



Università degli Studi di Padova

Facoltà di medicina veterinaria
Corso di laurea specialistica in Medicina Veterinaria

Tesi di Laurea

**Valutazione della risposta adattativa dei
cani ricoverati in canile sanitario**

Relatore: Dott.ssa Simona Normando
Correlatore: Dott.ssa Lieta Marinelli

Laureanda: Francesca Andreatta
Matricola: 474633/MV

Anno Accademico: 2007/2008

1.6.2) Funzioni dei glucocorticoidi.....	26
1.6.3) Variazioni del cortisolo.....	28
1.6.3.1) Variazioni del cortisolo relative al tempo di permanenza in canile.....	28
1.6.3.2) Variazioni di cortisolo relative al genere.....	30
1.6.3.3) Variazioni di cortisolo relative all'età.....	31
1.6.3.4) Modificazioni dei livelli di cortisolo non specifiche.....	32
2) SCOPO DELLA TESI	35
3) MATERIALI E METODI	37
3.1) Strutture coinvolte.....	37
3.2) Protocollo.....	39
3.3) Osservazioni comportamentali.....	39
3.4) Test Comportamentale.....	43
3.4.1) Osservazioni in box.....	43
3.4.2) Approccio al box.....	44
3.4.3) Ingresso nel box/camminare a guinzaglio.....	44
3.4.4) Socievolezza.....	45
3.4.5) Accarezzare il dorso.....	46
3.4.6) Controllo dei denti.....	46
3.4.7) Abbraccio.....	47
3.4.8) Aggressività possessiva.....	48
3.4.9) Aggressività da cibo.....	49
3.4.10) Gioco / eccitabilità / recupero.....	50
3.4.11) Reattività alla manipolazione.....	51
3.4.12) Valutazione.....	52
3.5) Cortisolo.....	52
3.5.1) Raccolta dei Campioni.....	52
3.5.2) Analisi radioimmunologica (RIA).....	54

3.5.2.1)	Adsorbimento dell'anticorpo anti-IgG di coniglio alla micropiastra (II-Ab)	56
3.5.2.2)	Incubazione con l'anticorpo specifico (I-Ab)	57
3.5.2.3)	Estrazione del cortisolo dal plasma	57
3.5.2.4)	Allestimento della curva di taratura	58
3.5.2.5)	Incubazione di campione e standard	58
3.5.2.6)	Separazione legato-libero	60
3.5.2.7)	Conteggio della radioattività ed elaborazione	60
3.6)	Analisi statistica	60
4)	RISULTATI E DISCUSSIONE	63
4.1)	Analisi del campione	63
4.2)	Analisi complessiva dei comportamenti rilevati in box	66
4.2.1)	Comportamento e classe d'età	69
4.2.2)	Comportamento e genere	71
4.3)	Analisi dei dati riguardanti lo stress	72
4.3.1)	Età e segni di stress	78
4.3.2)	Genere e comportamenti segnale di stress	82
4.3.3)	Cortisolo e segni di stress rilevati mediante behavioural focal sampling	83
4.4)	Test comportamentale	85
5)	CONCLUSIONI	87
	Bibliografia	89
	Siti consultati in internet	101
	Allegato 1	103
	Ringraziamenti	107

Abstract

Questo studio si è prefisso di valutare l'effetto di alcune caratteristiche dei soggetti sulla risposta adattativa di cani all'arrivo al canile sanitario (periodo 1) e dopo una settimana di permanenza nello stesso (periodo 2). Sono stati inclusi in questo studio 34 cani di età variabile da 2 mesi a 9 anni, 20 maschi e 14 femmine. Su questi soggetti sono state effettuate:

1. osservazioni comportamentali in *instantaneous focal animal sampling* ogni 15 secondi per 20 minuti nei giorni 2, 3, 4 (periodo 1) e 9, 10, 11 (periodo 2) dall'entrata per la valutazione globale del comportamento;
2. *behavioural sampling* sui comportamenti ritenuti indicatori di stress per 20 minuti nei giorni 2, 3, 4 (periodo 1) e 9, 10, 11 (periodo 2) dall'entrata;
3. prelievi di sangue il giorno 2 e 10 per la valutazione dei livelli di cortisolo plasmatico;
4. test comportamentale il giorno 11, per la valutazione del temperamento.

Si è riscontrato come l'età abbia un'influenza sulla percentuale di tempo in cui i cani restavano nascosti e guardavano le persone nel secondo periodo, e sulla differenza tra i due periodi di alcuni comportamenti legati allo stress come lo sbadigliare. È stato evidenziato un effetto del genere sulla modificazione di alcuni comportamenti indicatori di stress quali leccarsi le labbra e sbadigliare tra primo e secondo periodo e nel comportamento esplorativo verso le strutture durante il secondo periodo.

The aim of this study was to evaluate the effects of some characteristics of the subjects on the adaptive response of dogs entering an animal shelter (first period) and a week after their entrance at the shelter (second period). In the present study 34 dogs, 20 males

and 14 females, aged between 2 months and 9 years, were included.

The design included:

1. behavioral observations, in instantaneous focal animal sampling, every 15 seconds for 20 minutes on the 2nd, 3rd, 4th day (first period) and on the 9th, 10th, 11th day (second period) from the entrance at the shelter, in order to evaluate the dogs' overall behavior;
2. behavioral sampling on those behaviors thought to be stress' indicators for 20 minutes on the 2nd, 3rd, 4th day (first period) and on the 9th, 10th, 11th day (second period) from the entrance at the shelter;
3. blood samples to evaluate plasma cortisol levels on the 2nd and 10th day;
4. behavioral test to evaluate the dog's temperament on the 11th day.

Age was found to influence the percentage of time in which the animals were hiding from sight and were looking at people in the second period, and the difference between periods of some behaviors related to stress, such as yawning. There was a gender effect on the modification of some stress behaviors such as licking lips and yawning between first and second period and on the exploratory behavior toward structures during the second period.

Capitolo 1:

Introduzione

1.1) Il rapporto con l'uomo

Fin dall'antichità il cane è stato un importante compagno per l'uomo. Inizialmente, alla base del rapporto uomo cane c'era un fine utilitaristico, perché esso svolgeva mansioni come cane da caccia o da guardia, e ancora oggi queste sono due importanti funzioni, ma per la maggior parte delle persone il ruolo dei cani è soprattutto quello di animali da compagnia (Overall, 2001).

È stato dimostrato in diversi studi come i cani siano considerati veri e propri membri della famiglia (52%), come un compagno o un figlio (48%) (Neidhart e Boyd, 2002), o come punto di riferimento e conforto (Archer, 1996). Anche nello studio di Marston e Bennett (2003) è riportato come i cani siano considerati veri e propri membri della famiglia, visto anche l'importante supporto emotivo che danno, e come siano spesso ritenuti dei compagni, confidenti, protettori, amici con cui giocare. È stato dimostrato, inoltre, come il rapporto cane-uomo porti benefici ad entrambe le specie, alcuni facilmente intuibili come cibo, cure, affetto per il cane e compagnia, affetto, lealtà verso il proprietario, ma anche vantaggi misurabili dal punto di vista fisiologico, come ad esempio una diminuzione della reattività cardio-vascolare ad eventi stressanti ed un ridotto rischio di malattie cardio-vascolari (Friedmann e Thomas, 1995, Friedman *et al.*, 2007), inoltre secondo quanto riportato da Odendaal (2000) la presenza di un cane può dare una riduzione di pressione cardiaca, colesterolo e cortisolo, un aumento di ossitocina, fenilalanina, acido fenilacetico, β -endorfine e dopamina. Un cane, inoltre, riesce a facilitare le interazioni sociali anche tra persone: è stato dimostrato come la presenza di un cane insieme al proprietario, anche solo in foto, faccia percepire la

persona in una luce maggiormente positiva (Lockwood 1983, come citato da Marston e Bennett, 2003). Dando e ricevendo affetto, gli animali da compagnia contribuiscono alla felicità delle persone che li circondano, specialmente se si tratta di persone sole o con pochi altri con cui relazionarsi (Albert e Bulcroft, 1988), inoltre come riportato in uno studio di Serpell (1990) i proprietari di cani presentano una notevole riduzione di lievi problemi di salute.

In Italia sono circa 7 milioni i cani di proprietà (Fonte dati Eurispes 2004⁴), distribuiti in circa il 25% delle famiglie italiane. Per confrontare questi dati con quelli di altri paesi si può notare come negli Stati Uniti il 37,2% delle famiglie abbia almeno un cane (in media 1,7 per famiglia, per un totale di circa 72 milioni di cani di proprietà) (AVMA¹, 2007); in Australia il 37,8% delle famiglie (dati del 2005⁵) e nel Regno Unito il 34% delle famiglie possiede almeno un cane (Marston e Bennett, 2003).

1.2) Abbandono: ragioni e fattori di rischio

Il legame che si forma tra cane e proprietario, però, non sempre risulta essere profondo e duraturo e, in molti casi, un legame che non si forma o che si deteriora può portare all'abbandono dell'animale. Non ci sono dati accurati sul numero di cani presenti nei canili, sul numero di cani adottati, di quelli restituiti al canile dopo l'adozione e di randagi in Italia. Nel 2001 la lega nazionale per la difesa del cane aveva nei suoi canili 16.000 cani dei quali 5.000 sono stati poi adottati, l'ENPA ne aveva 11.400 e di questi ne sono stati adottati il 34% (Mondelli *et al.*, 2004). Altre fonti indicano che il numero dei randagi sia di circa 450.000, e 150.000 è il numero di cani presenti nei canili (Fonte Ministero della salute 2008³), anche se secondo la LAV questo numero è maggiore (circa 1.600.000 cani) con un numero di abbandoni di circa 150.000 cani ogni anno (stima OIPA 2006⁴). Negli Stati Uniti il numero di abbandoni è stimato all'incirca sugli 8.3 milioni di animali l'anno (Arkow, 1994 come citato da Frank 2004) di cui circa 5 milioni sono umanamente soppressi (Clancy e Rowan, 2003 come citato da Frank 2007).

Sulle ragioni che spingono un padrone ad abbandonare il proprio cane sono stati condotti moltissimi studi (ad esempio Salman *et al.*, 1998; New *et al.*, 1999; Scarlett *et al.*, 1999; New *et al.*, 2000; Salman *et al.*, 2000; Marston e Bennett, 2003 ; Shore *et al.* 2003).

Ci sono diverse ragioni citate, in questi studi, come causa di abbandono quali:

- problemi comportamentali (ad esempio iperattività, paura, rumorosità...);
- problemi di salute del proprietario;
- problemi personali del proprietario (ad esempio cambiamenti nel nucleo familiare come la nascita di un figlio)
- trasloco;
- mancanza di tempo da dedicare all'animale;
- problemi economici;
- perdita di interesse da parte del proprietario;
- presenza di troppi animali in casa
- animali vecchi, malati o con gravi problemi (specialmente di aggressività) sono abbandonati in canile per l'eutanasia.

Anche per quanto riguarda i fattori che possono aumentare il rischio di abbandono sono stati fatti diversi studi (New *et al.*, 2000; Wells e Hepper, 2000a; Kass *et al.*, 2001; Lepper *et al.*, 2002; Neidhart e Boyd, 2002; Marston e Bennet, 2003; Mondelli *et al.*, 2004; Diesel *et al.*, 2008) che hanno messo in evidenza i seguenti fattori:

- la personalità del cane è risultata essere uno dei maggiori fattori di rischio;
- la taglia dell'animale (i cani di taglia grande hanno un maggior rischio di abbandono);
- lo stato riproduttivo (se interi o sterilizzati, i cani sterilizzati presentano minor rischio di abbandono);
- il costo del cucciolo (pare che gli animali avuti ad un basso costo siano più a rischio di abbandono, mentre per quelli pagati di più, i proprietari si impegnano maggiormente e sono quindi meno a rischio di abbandono);
- presenza di problemi comportamentali e loro gravità, con un esito diverso a seconda del tipo di problema; e se il proprietario avesse ricevuto o meno dei consigli utili per affrontare la situazione (ad esempio se il proprietario è stato indirizzato verso un comportamentalista o verso un addestratore per problemi di obbedienza);
- il fatto che il proprietario sia realisticamente preparato all'impegno che comporta avere un cane per quanto riguarda responsabilità, quantità di lavoro;
- età dei cani all'adozione (i cani che all'adozione hanno più di sei mesi, soprattutto quelli di età compresa tra 1 e 2 anni, sono i più a rischio di

- abbandono);
- da quanto tempo l'animale è stato adottato, i primi 6 mesi post adozione sono quelli più delicati (è più facile che in questo periodo il cane presenti problemi di salute, o che i proprietari si rendano conto di problemi comportamentali, etc., oltre al fatto che maggiore è il tempo di permanenza presso la nuova famiglia più forte è il legame che si sviluppa tra cane e proprietario);
 - il fatto che al cane non venga fatto seguire un corso di addestramento o non venga portato dal veterinario
 - cambiamenti nella composizione della famiglia (e.g. nascita di un figlio);
 - presenza di bambini (soprattutto di età inferiore ai 13 anni);
 - presenza di altri animali (con i quali il nuovo cane potrebbe non andare d'accordo);
 - un *matching* scorretto cane-proprietario;
 - proprietari non intenzionali (cioè quelli che si sono trovati costretti a prendere con sé il cane di parenti o amici)
 - fattori economici

Si è visto come la presenza di un forte legame possa diminuire i fattori di rischio e come questo legame sia confermato, ad esempio, da dove l'animale viene fatto dormire (in casa o fuori casa; se in casa: in camera col proprietario o in un'altra stanza), dalla quantità di tempo che il proprietario passa con il suo cane, se segue o meno corsi di addestramento, se l'animale riceve o meno le appropriate cure veterinarie, se il proprietario porta o meno la foto del cane con sé, etc. (Lepper *et al.*, 2002; Neidhart e Boyd, 2002; Marston e Bennet, 2003; Diesel *et al.*, 2008).

