaga 1	0
Bilaga 2	0

Sammanfattning

Idag finns i Sverige inget läkemedel som är godkänt för smärtlindring av små idisslare. Smärtlindring är viktigt ur djurskyddssynpunkt vid skador, sjukdomar eller operativa ingrepp som kastrering och avhorning. Syftet med den här studien var att titta på om friska getter som injicerades subkutant med det smärtstillande medlet butorfanol (0,2 mg/kg) uppvisade några stressrelaterade beteendeförändringar som kunde tyda på att djuren upplevde obehag av läkemedlet. Studien gjordes i en crossover-design på åtta ungetter där alla getter var sina egna kontroller. Getternas beteende observerades med etogram där bland annat beteenden som kunde tyda på stress eller obehag observerades. Beteendena observerades före och efter injiceringen vid 14 olika tillfällen under varje observationsdag. Varje tillfälle varade i fem minuter. Beteendena bräka, bita och klättra observerades kontinuerligt under varje femminutersperiod medan beteendena ligga, stå/gå, stå mot grind, äta och idissla observerades var 20:e sekund.

Parallellt med beteendestudien gjordes en kinetisk och en fysiologisk studie. I de studierna beräknades halveringstiden samt eventuella förändringar i blodkoncentration av kortisol, vasopressin, plasmaproteiner samt hematokrit.

Resultatet visade att getterna när de fått butorfanol ägnade signifikant mer tid till att bräka, bita på inredningen och klättra och mindre tid till att ligga ner och idissla jämfört med när de fått koksaltlösning. Däremot fanns ingen skillnad i hur mycket de stod och hur mycket tid de ägnade åt att äta. Vi kunde alltså inte se någon minskad aptit, men det var tydligt att läkemedlet påverkade getterna så att de slutade idissla en tid. För de flesta beteenden med skillnad var effekten störst den närmaste timmen efter injiceringen. Det tog däremot flera timmar innan getterna började idissla igen efter att de fått butorfanol, trots att de åt som vanligt. Den kinetiska studien visade på en kort halveringstid och den fysiologiska studien visade förhöjda halter av hematokrit och plasmaproteiner efter att getterna fått butorfanol, men ingen skillnad för hormonerna kortisol och vasopressin.

Studien visade att butorfanol vid denna dos påverkar getternas beteende på ett sätt som tyder på att de upplever stress och obehag, men effekten är relativt snabbt övergående. Butorfanol skulle kunna vara lämpligt att använda för smärtlindring av getter under en kortare tid. Dock behövs vidare studier för att avgöra vid vilken dos läkemedlet kan anses ha smärtstillande effekt.

Abstract

There are currently no drugs approved for pain management of small ruminants in Sweden. Pain relief in animals is important during injury, disease or surgical procedures as castration and dehorning. The purpose of this study was to find out if healthy goats that were injected subcutaneously with the pain relieving drug butorphanol (0.2 mg/kg) showed any stress-related behavioral changes that might indicate that the animals experienced discomfort of the drug. The study was performed in a crossover design in eight young goats in which the goats were their own controls. The goats' behavior was observed in a protocol where, among other, behaviors that might indicate stress or discomfort were observed. The behaviors were observed before and after the injection at 14 different times during each observation day. Each observation lasted for five minutes. The behaviors bleat, bite and climb were observed continuously during each five-minute period while the behaviors lie, stand/walk, stand against the gate, eat and ruminate was observed every 20 seconds.

In parallel with the behavioral study, kinetic and physiological studies were done. In these studies half-life of butorphanol and possible changes of blood concentration of cortisol, vasopressin, total plasma protein concentrations and hematocrit were estimated.

The results showed that goats, when they had received butorphanol, spent significantly more time to bleat, bite on the interior and climb and less time to lie down and ruminate compared to when they received saline. However, there was no difference in how much they were standing and how much time they devoted to eat. We did not see any loss of appetite, but it was clear that the drug affected the goats so that they stopped ruminating for some time. For most behaviors with significant differences the effect appeared the immediate hours after the injection. However, it took several hours before the goats began to ruminate again after receiving butorphanol, even though they did eat as usual. The kinetic study showed a short half-life and the physiological study showed elevated levels of hematocrit and plasma protein concentrations after the goats received butorphanol, but no difference in the hormones cortisol and vasopressin.

The study showed that butorphanol at this dose affects the behavior of goats in a way that suggests that they experience stress and discomfort, but the effect is relatively short-lived. Butorphanol may be appropriate to use for pain relief in goats for a shorter time. However, further studies are needed to determine at what concentration the drug can be considered to have analgesic effects.

Inledning

Enligt den svenska djurskyddslagen ska djur skyddas mot onödigt lidande och sjukdom (2§ DL1988:534). Smärta är ett stort välfärdproblem hos djur och det är viktigt att djur kan smärtlindras när det behövs. Idag finns i Sverige inget läkemedel som är godkänt för smärtlindring av små idisslare. Getter var förr ett av våra vanligaste husdjur i Sverige, men utgör idag en mindre andel av våra livsmedelsproducerande djur. De senaste åren har dock antalet getter i Sverige ökat igen, mycket på grund av en ökad efterfrågan på getost och lokalproducerade livsmedel (Högberg, 2011) och i dagsläget finns 11650 registrerade getter i Sverige (SJV, 2012). Getter hålls i många länder främst för produktion av ost (Haenlein, 2006). I Asien och Afrika har dock geten fortfarande stor betydelse för invånarnas försörjning då getter klarar av att producera mjölk och kött även på näringsfattiga marker. Globalt sett är därför geten ett av de vanligaste och viktigaste husdjuren och ökar kraftigt i antal (Morand-Fehr et al., 2004; Silanikove et al., 2010). År 2009 fanns närmare 880 miljoner getter i världen (Faostat, 2011). Det borde därför vara av internationellt intresse att ta fram bra smärtlindring för getter.

Smärtlindring behöver användas till getter vid bland annat avhorning och kastrering och vid lindring av smärta vid sjukdom. Idag används läkemedel för andra djurslag, bland annat butorfanol. Hos dessa medel saknas dock väl underbyggda doseringsrekommendationer samt kunskap om appliceringssätt, smärtlindringseffekt och biverkningar vilket är olyckligt då upptag och biverkningar kan variera mycket mellan djurslag.

I den här studien studerade vi kortsiktiga beteendeförändringar hos getter som inte hade ont och som injicerats subkutant med butorfanol. Syftet var att avgöra om medlet, som idag är godkänt för häst, katt och hund (FASS, 2011), är lämpligt att använda på get med avseende på beteendemässiga biverkningar. Ett förändrat beteende efter administration kan tyda på stress eller annat obehag som försämrar djurvälståndet istället för att förbättra. Beteendeförändringar som tyder på obehag kan därför vara avgörande för om ett läkemedel är lämpligt som smärtlindring eller om det har motsatt effekt. Det kan vara svårt att mäta stress då det finns flera definitioner på vad stress är. Ett stressat eller oroligt beteende kan tyda på att djuret har ont eller känner någon annan typ av obehag. Jensen (1996a) beskriver stress som ett samlat begrepp för de reaktioner som djur och människor har inför hot som är svåra att hantera. Individerna försöker hantera situationen på bästa sätt, men kan den inte det uppstår stress.

Förhoppningen i denna studie var att inga signifikanta beteendeförändringar skulle upptäckas. Ett bra läkemedel för smärtlindring av get innebär en förbättrad djurvälstånd vid behandling av sjuka eller skadade djur. Parallellt med beteendestudien gjordes två andra studier som inriktade sig på farmakokinetiska och fysiologiska effekter som kan ha samband med eventuella beteendeförändringar. Resultaten från dessa studier kommer senare att ligga till grund för optimal dosering och förhoppningsvis en god smärtlindring hos get.

Tidigare har det på SLU gjorts försök där läkemedlet buprenorfin prövats som smärtlindring till get, men de försöken visade att detta medel var olämpligt till get då beteendeförändringar såsom oro och hämmad idissling uppkom efter administreringen. Djuren som injicerats med buprenorfin idisslade inte en enda gång under de första timmarna efter administreringen trots att de ätit som vanligt på morgonen. Författarna förklarade detta som att buprenorfin binder till receptorer i hjärnan där idisslingscentrum sitter eller att opioider ger nedsatt motilitet i mag- och tarmkanalen som kan leda till förstoppning (Ingvast-Larsson et al., 2007; Bohman, 2008).

Bakgrund

Butorfanol

Det smärtstillande läkemedlet butorfanol finns idag godkänt för smärtlindring av häst, hund och katt. Medlet tillhör gruppen opioider som är kända för att utveckla tolerans. Butorfanol är en så kallad syntetisk opioid som kännetecknas av att ha en kortvarig smärtstillande effekt på mild till måttlig smärta (Riviere & Papich, 2009). Opioider har olika effekt på olika djurslag. Hos häst har man sett att biverkningar som okontrollerade muskelrörelser eller upphetsning är vanliga (FASS, 2011).

I en studie av Carroll et al. (2001), kunde man se att butorfanol gav signifikanta beteendeförändringar både när det gavs intravenöst och intramuskulärt till getter utan smärta. Dosen som användes var 0,1 mg/kg. I den studien graderades getternas beteende mellan 0 och 3 där 0 var normalt beteende och 3 var bråkigt beteende. Här kunde man se att detta beteendetal 15 och 30 minuter efter injicering var märkbart högre än innan injicering och att det hade sjunkit till normala nivåer igen efter 120 minuter vid intravenös injicering och efter 240 minuter vid intramuskulär injicering. Halveringstiden i det försöket var 112 ± 89 respektive 165 ± 116 minuter, vilket ansågs vara acceptabelt.

I en annan studie av friska getter som injicerades med butorfanol intravenöst eller med koksalt som kontroll tittade man på förändringar i koncentration av hormonerna adrenalin, noradrenalin och kortisol. Doseringen som användes var 0,1 mg/kg. Författarna såg då inga signifikanta förändringar i något av de tre hormonerna. Andningsfrekvensen var dock signifikant högre 60 minuter efter det att getterna behandlats med butorfanol jämfört med när de behandlats med koksalt. Hjärtfrekvensen var högre efter 75 minuter jämfört med innan administreringen och kroppstemperaturen var högre efter 30 minuter jämfört med efter 120 minuter. Dock poängterades att dessa förändringar kan vara ett resultat av själva drogen och inte nödvändigtvis beroende av smärta eller stress. Inga märkbara beteendeförändringar observerades på getterna i den studien (Gwendolyn et al., 1998).

I en studie av Carroll et al. (2002) injicerades sex lamor med 0,1 mg/kg butorfanol intravenöst och intramuskulärt för att studera skillnader i medlets effekt på olika fysiologiska variabler. Man kunde se att halveringstiden var kortare vid intravenös injicering än vid intramuskulär injicering, 16 ± 9 minuter respektive 67 ± 13 minuter. Hjärtfrekvensen minskade och kroppstemperaturen ökade. Två av lamorna blev tillfälligt sederade och två blev tillfälligt uppspelta efter intramuskulär injicering av butorfanol.

Hos får såg man inget förändrat beteende på grund av butorfanoladministrering när en dos på 0,05 mg/kg injicerades intravenöst. Vid en dos på 0,1 mg/kg blev fåren rastlösa, bräkte oavbrutet och tuggade tvångsmässigt i upp till 60 minuter. Vid en dos på 0,4 mg/kg blev fåren märkbart vingliga (Waterman & Livingston, 1991).

Hos hundar har man sett att butorfanol höjer CO₂-träskeln till det centrala nervsystemets (CNS) respiratoriska centrum, men det sänker inte känsligheten. CNS-depression har rapporterats på hundar medan CNS-stimulering har setts hos hästar, katter och hundar. Biverkningar som nedstämdhet har inte rapporterats hos fåglar, reptiler eller små exotiska däggdjur. Även om butorfanol har rapporterats ha minimala biverkningar finns en potentiell risk att det minskar tarmrörelserna. Butorfanol har färre kardiovaskulära effekter än klassiska opiatagonister, men kan orsaka sänkt hjärtfrekvens och blodtryck (Schnellbacher, 2010).

I en studie där elektriska stimuli användes för att uppskatta lägsta dosering där biverkningar uppstår använde man papegojfågeln grå jako som behandlades med butorfanol. En mindre biverkningseffekt identifierades när 1-2 mg/kg injicerades till fåglarna. Efter injiceringen minskade hjärtfrekvensen signifikant. Hos amazonpapegojor gav högre doser av butorfanol, 2 mg/kg, liknande effekt. För aviära arter rekommenderas dosen 1-4 mg/kg för smärtlindring med en doseringsfrekvens på 2 till 4 timmar (Sladky et al., 2006; Schnellbacher, 2010).

Hos både häst och hund har butorfanol använts i kombination med detomidin som sedering vid hudreaktionstester vid intradermaltest. I båda fallen användes dosen 0,01 mg/kg i kombination med samma dos detomidin. I dessa studier kunde författarna inte se att medlet gav några beteendeföreändringar som tydde på stress efter det att det injicerats. I försöket med hästar kunde man konstatera att de flesta hästarna blev mer lätthanterliga när de sederades med butorfanol och detomidin. En av hästarna blev dåsig och gick ner på ena frambenet under försöket. I försöket nämns att butorfanol ska ge effekt efter 2-5 minuter och ha full effekt runt 15-30 minuter efter injektion (Molin, 2009; Dahlheim, 2010).

Getters beteende

För att kunna avgöra om ett djur har ett onormalt beteende är det viktigt att känna till vad artens normala beteenden är. Hos domesticerade djur, som getter, kan det vara svårt att veta om de beter sig naturligt eftersom djur som hålls i fångenskap sällan har möjlighet att bete sig helt naturligt. Det räcker alltså inte med studier på djurens beteende i dess naturliga miljö utan det är viktigt att lära känna djuren i den miljö de lever i normalt och se vilka beteenden de ägnar sig åt. Det finns även individuella skillnader inom grupper och det är därför viktigt att känna djuren man studerar så att man vet hur just de normalt beter sig. En get som rör mycket på sig under ett försök kan uppfattas som nervös, men den observationen säger inget om just den geten i normala fall rör mycket på sig (Martin & Bateson, 2007).

Tamgeten (*Capra hircus*) är ett av våra äldsta husdjur. Den domesticerades redan för ca 9000 år sedan och beteendet har inte ändrats mycket sedan dess (Russel & Mowlem, 1999). Det äldsta säkra fyndet av get kommer från Iran och är 9500 år gammalt (Hallander, 1989). Generellt sett är välmående getter tysta, impulsiva och fulla av energi. En frisk get har upprätt huvud och alert attityd och äter med god aptit. Eftersom geten naturligt sett är ett bytesdjur så försöker den liksom alla bytesdjur dölja smärta för att inte visa sig sjuk eller skadad. Generellt kan man säga att både onormalt låg och onormalt hög aktivitet och rastlöshet kan tyda på stress, smärta eller obehag. En hög aktivitet är inte önskvärd som biverkning då djuren som behandlas med smärtstillande medel ofta är sjuka eller skadade. Ett vanligt sätt att upptäcka smärta eller obehag är om geten bräker mycket till synes utan anledning, men det kan även vara tvärtom och det är därför viktigt att känna till individerna i flocken. Det är normalt att getter bräker mycket om de vill ha mat, är brunstiga eller vid avvänjning. Ett vanligt beteende om geten inte mår bra är att den saknar aptit, inte idisslar, håller sig borta från flocken eller inte verkar bry sig om vad som händer (Harwood, 2006). Getter ägnar normalt 6-9 timmar per dygn åt att äta och idisslar främst under natten och då i ca en minut per period (Ensminger, 2002). Utebliven idissling är under en längre period mycket allvarligt då det kan bildas gas i våmmen som i sin tur leder till oro och lös avföring. Tvärtom kan även onormalt mycket aktivitet också tyda på stress eller smärta. Snabb eller kraftig andning kan tyda på rädsla eller oro (Harwood, 2006). När djuret är frustrerat kan även beteenden uppstå som är till synes helt irrelevanta. Fåglar kan till exempel börja putsa sig när de är hungriga och fått mat som är täckt av plexiglas (Duncan & Wood-Gush, 1972). Getter har starka sociala band inom sin flock och kan bli stressade eller oroliga om de hålls skilda från varandra (Hallander, 1989).

Vid beteendestudien i detta försök studeras beteendeförändringar som kan påverkas av stress, såsom foderintag, idissling, aktivitet och vokalisering. Ett stressat beteende kan tyda på att djuret har ont eller mår illa. Även frekvensen och intensiteten av vissa beteenden kan ge information om den stress som djuret upplever (Olsson et al., 2011). Fördelen med att använda beteende som mått på stress är att man kan se förändringar i ett tidigt stadium. En nackdel är att ett ändrat beteende kan bero på andra faktorer än de vi söker och att vi inte kan se individens verkliga känslor. Därför bör beteendestudier, som i detta fall, kombineras med fysiologiska studier för att få säkrare resultat.

Stressrelaterade blodvariabler

I detta försök togs regelbundna blodprover från getterna både före och efter injicering för att analysera butorfanolets halveringstid samt koncentrationerna av kortisol, vasopressin, plasmaproteiner och hematokrit. Förändringar i dessa parametrar kan tyda på att djuret är mer stressat än normalt när det är påverkat av butorfanol. Dessa resultat kommer främst att redovisas i två andra separata examensarbeten, men kommer även att diskuteras här då de kan ha koppling till eventuella beteendeförändringar.

Vid stress och andra påfrestningar aktiveras bland annat det autonoma nervsystemet i kroppen, framförallt det sympatiska nervsystemet. Aktivering av det sympatiska nervsystemet leder bland annat till att katekolaminer (adrenalin och noradrenalin) frisätts från binjuremärgen och att hjärtfrekvens, blodtryck och andningsfrekvens ökar samtidigt som den mentala aktiviteten stiger. Autonoma funktioner som hjärtfrekvens, blodtryck, andningsfrekvens och kroppstemperatur, skulle vara intressanta att mäta. Blodtryck är dock svårt att mäta non-invasivt och vi valde att inte störa getterna med fler mätningar då djuren var unga och vi inte ville att deras beteende skulle påverkas av för många fysiologiska mätningar.

Påfrestande situationer stimulerar också frisättningen av kortikosteroider från binjurebarken. Glukokortikoider, till exempel hormonet **kortisol**, avsöndras från binjurebarken under kontroll av ACTH (adrenokortikotropiskt hormon) som i sin tur utsöndras från hypofysens framlob. I djurförsök har man tidigare kunnat visa att hormonet CRH (corticotropin releasing hormone) påverkar hypofysens utsöndring av ACTH och att höga halter av CRH i blodet ger upphov till ångest (Währborg, 2009). CRH utsöndras från hypotalamus som en respons på stress. Stress medför alltså att glukokortikoidkoncentrationen i blodet stiger och höga halter av kortisol är därför en vedertagen indikation på stress (Sjaastad et al., 2003a).

I en studie där killingar avhornades ökade kortisolnivåerna kraftigt direkt efter avhorningen. Samma studie visade att bara lokalbedövning är otillräckligt som smärtlindring vid avhorning, en mer långvarig smärtlindring krävs för att reducera kortisolnivåerna (Alvarez et al., 2009). Råttor som injicerats med CRH uppvisade en ökning av beteenden som rörelseaktivitet, orosrelaterade beteenden, vokalisering, putsning och minskad aptit (Buwalda et al., 1997). I en studie av Aoyama et al. (2007) fann författarna att CRH har liknande effekt på getters beteende samt att koncentrationen av kortisol steg i samband med administreringen. Kortisol har ofta använts som markör för hälsostatus i studier där stressrelaterade sjukdomar är av intresse. Stress är dock komplext, individuellt och påverkar många system i kroppen, därför är det osäkert att använda bara en variabel eller effekt som indikation på stress (Bayazit, 2009).

När förhöjda halter glukokortikoider upptäcks av hypofysen hämmas frisättningen av ACTH genom negativ feedback och koncentrationen av kortisol går ner igen och normaliseras inom ca sex timmar (Währborg, 2009). Koncentrationen av glukokortikoider är inte bara relaterade till stress utan även till andra situationer, t ex höjer sexuellt umgänge och födointag nivåerna

(Jensen, 1996b). Blodvärden kan därför endast tolkas på ett trovärdigt sätt om det görs med bakgrund av djurets beteende. Gemensamt för glukokortikoider är att de påverkar hjärnan och därigenom beteendet. Djuret blir mer alert då glukoshalten ökar och reagerar lättare på yttre stimuli (Jensen, 1996b). På lång sikt kan kortisol även hämma immunförsvaret och därför vill man inte utsätta djur för situationer som ger förhöjda halter av kortisol under längre perioder (Campbell & Reece, 2005). På får har man sett att den vanligaste orsaken till förhöjda halter av kortisol i blodet bland annat är isolering och vistelse på en okänd plats (Kilgour & De Langen, 1970)

I detta projekt har även hormonet **vasopressin**, eller antidiuretiskt hormon (ADH), analyserats. Vasopressin är aktivt i njurarna för att reglera permeabiliteten (Sjaastad et al., 2003a) och syntetiseras från neuroner i hypotalamus och lagras och frisätts från hypofysens baklob vid uttorkning för att minska vattenavsöndringen från njurarna. Det har även en kärksammandragande och blodtryckshöjande effekt och är en neurotransmittor som kan öka blodtrycket och framkalla aggressivt beteende om det når höga nivåer (Winblad von Walter, 2010). Studier har även visat att koncentrationen av vasopressin kan öka i samband med smärtupplevelser, bland annat hos kvigor och getter under förlossning (Hydbring et al., 1999).

Hos vissa arter stimulerar sympatiska nervsystemet mjälten att kontrahera och frisätta lagrade erythrocyter (röda blodkroppar) och därmed ökar **hematokrit**, dvs. procenten röda blodkroppar. Därför kan hematokriten användas som en indikator på sympatikuspåslag (Hydbring et al., 1996; Winblad von Walter, 2010) hos de arter som har en mjältreserv. Normal hematokrit för getter är 24-38 % (Sjaastad et al., 2003b) och det föreligger en ganska stor individuell variation.

Vid högt blodtryck, till följd av att sympatiska nervsystemet aktiverats, pressas vätska ut från kärlbädden och koncentrationen av beståndsdelar såsom röda blodkroppar och **plasmaproteiner** blir högre (Eriksson et al., 1994). Förhöjning av hematokrit och plasmaproteinkoncentration kan därför tyda på att blodtrycket har ökat.