Per tutti questi motivi, ogni anno, moltissimi animali vengono abbandonati e tenuti presso canili.

1.3) Permanenza in canile

I cani abbandonati vengono ammessi nei canili e, in Italia, la legge 281/91 ⁽²⁾ ne vieta l'eutanasia, a meno che essi non siano “gravemente malati, incurabili o di comprovata pericolosità”. Sempre questa legge pone l'obbligo alle regioni di istituire un'anagrafe canina, a cui tutti i cani di proprietà devono essere iscritti, iscrizione che viene

completata con l'applicazione di un microchip. Questo ha permesso di ridurre il numero degli abbandoni e smarrimenti, tuttavia un numero molto elevato di cani resta comunque privo di identificazione, in quanto molti proprietari non registrano il proprio cane, e per questo motivo molti degli animali che arrivano nei canili non sono riconducibili ad un proprietario e devono essere tenuti in canile fino a quando non vengono affidati ad un'altra persona (Camerini, 2008).

1.3.1) Principali problemi: costo del mantenimento in canile

Proprio per il divieto di sopprimere gli animali, ogni anno il numero di animali che vivono in canile aumenta e le adozioni non riescono a controbilanciare la situazione (Mondelli *et al.*, 2004). Dal momento dell'arrivo in canile all'adozione solitamente trascorrono dei periodi di tempo molto lunghi che possono andare da diversi mesi a diversi anni. Quindi, i costi di mantenimento degli animali sono un problema gravoso per le amministrazioni comunali dove si trovano i canili rifugio; le lunghe permanenze, inoltre, risultano essere un problema per quanto riguarda il benessere animale oltre che un problema etico (Normando *et al.*, 2006).

I costi variano a seconda del tipo di convenzione presente tra canili e comuni, a seconda di chi gestisce i canili, etc. In Lazio, ad esempio, il costo, in media, secondo le stime dell'Ufficio Tutela Animali dell'Assessorato Agricoltura e Ambiente della Provincia di Roma è di 2.50€ al giorno per cane (e questa cifra pare comunque non consentire un adeguato mantenimento degli animali) (Felicetti, 2005). In Lombardia i costi sono in media di 12.500€ per comune per anno. Frank, in uno studio del 2007 riguardante la sovrappopolazione, riporta come negli Stati Uniti si spenda circa un miliardo di dollari l'anno per la cura degli animali abbandonati, oltre al fatto che circa 5 milioni di cani e gatti vengono soppressi ogni anno nei canili. In un altro studio del 2004, Frank analizza le possibili soluzioni al problema e, tra le varie metodiche analizzate, le più efficaci risultano essere un aumento del tasso di sterilizzazione (almeno del 47%), un aumento del numero di adozioni (sia aumentando il target di persone che vanno ad adottare i cani, sia diminuendo le fonti diverse dal canile), creare dei programmi di educazione dei cittadini a non abbandonare i cani e ad adottare i cani dal canile e l'ipotesi di una tassa per quegli animali non presi al canile. Risultati simili per evitare una crescita eccessiva della popolazione di cani sono stati ottenuti anche da uno studio riguardante i cani di

proprietà in centro Italia, dove si calcolava la necessità di avere un tasso di sterilizzazione del 55% per fermare la crescita del numero di cani (Di Nardo *et al.*, 2007).

È di primaria importanza per ridurre i costi, aumentare il tasso di adozioni, tentare di ridurre il periodo di permanenza degli animali in canile, ridurre il numero degli animali resi al canile dopo l'adozione per la comparsa di problemi. La permanenza in canile, infatti, può essere la causa della comparsa di problemi comportamentali, quali ansia da separazione (Hennessy *et al.*, 1997), ma possono insorgere dei problemi dopo l'adozione anche per un matching scorretto cane-proprietario (Marston e Bennet, 2003; Shore, 2005)

1.3.2) Principali problemi: il benessere degli animali

Un altro problema, di pari importanza rispetto all'aspetto economico dei costi di gestione dei canili, è quello, più a carattere etico, del benessere degli animali che si trovano a dover vivere presso queste strutture. L'ambiente del canile è per gli animali molto stressante: li attende una routine completamente diversa rispetto a quella alla quale erano abituati, l'ambiente è nuovo e rumoroso e, in generale, gli animali in canile non riescono ad avere nessun controllo sull'ambiente in cui si trovano a vivere, oltre al fatto che hanno appena subito un trauma come l'abbandono (Hennessy *et al.*, 1998).

1.3.2.1) Definizioni di stress e benessere

Il benessere animale è un argomento ampiamente dibattuto, soprattutto per quanto riguarda la sua definizione e le modalità di valutazione. Tra le diverse definizioni di benessere ricordiamo “la possibilità di vivere in armonia con l'ambiente e con se stessi, sia fisicamente che psicologicamente” (Lorz, 1973 come citato da Bracke *et al.*, 1999), essere in completa armonia con l'ambiente (Hughes, 1976, come citato da Bracke *et al.*, 1999), “grado di adattamento senza sofferenza ad un ambiente modellato dall'uomo” (Carpenter, 1980, come citato da Bono G., 2000), il benessere riguarda lo stato emotivo dell'animale, ciò che vuole, i suoi sentimenti e l'assenza di sofferenza (Dawkins, 1980, come citato da Bracke *et al.*, 1999), controllabilità e predittibilità (Wiepkema, 1982, come citato da Bracke *et al.*, 1999), “appagamento dai bisogni” (Curtis 1987, come citato da Bono G., 2000) “lo stato raggiunto nel tentativo di adattarsi all'ambiente. Il

grado di benessere coincide con il grado di successo ottenuto nel superare le condizioni difficili” (Broom, 1996 come citato da Bono G., 2000). Secondo Bracke e coautori (1999), lo stato di benessere dell’animale dipende dalla sua biologia e da come l’animale stesso valuta il proprio benessere; il benessere è una caratteristica propria dell’animale, non dell’ambiente in cui esso vive. Secondo Mormède e coautori (2007) “il benessere si riferisce soprattutto allo stato psicologico dell’individuo in relazione all’ambiente interno ed esterno”.

Un termine strettamente legato a quello di benessere è quello di stress: concetto introdotto da Seyle che lo definisce come una risposta aspecifica del corpo a cambiamenti esterni, quali agenti patogeni o difficili condizioni di vita (eg. caldo, freddo...), per ritornare ad una condizione di normalità; anche il benessere, come già accennato precedentemente, è stato spiegato varie volte in relazione all’adattamento all’ambiente (Seyle, 1973, come citato da Mormède *et al.* 2007). Altre definizioni date dallo stesso Seyle allo stress sono “esposizione ad un ambiente avverso”, ma anche “stimolo che promuove l’attività adrenocorticale” o semplicemente “stimolo che perturba l’omeostasi” (come citato da Bono G., 2000). Secondo Banks (1982, come citato da Bono G., 2000) lo stress è “un massivo disturbo fisiologico e comportamentale indotto da fattori nocivi” e sempre secondo Mormède e collaboratori (2007) si tratta di un “termine molto generale, usato per descrivere fattori ambientali che sollecitano dei meccanismi adattativi e la risposta a questi stimoli”. Mason (1971, come citato da Mormède *et al.*, 2007) in uno studio conclude che lo stress non dipende tanto dalla situazione in sé, ma da come essa è percepita dall’animale, e altri autori fanno dipendere il benessere dallo stato emotivo o mentale degli animali coinvolti (eg. Dawkins, 1980, come citato da Dawkins, 1998)

Dawkins (2003) riflette su come sia soprattutto la valutazione del benessere negli animali a creare delle difficoltà, in quanto non esiste una singola misura possibile, nessun test certo, nessuna assicurazione che quanto si fa, in nome del benessere degli animali, sia effettivamente considerato tale dal loro punto di vista. Sebbene ci sia un generale consenso sul fatto che si tratta di un problema complesso e che abbisogna di più parametri per essere definito, manca un accordo su quali siano effettivamente le rilevazioni più appropriate da svolgere. Sempre secondo l’autrice (2003 e 2006) è importante concentrarsi su due aspetti principali, cioè la salute dell’animale e che cosa può volere l’animale stesso e ci si deve basare sui dati riguardanti la salute dell’animale, i parametri fisiologici e i dati comportamentali.

Secondo Broom (1991), essendoci molti modi per adattarsi all'ambiente, ci sono diversi parametri da tenere in considerazione e da misurare; il fatto che uno di questi possa risultare normale, non prova il fatto che l'animale si trovi in uno stato di benessere.

Alcuni degli indicatori di scarso benessere sottolineati da questo autore sono:

- difficoltà/impossibilità di adattarsi;
- ridotta aspettativa di vita;
- ridotta capacità di apprendimento;
- presenza di danni o ferite;
- malattie;
- uno stato di immunosoppressione;
- attività surrenalica aumentata (cortisolo);
- alterazioni del comportamento.

È importante in una valutazione del benessere animale, andare ad integrare i dati comportamentali con quelli fisiologici, quali la cortisolemia (o il dosaggio di cortisolo in saliva, urine o feci), per avere un quadro più completo della situazione dell'animale.

1.3.2.2) Stress e comportamento nei cani in canile in relazione al tempo di permanenza e alle condizioni di stabulazione

Nei cani ci sono diversi studi che riguardano lo stress e i possibili parametri di misurazione: ad esempio Beerda e coautori (1997) in uno studio su come misurare lo stress acuto e cronico negli animali individuano alcuni comportamenti segnale di stress (leccarsi le labbra, sollevare la zampa, postura bassa, aumento nelle vocalizzazioni) e altri, provocati da uno stimolo di maggiore intensità, quali aumentata salivazione, *panting*, ridotta produzione di urina e comparsa di stereotipie. Per quanto riguarda i parametri fisiologici sono stati studiati soprattutto quelli riguardanti l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, con produzione di cortisolo da parte della corticale surrenale, e il sistema nervoso autonomo simpatico, che stimola la midollare del surrene con produzione di catecolamine, antidiuresi e alterazioni a livello di sistema cardiovascolare.

In un altro studio di Beerda e collaboratori (1998) sullo stress acuto veniva usato un insieme di parametri fisiologici e comportamentali, quali frequenza cardiaca, cortisolo salivare e comportamento, per avere un dato più attendibile sulle reazioni degli animali. Gli animali in questo studio venivano sottoposti a sei prove, tre in presenza di un

operatore (nella prima il cane veniva forzato a terra e tenuto in posizione distesa per 20 secondi dall'operatore, nella seconda prova l'animale veniva forzatamente messo a terra tramite una corda, nella terza l'operatore puntava un ombrello verso il cane e poi lo apriva) e tre prove con il cane lasciato solo nella stanza (nella prima veniva lasciata cadere una borsa di plastica piena di carta dal soffitto, nella seconda c'era un suono improvviso di 110-120 dB di intensità, e nell'ultima era somministrato al cane uno shock di durata di uno o due secondi). Si è notato come le prove che coinvolgevano la presenza di un operatore e che consistevano in situazioni che l'animale poteva anticipare davano come comportamenti nell'animale bassa postura (arti flessi, coda tra le gambe), inquietudine, tremori e un aumento di comportamenti come leccarsi le labbra e il naso. Nel corso di stressor intensi, improvvisi, non prevedibili i cani assumevano posture molto basse, i livelli di cortisolo risultavano molto elevati. Non c'era segno invece di comportamenti come leccarsi le labbra. Gli autori lo spiegavano con il fatto che si trattava di comportamenti che venivano eseguiti in contesti sociali, cioè in quelle prove in cui c'era la presenza di un operatore, e non quando gli animali erano lasciati da soli. Per quanto riguarda la frequenza cardiaca, si era notato un suo generico aumento indipendentemente dal tipo di stimolo somministrato, anche quando erano semplicemente avvicinati dall'operatore, prima di iniziare la prova. Gli autori suggerivano di considerare questo parametro come risposta generica ad un evento potenzialmente significativo, sia positivo che negativo.

È indubbio che l'arrivo in canile possa rappresentare uno stressor per il cane. Infatti, per quanto un canile sia gestito in maniera ottimale, è comunque completamente diverso rispetto alla precedente vita dell'animale, che si suppone si sia svolta presso una famiglia; inoltre il cane arrivato in canile ha subito la perdita delle figure affettive di riferimento, probabilmente ha vissuto dei momenti come cane randagio prima della cattura e una volta arrivato in canile deve riuscire ad adattarsi ad una routine completamente diversa da quella a cui era precedentemente abituato, su cui non ha alcun controllo e molto spesso con minime possibilità di socializzazione (sia con i conspecifici che con le persone) (Hennessy *et al.*, 2001).

In particolare, è stata sottolineata in diversi studi (Hennessy *et al.*, 1997; Beerda *et al.*, 1999; Marston e Bennett, 2003; Coppola *et al.*, 2006) la presenza di diversi elementi fonte di stress nell'ambiente del canile quali:

- un alto livello di rumore;
- la continua esposizione ad elementi nuovi;

- isolamento/separazione dalle figure di attaccamento;
- confinamento prolungato (in spazi ristretti e mancanza di esercizio);
- una ridotta interazione con conspecifici e persone;
- l'alterazione della routine giornaliera (nessuno studio ha mai trattato approfonditamente gli effetti dell'alterata routine, ma si suppone sia fonte di stress per l'animale).

Questi fattori sono causa di stress per gli animali, con risultati particolarmente gravi se questo avviene in un periodo sensibile (cuccioli) (Marston e Bennet, 2003).

Dal punto di vista comportamentale, fattori ereditari, ma anche età ed esperienza, influenzano la risposta ad un ambiente o ad esperienze stressanti; in generale pare che lo stress causi un aumento della vocalizzazione, dei comportamenti associati a paura e sottomissione (e.g. postura bassa), un aumento di salivazione, panting, e antidiuresi. Inoltre gli animali possono sviluppare anche stereotipie, soprattutto nei cani stabulati singolarmente (Beerda *et al.*, 1997).

Non sono molti gli studi condotti nelle primissime settimane dall'ingresso al canile (ad esempio Hennessy *et al.*, 1997, sul cortisolo plasmatico, Stephen e Ledger, 2005, sui comportamenti ritenuti indicatori di stress, Stephen e Ledger, 2006, sul cortisolo urinario e Hiby *et al.*, 2006, su risposte comportamentali e fisiologiche di cani all'ingresso in canile).

Lo studio di Hennessy e coautori sottolineava una diminuzione dei livelli di cortisolo dopo il terzo giorno dall'ingresso, al contrario Stephen e Ledger trovavano una certa variabilità, in alcuni cani il cortisolo scendeva, ma in altri aumentava in maniera costante fino ad oltre il decimo giorno. Nello studio di Hiby e collaboratori, gli autori avevano notato come l'aumento del cortisolo fosse tipico dei cani che entravano nel canile per la prima volta, mentre per i randagi e gli animali che avevano avuto precedenti esperienze in canile il cortisolo scendesse dopo i primi giorni di permanenza. Stephen e Ledger (2005) hanno analizzato l'evoluzione dei comportamenti indicatori di stress dall'ingresso al canile, per le prime 6 settimane, osservando soprattutto vocalizzazioni eccessive e apatia. Inizialmente erano più frequenti comportamenti associati ad ansia e paura (quali tentativi di fuga, nascondersi e mancanza di appetito), in seguito insorgevano anche comportamenti associati a noia e frustrazione (ad esempio camminare in cerchio o saltare ripetutamente sulle pareti del box).

In uno studio più a lungo termine (Stephen *et al.* 2002), condotto presso otto diversi canili inglesi, si era osservato come tutti i cani esaminati mostrassero segni di stress.

Inizialmente, nelle prime due settimane, i comportamenti più frequenti erano abbaiare, camminare in circolo e saltare; col passare del tempo, tra ottava e dodicesima settimana, aumentavano *panting* (ansimare), vocalizzazioni e camminare in circolo. Questo studio dimostrava come gli animali sentissero lo stress dovuto alle condizioni di stabulazione e all'ambiente del canile sia nel periodo immediatamente successivo all'ingresso (durante le prime due settimane), che successivamente (tra la decima e la dodicesima settimana di permanenza in canile).

Secondo lo studio di Wells e Hepper (1992) la maggior parte dei cani stabulati in un ambiente privo di stimoli, passava la maggior parte del tempo inattiva, riposando (molto poco effettivamente dormendo, ma probabilmente questo era dovuto all'elevato livello di rumorosità della struttura). Inoltre con questo articolo gli autori si erano riproposti di controllare le risposte dei cani in diversi giorni dall'ingresso in canile (1, 3, 5) a diversi stimoli: cibo, presenza di una persona all'esterno della gabbia e di un gioco nel box. Una bassissima percentuale di cani andava ad interagire con il gioco (probabilmente perché il loro livello di stress era troppo elevato), reagivano alla presenza della persona che li osservava dall'esterno del box, comportandosi dapprima in maniera molto agitata, ma col passare del tempo in maniera più calma e rilassata (ciò fa pensare ad una abitudine all'ambiente del canile o alla persona che li osservava) e, per quanto riguarda il cibo, con il passare del tempo andavano a mangiare più velocemente e con sempre minor esitazione.

Wells, Graham e Hepper (2002) hanno studiato come il tempo di permanenza in canile andasse a influenzare il comportamento del cane, considerando cani entrati da meno di un mese, da meno di un anno, da 1 a 5 anni e da più di 5 anni. È risultato che i cani in canile da molto tempo, soprattutto quelli da più di 5 anni, avevano un minor livello di attività, passavano minor tempo nella parte frontale della gabbia, rimanendo visibili per minor tempo, e comunque interagivano molto poco con i visitatori. Con l'aumentare del tempo trascorso in canile i cani sembravano perdere interesse verso l'ambiente esterno, con un aumento di comportamenti sedentari e prolungati periodi di riposo che potevano riflettere uno stadio di noia o apatia, ma anche uno stato di "learned helplessness", cioè una forma di apatia dovuta alla mancanza di controllo che avevano sull'ambiente.

È importante evitare che questo accada perché minore è il tempo che gli animali sono visibili e interagiscono con i visitatori, minori sono le speranze per questi animali di essere adottati. Infatti, uno studio (Wells e Hepper, 2000b) ha dimostrato come le persone siano più interessate a cani che passino più tempo visibili, che siano calmi,

invece di abbaiare, attenti e tenuti in un ambiente complesso, invece che in una gabbia spoglia e priva di qualsiasi comfort.

Le condizioni di stabulazione, infatti, sembrano avere un effetto rilevante sul comportamento dei cani presenti in canile.

Beerda e coautori (1999) hanno esaminato le risposte comportamentali allo stress confrontando le diverse reazioni di cani stabulati all'aperto e in gruppo o all'interno e singolarmente. Il comportamento degli animali stabulati singolarmente denotava delle differenze rispetto agli animali in gruppo quali un aumento di auto-grooming, posture basse, stare seduti, sollevare una zampa, vocalizzare, camminare in circolo e mangiare le feci. I cani di questo studio erano anche sottoposti ad una serie di otto test, in cui il cane:

1. veniva introdotto in un ambiente nuovo;
2. gli veniva data la possibilità di scappare e di esplorare l'area all'esterno;
3. veniva costretto a terra per 20 secondi;
4. veniva fatto camminare in un corridoio nuovo;
5. gli veniva presentato un oggetto nuovo;
6. veniva esposto ad un rumore improvviso;
7. gli veniva dato del cibo;
8. veniva messo a contatto con un cane sconosciuto.

I risultati delle diverse prove evidenziavano come i cani stabulati singolarmente avessero ottenuto dei risultati peggiori rispetto ai cani stabulati in gruppo, essendosi questi dimostrati più incerti e aggressivi. Si deduce che sarebbe meglio per gli animali essere stabulati insieme, ma per evitare la trasmissione di malattie o problemi di aggressività, nella maggior parte dei canili gli animali sono stabulati singolarmente (Wells e Hepper, 1998).

1.3.2.3) Arricchimento ambientale

Per migliorare il benessere degli animali è importante riuscire a creare un ambiente che sia il migliore possibile per i cani stabulati in un canile, pur disponendo di risorse limitate. Molti studi hanno trattato il problema dell'arricchimento ambientale per migliorare le condizioni di vita e il benessere dei cani di canile (Hetts *et al.*, 1992; Hubrecht *et al.*, 1992; Wells e Hepper, 1992, Hubrecht, 1993; Hennessy *et al.*, 1997; Hennessy *et al.*, 1998; Loveridge, 1998; Wells e Hepper, 1998; Tuber *et al.*, 1999;

Wells e Hepper, 2000b; Gacsi *et al.*, 2001; Hennessy *et al.*, 2002a; Hennessy *et al.*, 2002b; Valsecchi *et al.*, 2002; Wells, 2004a; 2004b Graham *et al.*, 2005; Tod *et al.*, 2005, Barbero *et al.*, 2006; Coppola *et al.*, 2006; Hennessy *et al.*, 2006; Luescher *et al.*, 2007; Valsecchi *et al.*, 2007; Schipper *et al.*, 2008).

Ad esempio Wells e Hepper (2000b) hanno valutato le reazioni dei cani a cambiamenti nella routine (aumentato contatto con le persone) e nella loro gabbia (spostando la cuccia dalla parte non visibile alla parte più frontale, mettendo dei giochi nella gabbia). Si era visto come un maggior contatto con le persone portasse il cane ad essere più attivo, più presente nella parte visibile della gabbia, anche se aumentava lievemente il tempo che il cane trascorrevva abbaiando. Lo spostamento della cuccia aumentava il tempo trascorso nella parte frontale, senza avere un significativo effetto sull'attività, né sul tempo trascorso ad abbaiare. L'aggiunta di un gioco nella gabbia si era rivelata importante in quanto aveva un effetto positivo sulle adozioni, mentre non aveva degli effetti significativi sui cani, in quanto la maggior parte dei soggetti ignorava completamente il gioco. L'effetto positivo sul numero di adozioni poteva essere dovuto al fatto che le persone vedevano più come animali da compagnia che animali non voluti quei cani con dei giochi all'interno del proprio box.

Hennessy e collaboratori (1998) hanno indagato l'effetto del contatto umano sui livelli di cortisolo e sul comportamento dei cani che vivevano in canile: una semplice sessione di 20 minuti in cui una persona accarezzava il cane e gli parlava dolcemente poteva ridurre i livelli plasmatici di cortisolo dovuti a situazioni spiacevoli quali prelievi di sangue o visite mediche. In uno studio di Luescher e collaboratori (2007) venivano sperimentate sia forme di arricchimento ambientale che di addestramento, insegnando ai cani i comandi più semplici come camminare a guinzaglio in maniera adeguata, stare seduti e venire quando chiamati, aggiungendo giochi e coperte, bocconcini che i visitatori potevano dare ai cani nei box, aggiunta di piante nella struttura e fogli colorati con le descrizioni degli animali sulle gabbie. Si era visto come, rispetto al controllo, nei gruppi con arricchimento ambientale e sociale le adozioni fossero più numerose. In uno studio in due canili italiani (Valsecchi *et al.*, 2002) veniva messa a confronto la gestione degli animali: in uno dei canili i cani non venivano mai portati fuori dal box, nell'altro erano fatti uscire e interagire con i volontari; si era visto come i cani del secondo canile fossero più sicuri nei confronti delle persone nuove, più disponibili al gioco, e più portati a imparare i comandi di base.

In conclusione, per quanto riguarda l'arricchimento ambientale e sociale, questo

dipende dalle risorse del canile (soprattutto fondi e volontari), il tipo più efficace è la stimolazione sociale, ma anche dei semplici metodi di arricchimento ambientale possono aumentare le speranze di adozione di animali in canile.

1.3.3) Test comportamentali

Come già accennato, i problemi comportamentali sono la principale causa di abbandono dei cani (Salman *et al.*, 2000). Nella gestione di un canile è importante aumentare il numero delle adozioni, ma è fondamentale avere dei mezzi per evitare che vengano dati in adozione cani non adatti, o che possano costituire un rischio, per la famiglia che adotta l'animale (Segurson *et al.*, 2005). Tra gli obiettivi dei canili non c'è solo il benessere animale, ma anche la pubblica sicurezza e proprio per questo motivo è importante avere un metodo per stabilire quali cani possano essere dati in adozione senza alcuna riserva. Per questo molti canili usano dei test comportamentali; esistono molti test tra cui scegliere (come ad esempio van der Borg *et al.*, 1991; Netto e Planta, 1997; Lucidi *et al.*, 2005; Bollen e Horowitz, 2007; Sternberg, 2003, come citato da Christensen *et al.*, 2007), pubblicati o resi noti tramite conferenze o comunicazioni personali (Christensen *et al.*, 2007). La maggior parte dei test si è concentrata sul problema dell'aggressività, ma per i canili sarebbe interessante riuscire a valutare sia le caratteristiche negative che quelle positive dei cani (Sternberg, 2002, come citato da Taylor e Mills, 2006). Un test comportamentale dovrebbe stabilire quindi, non solo quali cani sia sicuro affidare ad una nuova famiglia, ma anche quali siano i più facilmente adottabili (Marston e Bennet, 2003). Infatti i test comportamentali possono aiutare a migliorare il matching adottante-cane, riducendo le restituzioni al canile dovute ad un'adozione di animali che risultino non essere adeguati allo stile di vita dei proprietari (van der Borg *et al.*, 1991).