Material och metoder

Huvudförsöket och pilotförsöket gjordes på totalt tio hongetter av svensk lantras som tillhör institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi på Sveriges lantbruksuniversitet. Getterna var tränade att stå tillfälligt i ensamboxar sedan några veckor tillbaka för att de skulle påverkas så lite som möjligt av att hållas från varandra. Normalt hölls getterna fritt tillsammans i en stor box. De hade dock möjlighet att se, höra och nosa på varandra genom galler under försöket. Personerna som genomförde beteendestudien var sedan tidigare bekanta för getterna. Försöket var godkänt av Uppsalas djurförsöksetiska nämnd.

Pilotstudie

Inför huvudförsöket gjordes några månader tidigare en pilotstudie på två vuxna men icke lakterande hongetter. Getterna var vid försöket 11 månader gamla och vägde 28 respektive 34 kg. Två olika administreringsmetoder användes; intravenös eller subkutan injicering, för att kunna jämföra kinetiken och undersöka effekterna av subkutan administreringsätt jämfört med intravenöst. Förutom kinetik analyserades också hematokritvärdena och hur getterna påverkades beteendemässigt av butorfanol (Butador vet®, injektionsvätska innehållande butorfanol 10 mg/ml; Richter Pharma AG). Dosen som användes i pilotförsöket var 0,1 ml/kg kroppsvikt. Denna dos valdes ut baserat på tidigare studier med butorfanol till idisslare (Waterman & Livingston, 1991; Gwendolyn et al., 1998; Carroll et al., 2001; Carroll et al., 2002; Dzikiti et al., 2009). Ingen statistisk analys av beteendedata gjordes vid pilotstudien, men inga märkbara beteendeförändringar observerades. Den kinetiska studien visade att intravenös injicering hade mycket kort halveringstid på endast 69 minuter, medan halveringstiden för subkutan injicering var fyra timmar. Studien visade också en ökning av hematokriten efter butorfanoladministreringen. Getterna var dock ganska oroliga i början av dagen vilket kan ha bidragit till de ökade nivåerna. På geten som fick intravenös injicering gick hematokriten tillbaka till ursprungsvärdena fortare, vilket förmodligen berodde på att läkemedlet lämnade kroppen snabbare.

Med stöd av pilotstudiens resultat bestämdes att dosen till huvudförsöket skulle fördubblas till 0,2 ml/kg kroppsvikt för att få säkrare data, samt att subkutan injicering skulle användas då den metoden hade en längre halveringstid och är mer praktiskt tillämpbar.

Huvudförsök och upplägg

Huvudförsöket gjordes på åtta hongetter av lantras. Getterna var vid försöken ca 6 månader gamla, kliniskt friska, varken dräktiga eller lakterande och hade nyligen kommit in från sommarbetet. Djuren vägde mellan 20 och 35 kg. Getterna utfodrades med hö på samma tider varje försöksdag (kl 7.00, 12.15 och 15.00) och hade fri tillgång till vatten.

Försöken utfördes vid totalt fyra tillfällen. Getterna delades upp i två grupper på vardera fyra getter genom lottning och varje grupp genomgick försöket vid två tillfällen med tre veckors mellanrum. Vid varje tillfälle deltog alltså fyra getter varav två injicerades med butorfanol (0,2 mg/kg) och två med koksaltlösning (NaCl) (Butador vet®, injektionsvätska innehållande butorfanol 10 mg/ml; Richter Pharma AG respektive Natriumklorid 9 mg/ml, Frenesius Kabi, Uppsala, Sverige). Inför varje tillfälle vägdes getterna för att det alltid skulle få samma dos per kg kroppsvikt. De två getter som fick NaCl fungerade som kontroller. Vid det andra tillfället då samma grupp deltog byttes rollerna och de getter som vid första tillfället fick butorfanol fick nu NaCl enligt en crossover-design (tabell 1). På så sätt fick alla getterna behandling med butorfanol en gång var under studien. Vilka getter som skulle börja få butorfanol bestämdes genom lottning och de personerna som genomförde beteendestudien visste inte vilka getter som var kontroller.

Tabell 1. Schematisk bild över försökstillfällena i en cross over design. B = geten injicerades med butorfanol (Behandling). K = geten injicerades med NaCl (Kontroll) . - = geten deltog inte vid tillfället

	Get nr	Tillfälle 1	Tillfälle 2	Tillfälle 3	Tillfälle 4
Grupp 1	1	B	-	K	-
	2	B	-	K	-
	3	K	-	B	-
	4	K	-	B	-
Grupp 2	5	-	B	-	K
	6	-	B	-	K
	7	-	K	-	B
	8	-	K	-	B

Beteendeprotokoll

Under försöksdagen observerades getternas beteende vid 14 bestämda tidpunkter, oftast fem minuter innan blodprovstagningen, både innan och efter att de injicerats med butorfanol eller NaCl (tabell 2). Den första observationen gjordes 36 minuter innan injicering och den sista gjordes 7 timmar och 54 minuter efter injicering och samtliga observationer utfördes vid samma klockslag vid varje försökstillfälle. Även utfodring skedde vid samma klockslag för att miljön vid försökstillfällena skulle bli så lika som möjligt. Varje observation varade i fem minuter och långa beteenden, som ligga och stå, observerades som intervallstudier med 20 sekunders intervall medan korta beteenden, som bräka och bita, observerades som kontinuerliga studier under hela observationstiden.

Tabell 2. Protokoll över observationer under varje försökstillfälle. Även tillfällena för blodprovstagning visas i tabellen, utöver dessa tillfällen togs även blodprover 10.05, 21.00 och 08.00 morgonen därpå. Blodproverna togs, som tabellen visar, just efter en beteendeobservation

Observation	Klockslag	Tid efter injicering (minuter)	Blodrov
1	09.24-09.29	-36	09.30
2	09.44-09.49	-16	09.50
INJICERING 10.00			
3	10.09-10.14	9	10.15
4	10.24-10.29	24	10.30
5	10.54-10.59	54	11.00
6	11.24-11.29	84	-
7	11.54-11.59	114	12.00
8	12.24-12.29	144	-
9	12.54-12.59	174	-
10	13.54-13.59	234	14.00
11	14.54-14.59	295	-
12	15.54-15.59	354	16.00
13	16.54-16.59	414	-
14	17.54-17.59	474	18.00

Ett protokoll för olika beteenden konstruerades (bilaga 1) och delades upp i intervallstudier och kontinuerliga studier. Beteendena definierades noga, se tabell 3. I protokollet inkluderades både beteenden som hör till getternas normala beteendepertoar såsom stå, ligga, idissla, äta etc. och beteenden som kan tyda på stress, oro eller överaktivitet till följd av läkemedlet såsom bräka, klättra, bita, rulla med huvudet etc.

Intervallstudier gjordes endast var 20:e sekund under de fem minuter som varje observation pågick, alltså 15 gånger per fem-minutersperiod. Kontinuerliga studier gjordes varje gång de beteendena utfördes under observationstillfället, för att senare kunna räkna ut frekvensen av beteendet under observationstillfället. För att underlätta observationerna användes en timer som var inställd på att pipa var 20:e sekund.

Tabell 3. Definitioner för de beteenden som observerades enligt etogrammet

Beteckning	Beteende	Definition
LA*	Ligga aktivt	Ligger ner och har ögonen öppna
LV*	Ligga vilande	Ligger ner med ögonen stängda eller halvstängda
S*	Stå	Står still med alla klövar i marken
Gå*	Gå	Rör sig runt i boxen
SG*	Stå mot grind	Står med framklövarna uppe på grinden
Ä*	Äta	Plockar i sig foder (och tuggar)
I*	Idissla	Malande tuggande utan att plocka nytt foder
Dr*	Dricka	Har nosen mot vattenytan och sväljer
Da*	Darra	Kroppen skakar/darrar
Br	Bräka	Vokaliserar med bråkande ljud
Bi	Bitar	Biter på inredning
Klä	Klättra	Sätter upp framklövarna på grinden, eller flyttar till annan grind
Fn	Fnysa	Blåser kraftigt ut luft genom nosen
Fl	Fly	Snabb skräm rörelse
RH	Rulla med huvudet	Slänger bak/rullar runt huvudet
R	Ruska	Skakar på huvudet eller kroppen
Kli	Klia	Kliar sig med tänder, klövar eller inredning
NG	Nosa på granne	Nosar på granne genom gallret
U	Urinera	Urinerar
Gö	Gödsla	Gödslar

*Beteenden som kontrolleras vad 20:e sekund.

Farmakokinetiska och fysiologiska studier

Parallellt med beteendestudien togs vid tolv bestämda tidpunkter innan och efter injiceringen blodprover från kanyler som satts in i en av halsvenerna, *vena jugularis*, innan försöket samma morgon. Innan kanylerna sattes i rakades halsen och platsen lokalbedövades med EMLA (Ointment lidocaine 25 mg/g, prilocaine 25 mg/g, AstraZeneca, Södertälje, Sweden). Proverna togs från 30 minuter innan injicering till 22 timmar efter, se tabell 2. De två första proverna togs innan injicering för att användas som referens. För att inte blodprovstagningarna skulle påverka resultaten för beteendestudien så togs proverna direkt efter beteendeobservationerna. Blodproverna analyserades med avseende på koncentration av butorfanol, kortisol, vasopressin, plasmaproteiner samt hematokrit (Andersson, 2012; Gustavsson, 2012).

Statistisk analys

Beteendedata sammanställdes först i Excel där summan av de olika beteendena vid varje observationstillfälle och för varje get och behandling räknades ut. Beteendena ligga, stå/gå, stå mot grind, äta och idissla räknades ut i % av observationstiden medan beteendena bräkningar, bitningar och klättringar räknades ut i frekvens.

Beteendedata analyserades med SAS Software (SAS 2008. Statistical Analysis Systems. 9.2, SAS Institute, Cary, NC, USA) Resultaten presenterades som medelvärden för varje observation \pm standardfel. Vidare beräkningar för att få fram signifikanta skillnader inom behandling gjordes med hjälp av ANOVA (Mixed procedure). Observationstillfälle 2 valdes ut som kontroll och alla jämförelser inom behandling gjordes mot detta tillfälle. Den statistiska modellen som användes inkluderade den fixa effekten av observation och den slumpmässiga effekten av djur. Vid den statistiska analysen av skillnader mellan behandlingar användes Wilcoxon matched pairs' test och samtliga observationer efter administrering av butorfanol respektive NaCl jämfördes (3-14). Signifikansnivån sattes till $p \leq 0,05$.

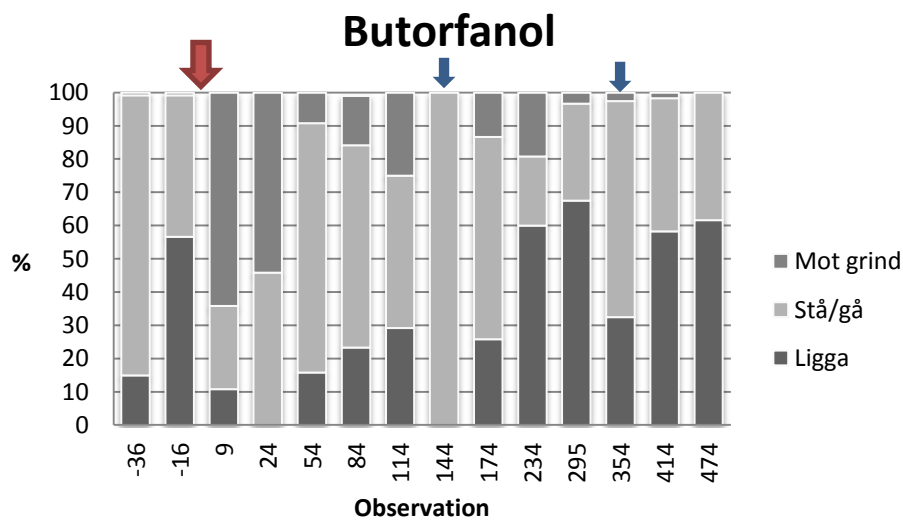
Resultat

Beteende

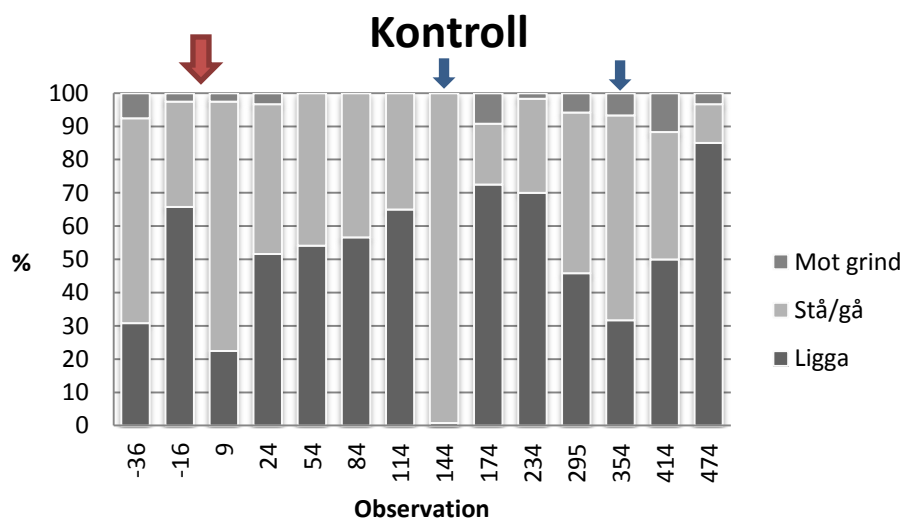
Beteenden som inte uppvisade någon variation som kunde bero på de olika behandlingarna eller beteenden som inte alls förekom, det vill säga dricka, darra, fnysa, fly, rulla med huvudet, ruska, klika, nosa på granne, urinera och gödsla, redovisas inte i detta arbete.

Position

Efter att studien genomförts slogs beteendena ligga aktivt och ligga vilande ihop då de ibland under observationerna var svårt att se getternas ansikten när de låg ner då de kunde ligga dolda av boxkanten. Även beteendena stå och gå slogs ihop då getterna mest ägnade tid till att gå för att byta plats i boxen och inte för att de verkade rastlösa. I figur 1 och 2 redovisas en sammanställning av den procent av observationstiden som getterna ägnat åt beteendena ligga, stå/gå och stå mot grind.



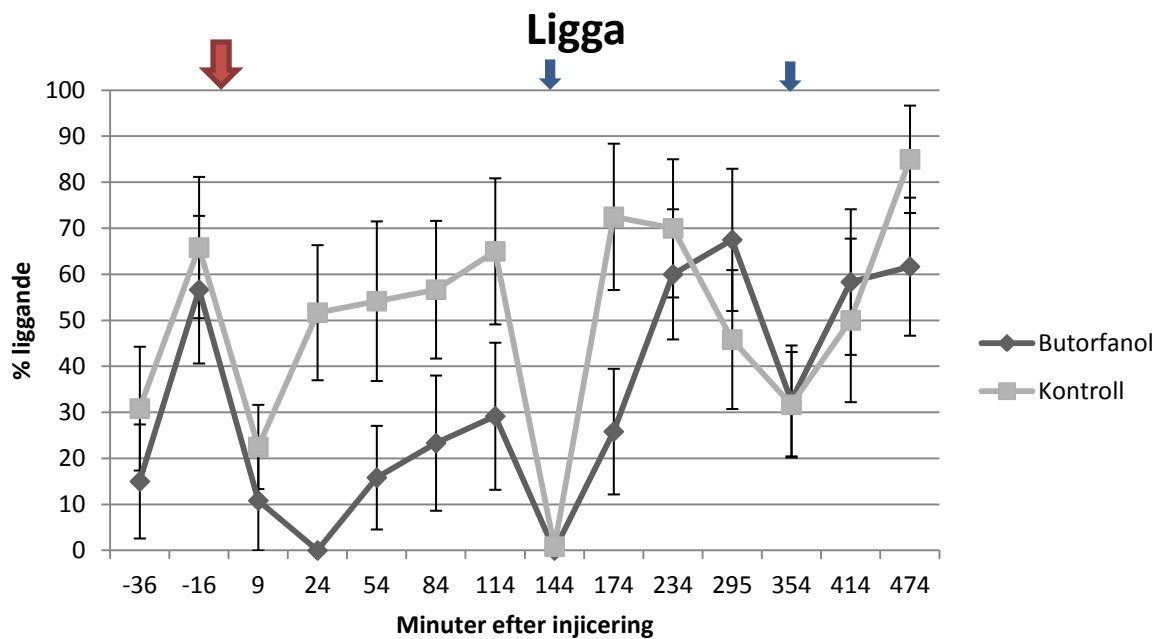
Figur 1. Getternas position efter administrering av butorfanol vid de olika observationerna. Den stora (röda) pilen visar var injicering skedde. De små (blå) pilarna visar var utfodringarna skedde. (n=8). Resultaten är medelvärden (%).



Figur 2. Getternas position efter administrering av NaCl (kontroll) vid de olika observationerna. Den stora (röda) pilen visar var injicering skedde. De små (blå) pilarna visar var utfodringarna skedde. Resultaten är medelvärden (%).

Ligga

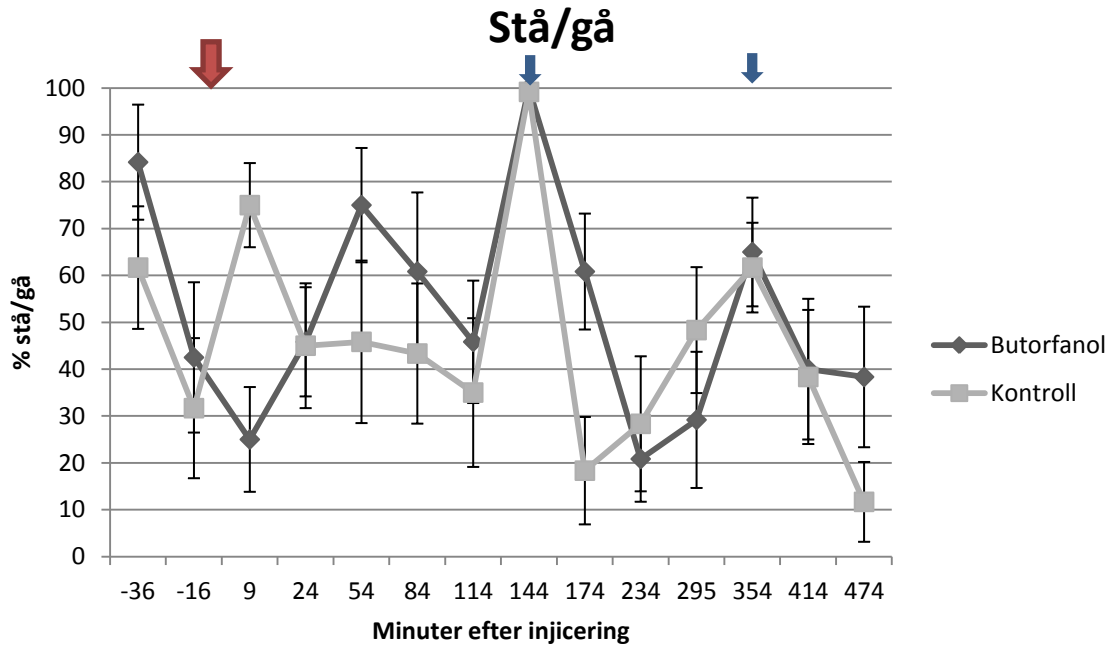
I figur 3 redovisas hur många procent av observationerna under varje observationstillfälle som getterna i genomsnitt ägnade åt att ligga ner. När getterna fått butorfanol ägnade de betydligt mindre tid åt att ligga ner än när de fått NaCl. Tydligast var det fram till observation 10 som gjordes fyra timmar efter injicering. När getterna fått butorfanol fanns det en signifikant skillnad mellan observation 1 och 2. När observationerna efter injicering jämfördes med observation 2 var det skillnad vid observation 3 (9 min), 4 (24 min), 5 (54 min) och 8 (144 min) då liggbeteendet minskade. Inom kontrollgruppen var det skillnad vid observation 3 och 8 med ett minskat liggbeteende.



Figur 3. Liggbeteende hos getter före och efter administrering av butorfanol respektive NaCl (kontroll) (n=8). Den stora (röda) pilen visar var injicering skedde. De små (blå) pilarna visar var utfodringarna skedde. Den statistiska analysen visade att när getterna injicerades med butorfanol låg de signifikant mindre än när de fått NaCl ($P \leq 0.01$). Vid butorfanoladministrering låg getterna mindre vid 9, 24, 54 och 144 minuter efter injicering och när de fått NaCl vid 9 och 144 minuter efter injicering jämfört med andra observationstillfället. Medelvärden \pm SE. $P \leq 0.05$.