Molti canili, a questo scopo, usano dei test comportamentali condotti dal personale che lavora presso il canile. La maggior parte di questi test, però, non risulta validata e quindi non è certo se il risultato del test sia attendibile. L'importanza dell'accuratezza e validità dei test è un aspetto fondamentale in quanto i risultati possono avere una conseguenza diretta sui cani che potrebbero, a causa di un risultato negativo, essere esclusi dalle adozioni o, soprattutto in altri paesi, soppressi, e possono determinare conseguenze anche sulle persone nel caso in cui adottino cani che, pur avendo superato un test comportamentale, si dimostrano aggressivi. Anche quei pochi test che sono stati

validati (fino al 2006 erano meno di dieci i test comportamentali pubblicati su una rivista scientifica, secondo quanto riportato da Taylor e coautori) risultano essere troppo lunghi per essere usati in un canile: ad esempio il test sviluppato da van der Borg e collaboratori (1991) dava dei risultati che per accuratezza superavano di gran lunga le valutazioni fatte dal personale del canile, tuttavia il tempo richiesto per sottoporre ciascun cane al test era di circa un'ora e mezza, e questo rendeva il test inutilizzabile per la maggior parte dei canili (Martson e Bennett, 2003)

Un altro problema dei test comportamentali svolti presso i canili è che il comportamento viene testato in un ambiente nuovo e stressante, in maniera rapida, quindi alcuni problemi possono non emergere dal test e risultare evidenti solo quando il cane si è abituato alla nuova famiglia (Segurson *et al.*, 2005; Christensen *et al.*, 2007).

In ogni caso, i test comportamentali risultano essere un valido mezzo, specialmente se abbinati al parere del personale del canile e ai commenti degli ex-proprietari, nel valutare i cani aggressivi (Christensen *et al.*, 2007). Ad esempio, nello studio di Bollen e Horowitz (2007) si era visto come l'introduzione di un test comportamentale avesse ridotto la percentuale di cani restituiti al canile dal 19% al 14%, e le restituzioni dovute a problemi di aggressività dal 5% al 3.5%, con una riduzione significativa degli incidenti gravi causati da cani aggressivi. In questo studio i cani risultati aggressivi non venivano resi disponibili per l'adozione, quelli che passavano il test ma risultavano "poco socievoli" risultavano poi essere associati a problemi comportamentali, diversi dall'aggressività, nel *follow-up* a 6 mesi dall'adozione e quei cani che superavano il test ma erano "borderline" risultavano essere associati a problemi di aggressività e per questo, solitamente, venivano restituiti al canile. Secondo gli autori le informazioni più accurate e predittive si ottenevano unendo l'anamnesi del cane ai risultati del test, ma, in mancanza di un'anamnesi, la valutazione comportamentale era certamente utile nello screening per l'aggressività.

Sarebbe importante poter avere dei test rapidi, facili da eseguire e correlati a quelle situazioni che il cane può incontrare vivendo presso una famiglia e che questi test venissero validati per poter avere un mezzo sicuro da cui ricavare un profilo accurato dei cani presenti in canile e quindi migliorare ulteriormente il *matching* cane-proprietario (Marston e Bennett, 2003). Inoltre altre caratteristiche fondamentali per i test dovrebbero essere standardizzazione, brevità, facilità, oltre che nell'esecuzione, anche nella valutazione (Taylor e Mills, 2006).

1.3.4) Cani in canile e differenze legate all'età

Nonostante ci siano moltissimi studi sul comportamento di cuccioli, animali adulti e anziani e sui problemi comportamentali che possono avere (e.g. Overall, 2001; Landsberg *et al.*, 2003; Landsberg e Araujo, 2005), poca attenzione è stata data all'influenza che l'età può avere sul comportamento in riferimento all'ingresso in canile e al primo periodo di permanenza in tali strutture e come questo possa andare in qualche modo a influenzare le possibilità di adozione.

Risulta abbastanza immediato come cuccioli e adulti abbiano un diverso comportamento, e per quanto riguarda i cani anziani, ci sono sempre più studi che vanno a focalizzarsi sui loro problemi comportamentali, sulla sindrome da disfunzione cognitiva (sindrome considerata simile all'Alzheimer negli uomini), caratterizzata da alterazioni a livello encefalico e delle meningi, quali ispessimento meningeo, deposito di β -amiloide, alterazioni vascolari, morte neuronale con maggior apoptosi, formazione di granulazioni, etc. (Landsberg *et al.* 2003).

In uno studio condotto da Pal e coautori (1998) sono state osservate le interazioni agonistiche tra gruppi di cani randagi in un villaggio in India. Si è osservato come gli adulti fossero più aggressivi rispetto ai giovani (di età dai 9 ai 15 mesi), specialmente le femmine; mentre negli animali più giovani si è maggiormente notata la presenza di un comportamento di sottomissione verso gli altri animali, soprattutto nei maschi.

In uno studio di Stephen e Ledger (2005) sono state rilevate delle differenze nel comportamento nel corso delle prime sei settimane in canile tra cani giovani (saltano e mordicchiano la cuccia) e cani più anziani (*panting*, abbaiano eccessivamente).

Confrontando due studi, quello di Wells (2004b) e Hubrecht (1993), si poteva notare come i cani adulti si abituassero alla presenza di giochi nel proprio box molto più velocemente (circa 5 giorni) di animali di età inferiore ai quattro mesi, che continuavano a giocare con lo stesso gioco per l'intera durata dello studio, cioè per circa due mesi.

In uno studio di Hennessy e coautori (1998) gli animali venivano sottoposti ad un protocollo che prevedeva un primo prelievo, quindi che trascorressero 20 minuti con un operatore che li coccolava e quindi un secondo prelievo per vedere se l'interazione con una persona poteva ridurre lo stress dato da una manipolazione come il prelievo di sangue. Si è osservato che durante i 20 minuti con l'operatore i cuccioli passavano più tempo rispetto a giovani e adulti rilassati in posizione di decubito, che ansimavano

meno e tentavano meno di scappare.

Un altro studio di Wells (2000a) sui problemi comportamentali emersi da cani di canile entro un mese dall'adozione rivelava come i cuccioli fossero la fascia d'età con minori problemi, i giovani quelli caratterizzati da maggiori livelli di attività e gli adulti quelli più propensi a manifestare aggressività verso gli altri cani.

Siwak e coautori (2001) hanno confrontato le differenze di comportamento in Beagle giovani (2-4 anni), anziani (9-15 anni) senza deficit cognitivi e anziani con deficit, andando a controllare differenze soprattutto per quanto riguarda locomozione, comportamento esplorativo, socievolezza sia verso conspecifici che persone.

I giovani erano più attivi degli anziani normali, gli anziani con deficit, invece, mostravano iperattività. Per quanto riguarda il comportamento esplorativo, esso era maggiore nei giovani, risultava presente, anche se in misura minore, negli anziani normali, mentre era completamente assente in quelli con deficit. I giovani si dimostravano più interessati all'introduzione di oggetti nuovi, alla loro immagine riflessa nello specchio, alla presenza di altri cani e alle persone; gli anziani normali mostravano risposte sociali appropriate e curiosità verso gli oggetti nuovi introdotti, ma in misura minore rispetto ai giovani. Questo si può spiegare come un'abitudine dovuta ad una maggior esperienza. Invece per quanto riguarda i cani con deficit cognitivi, questi non mostravano nessun interesse né per le persone, né per conspecifici, né per eventuali oggetti nuovi, mostrando un certo interesse, superiore ad entrambi gli altri gruppi, solo per la propria immagine riflessa in uno specchio (dato che risulta compatibile con quanto riportato dalla letteratura umana che dice che i pazienti affetti da Alzheimer e/o demenza senile non riconoscono la propria immagine nello specchio).

In un altro studio (Siwak *et al.*, 2002) sempre sull'attività locomotoria di giovani e anziani, gli autori hanno riscontrato come, sebbene in un ambiente nuovo l'attività locomotoria di giovani e anziani non fosse molto diversa, in un ambiente familiare gli anziani avessero un'attività molto più ridotta.

Un altro studio (Takeuchi e Harada, 2002) ha considerato le alterazioni dei cicli sonno-veglia in due gruppi di animali di età diverse, uno con animali di 3-4 anni, l'altro composto da animali di età dai 16 ai 18 anni. I cicli sonno-veglia degli animali giovani erano risultati normali: dormivano di notte, erano attivi durante il giorno, con una fase di riposo verso mezzogiorno e diminuita attività nel pomeriggio, negli anziani invece c'era una scomparsa di questo ritmo, essi infatti dormivano meno la notte, di più durante il giorno, ma senza seguire un pattern regolare (come i giovani con la fase di

riposo verso mezzogiorno e nel pomeriggio), il loro pattern risultava frammentato e irregolare lungo tutto l'arco della giornata.

In generale questi cambiamenti dei cicli sonno-veglia (con una maggiore inattività durante il giorno e quindi durante l'orario di apertura del canile), un diminuito livello di attività e una diminuita interazione con le persone possono andare a ridurre ulteriormente la loro adottabilità (già compromessa dall'età) in quanto si è visto come le persone adottino più volentieri cani giovani e sani, che siano attenti e interagiscono con i visitatori (Wells 1996, come citato da Wells e Hepper 2000a).

1.3.5) Cani in canile e differenze legate al genere

Alcuni studi si sono soffermati sulle differenze comportamentali tra maschi e femmine. Ad esempio Beerda e collaboratori (1998), sottoponendo gli animali a otto diverse prove (che consistevano nell'esplorazione di un nuovo ambiente, nella possibilità di fuga dal box, nell'essere costretti a terra, camminare lungo un corridoio, nel venire a contatto con un oggetto nuovo, con un suono improvviso, con del cibo e con altri cani), hanno rilevato che in risposta alle prove a cui gli animali venivano sottoposti le femmine mostravano soprattutto il comportamento di sollevare una zampa, mentre i maschi risultavano avere una postura più alta, scodinzolavano di più e cambiavano meno frequentemente da uno stato di locomozione ad un altro. Sempre questo studio però non ha riportato differenze nei due generi nelle risposte comportamentali allo stress cronico.

In uno studio di Wells e Hepper (1999) sull'effetto che uomini e donne avevano sui cani fermandosi per qualche minuto di fronte alla loro gabbia, si notava come il genere del cane influenzasse soprattutto la durata di quanto l'animale fissava una persona; le femmine mostravano una diminuzione maggiore del comportamento rispetto ai maschi nel corso dei due minuti che la persona passava di fronte alla gabbia.

Stephen e Ledger (2005) hanno trovato una differenza di genere nel primo periodo di permanenza in canile per uno dei comportamenti osservati, cioè rincorrersi la coda. Le femmine, infatti, iniziavano prima rispetto ai maschi a mostrare tale comportamento, le autrici però sottolineavano come il risultato non fosse molto importante in quanto questo comportamento era stato eseguito da solo 9 animali su 148. Nessun'altra differenza di genere è stata riscontrata per gli altri comportamenti nel corso di questo studio.

In uno studio di Wells (2004b) sull'effetto della presenza di giochi all'interno del box, l'autrice non ha riscontrato alcun effetto del genere sul comportamento degli animali, concludendo che nell'ambiente del canile, per quanto riguarda la presenza di giocattoli, maschi e femmine reagiscono alla stessa maniera.

In un altro studio di Wells e Hepper del 2000 (a), sui problemi comportamentali riscontrati dai proprietari un mese dopo l'adozione di un cane da canile, si è notato una differenza di genere per quanto riguarda il tipo di problemi comportamentali esibiti (i maschi soprattutto aggressività verso altri cani e tendenza a scappare, mentre le femmine erano più spaventate).

1.4) Adozioni

Uno studio di Wells e Hepper del 2001 analizzava il comportamento delle persone che visitavano un canile e i fattori che potevano influenzare il loro interesse verso i cani presenti. Il comportamento dei visitatori variava a seconda che fossero da soli, in coppia o in gruppo: era più probabile che il singolo adottasse un cane, rispetto ai visitatori che erano in gruppo. Inoltre le persone mostravano maggior interesse per i cani che si trovavano più vicino all'entrata, prendendo in considerazione un numero di cani minore rispetto a quello effettivamente presente nel canile e disponibile per l'adozione. È stato notato inoltre come il comportamento iniziale del cane, cioè prima di qualsiasi interazione, influenzasse le persone nel mostrare interesse per il cane stesso.

Un altro studio di Wells e Hepper (1992) in un canile dell'Irlanda del Nord (USPCA) sottolineava le preferenze delle persone nella scelta del tipo di cane, ad influenzarle erano il colore (gli autori avevano notato una preferenza spiccata verso i cani bianchi e neri), la taglia, il sesso, l'età. Una preferenza riguardava la provenienza del cane: le persone mostravano di preferire cani ceduti dai proprietari rispetto a quelli catturati come randagi. L'età e il sesso non avevano alcuna influenza significativa, anche se le persone preferivano le femmine (59%) rispetto ai maschi (41%) e i cani giovani in percentuale maggiore rispetto agli adulti (57% e 43% rispettivamente) Questi fattori erano comunque in un certo senso marginali, e il fattore più importante preso in considerazione era la percezione, da parte delle persone che visitavano il canile, del temperamento dell'animale. Ad esempio, dopo una lunga permanenza in canile, il cane può iniziare a passare più tempo a fondo gabbia e smettere di interagire con i visitatori del canile e questo può diminuire le chance di adozione dell'animale, visto che le

persone preferiscono cani attivi e che cercano l'interazione.