Stå/gå

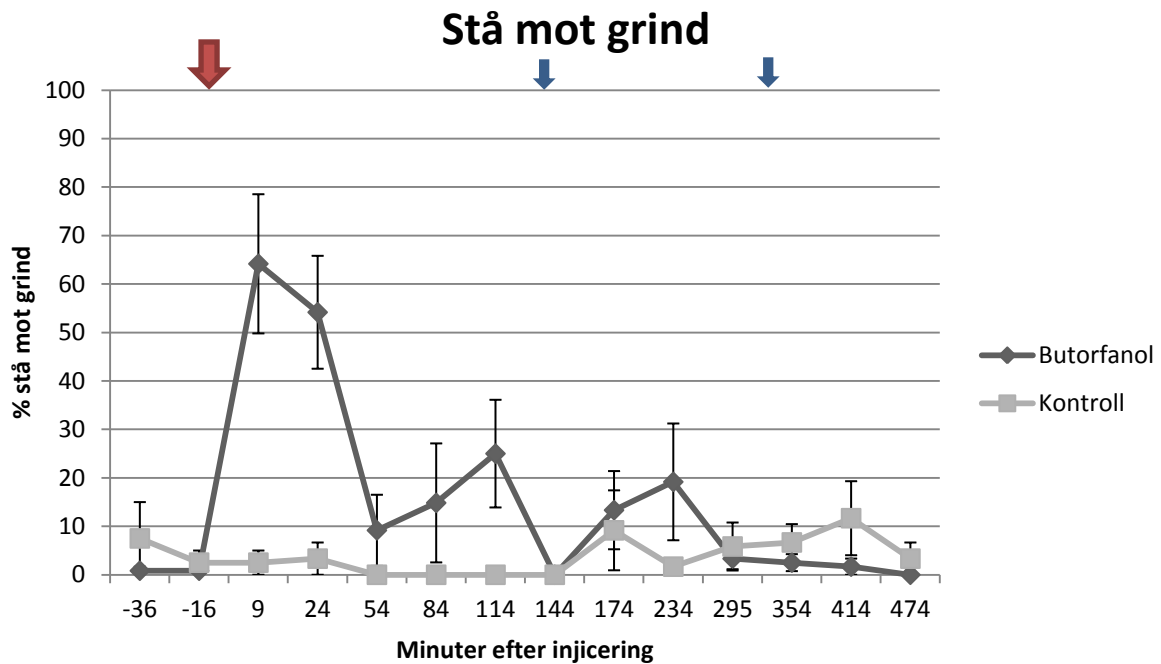
Figur 4 visar hur många procent av observationerna vid varje observationstillfälle som getterna ägnade åt att stå eller förflytta sig i boxen. Det fanns ingen signifikant skillnad för detta beteende mellan de båda behandlingarna. Även här fanns dock en skillnad mellan observation 1 och 2 när getterna fått butorfanol. Vid jämförelse med observation 2 inom behandlingarna fanns en skillnad vid observation 3 (9 min) med ett ökat stå/gåbeteende när getterna fått NaCl, samt vid observation 8 (144 min) med ett ökat stå/gåbeteende för båda behandlingarna.



Stå/gåbeteende hos getter före och efter administrering av butorfanol respektive NaCl (kontroll) (n=8). Den stora (röda) pilen visar var injicering skedde. De små (blå) pilarna visar var utfodringarna skedde. Den statistiska analysen visade att det totalt sett inte fanns någon signifikant skillnad mellan behandlingarna för dessa beteenden. Inom behandlingarna var det vid butorfanol skillnad vid 144 minuter efter injicering och för NaCl vid 9 och 144 minuter efter injicering jämfört med andra observationstillfället. Medelvärden \pm SE. $P \leq 0.05$.

Stå mot grind

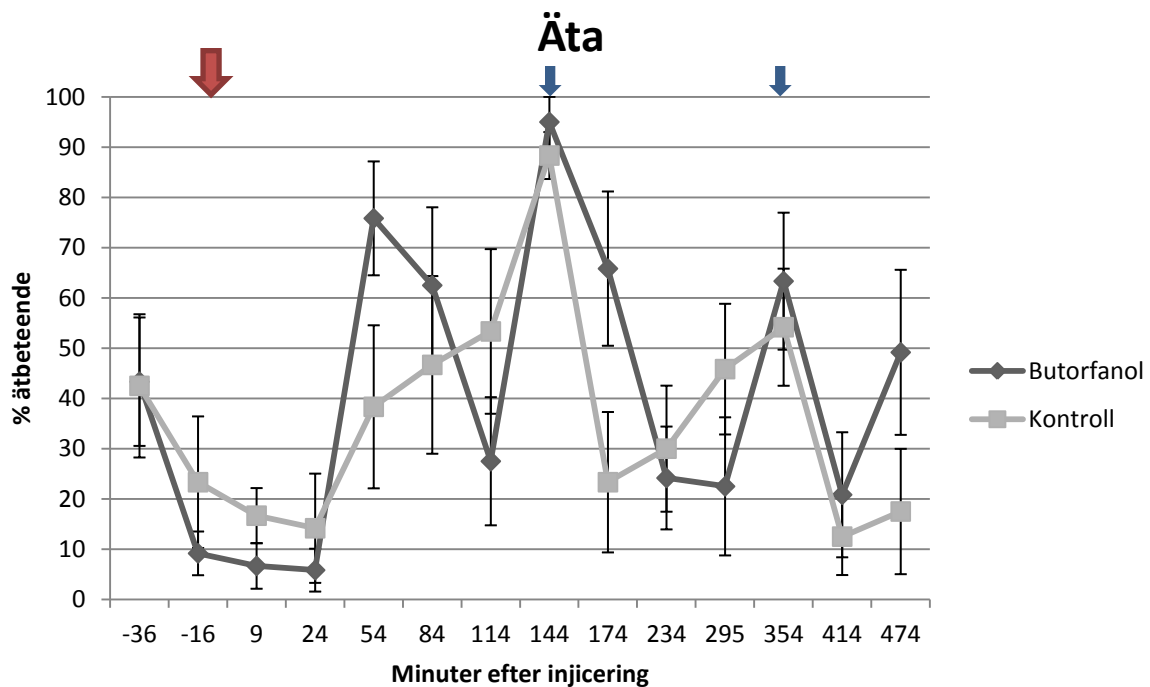
Figur 5 visar hur många procent av observationerna vid varje observationstillfälle som getterna ägnade sig åt att stå med framklövarna uppe på grinden. Här fanns en tydlig signifikant skillnad mellan behandlingarna då getterna när de fick butorfanol ägnade mer tid till att stå mot grinden än när de fick NaCl. Vid jämförelse med observation 2 fanns vid butorfanoladministreringen ökad andel stå mot grindbeteende vid observation 3 (9 min), 4 (24 min) och 7 (114 min). När getterna fick NaCl fanns ingen skillnad alls.



Figur 5. Stå mot grind-beteende hos getter före och efter administrering av butorfanol respektive NaCl (kontroll) (n=8). Den stora (röda) pilen visar var injicering skedde. De små (blå) pilarna visar var utfodringarna skedde. Den statistiska analysen visade att när getterna fick butorfanol stod de signifikant mer mot grinden än när de fick NaCl ($P \leq 0.001$). Inom behandlingarna var det vid butorfanoladministrering skillnad vid 9, 24 och 114 minuter efter injicering jämfört med andra observationstillfället. Efter koksaltadministrering fanns ingen skillnad. Medelvärden \pm SE. $P \leq 0.05$.

Äta

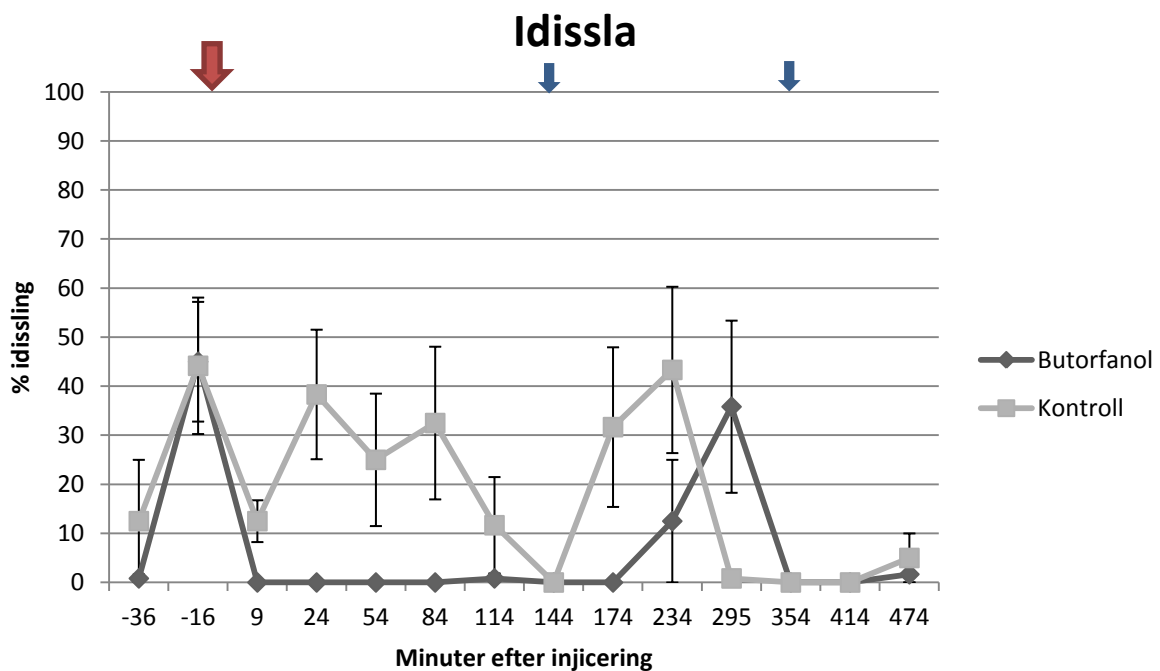
Figur 6 visar hur många procent av observationerna under varje observationstillfälle som getterna ägnade åt att äta. Det statistiska resultatet visar att det totalt sett inte fanns någon signifikant skillnad i ätbeteende mellan behandlingarna. Vid jämförelse inom behandlingarna fanns det en signifikant skillnad mellan observation 1 och 2 för båda behandlingarna där ätandet minskade från observation 1 till 2. För butorfanolbehandlingen fanns en ökad andel ätande vid observation 5 (54 min), 6 (84 min), 8 (144 min), 9 (174 min), 12 (354 min) samt 14 (474 min), jämfört med andra observationstillfället, med ett ökat beteende. Vid kontrollbehandlingen fanns endast ökat ätbeteende vid observation 8. Vid observation 8 (144 min) och 12 (354 min) hade getterna nyligen utfodrats.



Figur 6. Ätbeteende hos getter före och efter administrering av butorfanol respektive NaCl (kontroll) ($n=8$). Den stora (röda) pilen visar var injicering skedde. De små (blå) pilarna visar var utfodringarna skedde. Den statistiska analysen visade inte på någon signifikant skillnad mellan behandlingarna. ($n=8$). Inom behandlingarna fanns för butorfanol signifikant skillnad vid 54, 84, 144, 354 och 474 minuter efter injicering och för kontrollen vid 144 minuter efter injicering då ätbeteendet ökade jämfört med andra observationstillfället. Medelvärden \pm SE. $P \leq 0.05$.

Idissla

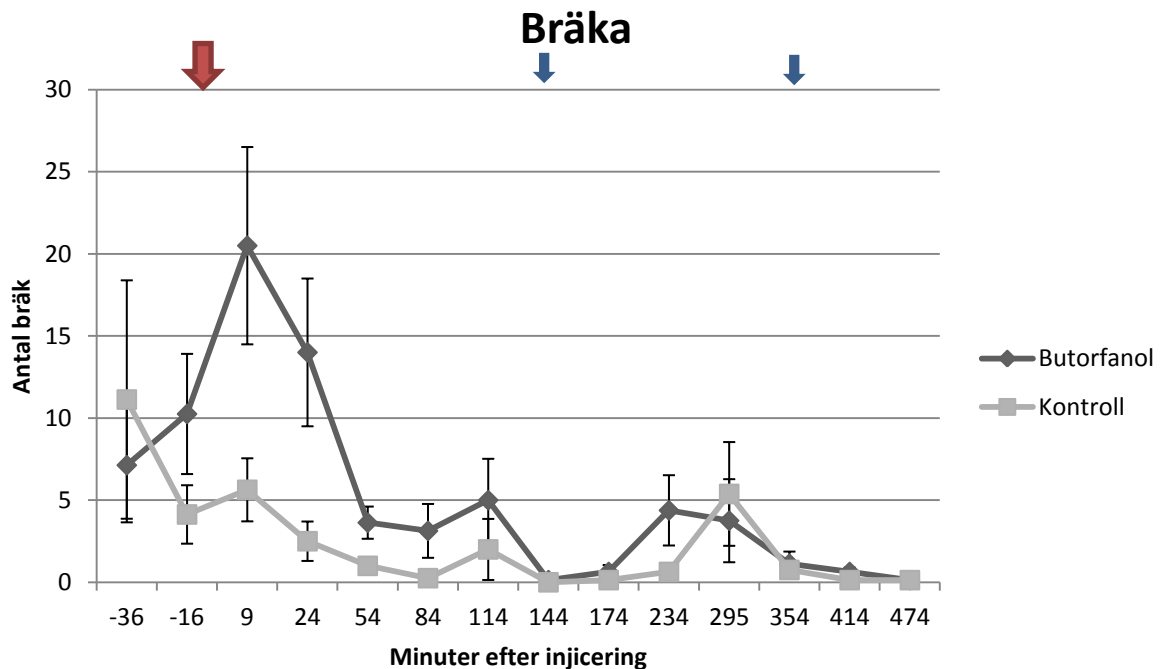
Figur 7 visar hur många procent av observationerna under varje observationstillfälle som getterna ägnade åt att idissla. Resultatet visar att getterna i båda behandlingarna ägnade mycket tid åt att idissla innan injicering, men efter injiceringen minskade frekvensen för båda behandlingarna. När getterna fått NaCl började de snart idissla igen, medan getterna när de fått butorfanol inte började igen förrän efter flera timmar. Först vid observationen 13.54, 234 minuter efter injicering, kan man se att de getter som fått butorfanol börjat idissla, men variationen är väldigt stor. Ingen av getterna i försöket idisslade vid observationerna efter utfodringstillfällena. Det statistiska resultatet visade att det fanns en tydlig signifikant skillnad mellan de båda behandlingarna, där getterna när de injicerats med butorfanol idisslade betydligt mindre efter injiceringen än när de fått NaCl. Inom båda behandlingarna fanns en tydlig signifikant skillnad mellan observation 1 och 2 då idisslingen ökade till andra observationstillfället. Efter administrering av butorfanol minskade idisslingen vid alla observationer utom observation 11 (295 min). Efter koksaltinjicering minskade idisslingen vid observation 3 (9 min), 7 (114 min), 8 (144 min) samt 11-14 (295-474 min) jämfört med andra observationstillfället.



Figur 7. Idissling hos getter före och efter administrering av butorfanol respektive NaCl (kontroll) ($n=8$). Den stora (röda) pilen visar var injicering skedde. De små (blå) pilarna visar var utfodringarna skedde. Den statistiska analysen visade att när getterna injicerades med butorfanol idisslade de signifikant mindre än när de fick NaCl ($P \leq 0,001$). Vid butorfanolbehandlingen fanns en signifikant minskad idissling vid alla observationer efter injicering utom vid 295 minuter jämfört med andra observationstillfället. Vid koksaltadministreringen minskade idisslingen vid 9, 114, 295, 354, 414 samt 474 minuter efter injicering jämfört med andra observationstillfället. Medelvärden \pm SE. $P \leq 0,05$.

Bräka

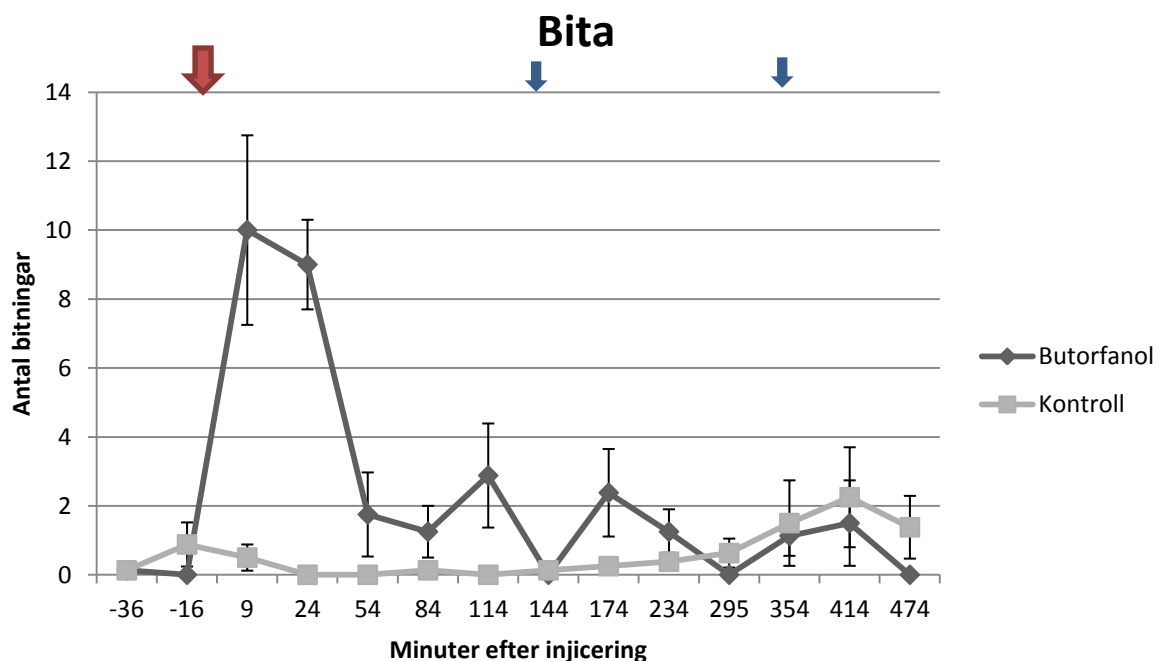
I figur 8 redovisas genomsnittligt antal bräk vid varje observationstillfälle. Här syns att antalet bräk, då getterna fått butorfanol, ökade signifikant strax efter injicering, men kom snabbt ner på samma nivå som när de fått NaCl. Vid observation 3 som utfördes 9 minuter efter injicering var skillnaden som störst. Under dessa fem minuter bräkte getterna efter butorfanoladministrering i genomsnitt 20,5 gånger och efter koksaltadministreringen 5,6 gånger. Den statistiska analysen visar att det är en tydlig signifikant skillnad i antal bräk mellan behandlingarna där getterna när de fått butorfanol bräkte mera än när de fick NaCl. När getterna fått butorfanol bräkte de signifikant mer vid observation 3 (9 min), precis efter injicering. Därefter minskade bräkningarna och vid observationerna 6 (84 min), 8 (144 min), 9 (174 min) samt 12-14 (354-474 min) bräkte de mindre än innan injicering. När getterna fått NaCl fanns ingen skillnad efter injicering.



Bräkningar hos getter före och efter administrering av butorfanol respektive NaCl (kontroll) (n=8). Den stora (röda) pilen visar var injicering skedde. De små (blå) pilarna visar var utfodringarna skedde. Statistiska analysen visade att getterna bräkte mer när de fått butorfanol än när de fått NaCl ($P \leq 0,001$) Efter att getterna fått butorfanol ökade antalet bräk signifikant vid observationen 9 minuter efter injicering, men minskade signifikant vid 84, 144, 174, 354, 414 och 474 minuter efter injicering jämfört med andra observationstillfället. Efter det att getterna fått NaCl fanns ingen skillnad. Medelvärden \pm SE. $P \leq 0.05$.

Bitar

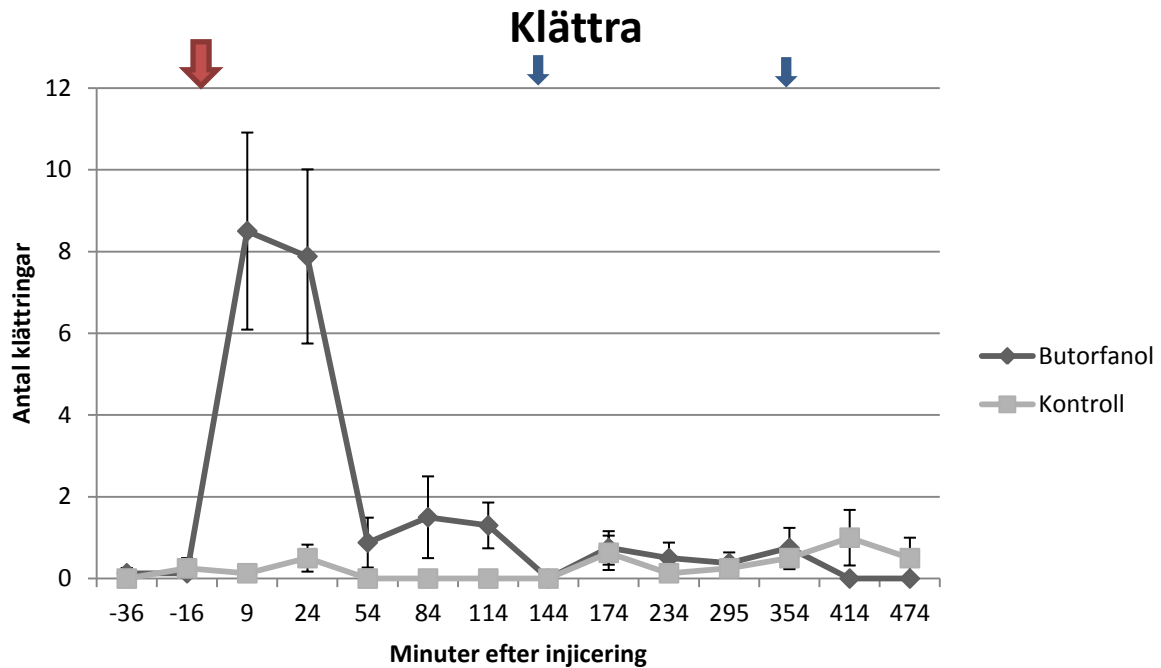
I figur 9 redovisas hur många gånger getterna i försöket bet på inredningen under varje observationstillfälle. Antalet bitningar ökade kraftigt efter injiceringen av butorfanol. En timme efter injiceringen hade antalet bitningar sjunkit igen. När getterna fått NaCl låg antalet bitningar mycket lågt men ökade något på eftermiddagen. 9 minuter efter injicering var genomsnittligt antal bitningar under observationen 10 stycken efter butorfanoladministreringen och 0,5 efter koksaltadministreringen. Den statistiska analysen visade på en tydlig signifikant skillnad där getter som fått butorfanol bet signifikant mer än getter som fått NaCl. Efter butorfanolinjiceringen var antalet bitningar på inredning signifikant högre vid observationerna 3 (9 min), 4 (24 min) och 7 (114 min) jämfört med andra observationstillfället. Då getterna fått NaCl fanns ingen signifikant skillnad men antalet bitningar tenderade att öka på eftermiddagen flera timmar efter injicering.



Figur 9. Bitningar hos getter före och efter administrering av butorfanol respektive NaCl (kontroll) ($n=8$). Den stora (röda) pilen visar var injicering skedde. De små (blå) pilarna visar var utfodringarna skedde. När getterna fått butorfanol bet de signifikant mer på inredningen än när de fått NaCl ($P \leq 0,001$). Efter butorfanoladministreringen var antalet bitningar signifikant högre 9, 24 och 114 minuter efter injicering jämfört med andra observationstillfället. Efter att getterna fått NaCl fanns ingen skillnad. Medelvärden \pm SE. $P \leq 0,05$.

Klättra

Antalet klättringar på gallret redovisas i figur 10. Under observationen 9 minuter efter injicering är genomsnittliga antalet klättringar 8,5 efter butorfanoladministreringen och 0,13 efter koksaltadministreringen. Den statistiska analysen visade att när getterna fått butorfanol klättrade de betydligt mer än när de fått NaCl. När getterna fått butorfanol ökade antalet klättringar signifikant vid observation 3 och 4, dvs. 9 respektive 24 minuter efter injicering jämfört med andra observationstillfället. När getterna fått NaCl fanns ingen signifikant skillnad efter injiceringen, men de tenderade att klättra lite mer på grunden på eftermiddagen.



Figur 10. Klättringar hos getter före och efter administrering av butorfanol respektive NaCl (kontroll) (n=8). Den stora (röda) pilen visar var injicering skedde. De små (blå) pilarna visar var utfodringarna skedde. Statistiska analysen visade att getterna klättrade mer när de fått butorfanol än när de fått NaCl ($P \leq 0,001$). Efter butorfanolinjiceringen ökade antalet klättringar vid observationerna 9 och 24 minuter efter injicering jämfört med andra observationstillfället. Efter koksaltadministreringen fanns ingen skillnad. Medelvärden \pm SE. $P \leq 0,05$.

Övriga observationer

Under försöken noterades även att några av de getter som behandlats med butorfanol hässjade kraftigt upp till 1,5 timme efter injiceringen. En av getterna blev under en kort tid efter injiceringen tydligt rastlös och tog språng runt i boxen.

Individkurvor för varje beteende redovisas i bilaga 2.

Fysiologiska förändringar

I ett separat examensarbete (Andersson, 2012) kunde det konstateras att det inte fanns några signifikanta skillnader mellan behandlingarna för hormonerna kortisol och vasopressin. Det var dock stora skillnader mellan individerna. Några hade märkbart mer kortisol i blodet när de behandlades med butorfanol medan en del hade högre värden när de fick NaCl.

Hematokriten var signifikant högre när getterna fått butorfanol. Det fanns en signifikant skillnad mellan behandlingarna 30 minuter till fyra timmar efter injicering. Därefter stabiliserades nivåerna igen. För plasmaproteinerna fanns en signifikant ökning 15 minuter till en timme efter injicering. Därefter stabiliserades nivåerna för plasmaproteiner.

Getterna fick alltså en ökning av hematokrit och plasmaproteiner när de hade behandlats med butorfanol jämfört med när de var kontroller. Även om vissa getter också hade en tydlig ökning av kortisol och vasopressin så fanns ingen generell ökning för dessa hormoner (Andersson, 2012).

Butorfanol, kinetik och halveringstid

I examensarbetet som fokuserade på kinetiken (Gustavsson, 2012) upptäcktes att det var stor individuell variation i den hastighet som läkemedlet bröts ner, men en genomsnittlig halveringstid beräknades till 78,6 minuter. Det förelåg en mycket stor variation i butorfanolkoncentration mellan olika getter vilket eventuellt kan förklaras av att subkutan administrering ofta ger stor spridning i upptaget av läkemedlet.

Diskussion

Det finns idag inget läkemedel som är godkänt för små idisslare i Sverige och det tycks vara av låg prioritet för läkemedelsföretagen att utveckla läkemedel för djur som inte har ett stort ekonomiskt värde i samhället. I det här försöket som utfördes som examensarbete på Sveriges Lantbruksuniversitet valdes getter som försöksdjur även om får är ett vanligare produktionsdjur i landet. Detta då universitetet håller egna getter för försök. Geten är dessutom ett av de vanligaste husdjuren globalt sett.

Den statistiska analysen visade att getterna, när de behandlats med butorfanol, ägnade signifikant mer tid åt att bräka, bita på inredning, klättra på gallret och stå med framklövarna på gallret än när de behandlats med NaCl. De ägnade även signifikant mindre tid åt att ligga ner och att idissla än när de behandlats med NaCl. För beteendena äta samt att stå/gå fanns inga signifikanta skillnader mellan behandlingarna. Det noterades även att några av getterna hässjade kraftigt efter butorfanolinjiceringen. Resultatet visade alltså att det fanns en tydlig förändring i getternas beteende efter att de injicerats med butorfanol jämfört med när de var kontroller. Tydligast var skillnaden närmaste timmen efter injicering.

Både beteendena ”Stå mot grind” som observerades var 20:e sekund och ”Klättra” som observerades kontinuerligt togs med i studien. Detta för att beteendet är viktigt för studien och lätt kan missas om det bara observeras var 20:e sekund. Att en get står med klövarna på grinden vid bestämda tillfällen säger inte så mycket om hur mycket de klättrar upp och ner, ett beteende som kan vara ett tecken på stress. Ett beteende som tidigare i detta arbete beskrivs som ett tecken på smärta är att de kan dra sig undan från flokken, men då getterna här hölls individuellt i boxar så kunde detta beteende inte studeras i denna studie.

Vad gäller position så visar resultatet att getterna när de fått butorfanol ägnade signifikant mer tid till att stå med framklövarna på gallret, detta med en *** signifikans. När de var kontroller ägnade de signifikant mer tid till att ligga ner med en ** signifikans. För beteendet stå/gå fanns ingen signifikant skillnad mellan behandlingarna. I resultatet framgår att getterna vid kontrollbehandlingen vid den första observationen efter injicering ägnade mer tid åt att stå och gå än innan observationen medan de när de fått butorfanol ägnade mindre tid åt det beteendet. Det kan verka som att getterna blev mer aktiva när de fick NaCl, men detta kan istället förklaras av att getterna när de fått butorfanol istället ägnade mer tid åt att stå mot grinden och att när de var kontroller också blev mer aktiva på grund av beteendet hos getterna som fått butorfanol. Under butorfanolbehandling var de alltså mer aktiva än när de fått NaCl den närmaste tiden efter injicering. När de var kontroller visade sig dock den ökade aktiviteten som att de stod och gick mer, men inte stod mot grinden. Anledningen till att alla getter stod upp och ingen låg ner vid observationstillfället 144 minuter efter injicering beror sannolikt på att getterna nyligen hade utfodrats kl 12.15.

Det fanns ingen skillnad i ätbeteende och i och med det kunde man heller inte se någon minskad aptit av medlet som annars kan vara ett tecken på stress eller smärta. Däremot idisslade getterna betydligt mindre efter butorfanolbehandlingen. När de fått butorfanol idisslade de knappt alls på flera timmar efter injiceringen. Även när de var kontroller var idisslingen signifikant lägre på vissa punkter efter injicering jämfört med innan, men här var variationen stor. Det kunde under observationerna vara svårt att avgöra om getterna verkligen åt eller om de bara stod och plockade i höet. Det finns därför en teori om att getterna när de fått butorfanol även åt mindre även om det vid vissa observationer uppfattades som att de åt. Under det första observationstillfället efter utfodringen klockan 12.15 ägnade sig alla getter åt att äta, även de som då fått butorfanol. Även efter utfodringen klockan 15.00 kan man se en ökning av ätbeteende och minskning av andra beteenden. Tydligt är att butorfanol på något

sätt hämmar idisslingen, vilket man även kom fram till i studien med buprenorfin (Ingvast-Larsson et al., 2007; Bohman, 2008). I vår studie varade dock inte hämningen lika länge. Då de är helt olika läkemedel så kan man förstås inte jämföra deras verkan. Dessutom gav försöket med buprenorfin tydligt minskat idisslingsbeteende trots att det gavs i en tio gånger lägre dos. Dessa olika biverkningar kan bero på att läkemedlet verkar på olika receptorer i hjärnan. När medlet ges vid de prövade doserna är butorfanol ur djurskyddssynpunkt lämpligare att använda på get än buprenorfin då bieffekterna inte varade lika länge.

För alla beteenden bräka, bita och klättra fanns en tydlig skillnad där getterna när de behandlats med butorfanol ägnade sig mer åt detta än när de var kontroller. Det verkar finnas ett starkt samband mellan beteendena klättra och bita då kurvorna tydligt följer varandra. Detta beror förmodligen på att getterna sträckte sig upp och klättrade upp med framklövarna på grinden för att komma åt att bita på det övre gallret eller inredningen bakom boxen. En sak som är svår att förklara är varför getterna när de var kontroller började ägna sig mer åt beteenden som klättra, bita och bräka i slutet av dagen. En teori kan vara att de normalt är mer aktiva på eftermiddagen och att getterna när de fått butorfanol vid det laget var för trötta för att bli mer aktiva. Personalen som sköter om getterna i vanliga fall kan intyga att getterna är mer aktiva när det är matdags.

Resultatet för beteendestudien tyder alltså på att getterna får ett mer oroligt beteende en tid efter att de injicerats med 0,2 mg/kg butorfanol. Detta stämmer med många av de tidigare studier som gjorts på idisslare, även om man då ofta sett ett förändrat beteende redan vid lägre doser. Den dosen vi använde oss av är i många fall dubbelt så hög än den som använts i tidigare studier med butorfanol. De fysiologiska resultaten visade att hematokrit och plasmaproteiner hade en ökad koncentration under motsvarande period. Däremot fanns ingen signifikant skillnad för stresshormonerna kortisol och vasopressin vilket var lite förvånande med tanke på de stora beteendeförändringarna. Nivåerna av hematokriten var signifikant förhöjda 30 minuter och upp till fyra timmar efter injicering och för plasmaproteiner 15 minuter och upp till en timme efter injicering. De tiderna stämmer väl med den period då getterna när de fått butorfanol visade signifikanta beteendeförändringar.

Enligt den farmakokinetiska studien hade läkemedlet en halveringstid på 78,6 minuter och hade till stor del försvunnit redan efter första halvtimmen efter injicering. Denna halveringstid skiljde sig mycket från halveringstiden i pilotförsöket då dosen 0,1 mg/kg användes på vuxna getter och var kortare än halveringstiden i studien av Carroll et al. (2001) trots att denna injicering gjordes subkutant och att dosen var dubbelt så hög. Det fanns dock en stor individuell variation mellan getternas maxkoncentration av läkemedlet. Detta kan bero på att subkutan injicering är ganska svår att utföra så getterna kan ha fått olika koncentration i blodet. En annan teori var att det gjorts fel vid analysen av blodet, men proverna analyserades två gånger med samma resultat. Variationen kan även bero på genetiska skillnader som gör att getterna har olika snabb metabolism. I den farmakokinetiska studien drogs slutsatsen att man kan förvänta sig en smärtlindring på 30-60 minuter hos getter vid denna dos och appliceringsmetod.

I studien användes ett relativt litet antal getter och med de stora variationerna som förelåg kan det vara svårt att dra slutsatser baserat på beteendeförändringarna. Av etiska och ekonomiska skäl bör antalet djur i försök dock hållas nere då analyserna är mycket dyra och åtta djur är ett vanligt antal djur i fysiologiska studier. Getterna var också sina egna kontroller i en så kallad crossover design vilket ändå gör resultatet tillförlitligt eftersom getternas jämförs med sig själva i de båda behandlingarna. Skulle samma studie göras med två grupper med olika getter skulle ett större antal djur behövas.

En annan felkälla var att den mänskliga faktorn sannolikt ibland påverkade resultatet. Speciellt vid första observationstillfället under dagarna brukade getterna vara mer uppspelta av alla människor i rummet. Vid ett par av observationsdagarna rörde sig folk i det rum där fodret kommer ifrån vid utfodring vilket gjorde att getterna reagerade starkt och bräkte och var mer aktiva vilket syns i resultatet då det ofta är en signifikant skillnad i beteende mellan första och andra observationen inom behandlingarna även fast de inte hade injicerats än. Därför har vi när vi gjort jämförelser inom behandlingarna valt att jämföra observationerna efter injicering med den andra observationen eftersom getterna ansågs uppföra sig mer normalt då. En av getterna bräkte 50 gånger under den första 5-minutersobservationen trots att hon inte fått butorfanol vid det tillfället. Dock bör denna miljöpåverkan inte påverka resultatet mellan behandlingarna då båda behandlingarna gjordes alla dagarna. Det var även tydligt att getterna som vid varje försökstillfälle var kontroller påverkades av beteendet hos getterna som fått butorfanol och blev något mer stressade även de.

Även om gruppen av getter var väldigt homogen, med samma kön, ålder, bakgrund, uppväxt och vanor, så var det stor variation på djurens personlighet. Vissa getter bräkte betydligt mer än andra, även när de var kontroller, medan vissa klättrade mer eller bet mer på inredningen. Därför blev variationen stor för flera beteenden.

Slutsats

Syftet med studien var att titta på hur det smärtlindrande läkemedlet butorfanol påverkar getters beteende och om eventuella beteendeförändringar kan tyda på att djuren blir stressade eller upplever obehag eller smärta. Resultatet visade att unga getter påverkas märkbart när de injiceras med butorfanoldosen 0,2 mg/kg. Djuren blir mer aktiva, klättrar på grinden, bräker och biter mer på inredningen jämfört med när de får NaCl. Samtidigt visade den parallella fysiologiska studien att det inte fanns några signifikanta skillnader för hormonerna vasopressin och kortisol som man väntat. Däremot resulterade butorfanoladministreringen i en signifikant högre hematokrit och plasmaproteinkoncentration vilket styrker teorin om att butorfanol även påverkat getterna fysiologiskt. Den farmakokinetiska studien visade på en kort halveringstid vid subkutan injicering vilket tyder på att läkemedlet bryts ner snabbt och inte är lämpligt vid längre tid av smärtlindring.

Butorfanol skulle kunna anses lämpligt som smärtlindring till getter under en kortare tid. Frågan är dock om det är så lämpligt med ett mer aktivt beteende på getter som är sjuka eller skadade. Fortsatta studier krävs för att avgöra hur effektivt butorfanol är för smärtlindring till getter. Om medlet skulle visa sig vara effektivt även i mindre doser så skulle medlet kunna användas utan märkbara biverkningar.

Tack till

Min handledare Eva Sandberg som hela tiden varit positiv och till stor hjälp i upplägg och skrivande. Åsa Eriksson som är getansvarig och har varit till stor hjälp under försöken. Felicia Andersson och Helena Gustavsson som gjorde sina examensarbeten parallellt och även var till hjälp för min studie. Samt alla andra på institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi på Sveriges lantbruksuniversitet i Uppsala som hjälpt till i arbetet.

Referenser

- Alvarez, L., Nava, R.A., Ramírez, A., Ramírez, E., Gutiérrez, J. 2009. Physiological and behavioural alterations in disbudded goat kids with and without local anaesthesia. *Applied Animal Behaviour Science* 117, 190–196.
- Andersson, F. 2012. Fysiologiska förändringar vid administrering av butorfanol till friska getter. Examensarbete. Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi. Sveriges lantbruksuniversitet, Uppsala.
- Aoyama, M., Negishi, A., Abe, A., Yokoyama, R., Ichimaru, T., Sugita, S. 2007. Physiological and behavioural effects of an intracerebroventricular injection of corticotropin releasing hormone in goats. *The Veterinary Journal* 177, 116–123
- Bayazit, V. 2009. Evaluation of cortisol and stress in captive animals. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(2): 1022-1031.
- Bohman, M. 2008. Buprenorfin till get – grundläggande farmakokinetik och påverkan på beteende. Examensarbete 2008:55. Inst. för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, Sveriges lantbruksuniversitet.
- Buwalda, B., de Boer, S.F., Van Kalkeren, A.A., Koolhaas, J.M., 1997. Physiological and behavioural effects of chronic intracerebroventricular infusion of corticotropin-releasing factor in the rat. *Psychoneuroendocrinology* 22, 297–309.
- Campbell, N.A., Reece J.B. 2005. Animal form and function. I: *Biology, 7th edition*. 820-1045. Von Hoffman Press, Inc.
- Carroll, G.L., Boothe, D.M., Hartsfield, S.M., Waller, M.K., Geller, S. 2001. Behavioral changes and pharmacokinetics of butorphanol in goats following intravenous and intramuscular administration. Texas A & M University, College Station, Texas, USA. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 28, 97-110.
- Carroll, G.L., Boothe, D.M., Hartsfield, S.M., Martinez, E.A., Spann, A.C., Hernandez, A. 2002. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of butorphanol in llamas following intravenous and intramuscular administration. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 29, 97-112
- Dahlheim, A. 2010. Effekter av sedering med dexmedetomidin och butorfanol på hudreaktivitet vid intradermaltest på friska hundar. Examensarbete 2010:04. Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap, Sveriges lantbruksuniversitet.
- Dzikiti, T.B., Stegmann G.F., Hellebrekers, L.L., Auer, R.E.J. & Dzikiti, L.N. 2009. Seditative and cardiopulmonary effects of acepromazine, midazolam, butorphanol, acepromazine-butorphanol and midazolam-butorphanol on propofol anaesthesia in goats. *Journal of the South African Veterinary Association*, 80:1, 10-16.
- Duncan, I.J.H., Wood-Gush, D.G.M. 1972. An analysis of displacement preening in the domestic fowl. *Animal Behaviour* 20, 68-71.
- Ensminger, M.E. 2002. Sheep and goat behaviour and environment. I: *Sheep and Goat Science*. 151-171. Interstate Publisher, Inc. Danville, Illinois.
- Eriksson, L., Hydbring, E., Tuomisto, L., MacDonald, E., Kokkonen, U.M., Olsson, K. 1994. Intraruminal fluid administration to goats: Effects of handling and fluid temperature. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 35, 289-298.
- Faostat (FAO Statistics Division). 2011. <http://faostat.fao.org/>. [2011-12-27].
- FASS. 2011. http://www.fass.se/LIF/produktfakta/substance_products.jsp?substanceId=IDE4POF0UAMF5V ERT1. [2011-10-16].

- Gustavsson, H. 2012. Farmakokinetik vid användning av butorfanol som smärtlindring till get. Examensarbete. Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap. Sveriges lantbruksuniversitet, Uppsala.
- Gwedolyn, L., Hartsfield, S.M., Champney, T.H., Slater, M.R., Newman, J.A. 1998. Stress-Related hormonal and metabolic responses to restraint, with and without butorphanol administration, in pre-conditioned goats. *Laboratory Animal Science*, Vol 48, No 4, August 1998.
- Hallander, H. 1989. Getter. I: *Svenska Lantraser, deras betydelse förr och nu*. 347-369. Dejavu, Stockholm.
- Haenlein, G.F.W. 2006. About the evolution of goat and sheep milk production. *Small Ruminant Research* 68, 3-6.
- Harwood, D. 2006. Goat behaviour. I: *Goat Health and Welfare, A Veterinary Guide*. 9-25. The Crowood Press Ltd, Ramsbury, Marlborough.
- Hydbring, E., Madej, A., MacDonald, E. Drugge-Boholm, G., Berglund, B., Olsson, K. 1999. Hormonal changes during parturition in heifers and goats are related to phases and severity of labour. *Journal of Endocrinology*, 160. 75-85.
- Högberg, M. 2011. Gårdsanalyser av mjölkens sammansättning hos Svenska lantrasgetter med en mobil infraröd spektrometri-metod, MIRIS. Examensarbete. Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi och Institutionen för livsmedelsvetenskap, Sveriges lantbruksuniversitet, Uppsala.
- Ingvast-Larsson, C., Svartberg, K., Hydbring-Sandberg, E., Bondesson, U., Olsson, K. 2007. Clinical pharmacology of buprenorphine in healthy, lactating goats. *Journal of Veterinary Pharmacological Therapy* 30, 249-256.
- Jensen, P. 1996a. Hur stress upptäcktes. I: *Stress i djurvärlden*. 7-23. Per Jensen och LTs förlag. Gummessons tryckeri, Falköping.
- Jensen, P. 1996b. Fysiologi och sjukdomar. I: *Stress i djurvärlden*. 23-38. Per Jensen och LTs förlag. Gummessons tryckeri, Falköping.
- Kilgour, R., De Langen, H. 1970. Stress in sheep resulting from management practices. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* 30: 65-76.
- Martin, P., Bateson, P. 2007. Think before you measure. I: *Measuring Behaviour - An Introduction Guide*. Cambridge University Press, New York.
- Molin, E. 2009. Effekt av premedicinering med detomidine i kombination med butorfanol på hudreaktivitet vid intradermaltest på friska hästar. Examensarbete 2009:44. Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap, Sveriges lantbruksuniversitet.
- Morand-Fehr, P., Boutonnet, J.P., Devendra, C., Dubeuf, J.P., Haenlein, G.F.W., Holst, P., Mowlem, L. Capote, J. 2004. Strategy for goat farming in the 21st century. *Small Ruminant Research* 51, 175-183.
- Olsson, A.I.S., Würbel, H., Mench, J.A. 2011. Behaviour. I: *Animal Welfare 2nd edition*. 138-155. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Riviere J.E. & Papich M.G. 2009. Veterinary Pharmacology and Therapeutics [online] 9 ed. Ames: Wiley-Blackwell. http://books.google.se/books?id=ievLulSqWBAC&pg=PP1&dq=Riviere+%26+Papich&ei=dfo_S_TcDpS-ywSQy9HgAw&cd=1#v=onepage&q&f=false [2011-12-14].
- Russel, A.J.F., Mowlem A. 1999. Goats. I: *Management and Welfare of Farm Animals*. Universities Federation for Animal Welfare. Halstan & Co Ltd, Amsterdham, Bucks, UK.

- Schnellbacher, R. 2010. Therapeutic Review: Butorphanol. *Journal of Exotic Pet Medicine*, Vol 19, No 2: pp 192–195.
- Silanikove, N., Leitner, G., Merin, U., Prosser, C.G. 2010. Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. *Small Ruminant Research* 89, 110-124.
- Sjaastad, Ø.V., Hove, K., Sand, O. 2003a. The endocrine system. I: *Physiology of Domestic Animals*. 199-233. Scandinavian Veterinary Press.
- Sjaastad, Ø.V., Hove, K., Sand, O. 2003b. Blood and its function. I: *Physiology of Domestic Animals*. 281-303. Scandinavian Veterinary Press.
- SJV, 2012. Jordbruksverkets hemsida <http://www.sjv.se/>
- Sladky, K.K., Krugner-Higby, L.A., Meek-Walker, E., Heath, T.D. & Paul-Murphy, J.R. 2006. Serum concentrations and analgesic effects of liposome-encapsulated and standard butorphanol tartrate in parrots. *American Journal of Veterinary Research*, 67, 775-781.
- Waterman, A.E., Livingston, A. 1991. Analgesic activity and respiratory effects of butorphanol in sheep. *Research in Veterinary Science*. 51: 19–23.
- Winblad von Walter, L. 2010. Physiological and behavioural responses to fear and discomfort in dogs and goats. Lic. thesis. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Anatomy, Physiology and Biochemistry, Uppsala.
- Währborg, P. 2009. Uppgivenessstress. I: *Stress och den nya ohälsan*. 167-195. Peter Währborg och Natur & Kultur, Stockholm. WS Bookwell, Finland.