Un altro studio (Lepper *et al.*, 2002) condotto in California, al Sacramento County Department of Animal Care and Regulation, individuava nei seguenti fattori quelli determinanti nella scelta di un cane:

- età (giovani);
- sesso (non presentava importanza se gli animali erano sterilizzati, ma se interi allora la preferenza era verso le femmine);
- razza (i cani di razza venivano normalmente preferiti ai meticci);
- taglia (soprattutto cani di taglia piccola);
- colore del mantello (contrariamente a quanto trovato da Wells e Hepper, i cani meno apprezzati erano quelli neri o bianchi e neri);
- storia dell'animale (anche qui i randagi erano considerati in maniera meno favorevole, e venivano evitati anche quei cani che presentavano problemi comportamentali);
- lo stato di salute dell'animale al momento dell'adozione.

Anche uno studio italiano (Normando *et al.*, 2006) aveva sottolineato come la permanenza in canile fosse minore, come durata, per i giovani (1,4 mesi) rispetto agli anziani (6,4 mesi), indicativa quindi di una maggior preferenza verso gli animali giovani.

Le preferenze delle persone per quanto riguarda il tipo di cane che vogliono, come si è visto, variano da stato a stato (soprattutto per quanto riguarda preferenze nell'aspetto), ma sono comunque dei dati importanti da tenere in considerazione e che possono influenzare le scelte di gestione del canile, ad esempio tentando di aumentare in altro modo l'adottabilità di quei cani le cui caratteristiche fisiche non incontrano il favore del pubblico.

Lo studio di Neidhart e Boyd del 2002 ha analizzato come sia possibile migliorare il processo di adozione, scoprendo come i futuri proprietari sentano il bisogno di informazioni accurate sulla salute e comportamento del cane, vorrebbero ricevere dei consigli sul tipo di cane migliore per loro, avere più informazioni sui servizi disponibili (eg classi di obbedienza), una più accurata educazione sull'importanza del veterinario (vaccinazioni, sterilizzazione,...) e dissuasione se vogliono adottare un cane per la ragione sbagliata (ad esempio, adottare un cane per figli o nipoti allo scopo di insegnare loro il senso di responsabilità).

Uno studio di Bailey e coautori (1993) sull'effetto di test comportamentali per

selezionare gli animali adottabili, un *matching* accurato con informazioni dettagliate e precise degli eventuali problemi del cane ai potenziali futuri proprietari, assistenza post adottiva per tutti i cani e consulenza per i proprietari che vogliono restituire il cane a causa di problemi comportamentali, ha appurato come questi servizi riescano a diminuire il tasso di restituzioni al canile (10,4%).

1.5) Possibili problemi post adozione

Il benessere dei cani in canile ha dei risvolti importanti non solo durante la permanenza in canile, ma anche in un secondo momento, post-adozione, come provato da alcuni studi (Hennessy *et al.*, 1997; Tuber *et al.*, 1999). Secondo uno studio di Hennessy e coautori (2002b) si è evidenziato come la permanenza per lunghi periodi di tempo (nello studio si considera un periodo di 4-6mesi) dia problemi comportamentali quali ansia/paura. Una volta che il cane è stato sensibilizzato da un trauma di natura psicologica, la sensibilità dell'animale per stimoli simili può risultare aumentata per un lungo periodo di tempo, con la possibilità di reazioni esagerate, se nuovamente sottoposto al trauma anche in maniera lieve. Questo spiega i frequenti problemi di ansia da separazione che hanno i cani provenienti dal canile, visto che la partenza del proprietario per il lavoro, ad esempio, richiama l'esperienza dell'abbandono (Marston e Bennet, 2003).

Un altro problema dovuto alla permanenza in canile è l'estinzione di comportamenti precedentemente imparati (e.g. *house-training*): il fatto che i cani manifestino dei comportamenti antisociali (e.g. sporcando in casa) può costituire un fattore di rischio per la restituzione al canile (Tuber *et al.*, 1999; Marston e Bennet 2003).

1.6) Cortisolo

Un parametro importante nella valutazione del benessere dei cani, oltre ai rilievi comportamentali, è la valutazione di parametri endocrini, tra cui la cortisolemia. Secondo lo studio di Beerda e coautori (1999b), alti livelli di stress, associati ad elevati livelli di cortisolo, non sempre corrispondono ad alterazioni del comportamento indicative di stress cronico. Risulta per questo importante, nella valutazione del benessere degli animali, non limitarsi ai soli rilievi comportamentali, ma anche avere dei dati sulla concentrazione di cortisolo plasmatico.

L'importanza della misurazione del cortisolo nel cane deriva dal fatto che in questa specie è la principale molecola prodotta a seguito dell'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene. Ci sono diversi stimoli che causano l'attivazione dell'asse (e.g. stress, cicli sonno-veglia, assunzione di cibo, variazioni ambientali di temperatura e umidità...); nell'ambito dello stress sono stati riconosciuti diversi stimoli, che possono essere suddivisi in *real threats/systemic stressors* (quali il dolore, segnali infiammatori, stimolazione di barocettori e osmocettori) e *predicted threats/neurogenic stressors* (quali riconoscimento/anticipazione dei predatori e pericoli associati ai nuovi ambienti) (Engelmann *et al.*, 2004). Sembra che siano soprattutto i *neurogenic stressors* (abbandono, esposizione ad ambienti nuovi, mancato controllo sugli eventi esterni) più efficaci rispetto a quelli indotti dai danni fisici ad attivare l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (Mason, 1975 come citato da Gazzano *et al.*, 2004). Anderson e collaboratori (1996) hanno ulteriormente approfondito l'argomento, evidenziando come sia il modo in cui l'animale percepisce lo stress e non la situazione stressante di per sé ad influenzare la risposta dell'animale e che l'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene dipenda dal controllo che l'animale può esercitare sull'evento stesso.

1.6.1) Asse Ipotalamo-Ipofisi-Surrene

1.6.1.1) CRH:

L'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene inizia con la liberazione da parte dell'ipotalamo di CRH (*corticotropine releasing hormone*), polipeptide composto da 41 amminoacidi, secreto a livello della parte anteriore dei nuclei paraventricolari dell'ipotalamo. I nuclei paraventricolari sono stimolati da diverse parti del sistema nervoso centrale, quali altri nuclei ipotalamici, mesencefalo, ponte, midollo allungato (che trasmettono segnali dalla periferia), fornice (che va a monitorare la composizione plasmatica) e dal sistema limbico (con variazioni connesse agli stati emotivi) (Mormède *et al.*, 2007).

Il CRH ha un'emivita di circa 60 minuti ed agisce sull'adenoipofisi, sulle cellule corticotrope, per stimolare la produzione di ACTH (ormone adrenocorticotropo). Nell'uomo la secrezione di CRH è potenziata dall'arginina-vasopressina e dall'angiotensina II; mentre risulta inibita dall'ossitocina, ma non ci sono ancora dati certi per quanto riguarda il cane sul ruolo di queste molecole (Feldman e Nelson, 2002).

Il CRH raggiunge l'adenoipofisi tramite il circolo portale ipofisario, dato dalle arterie ipofisarie dorsale e ventrale che vascolarizzano rispettivamente adeno- e neuroipofisi. L'arteria ipofisaria dorsale forma dei plessi capillari a livello di eminenza mediana e peduncolo nervoso; dai capillari si formano due vene parallele che decorrono nel peduncolo nervoso e si ramificano in capillari sinusoidali a livello della porzione distale dell'adenoipofisi. La parte ventrale ed assiale di tale porzione riceve il sangue da un "lungo" letto portale, mentre le parti più dorsali e periferiche da un "corto" letto portale (Swenson e Reece, 2002).

1.6.1.2) ACTH:

L'ACTH è un ormone peptidico costituito da 39 aminoacidi. È prodotto dalle cellule corticotrope dell'adenoipofisi a partire da un pro-ormone, pro-opio-melano-cortina, che può dare origine a diverse sostanze biologicamente attive, a seconda dei punti di "clivaggio", quali β -lipotropina, ormone α -melanocito-stimolante (α -MSH), β -MSH, β -endorfina, frammento N-terminale, Corticotropin Like Intermediate Lobe (Feldman e Nelson, 1998).

La liberazione di ACTH, sotto controllo di CRH, è pulsatile e caratterizzata da un ritmo circadiano con un aumento della secrezione poco prima del risveglio poi seguito da una diminuzione progressiva dei livelli di tale ormone nel corso della giornata (Feldman e Nelson, 1998). Nell'uomo anche l'arginin-vasopressina influisce sulla secrezione di ACTH, andando a potenziare gli effetti di CRH; da sola AVP non ha grandi capacità di stimolare la secrezione di ACTH (Engelmann *et al.*, 2004).

La principale funzione di ACTH riguarda soprattutto la produzione e la secrezione di glucocorticoidi, ma ha un minimo effetto anche nella produzione di mineralcorticoidi e androgeni (Feldman e Nelson, 1998).

1.6.1.3) Cortisolo:

L'interazione ACTH-recettore, nella cellula bersaglio, fa sì che ci sia attivazione dell'adenilato ciclasi, con incremento di AMPc, fosfo-proteino-chinasi, mRNA, DNA, proteine e quindi della sintesi di glucocorticoidi. I glucocorticoidi, la cui molecola principale nel cane è il cortisolo, derivano da un precursore comune a tre classi di ormoni (glucocorticoidi, mineralcorticoidi e androgeni), il colesterolo, derivato dalle

lipoproteine plasmatiche. All'interno della zona fascicolata del surrene si ha la conversione del colesterolo in pregnenolone e da questo in cortisolo (Feldman e Nelson, 2002).

Il cortisolo è un ormone lipofilo, quindi circa il 90% della quota circolante è legata all'albumina o a proteine leganti i corticosteroidi e solo 10% va a costituire la frazione libera, che è anche quella attiva. La percentuale non legata passa liberamente le membrane cellulari, si lega a recettori citoplasmatici, che li traslocano verso il nucleo e, a questo livello, i complessi ormone-recettore si legano a siti specifici (elementi responsivi ai glucocorticoidi) causando cambiamenti nella trascrizione dei geni (aumentandone o inibendone la trascrizione) (Swenson e Reece, 2002).

I valori basali della cortisolemia oscillano tra 5-60 ng/ml (Feldman e Nelson, 1998).

1.6.1.4) Feedback:

Il cortisolo esercita un feedback negativo sulla sintesi di ACTH, a livello ipotalamico e ipofisario, in due modi: esiste un feedback rapido legato al grado di variazione nella cortisolemia e un feedback lento che risente delle variazioni assolute nella cortisolemia. Anche l'ACTH stesso ha una funzione di feedback negativo sulla sua stessa produzione, in quanto alti livelli di ACTH vanno a inibirne la sintesi (Feldman e Nelson, 1998).

1.6.2) Funzioni dei glucocorticoidi:

Gli effetti fisiologici dei glucocorticoidi si esplicano a livello di diversi apparati ed organi (Swenson e Reece, 2002) (Tabella n. 1-1).

	Effetti dei glucocorticoidi
Metabolismo dei carboidrati	Attivano la gluconeogenesi, antagonizzano l'azione dell'insulina nei tessuti periferici diminuendo il catabolismo degli zuccheri, hanno un'azione permissiva su glucagone e adrenalina (nelle loro funzioni gluconeogenetiche e glicolitiche), mentre a livello epatico hanno azione insulino-simile (agendo sulla glicogeno-sintetasi e stimolando il deposito di glicogeno a questo livello).

Metabolismo lipidico	Danno ipercolesterolemia, fanno aumentare i livelli di acidi grassi liberi in circolo e causano la redistribuzione dei grassi di deposito.
Metabolismo proteico	Inibiscono la sintesi di proteine e ne aumentano la degradazione allo scopo di fornire substrati gluconeogenetici dai tessuti a cui non servono (muscoli, cute, tessuto adiposo, linfoide, connettivo) a quelli per cui la presenza di glucosio è fondamentale.
Escrezione dell'acqua	Aumentano la velocità di filtrazione glomerulare (e quindi la diuresi) ed aumentano la produzione di ormone natriuretico atriale da parte del cuore.
Sistema nervoso	Hanno un "effetto facilitatorio", è essenziale la loro presenza perché determinate cellule possano rispondere agli stimoli; a livello di ippocampo danno diminuzione della sopravvivenza neuronale.
Assorbimento gastrointestinale	Sono coinvolti nell'assorbimento di glucosio e calcio, inoltre aumentano l'assorbimento dei grassi e stimolano la secrezione di pepsina e acido cloridrico.
Sistema riproduttivo	Danno una diminuzione della produzione di estrogeni/testosterone a livello delle gonadi, hanno un feedback negativo sull'ipotalamo per diminuire la produzione di GnRH e sull'ipofisi per bloccare la produzione di FSH e LH.
Sistema immunitario	Danno una diminuzione nella produzione di anticorpi, diminuzione della fagocitosi, monocitosi, linfopenia, neutrofilia con deviazione a destra, eosinofilia, atrofia del timo.
Processi infiammatori	Hanno azione antinfiammatoria: agiscono a livello delle membrane lisosomiali stabilizzandole e prevenendo così la liberazione di enzimi proteolitici; inibiscono anche l'azione della fosforilasi A ₂ un'enzima della membrana plasmatica coinvolto nella conversione dell'acido arachidonico in mediatori dell'infiammazione. Inoltre hanno anche un'azione antiallergica perché impediscono la liberazione dell'istamina.