Bilaga 1

Beteendeprotokoll

Observation var 20:e sek i 5 min

Get:

Datum:

Klockslag:

Observatör:

Beteende	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Gå															
Stå															
Ligga aktivt															
Ligga vilande															
Äta															
Dricka															
Idissla															
Mot grind															
Darra															

Bräka	Fnysa, frusta	Klättra	Fly, skrämd	Rulla m huvud	Ruska	Klia	Bit	Nosa på granne	Urinera	Gödsla	Annat

Kommentar:

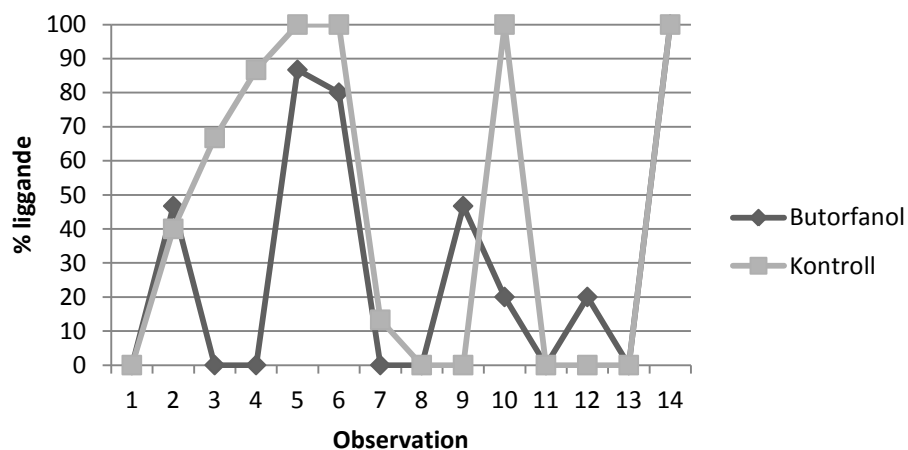
Bilaga 2

Tabell 1. Tid efter injicering för respektive observation

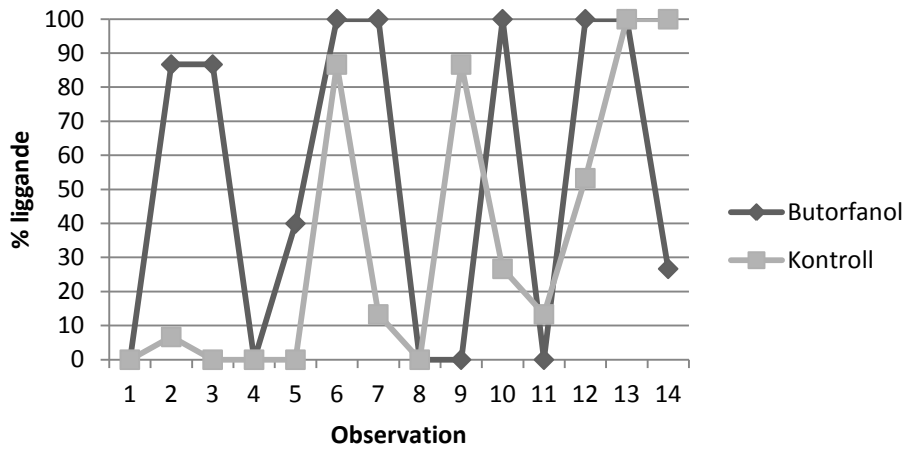
Observation	Minuter efter injicering
1	-36
2	-16
3	9
4	24
5	54
6	84
7	114
8	144
9	174
10	234
11	295
12	354
13	414
14	474

Individkurvor "Ligga"

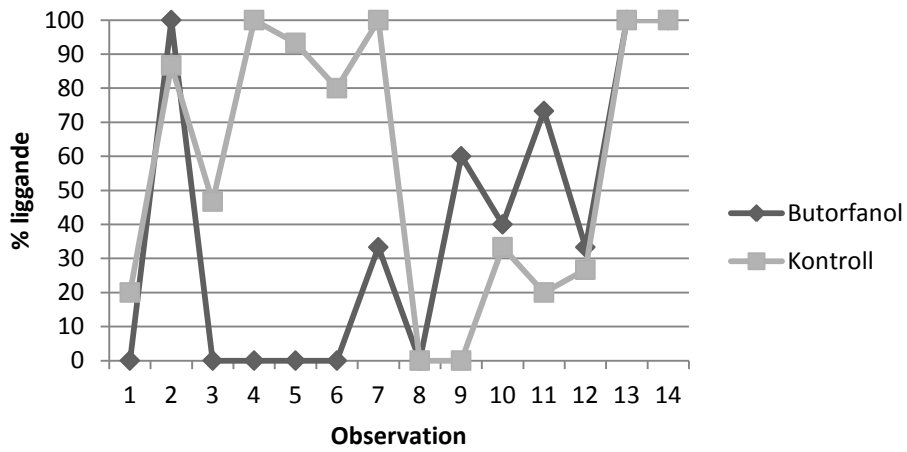
Get 1 (Kiwi)



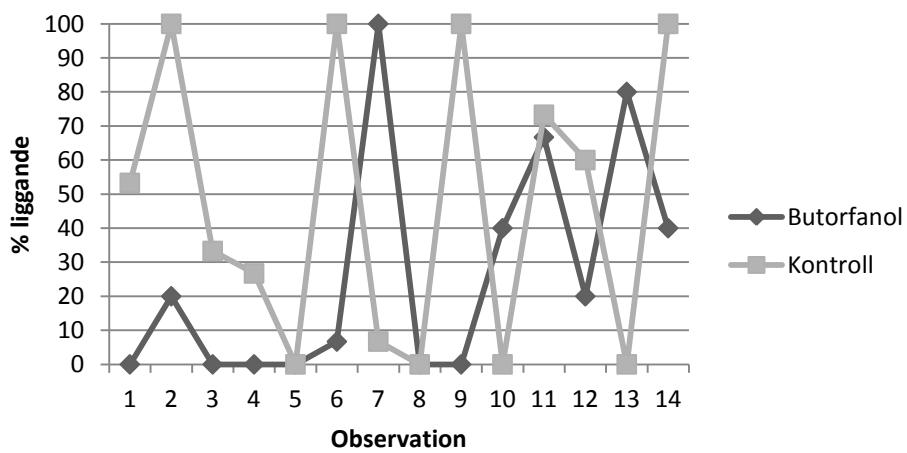
Get 2 (Guava)



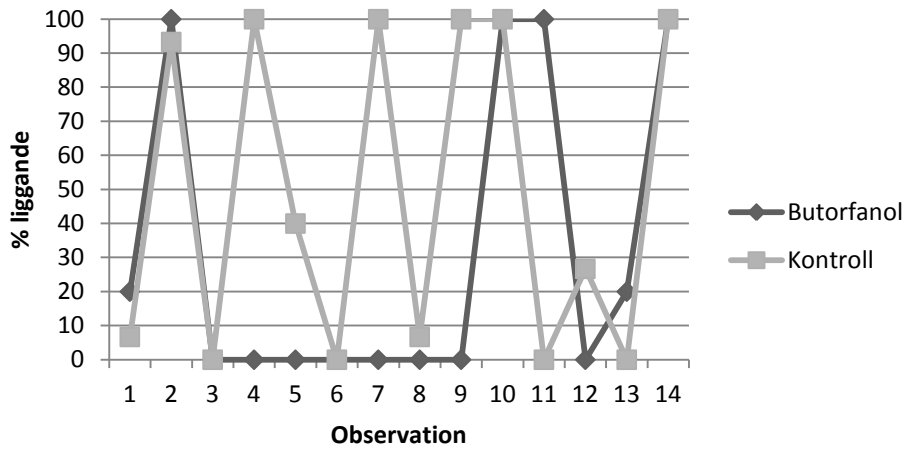
Get 3 (Druva)



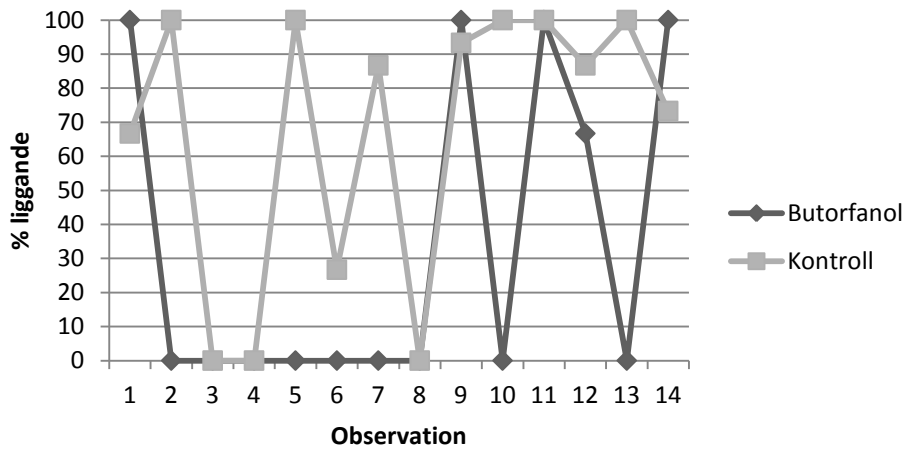
Get 4 (Persika)



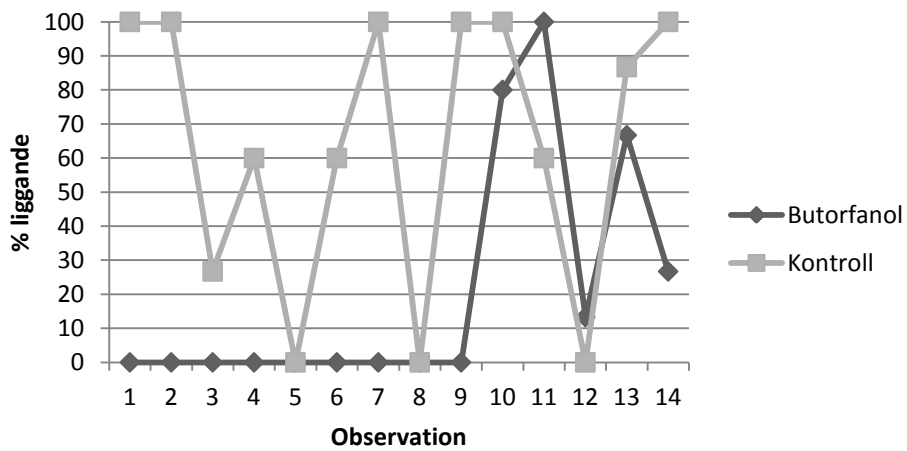
Get 5 (Sharon)



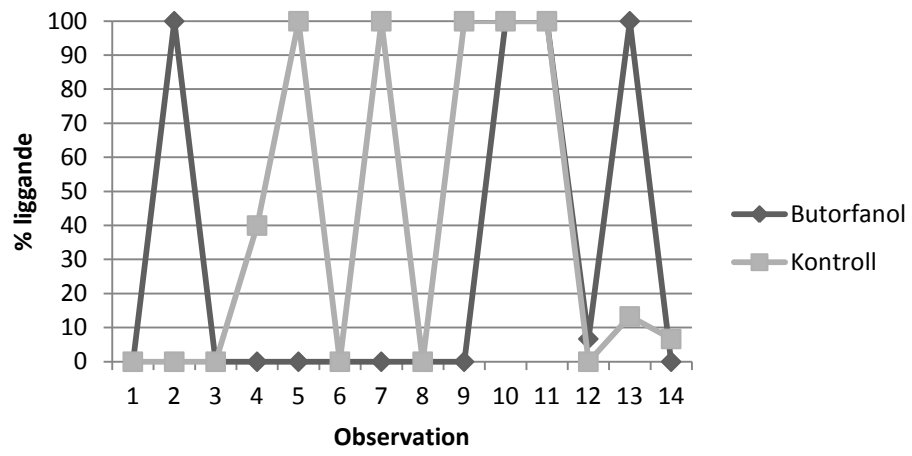
Get 6 (Passion)



Get 7 (Mango)

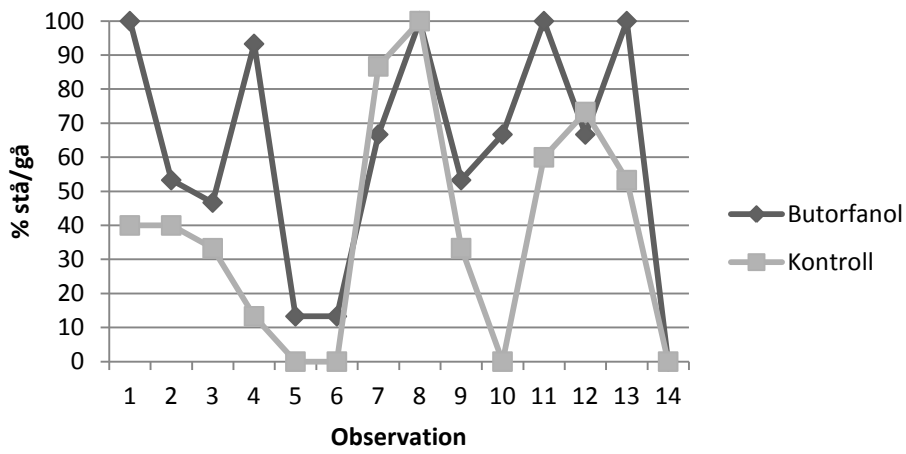


Get 8 (Plommon)

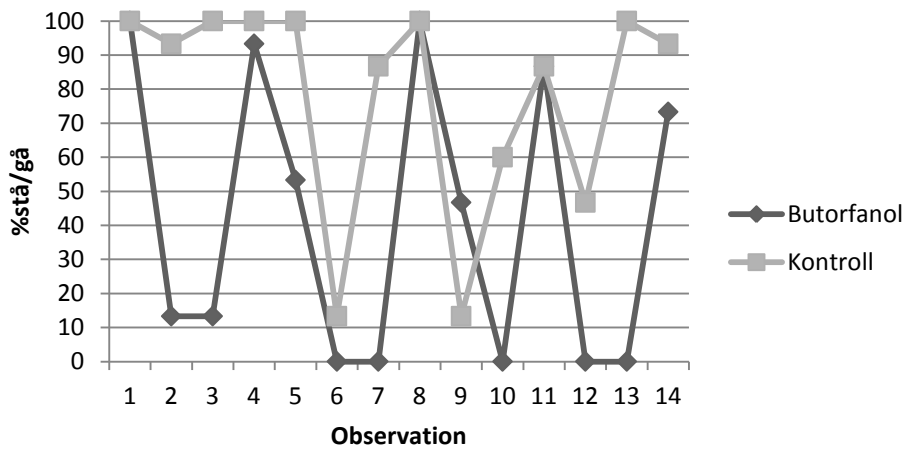


Individkurvor "Stå/gå"

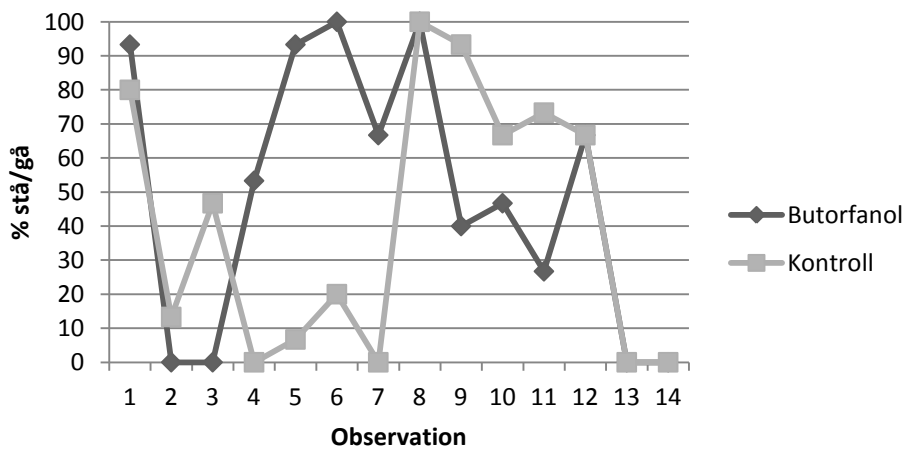
Get 1 (Kiwi)



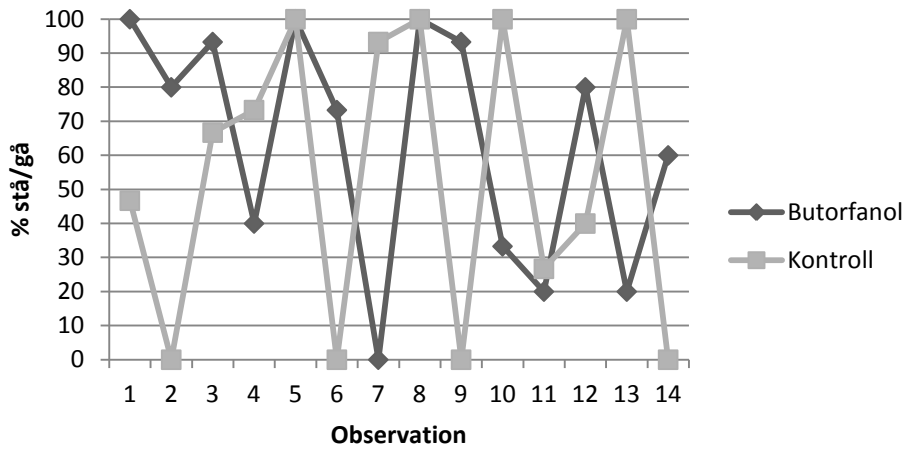
Get 2 (Guava)



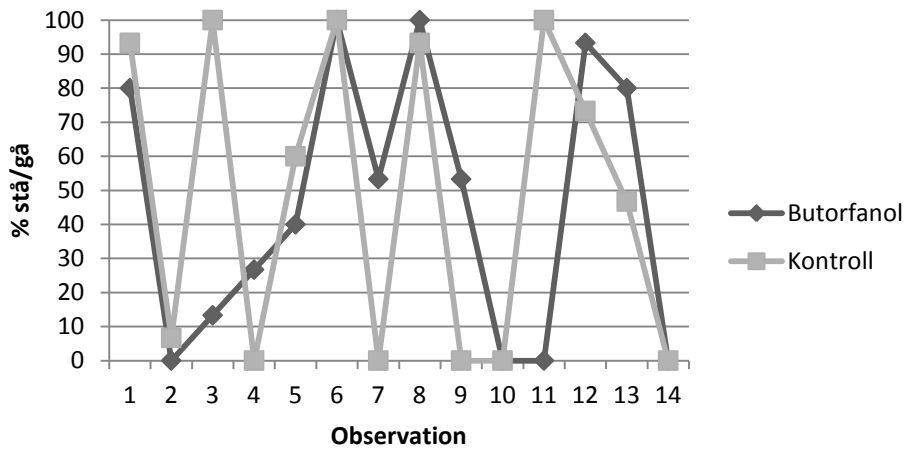
Get 3 (Druva)



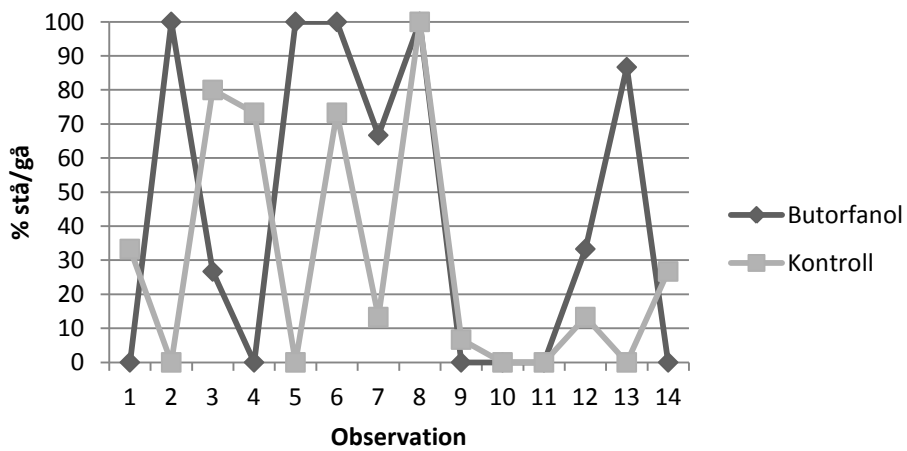
Get 4 (Persika)



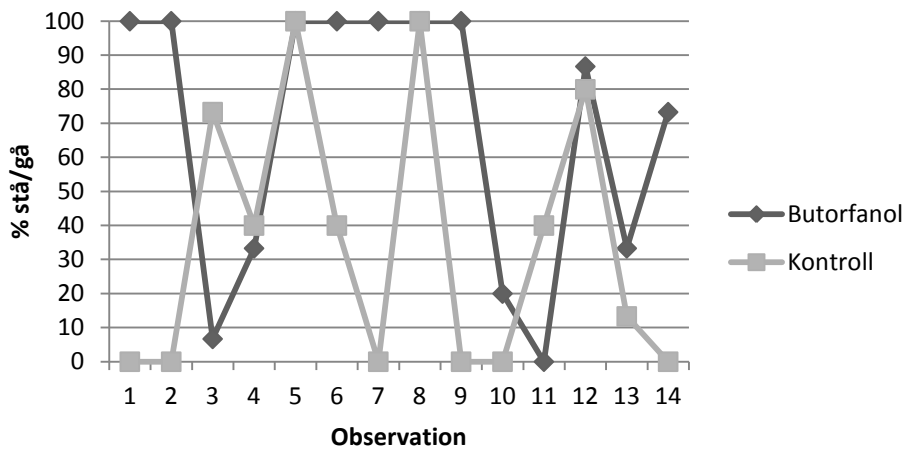
Get 5 (Sharon)