Tab. n. 1-1: Effetti dei glucocorticoidi

In corso di una stimolazione di breve durata (da alcuni minuti a diverse ore) i glucocorticoidi danno soppressione del comportamento riproduttivo, modulano il sistema immunitario, causano un aumento della gluconeogenesi; se la stimolazione, invece, risulta essere duratura (giorni-settimane) gli effetti sono di inibizione del sistema riproduttivo, immunosoppressione, alterazione dei sistemi di secondi messaggeri, morte neuronale e riduzione della crescita.

L'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, per essere benefica per l'animale, dovrebbe essere di durata limitata, infatti dovrebbe essere mirata a ristabilire l'omeostasi dell'individuo, tramite risposte neuroendocrine, del Sistema Nervoso Autonomo, e comportamentali, e una volta che l'omeostasi è ristabilita l'attivazione dell'asse dovrebbe essere terminata (Engelmann. *et al.*, 2004).

In caso di una risposta acuta allo stress (e.g. l'animale è separato da figure familiari, trasporto, ecc.), il rilascio di corticosteroidi inizia dopo qualche minuto dall'inizio della situazione stressante e continua per circa un'ora dopo la fine dell'evento. Se lo stimolo scatenante persiste, i livelli plasmatici di cortisolo solitamente diminuiscono, ritornando a livelli simili a quelli di animali non stressati, o appena un po' più elevati. Da un punto di vista comportamentale, però, questi animali reagiscono diversamente rispetto agli animali non stressati e anche l'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene risente di cambiamenti. L'asse è soggetta a influenze opposte, permissive da parte di CRH e ACTH e inibitorie da parte del cortisolo. Solitamente queste alterazioni dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene sono meglio evidenziate da test di stimolazione (con somministrazione esogena di ACTH o CRH) o tramite test di soppressione (con somministrazione di desametasone, steroide sintetico con attività simile ai glucocorticoidi) (Mormède *et al.*, 2007).

1.6.3) Variazioni del cortisolo

1.6.3.1) Variazioni del cortisolo relative al tempo di permanenza in canile

Il canile è un ambiente molto stressante per i cani. La maggior parte degli animali che arrivano in canile sono stati abbandonati dai proprietari e sono stati sottoposti al trauma della cattura da parte degli operatori del canile. Sono quindi ricoverati in gabbie e sottoposti ad una routine completamente diversa da quella alla quale erano abituati

(assenza di persone familiari, diverse abitudini alimentari). Vivono in un ambiente molto rumoroso e non hanno nessun controllo su di esso (e.g. cani nuovi arrivano continuamente) (Hennessy *et al.*, 1997).

La misura della cortisolemia può essere un aiuto nel determinare i livelli di stress degli animali. Lo studio di Hennessy e collaboratori (1997) su 35 cani (17 tenuti in casa e 18 in canile) dimostra come i livelli di cortisolo plasmatici in cani all'entrata in canile siano più elevati rispetto a quelli di cani che vivono in casa come animali da compagnia, usati come gruppo di controllo, dimostrando come la misurazione della cortisolemia sia utile per definire lo stato di stress dell'animale. Inoltre, sempre in questo studio, vengono fatti dei confronti tra il cortisolo rilevato in prelievi eseguiti a diversi giorni dall'entrata in canile (giorno 1, 2, 3, 4, 5, 6-9, e dopo i 9 giorni) e si vede come i livelli di cortisolo siano minori nei cani che restano più a lungo al canile. La differenza risulta significativa soprattutto confrontando i primi tre giorni, in cui i livelli di cortisolo si mantengono molto elevati, con il cortisolo misurato dopo i 10 giorni in cui risulta comunque sempre più elevato rispetto ai cani controllo. Sono stati rilevati valori intermedi nei campioni prelevati al quarto e sesto giorno.

Invece un altro studio (Stephen e Ledger, 2006) svolto su 81 cani e che si basa sulla misurazione del cortisolo urinario, mette in rilievo come la concentrazione di cortisolo media aumenti dal giorno 2 al giorno 17 dall'ingresso in canile, per poi diminuire fino al giorno 31 (ultimo giorno dei prelievi). In questo studio però si è riscontrata una grande variabilità nei singoli cani con il maggiore aumento al giorno 2 (14%), al giorno 5 (24%), al giorno 10 (33%), con una diminuzione a livelli minimi il giorno 5 e poi un aumento nei giorni seguenti (29%). Nello studio si ipotizza che le variazioni di cortisolo possano essere dovute a diverse ragioni. Alcune sono non specifiche in risposta ad attività fisica, altre ad un compromesso stato emotivo, che risente soprattutto delle diverse condizioni di stabulazione e, nel lungo periodo, della mancata opportunità di contatto e socializzazione con altri cani e persone. Le diverse risposte possono essere influenzate anche dalla situazioni ambientale (se stabulati in aree più o meno rumorose nel canile), da risposte individuali (soggetti più paurosi o più proni alla frustrazione dovuta a mancato contatto e inattività). Un'altra ragione può essere dovuta al fatto che intorno al giorno 10 i cani cambiano canile e quindi le tecniche diverse di gestione dell'animale possono di fatto influire sul loro stato.

1.6.3.2) Variazioni di cortisolo relative al genere

Il genere del soggetto è un'altra variabile presa in considerazione negli studi di Garnier e coautori (1990), Rothuizen e collaboratori (1993), Hennessy e coautori (1997), Beerda e collaboratori (1999b), Stephen e Ledger (2006).

Negli ultimi tre non sono state riportate differenze nei livelli di cortisolo tra maschi e femmine, mentre negli altri due è stata notata una differenza di genere.

Lo studio di Garnier e coautori (1990) su 58 Beagle confronta i livelli di cortisolo basale e dopo stimolazione con ACTH a 2 giorni, 5 settimane e 12 settimane dall'ingresso nell'ospedale veterinario.

Il risultato più significativo riguarda i livelli basali al giorno 2, che differiscono significativamente in maschi e femmine (27,908 ng/ml nelle femmine, 15,585 ng/ml nei maschi), mentre nel secondo prelievo post stimolazione con ACTH, non differiscono significativamente (105,472 ng/ml contro 110,909 ng/ml); a 5 e a 12 settimane non ci sono variazioni significative né per quanto riguarda i valori basali, né per quelli post stimolazione.

La conclusione a cui sono giunti gli Autori è che i maschi riescono ad adattarsi più velocemente rispetto alle femmine alle variazioni ambientali, ed è per questo che si osservavano differenze nei valori basali di cortisolo plasmatico al giorno 2, ma non dopo 5 o 12 settimane (in quanto tutti gli animali si sono già acclimatati); mentre in risposta alla somministrazione di ACTH (che va a mimare la reazione ad uno stress acuto) le reazioni sono uguali in entrambi i generi.

Anche nello studio di Beerda e collaboratori (1999b) si è riscontrata una certa variabilità di genere. Nel passaggio dalla stabulazione in gruppo in un ambiente spazioso, alla stabulazione singola, all'interno e isolati dagli altri cani, le cagne hanno livelli di ACTH e cortisolo, dopo iniezione di CRH esogeno, più alti dal 39 al 55% rispetto ai cani maschi. I livelli di cortisolo salivare, misurati dopo esposizione a rumori improvvisi, risultano più elevati rispetto a quelli dei cani maschi, dimostrando una maggiore risposta sia a stress acuti che a stress cronici dovuti al tipo di stabulazione. Infatti restrizioni spaziali e sociali vanno ad influire sulla secrezione del cortisolo in maniera diversa in maschi e femmine, facendo quindi supporre che le cagne siano più suscettibili a stress ambientali.

Riguardo i risultati dello studio di Beerda e coautori (1999b), Stephen e Ledger (2006)

formulano l'ipotesi che le differenze tra maschi e femmine siano maggiormente evidenti in quegli studi che usano cani geneticamente correlati (e.g. Beagle) rispetto agli studi in cui sono usati cani di canile (quindi meticci o anche cani di diverse razze) e con condizioni di campo più controllate (laboratorio) rispetto a quelle che si possono avere in un canile.

1.6.3.3) Variazioni di cortisolo relative all'età

Nelle varie specie animali è stato dimostrato come l'invecchiamento vada ad influire sull'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, con alterazioni a diversi livelli (espressione dei recettori, quantità di ormoni circolanti, alterazioni dei sistemi di controllo e di escrezione degli ormoni circolanti).

Per quanto riguarda il cane, lo studio più approfondito su questo argomento è di Rothuizen e collaboratori (1993). Gli Autori hanno rilevato diverse modificazioni dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene nei cani anziani. Queste alterazioni comprendono un aumento dell'attività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, caratterizzato da: incremento nei livelli basali e perdita di ritmicità nella secrezione di ACTH e cortisolo nel plasma; aumentata escrezione urinaria di cortisolo (l'escrezione urinaria riflette la quantità di cortisolo liberamente filtrabile, cioè la frazione attiva presente nel plasma, che risulta pertanto più elevata negli anziani); aumentata secrezione di ACTH e cortisolo in risposta a stress o somministrazione di CRH esogeno; maggior peso dei surreni come manifestazione di un'ipertrofia da stimolazione cronica; diminuita *clearance* plasmatica del cortisolo. In risposta alla somministrazione di desametasone non sono state riscontrate differenze nei due gruppi, con simile diminuzione della concentrazione di cortisolo e ACTH.

A livello di sistema nervoso sono state rilevate delle modificazioni dei recettori: il numero dei recettori per i glucocorticoidi (GR) è uguale in anziani e giovani in diverse zone del cervello, mentre risulta aumentato nell'adenoipofisi dei soggetti più vecchi. L'aumento di GR a livello di adenoipofisi potrebbe essere responsabile dell'aumentato feedback negativo mediato da questi recettori. I recettori per i mineralcorticoidi (MR) risultano diminuiti soprattutto a livello di ippocampo, setto, ipotalamo e adenoipofisi. La diminuzione di MR è alla base dell'aumento dei livelli basali e dei livelli post stimolazione stressante dell'asse HPA, soprattutto nell'ippocampo.

Nello studio di Stephen e Ledger (2006) gli autori riportano invece come non sia stato

possibile per loro rilevare una correlazione certa tra età e livelli di cortisolo urinario dell'animale.

Anche nelle scimmie sono stati fatti rilievi simili (Gust *et al.*, 2000): in animali anziani aumentano i livelli basali di cortisolo, soprattutto alla sera, e il ritmo circadiano di secrezione, che dovrebbe seguire un pattern diurno risulta appiattito, quindi i livelli della mattina sono più bassi e quelli del nadir della sera più elevati (accade lo stesso in uomini e ratti.) Per quanto riguarda il feedback negativo dei glucocorticoidi sull'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, secondo questo studio, l'età va ad influenzare il feedback alterandolo (con l'invecchiamento si assiste ad una perdita dei recettori per i glucocorticoidi nell'ippocampo, probabilmente dovuto ad un'esposizione prolungata a questi ormoni, di conseguenza c'è una diminuzione del feedback negativo che influenza la secrezione di ACTH).

Diversi studi sono stati condotti anche sui ratti (Haugher *et al.*, 1994; Cizza *et al.*, 1994 per citarne alcuni). Cizza e collaboratori (1994) mettono in evidenza l'aumento dei livelli basali di corticosterone la mattina (questi animali hanno un pattern notturno e quindi normalmente il picco massimo dovrebbe essere durante la notte e il nadir la mattina, l'opposto rispetto alle altre specie prese in esame finora), la diminuzione di CRH presente nell'ipotalamo, l'aumento di ACTH nell'adenoipofisi. Inoltre dopo somministrazione esogena di CRH si è visto che l'aumento di ACTH e cortisolo risulta superiore alla norma e ritardato, che diminuisce la produzione di corticosterone e che c'è un ritorno più lento a livelli basali di corticosterone dopo uno stress.

Un altro studio (Hauger *et al.*, 1994) ha messo in evidenza l'aumento della secrezione di CRH, di corticosterone e ACTH e una diminuzione di secrezione dell'AVP, dei recettori per il CRH nell'adenoipofisi in conseguenza all'aumento di secrezione del CRH, della produzione di ACTH in risposta a stress acuti.

Nell'uomo sono stati osservati un aumento nei livelli serali e notturni di cortisolo, una ridotta sensibilità dell'asse HPA al feedback steroideo, un volume ippocampale ridotto che può essere correlato alle modificazioni di secrezione serale e notturna di cortisolo (Ferrari *et al.* 2004)

1.6.3.4) Modificazioni dei livelli di cortisolo non specifiche

Lo studio di Hennessy e coautori (1998) ha evidenziato come le manipolazioni per il prelievo possano attivare l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene. Il loro esperimento prevede

un primo prelievo seguito da un secondo prelievo dopo 20 minuti ed evidenzia l'aumento di cortisolo tra i due prelievi. Altri studi (Coover *et al.* 1979 e Tuber *et al.* 1996) riportano che l'aumento plasmatico di cortisolo in risposta alle manipolazioni per il prelievo avviene entro i tre minuti dall'inizio di tale operazione. Kobelt e collaboratori (2003) hanno misurato le variazioni di cortisolo dovute al prelievo tramite Salivette (appositi collettori sterili per la misurazione del cortisolo salivare), senza trovare variazioni per prelievi che avvengono entro i 4 minuti dall'inizio della procedura. Secondo quanto scrivono Stephen e Ledger (2006) è molto probabile che i cani possano imparare ad anticipare il momento del prelievo, con un conseguente aumento del cortisolo prima dello stesso.

Ci sono anche altre ragioni per le variazioni del cortisolo plasmatico, non correlate a prelievi o ad altri stressors. Possono essere dovute al momento della giornata in cui si esegue il prelievo: normalmente i livelli di cortisolo seguono un ritmo pulsatile e l'ampiezza della secrezione ha un ritmo circadiano (ampiezza maggiore negli episodi pulsatili di mattina, minima durante la notte, per le specie diurne). È stato riscontrato anche un aumento di cortisolo plasmatico dopo i pasti e alterazioni dei livelli di cortisolo possono essere date anche da condizioni ambientali di umidità e temperatura.

Ci sono anche delle differenze individuali di cui tenere conto. Ci sono diversi meccanismi responsabili di variazioni genetiche nell'attività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene. Ad esempio, Hennessy e collaboratori (1988) hanno dimostrato come la risposta del surrene all'ACTH sia una caratteristica individuale ed ereditabile. Anche la disponibilità dei corticosteroidi dipende da fattori genetici (il polimorfismo del gene per le proteine leganti i corticosteroidi influenza i livelli di cortisolo circolanti) e ci possono essere grandi differenze individuali nell'efficienza dei recettori per i corticosteroidi.

Stephen e Ledger (2006) sottolineano, infine, come le diverse risposte possano essere dovute ad una stabulazione in aree diverse del canile (più o meno rumorose), alle diverse risposte individuali dei cani (e.g. soggetti paurosi), al grado di attività fisica dell'animale (soprattutto immediatamente precedente al prelievo).

Capitolo 2:

Scopo della tesi

Con la presente tesi si è voluto indagare se ci fossero differenze dovute ad alcune caratteristiche del soggetto, come età e genere, nella risposta adattativa (i. e., comportamento e livelli di cortisolo plasmatico) di cani durante i primi undici giorni di permanenza in un canile sanitario.

In particolare, all'interno dei primi undici giorni, si sono considerati due diversi periodi di permanenza, i primi tre giorni e la seconda settimana dall'ingresso, al fine di valutare se vi fosse una abitudine all'ambiente del canile e se si riscontrassero differenze nella capacità di adattamento, dovute alle caratteristiche dei soggetti.

Capitolo 3:

Materiali e Metodi

3.1) Strutture coinvolte:

Le osservazioni comportamentali sono state eseguite presso il canile sanitario di Selvazzano (ASL 16) (vedi Foto 3-1 e 3-2). In questo canile vengono ospitati cani randagi catturati dagli operatori ASL nel territorio di competenza, mentre non sono accettati cani ceduti dai proprietari. I cani catturati sono tenuti nel canile per circa 20 giorni e poi sono trasferiti al canile rifugio di Rubano.

All'ammissione in canile, il veterinario esegue una visita clinica dell'animale per accertarne le condizioni di salute e fornire una stima dell'età, inoltre viene eseguita la profilassi vaccinale, il trattamento contro gli ectoparassiti e infine viene applicato un microchip per l'identificazione del soggetto. Tutti gli animali sono sottoposti ai test per filaria e altri parassiti intestinali e, se positivi, sono trattati opportunamente. Se i cani arrivati in canile sono feriti, vengono fornite loro le cure appropriate (medicazione o intervento chirurgico a seconda delle necessità).

Dopo circa 10-12 giorni dall'arrivo, i cani vengono sterilizzati e tenuti in box fino alla rimozione delle suture dell'intervento. Quindi sono trasferiti nel canile di Rubano.

Per quei cani, che invece hanno già un identificativo, viene rintracciato il proprietario.



Foto n.3-1: Il canile di Selvazzano, cortile interno

Il canile è composto da 36 box, in cui i cani sono alloggiati singolarmente, ad eccezione dei cuccioli che vengono stabulati in numero minimo di due. Ogni box misura circa 6,5 mq ed è composto da una parte coperta ed una esterna. La parte coperta dei box è in muratura, mentre quella all'esterno è separata dagli altri box con reti metalliche, quindi i cani possono vedersi e interagire tra loro (guardarsi, annusarsi...). I cani hanno sempre la possibilità di spostarsi tra parte interna ed esterna del box. Nella parte coperta sono situate la cuccia in plastica e le ciotole con cibo e acqua.



Foto n.3-2: Il canile di Selvazzano, ingresso all'area con i box

L'acqua viene fornita ad libitum e il cibo consiste di mangime secco commerciale che è

somministrato una volta al giorno, la mattina verso le 7:00. Le eccedenze di cibo vengono rimosse verso le 13:00. La pulizia dei box inizia alle 7:30 e si protrae a seconda del numero dei cani (di solito fino alle 8:30).

3.2) Protocollo

Come risposte adattative si è scelto di usare alcuni parametri che fossero facilmente applicabili alle condizioni di campo in cui ci si trovava ad operare, quali il comportamento e la rilevazione del cortisolo plasmatico.

Uno schema del protocollo applicato è riportato in Tabella n.3-1.

Giorno dall'entrata in canile	Prelievo di sangue	Osservazioni comportamentali	Test comportamentale
1			
2	✓	✓	
3		✓	
4		✓	
5			
6			
7			
8			
9		✓	
10	✓	✓	
11		✓	✓

Tabella n.3-1: Protocollo

3.3) Osservazioni comportamentali

Sono state previste osservazioni dirette di 20 minuti per ciascun cane da svolgersi nei giorni 2, 3, 4 e poi 9, 10, 11 dall'ingresso. In questo modo, si voleva coprire il periodo subito dopo l'arrivo dell'animale in canile e confrontare i dati raccolti con le osservazioni della settimana successiva all'ingresso, considerando che, in questo periodo, il cane aveva avuto modo di familiarizzare con l'ambiente nuovo, con la routine del canile e con il personale. È stato deciso di non fare osservazioni il giorno 1,

cioè quello dell'ingresso, perché non è da considerarsi attendibile. Il cane, appena entrato, avendo subito gli stress della cattura e della visita con il veterinario, deve adattarsi al nuovo ambiente, inoltre i cani entrano in orari diversi a seconda di quando vengono catturati. La scelta dei giorni è stata dettata dalle necessità di routine del canile, in modo da avere un protocollo che permettesse di evitare osservazioni comportamentali nei weekend. Le osservazioni sono state eseguite con la metodica *instantaneous focal animal sampling* (cioè metodica di registrazione istantanea ad animale focale) ogni 15 secondi. Per alcuni comportamenti, cioè per i segni specifici di stress (sbadigliare, sollevare la zampa, leccarsi le labbra, assumere una postura bassa e camminare in cerchio), a questa metodica è stato affiancato un *continuous behavioural sampling* (cioè una metodica di registrazione continua per comportamento). Tramite *instantaneous focal animal sampling* si divide il tempo di osservazione in periodi di tempo (in questo studio 15 secondi) detti *sample intervals*, o intervalli campione. Il momento in cui finisce ogni intervallo campione è detto *sample point*, cioè punto campione. Nell'*instantaneous focal animal sampling* si rilevano solo i comportamenti che avvengono durante i *sample points*, mentre nella metodica *continuous behavioural sampling* si rilevano episodi del comportamento preso in esame anche quando essi si manifestino durante un intervallo campione (e quindi non in un punto campione) (Martin e Bateson, 1986). Quindi il totale della frequenza di un determinato comportamento tramite *continuous behavioural sampling* è dato dagli episodi del comportamento verificatisi nei *sample points* più quelli extra, cioè quelli che si manifestano al di fuori dei *sample points*. Questa metodica di registrazione della frequenza è anche detta "*all occurrences*".

I cani venivano osservati dalle 9:00 alle 15:00, a seconda del numero dei cani da osservare presenti in canile. L'osservatore, sempre la medesima persona, sedeva di fronte alla gabbia ad una distanza di 2-3 metri. Il tempo di adattamento prima dell'inizio della registrazione del comportamento, per permettere al cane di abituarsi alla presenza dell'operatore, era di 3-5 minuti circa.

Le osservazioni sono state eseguite su 34 cani, di questi solo 29 cani sono rimasti in canile fino all'undicesimo giorno e sono quindi stati osservati fino all'ultimo giorno previsto dal protocollo.

I comportamenti venivano osservati e classificati in base ad un etogramma (Tab.3-3), e

veniva annotata la postura dell'animale mentre eseguiva il comportamento (in stazione, in decubito, Tab.3-2)

Postura	Descrizione
Decubito	Posture di decubito sterno costale e laterale, con testa tenuta appoggiata o sollevata, con arti flessi o estesi. Oppure posizione di cane seduto, con gli arti anteriori estesi e i posteriori flessi
Stazione	Posture di stazione quadrupedale immobile, con orecchie e coda sollevate o rilassate, oppure con gli arti anteriori appoggiati alla recinzione;

Tab. n.3-2: Descrizione della postura dell'animale

Inattivo: (Inatt)		Locomotorio: (Loc)	Esplorativo verso le strutture: (AttStr)		Affiliativo: (Affil)		Guardare le persone: (GPers)		Stress: (Stress)		Self Grooming: (SG)		Altro: (Miscel)		Fuori Campo: (FC)	
S:	D:		S:	D:	S:	D:	S:	D:	S:	D:	S:	D:	S:	D:		
Animale fermo, fatta eccezione per piccoli movimenti e non impegnato in nessun'altra azione o comportamento.		Locomozione finalizzata.	L'animale esplora l'ambiente, annusa le strutture, gratta per terra e/o gli oggetti, mordicchia/lecca oggetti e/o strutture.		L'animale interagisce in modo non aggressivo con un altro cane, lo annusa o ne ricerca il contatto, gioca.		L'animale ricerca/sostiene il contatto visivo con le persone.		L'animale mette in atto dei comportamenti indicatori di stress.		L'animale si lecca, si morde leggermente con gli incisivi, si gratta con un arto.		L'animale mangia/beve, defeca/minge, altro.		L'animale non è visibile da dove si trova l'operatore.	

Leccarsi le labbra: (LL)		Sbadigliare: (Y)		Alzare la zampa: (Z)		Postura bassa: (P)		Camminare in cerchio: (O)	
S:	D:	S:	D:	S:	D:	S:	D:	S:	D:
L'animale si lecca le labbra o il naso		L'animale sbadiglia		L'animale tiene sollevato uno degli arti anteriori		L'animale assume una postura bassa (arti flessi, coda tra le gambe)		L'animale cammina in cerchio	

+

Leccarsi le labbra extra: (LLE)		Sbadigliare extra: (YE)		Alzare la zampa extra: (ZE)		Postura bassa extra: (PE)		Camminare in cerchio extra: (OE)	
S:	D:	S:	D:	S:	D:	S:	D:	S:	D:

Extra si riferisce alle osservazioni fatte tramite continuous sampling)

Leccarsi le labbra totale: (LLT)		Sbadigliare totale: (YT)		Alzare la zampa totale: (ZT)		Postura bassa totale: (PT)		Camminare in cerchio totale: (OT)	
S:	D:	S:	D:	S:	D:	S:	D:	S:	D:

Tab. n.3-3: Etogramma (S:stazione, D: decubito o seduto)

3.4) **Test Comportamentale**

All'undicesimo giorno, dopo l'ultima osservazione, il protocollo prevedeva l'esecuzione di un test comportamentale su ogni cane osservato, a meno che il soggetto non fosse valutato come aggressivo e quindi potesse risultare pericoloso eseguire il test. Il test eseguito è quello in uso allo Yolo County Animal Shelter, Woodland, CA, messo a punto dalla dott.ssa Barb Jones, resident del programma di Shelter Medicine alla UC Davis. Il test si basa su diversi test comportamentali usati in altri canili (come il Sacramento SPCA) e sui test approntati da Sue Sternberg (Assess-a-pet) e Emily Weiss (Safety Assessment For Evaluating Rehoming o SAFER test)

Il test (vedi allegato n.1) si divide in diverse sezioni e il suo scopo è determinare in modo semplice e veloce (circa 20-30 minuti per cane) se il cane sia aggressivo e il suo livello di socievolezza o indipendenza.