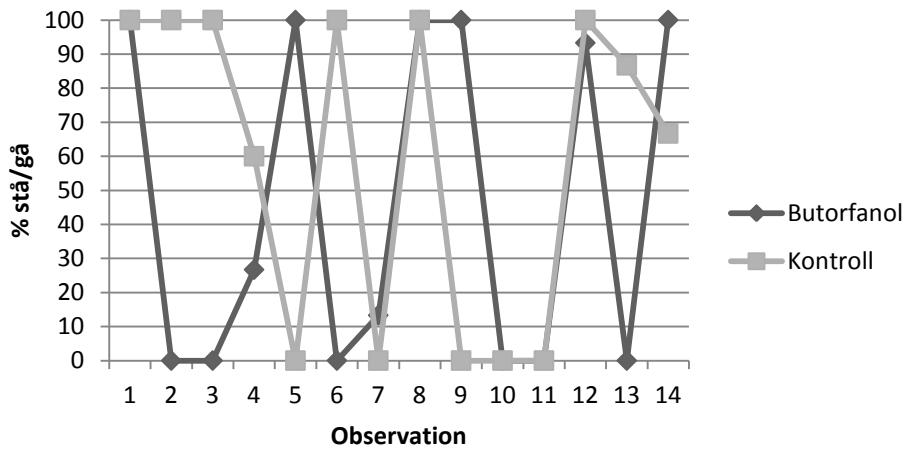
Get 6 (Passion)



Get 7 (Mango)

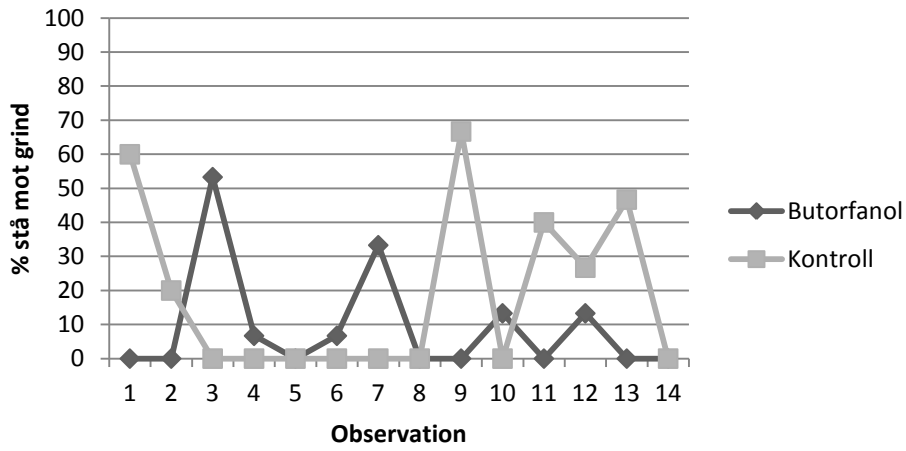


Get 8 (Plommon)

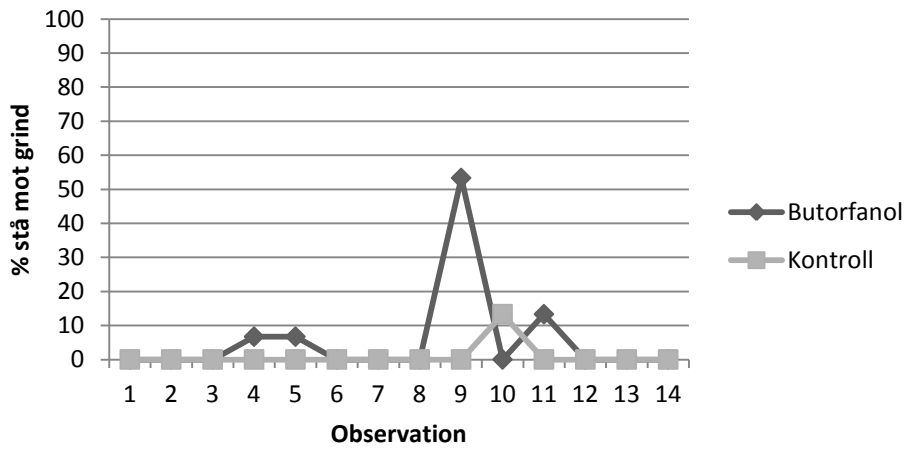


Individkurvor "Stå mot grind"

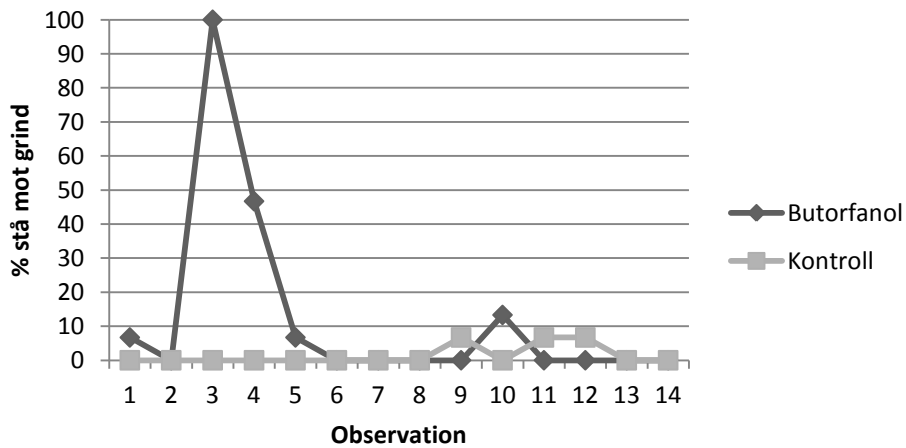
Get 1 (Kiwi)



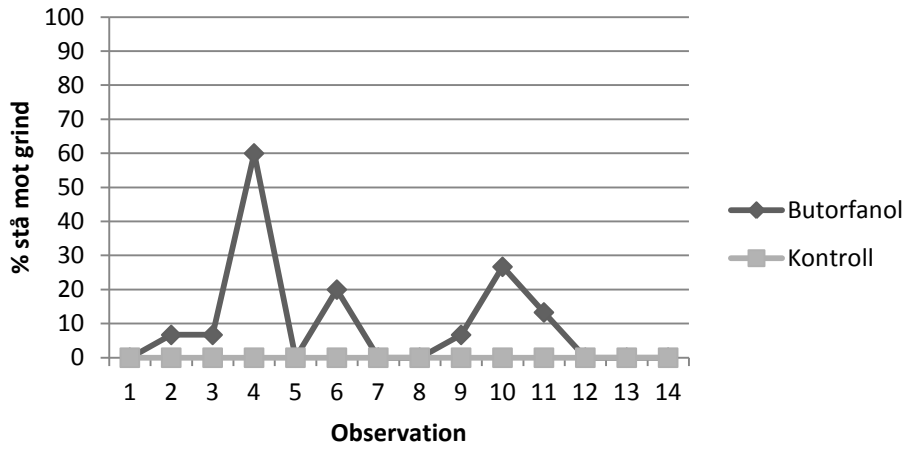
Get 2 (Guava)



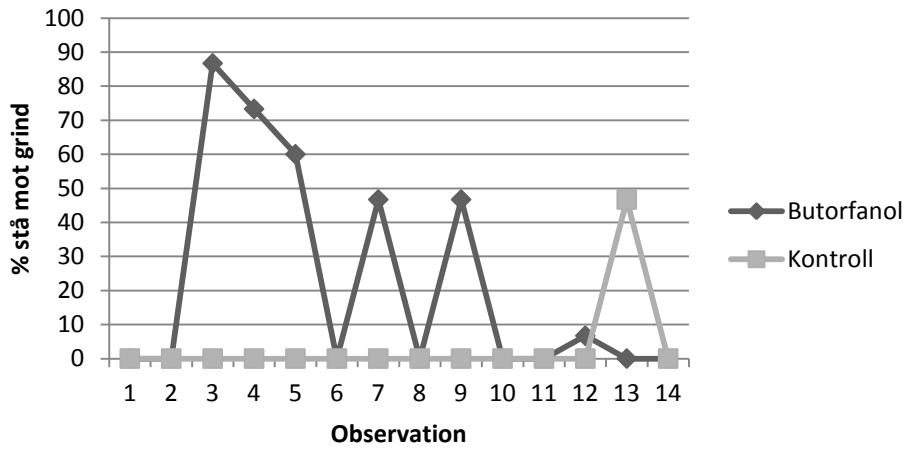
Get 3 (Druva)



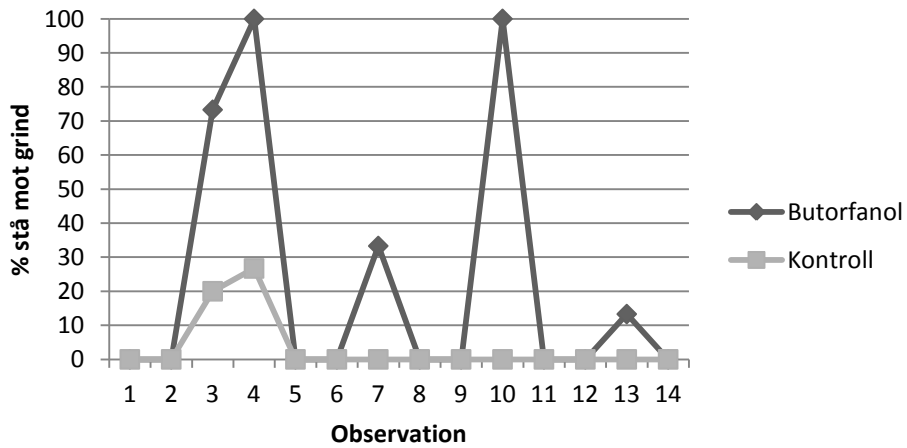
Get 4 (Persika)



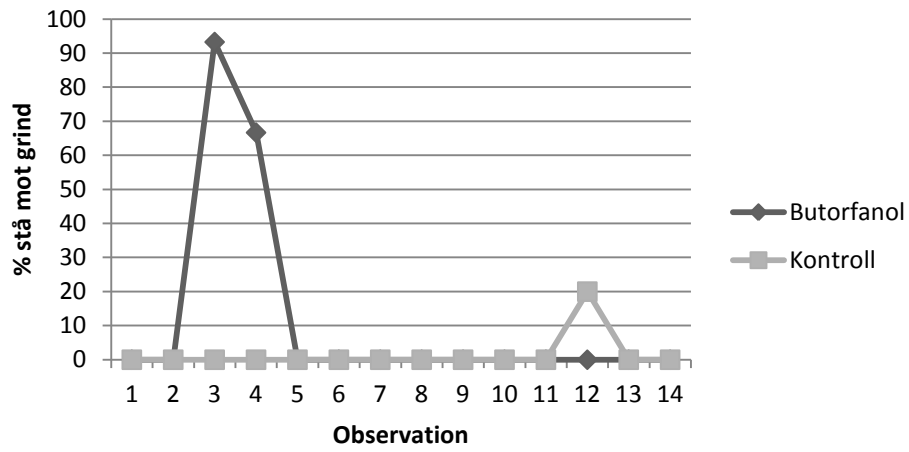
Get 5 (Sharon)



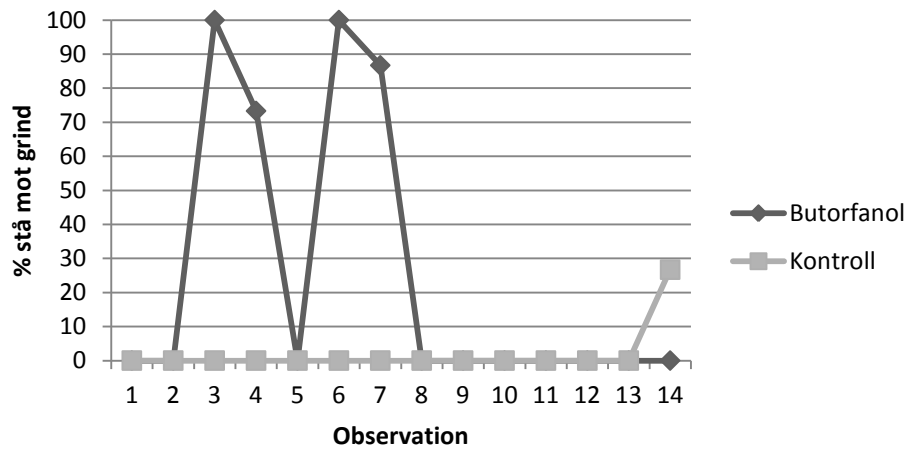
Get 6 (Passion)



Get 7 (Mango)

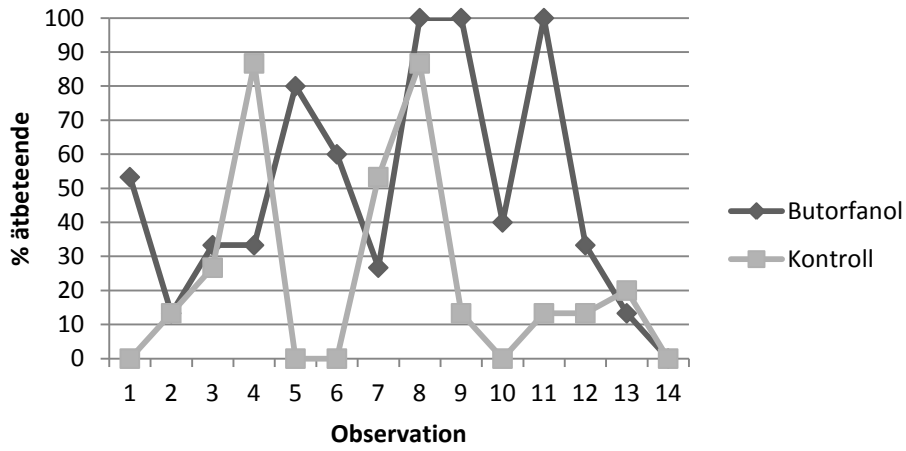


Get 8 (Plommon)

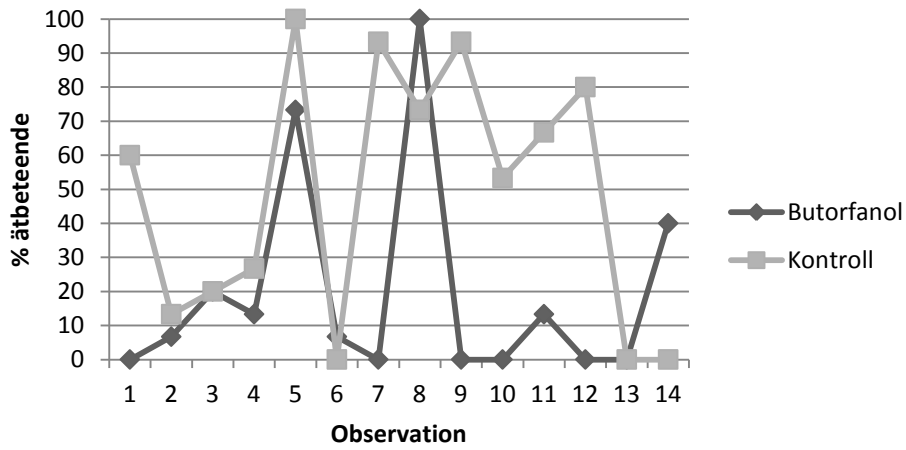


Individkurvor "Äta"

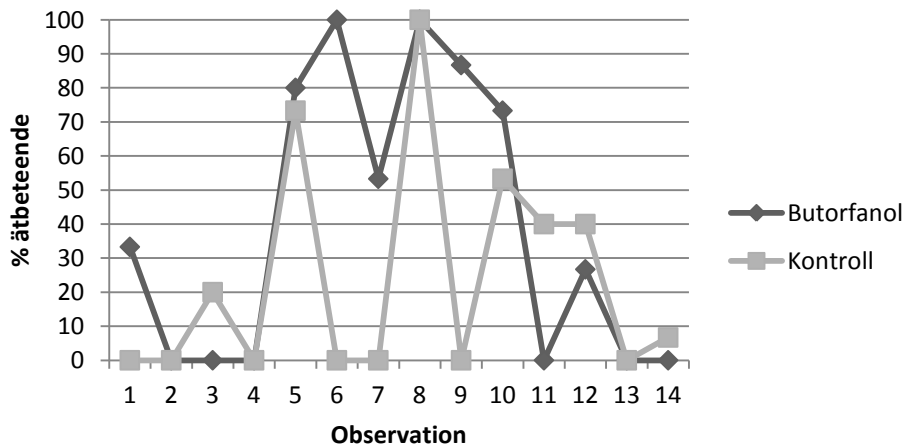
Get 1 (Kiwi)



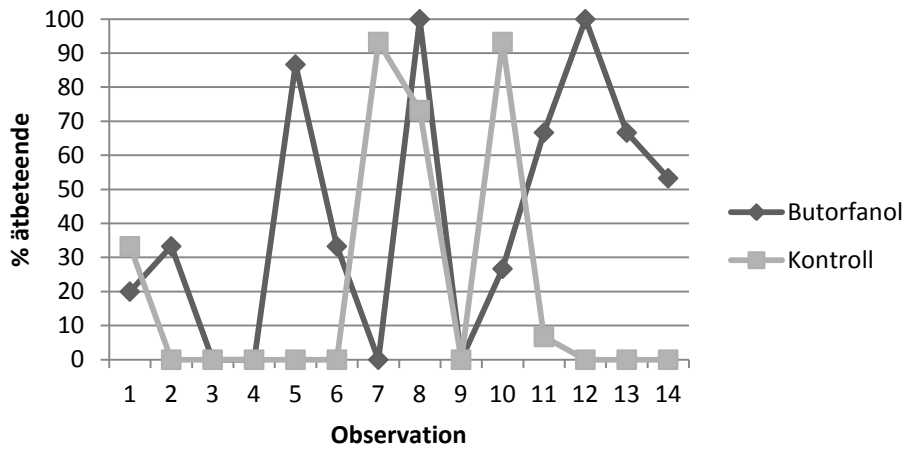
Get 2 (Guava)



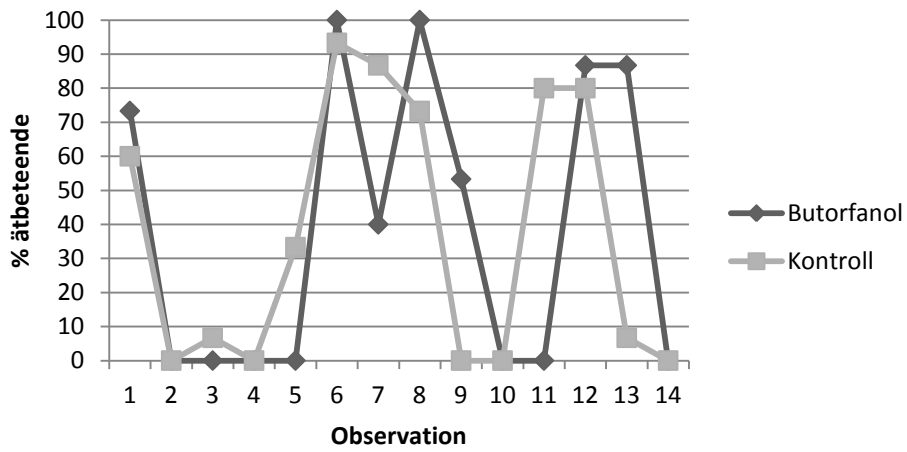
Get 3 (Druva)



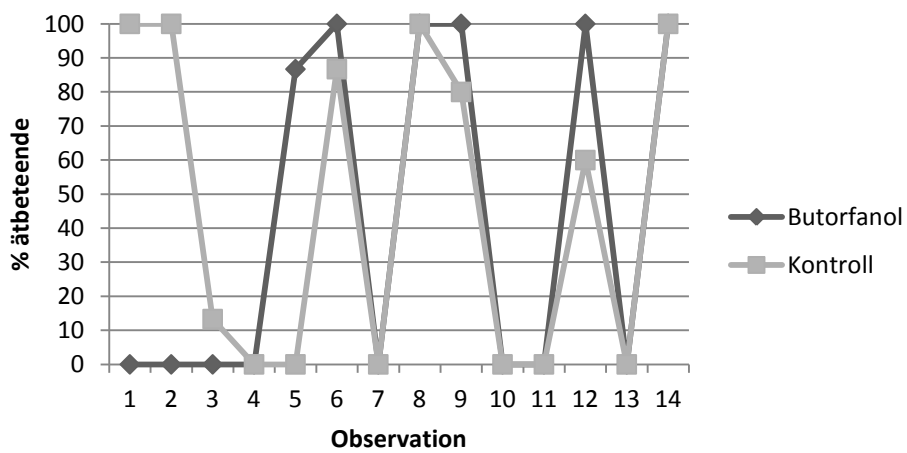
Get 4 (Persika)



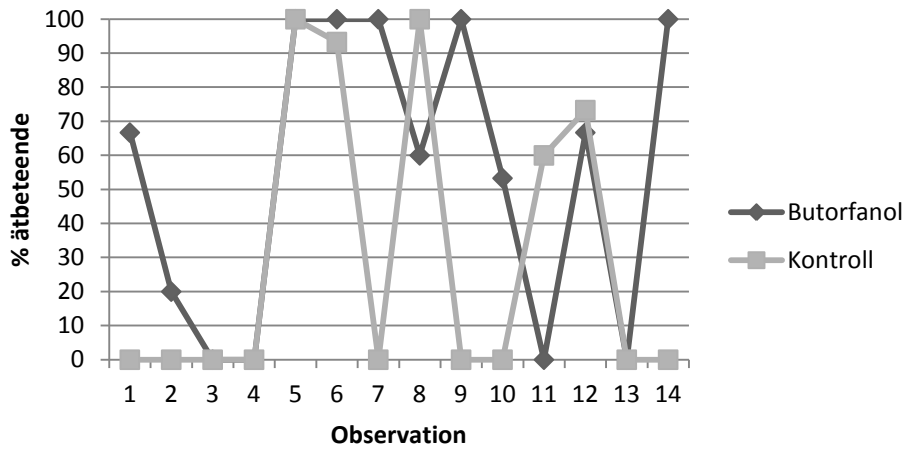
Get 5 (Sharon)



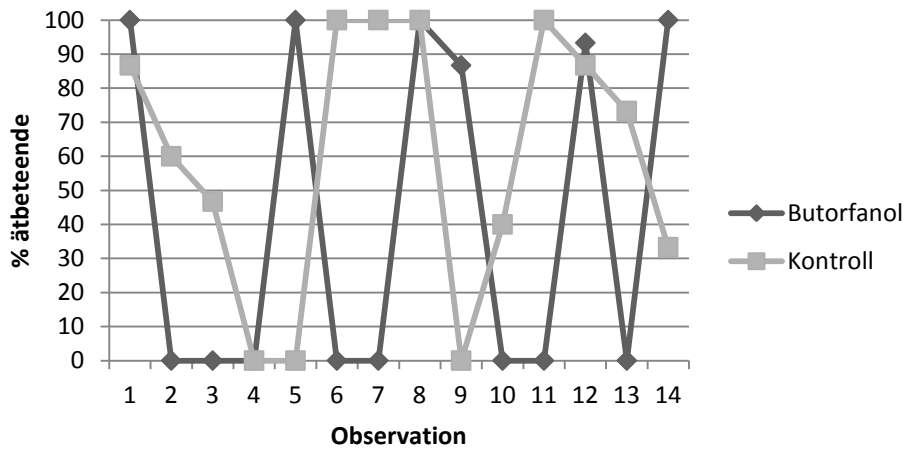
Get 6 (Passion)



Get 7 (Mango)

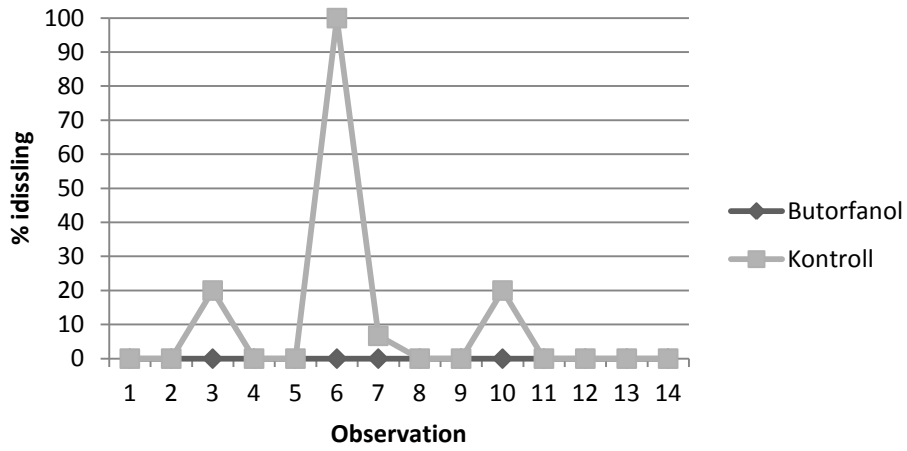


Get 8 (Plommon)

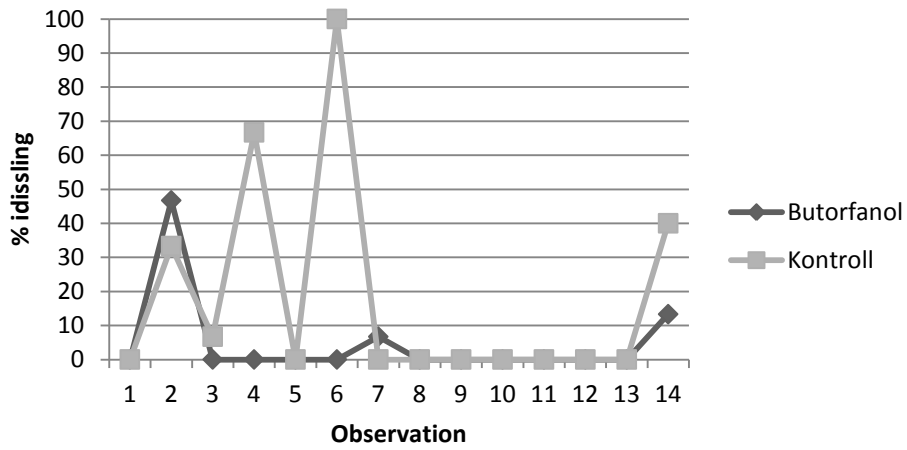


Individkurvor "Idissla"

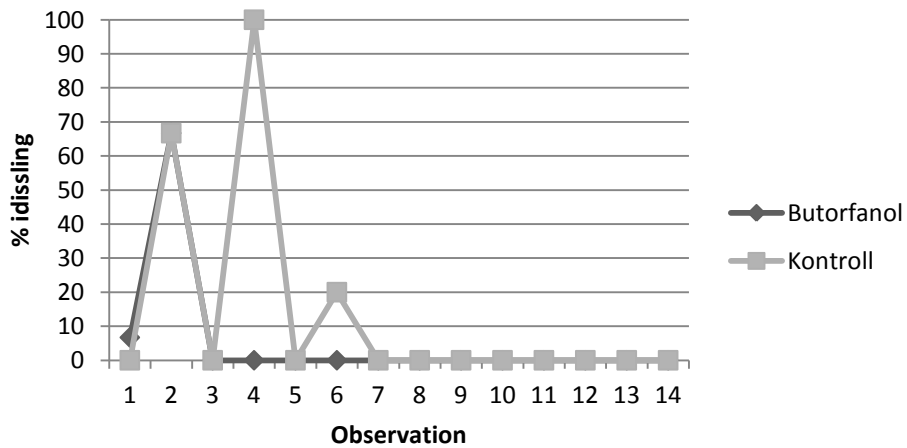
Get 1 (Kiwi)



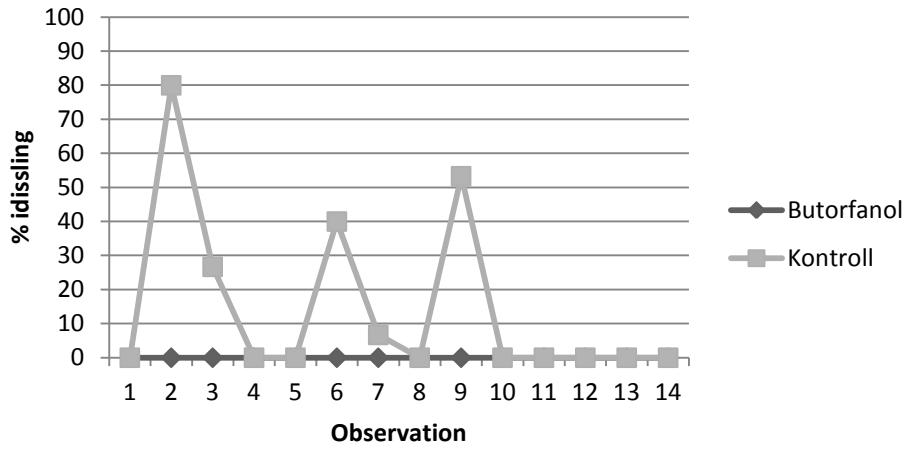
Get 2 (Guava)



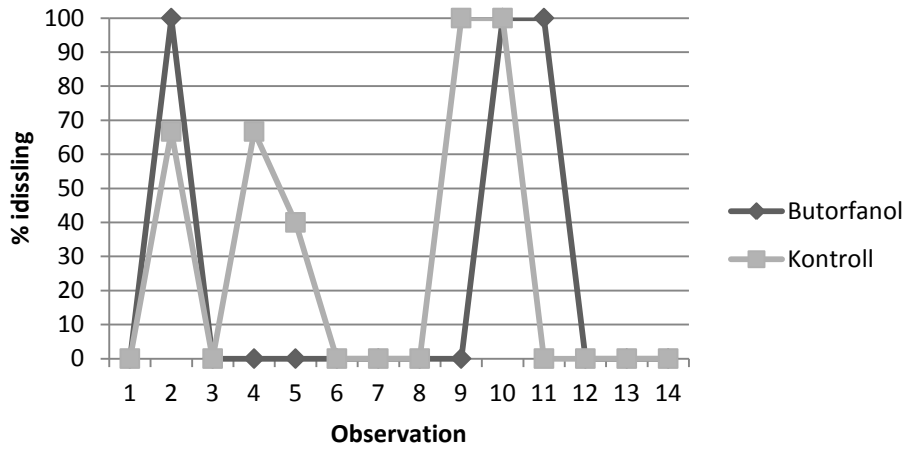
Get 3 (Druva)



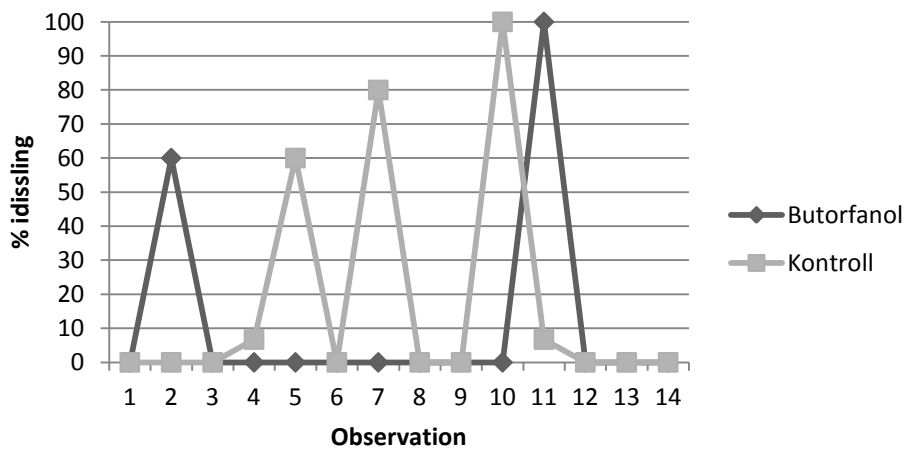
Get 4 (Persika)



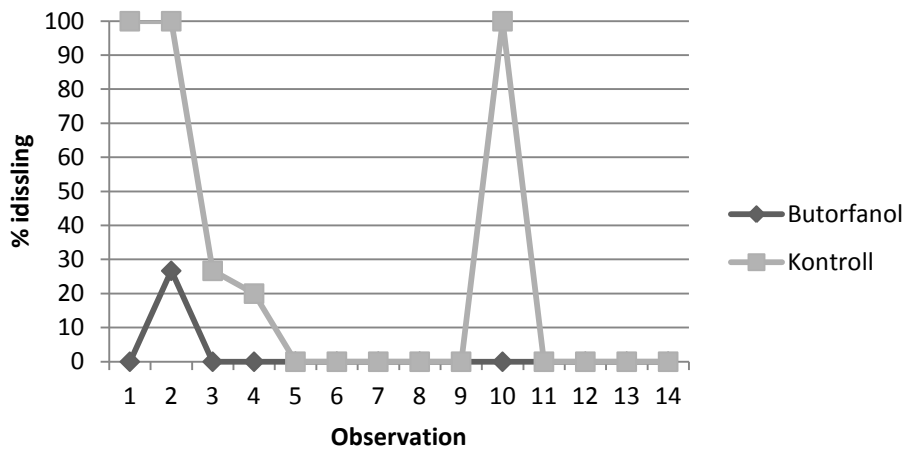
Get 5 (Sharon)



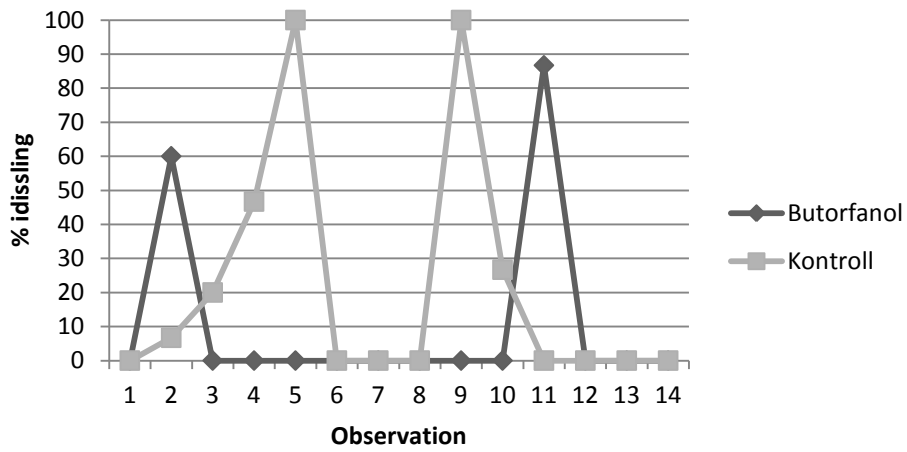
Get 6 (Passion)



Get 7 (Mango)

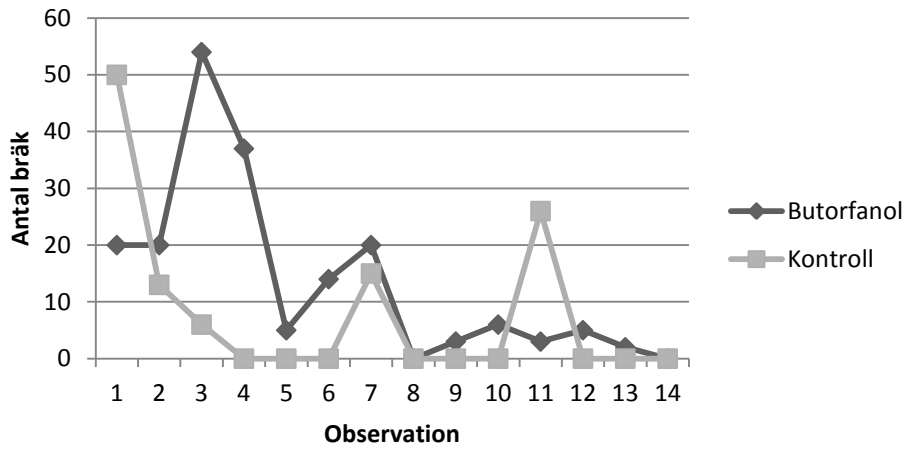


Get 8 (Plommon)

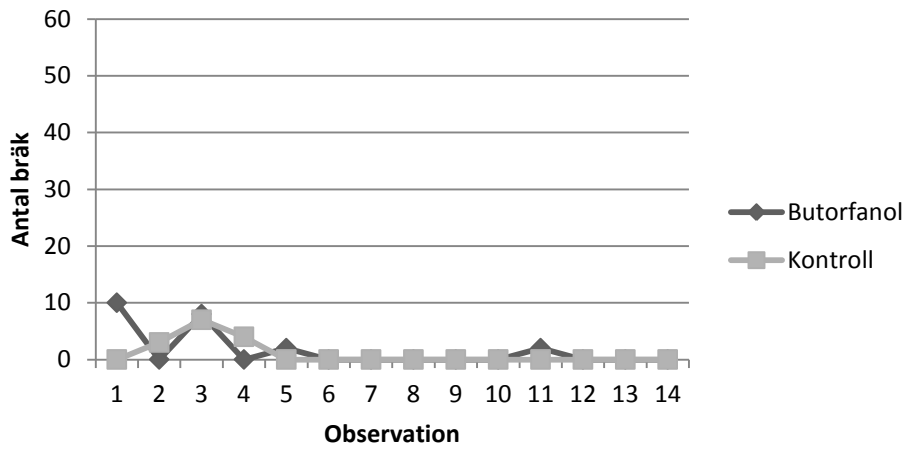


Individkurvor "Bräka"

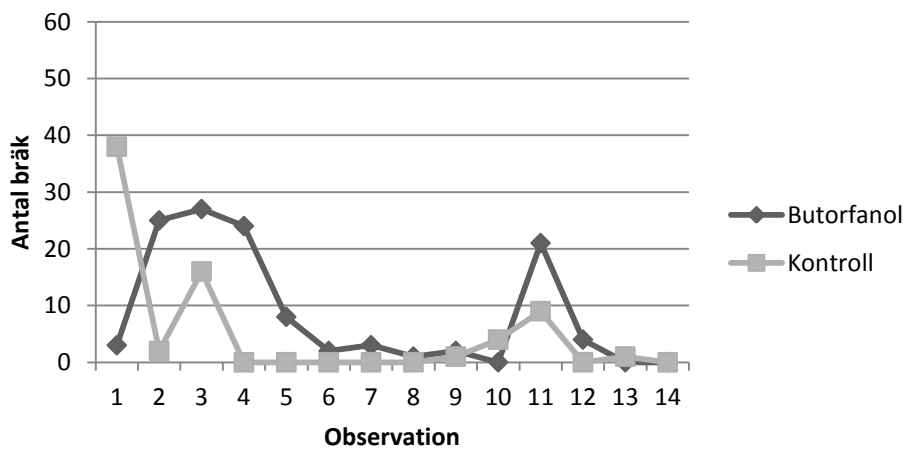
Get 1 (Kiwi)



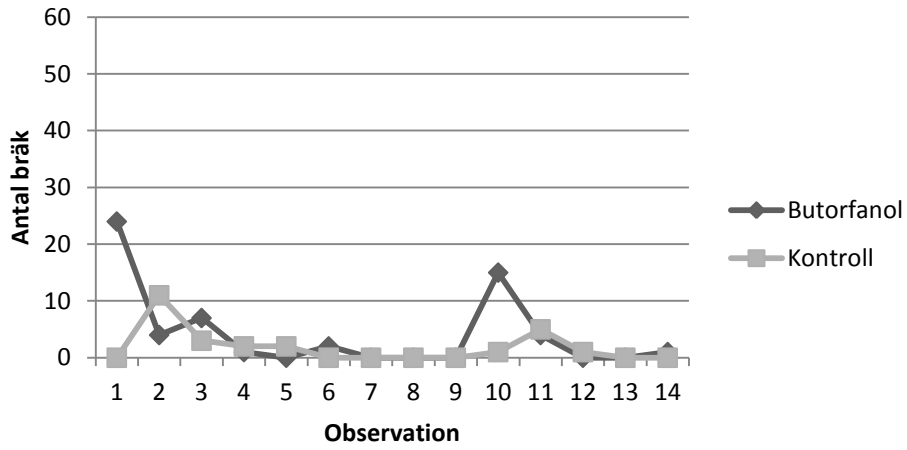
Get 2 (Guava)



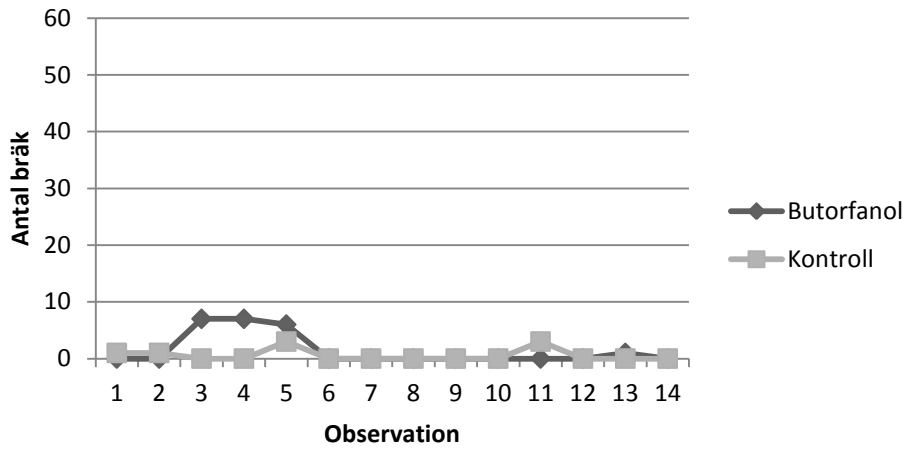
Get 3 (Druva)



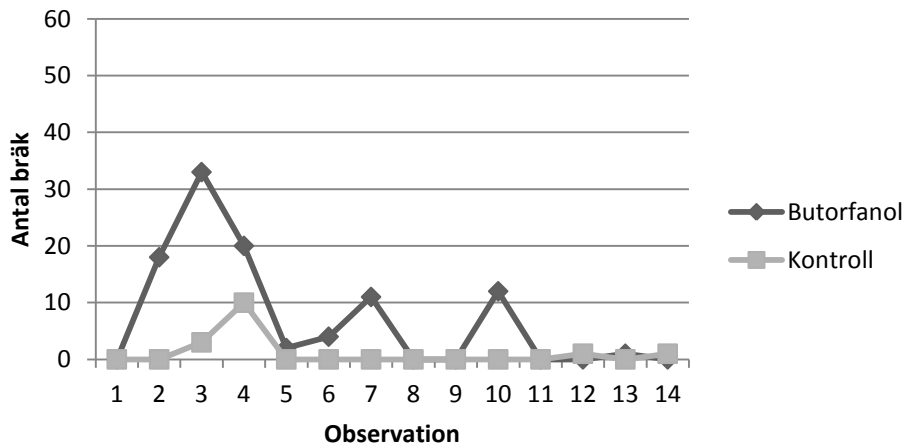
Get 4 (Persika)



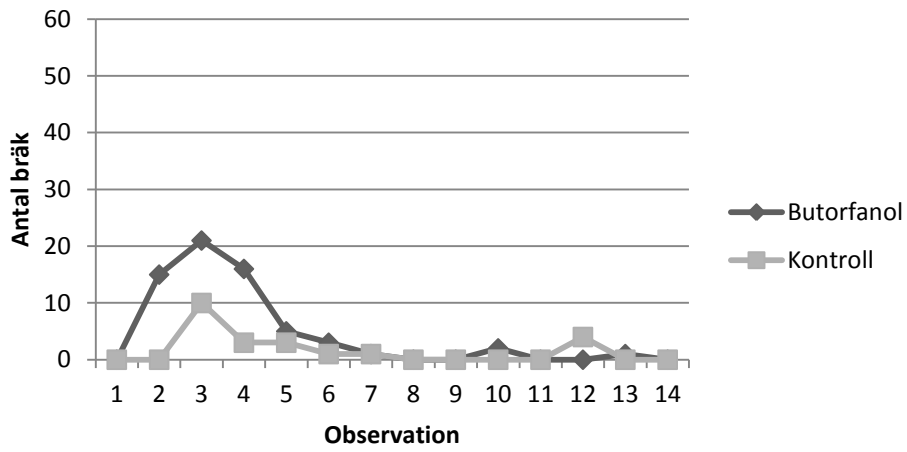
Get 5 (Sharon)



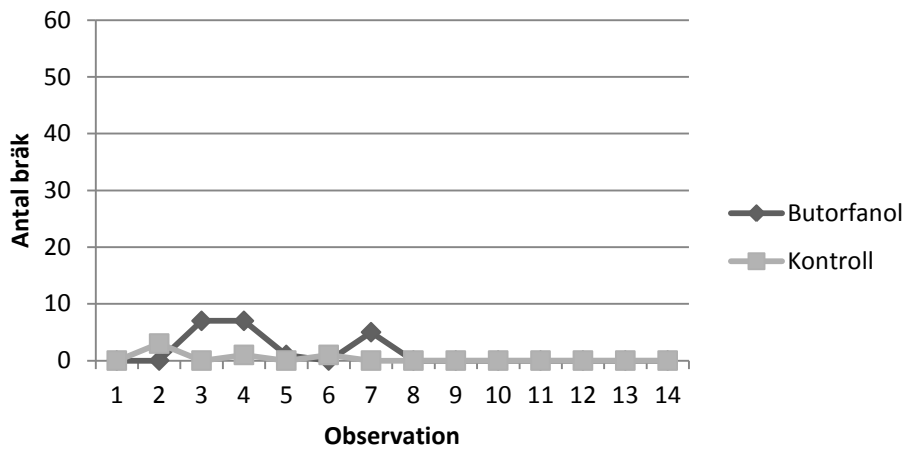
Get 6 (Passion)



Get 7 (Mango)

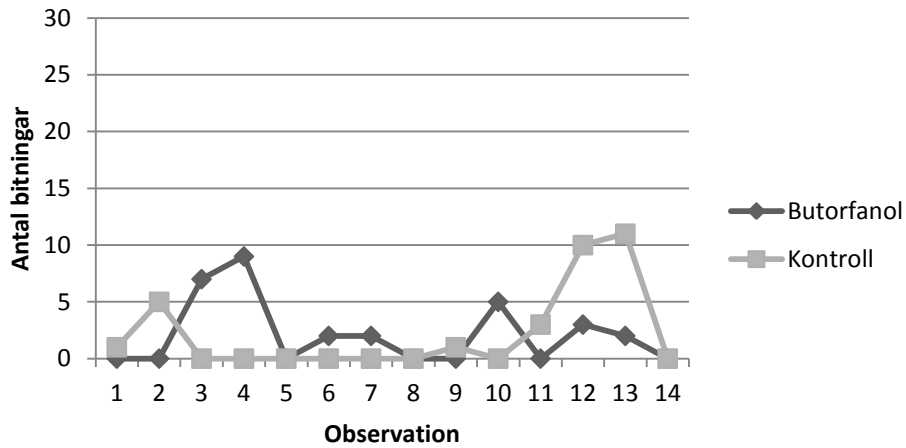


Get 8 (Plommon)

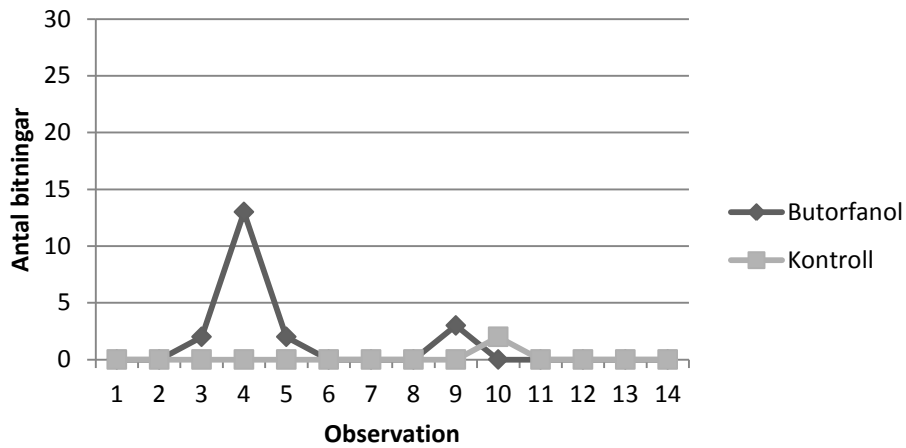


Individkurvor "Bita"

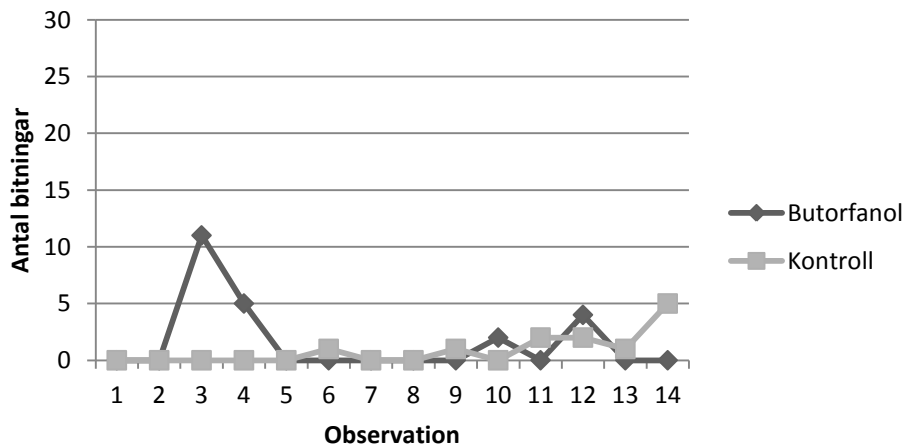
Get 1 (Kiwi)



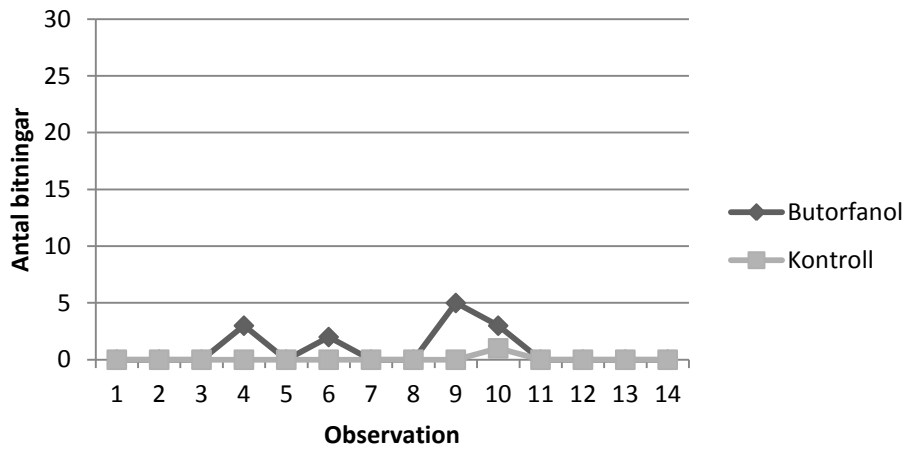
Get 2 (Guava)



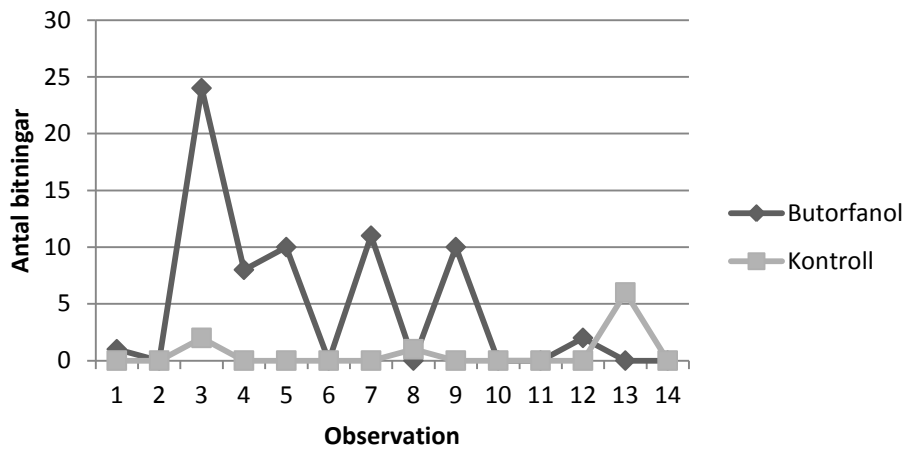
Get 3 (Druva)



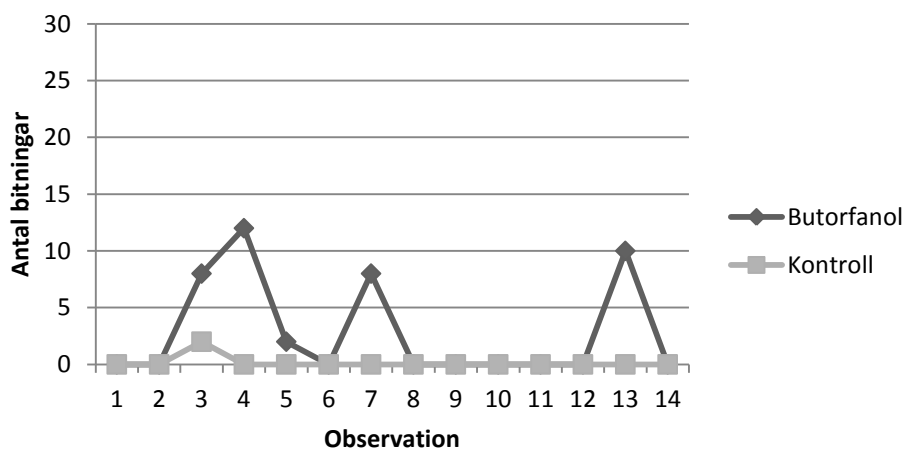
Get 4 (Persika)



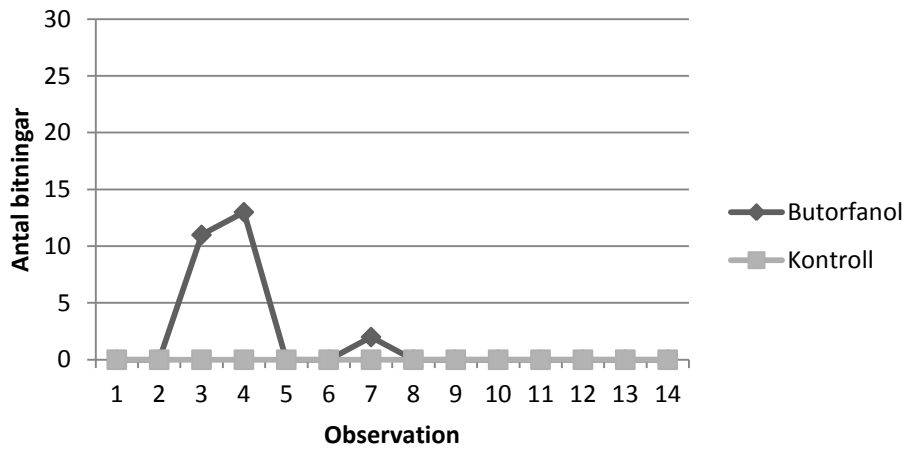
Get 5 (Sharon)



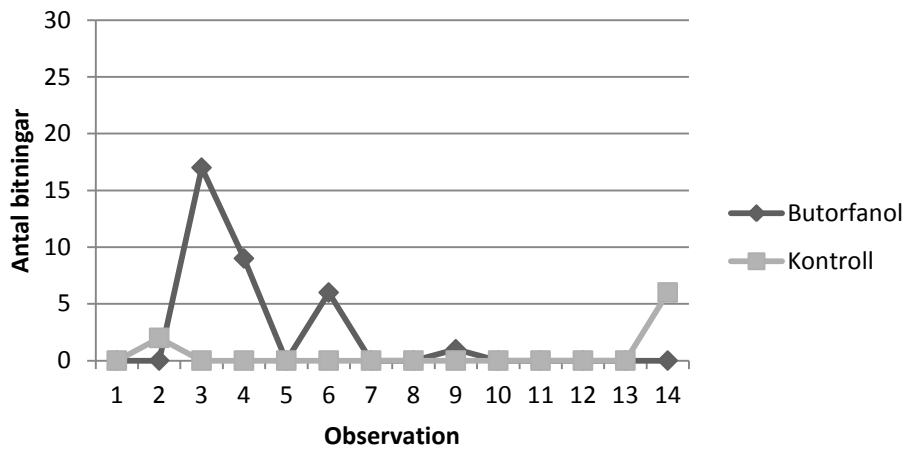
Get 6 (Passion)



Get 7 (Mango)

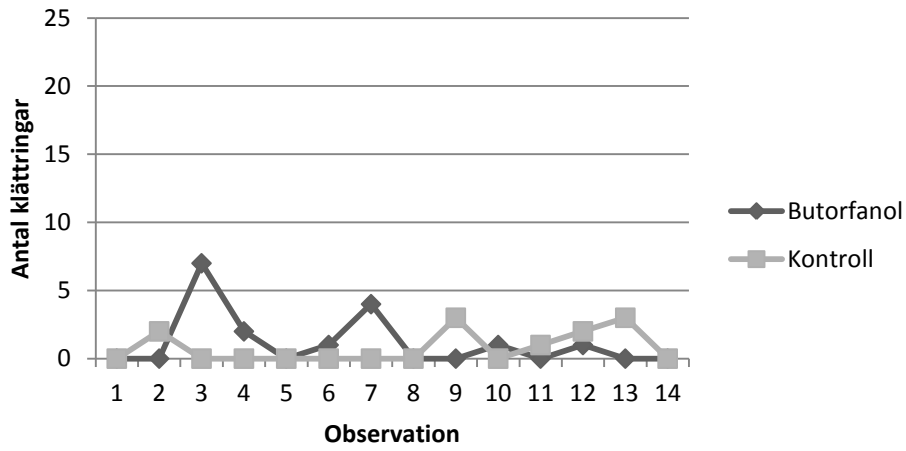


Get 8 (Plommon)

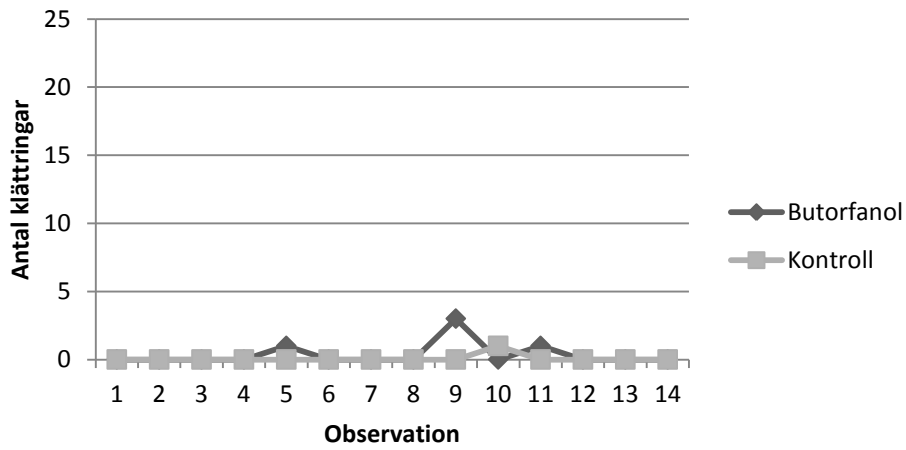


Individkurvor "Klättra"

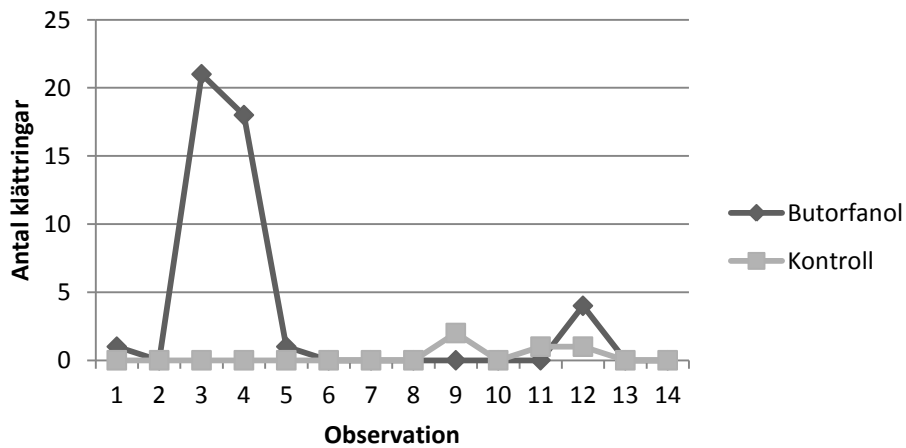
Get 1 (Kiwi)



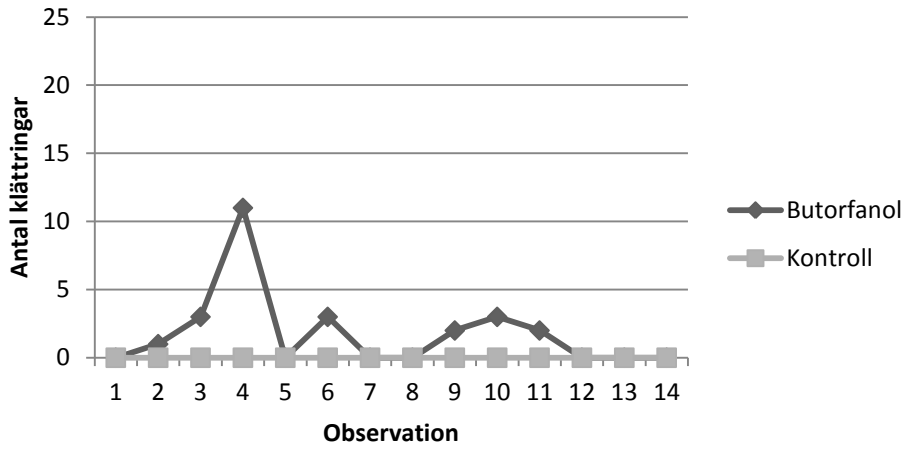
Get 2 (Guava)



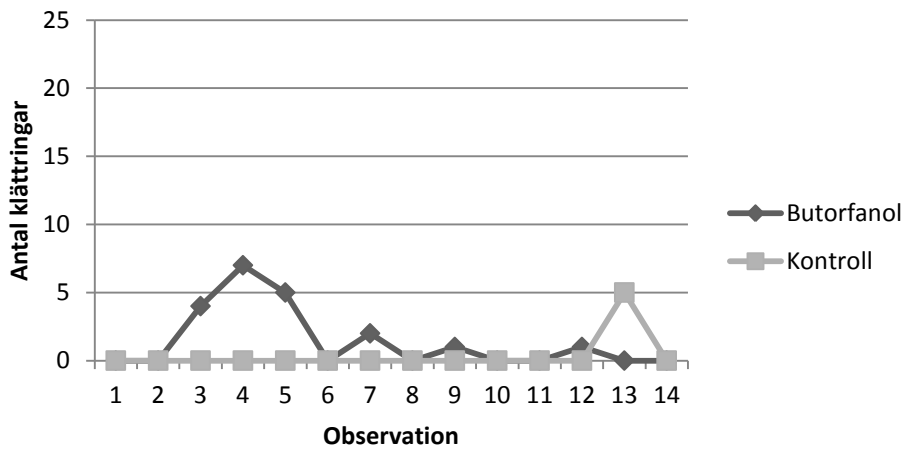
Get 3 (Druva)



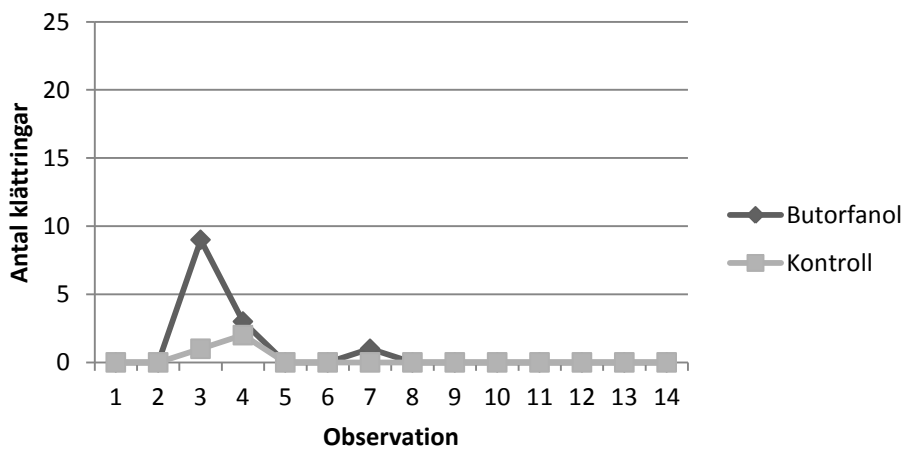
Get 4 (Persika)



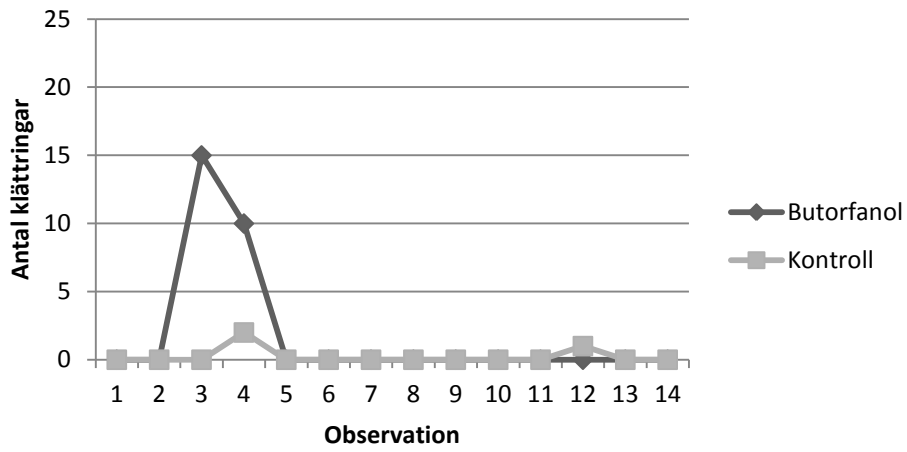
Get 5 (Sharon)



Get 6 (Passion)



Get 7 (Mango)



Get 8 (Plommon)