Il test veniva eseguito in una stanza apposita, normalmente adibita a magazzino, all'interno della struttura, di fronte ai box. La stanza misurava circa 10x6 m, era chiusa e non presentava pericoli per il cane, era situata in una zona tranquilla e non accessibile ai clienti dell'ambulatorio. Prima di iniziare il test, veniva portato nella stanza tutto il materiale utile al test (sedia, cibo, giochi...). Il cane sottoposto al test non poteva entrare in contatto con altri animali.

Il test è stato eseguito su 29 cani, in 5 cani non è stato possibile eseguire il test (due erano troppo aggressivi, i restanti, per diverse ragioni, non hanno completato l'iter previsto dal protocollo).

Il test era strutturato come segue:

3.4.1) Osservazioni in box:

Si tratta di osservazioni fatte dal personale che si occupa del cane ogni giorno o comunque da persone che sono a contatto con il cane, per monitorarne il comportamento dall'ingresso al canile al momento del test. In questa parte del test viene indicato il comportamento abituale del cane, dove si posiziona nella gabbia, come reagisce alla presenza delle persone, come mangia. Questa prima sezione contiene delle indicazioni per la persona che deve eseguire il test sul cane.

3.4.2) Approccio al box:



L'operatore resta in piedi di fronte alla porta del box, per cinque secondi (vedi foto n. 3-3). Quindi cerca il contatto visivo in modo non minaccioso, ma senza dire nulla al cane. Si valuta il tipo di reazione del cane: se si avvicina amichevolmente e scodinzola (A), se trema o si rifugia a fondo gabbia (B), se ignora l'operatore (C), se si dimostra nervoso e spaventato (D) o se scopre i denti, ringhia contro l'operatore, o se tenta di morderlo (F).

Foto n. 3-3: Approccio al box, in piedi

Quindi l'operatore si inginocchia lateralmente (vedi foto n. 3-4), stando sempre sulla porta del box e appoggia il dorso della mano sulla porta, a livello della testa del cane. Muove la mano lentamente sulla porta e osserva la reazione del cane. I tipi di reazione previsti per questa parte sono tre: il cane si dimostra amichevole e si avvicina alla mano (A), ignora l'operatore (C) o si dimostra aggressivo nei suoi confronti (F).



Foto n. 3-4: Approccio al box, chinandosi

3.4.3) Ingresso nel box/camminare a guinzaglio:

L'operatore entra nel box in modo non minaccioso e mette il cane a guinzaglio in maniera tranquilla, senza spaventare il cane. Porta il cane nell'area adibita al test. Non cerca alcun contatto non necessario. Non tenta di fare amicizia con il cane, ma allo stesso tempo non lo rimprovera. Se il cane è timido o riluttante a uscire dal box, lo

incoraggia dolcemente. Se il cane non cammina a guinzaglio (ed è abbastanza piccolo)



lo porta in braccio fino alla stanza del test.

La valutazione comprende cinque possibilità: il cane è facile da mettere a guinzaglio e cammina facilmente (A), il cane si muove troppo ed è quindi difficile metterlo al guinzaglio e, camminando, tira troppo (B), è spaventato, si rifiuta di camminare o tenta di correre per nascondersi o scappare, ma se incoraggiato dolcemente risponde in maniera positiva (C), è difficile da mettere a guinzaglio perché evita il contatto, cammina senza entusiasmo e non risponde agli incoraggiamenti (D), non è possibile metterlo al guinzaglio perché troppo aggressivo (F)

Foto n.3-5: Mettere il guinzaglio

3.4.4) Socievolezza:

Dopo aver dato 5 minuti al cane per investigare la stanza, l'operatore riprende il



Foto n. 3-6: Socievolezza, in piedi

guinzaglio e lo lascia abbastanza lungo in modo da dare al cane la possibilità di muoversi. L'operatore deve controllare il tempo con l'orologio e deve rimanere fermo in piedi. È importante rimanere neutrali senza tirare il guinzaglio. L'osservatore deve ignorare il cane completamente anche dopo che questo ha iniziato ad interagire. Quindi cronometra in quanto tempo il cane tenta di interagire, e cerca un contatto fisico con l'operatore annusandolo, saltando o leccandolo, cercando un contatto visivo e scodinzolando, appoggiandosi, o sedendosi ai suoi piedi (foto n. 3-6).

Viene valutato se l'animale si avvicina e tenta il contatto in meno di un minuto (A), in più di un minuto ma meno di due, con tentativi di contatto di intensità moderata (B), entro due minuti e per breve tempo (C), non cerca alcun contatto e sembra totalmente indipendente (D).

Dopo 2 minuti, l'operatore si siede su una sedia. Continua a ignorare il cane, ma ne

osserva le reazioni per un minuto (vedi foto n. 3-7). Si valuta se il cane si avvicina immediatamente, tenta di saltare o appoggiarsi all'operatore (A), se si avvicina ma è timido o si nasconde sotto la sedia scodinzolando (B), se si avvicina, si appoggia all'operatore, ma si guarda intorno (C), ignora l'operatore completamente (D).

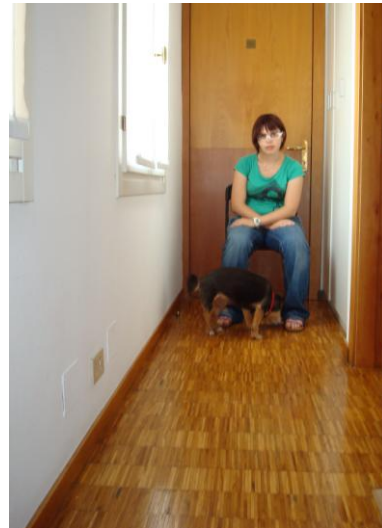
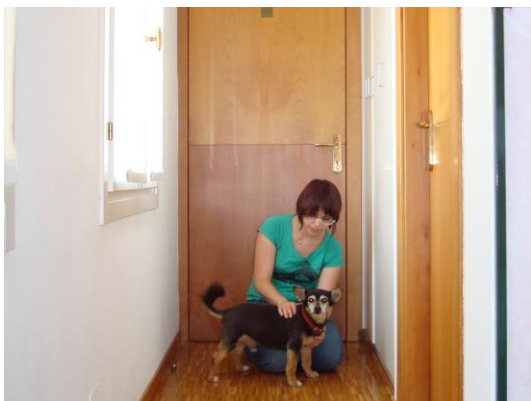


Foto n.3-7: Socievolzza, seduto

3.4.5) Accarezzare il dorso:

L'operatore accarezza il cane lentamente dal collo, lungo la spina dorsale fino alla base della coda, senza avere alcuna interazione verbale con il cane (vedi foto n. 3-8). Dopo averlo accarezzato una volta, si alza in piedi e si ferma per pochi minuti. La procedura va ripetuta per un totale di tre volte. È importante che l'operatore osservi il comportamento del cane prima e durante la prova.

Per la valutazione si controlla se il cane si avvicina all'operatore e scodinzola (A), se il



suo atteggiamento non cambia e rimane distaccato o distratto (B), se tenta di andarsene, cerca di evitare il contatto e diventa agitato (C), se si irrigidisce e smette di scodinzolare (D), se non permette di essere accarezzato e scopre i denti, ringhia o tenta di mordere (F).

Foto n. 3-8: Accarezzare il dorso

3.4.6) Controllo dei denti:

L'operatore esegue questa parte come se fosse una persona inesperta, senza mostrare competenza o confidenza al cane sottoposto a test. Deve tentare di esaminare i denti al cane, cinque volte di seguito per cinque secondi alla volta. Il cane viene maneggiato

delicatamente, ritraendosi spaventati se il cane oppone resistenza. L'operatore conforta e fa dei complimenti al cane durante tutto il test, anche se questo non collabora. La procedura prevede di mettere una mano sotto il mento, tenendo il palmo disteso e le dita tese, senza aggrapparsi alla mascella, quindi di mettere l'altra mano sopra il muso del cane, senza bloccare gli occhi o le narici e senza aprire la bocca del cane, e di spostare delicatamente il labbro superiore, esponendo sia canini che incisivi. L'operatore conta fino a cinque, se il cane si ritrae, lo lascia andare e ricomincia. Per la valutazione si controlla se il cane è facile da esaminare, tollerante e rilassato, è accettabile se si mette a pancia in su e trema (A), se si divincola, ma rimane amichevole (B), se è difficile da esaminare, si scrolla e scuote la testa e diventa meno socievole (C), se si irrigidisce e perde completamente la sua socievolezza (D), se scopre i denti e tenta di mordere (F).



Foto n. 3-9: controllo dei denti.

3.4.7) Abbraccio:

L'operatore esegue questa parte solo se è stato capace di completare l'esame dei denti. L'operatore deve parlare dolcemente al cane durante l'abbraccio. Prima mette il cane di fronte a sé, facendolo guardare alla sua destra. Poi porta lentamente il braccio destro sotto il collo del cane. Si ferma e gratta sotto il collare per alcuni secondi. In maniera rapida, ma delicata, prende il proprio collo con la mano destra e gira la testa a sinistra.



Resta così per 15 secondi, accarezzando il cane e facendogli complimenti (foto n. 3-10).

La valutazione per questa prova è divisa in due sezioni: una che riguarda il comportamento del cane durante l'abbraccio e una dopo l'abbraccio. Durante l'abbraccio il cane può essere rilassato o comunque

Foto n. 3-10: abbraccio

tollerante (A), inizialmente può divincolarsi, ma poi si calma (B), può immobilizzarsi, opporsi o essere preso dal panico (C), può scoprire i denti, ringhiare o tentare di mordere (F). Dopo l'abbraccio sono previste due possibilità: si dimostra amichevole verso l'operatore (A) o lo ignora e non ritorna neanche se incoraggiato (D).

3.4.8) Aggressività possessiva:

L'operatore mostra al cane un giocattolo o un premio (qualcosa di appetitoso), come un osso o un bastoncino da masticare. Lascia che il cane lo prenda dalla mano o lo incoraggia a prenderlo coinvolgendolo in un gioco, lanciando l'oggetto affinché il cane lo recuperi. Gli lascia del tempo per permettergli di mettersi comodo e di iniziare a masticarlo. Se necessario, procura un asciugamano o una coperta per incoraggiare il cane a stendersi. L'operatore si avvicina lentamente e prima di tutto osserva la reazione del cane a questo avvicinamento. Quindi, accarezza la schiena del cane e la testa con l'Assess-a-Hand (si tratta di una mano di plastica su un supporto di legno che l'operatore usa in situazioni di rischio, quando è probabile che il cane abbia una reazione aggressiva, per portare a termine il test senza correre eccessivi rischi) (vedi foto n. 3-11) lodandolo. Lentamente muove la mano verso l'oggetto masticato, arrivando a qualche centimetro di distanza, e si tira indietro di scatto, improvvisamente, come se spaventato dal fatto che il cane possa mordere. Per i cani sopra i quattro mesi lo ripete tre volte, per i cuccioli di quattro mesi o più giovani, solo una volta. Quindi, l'operatore usa l'Assess-a-Hand per spostare, gentilmente, ma fermamente, il muso del cane lontano dall'oggetto per tre secondi. Lo ripete una volta nei cani oltre i quattro mesi.

Per la valutazione dell'animale si considera se il cane si mostra interessato all'oggetto, ma lo lascia in cambio di attenzione da parte dell'operatore e se non è necessario spingere la testa lontano dall'oggetto (A), se fa resistenza nel lasciare l'oggetto, ma senza ringhiare né scoprire i denti e si può comunque allontanarlo facilmente (B), se blocca l'accesso all'oggetto, sobbalza quando toccato ed è difficile allontanarlo (C), se si irrigidisce ed è impossibile allontanarlo dall'oggetto (D), se scopre i denti, ringhia, tenta di mordere (F). Qualora il cane non sia interessato all'oggetto si ripete il test successivamente.



Foto n. 3-11: Assess-a-Hand

3.4.9) Aggressività da cibo:



Foto n. 3-12: Test per l'aggressività da cibo

L'operatore posiziona sul pavimento una ciotola di crocchette mescolate ad un'abbondante quantità di cibo umido molto appetibile (deve essercene abbastanza affinché il cane possa mangiare per almeno due minuti). Una volta che il cane ha iniziato a mangiare, gli si avvicina lentamente con l'Assess-a-Hand per accarezzarlo lungo la schiena, lodandolo. Quindi accarezza la testa con l'Assess-A-Hand, sempre continuando a lodarlo. A questo punto sposta lentamente la mano, avvicinandola alla ciotola, arrivando a un paio di centimetri, e la tira indietro di scatto, come se spaventato dal fatto che il cane potesse mordere. Per i cani sopra i quattro mesi, ripete la manualità tre volte, per i cuccioli di tre mesi o più giovani, solo una volta. Quindi mette la mano nella ciotola del cibo e gentilmente, ma con fermezza, tenta di spostare la testa del cane

fuori dalla ciotola per tre secondi (vedi foto 3-12). Ripete la manualità una sola volta per i cani sopra i quattro mesi.

Viene valutato se il cane scodinzola, è tranquillo, alza la testa dalla ciotola spontaneamente o lascia che venga allontanata dalla ciotola facilmente (A), se si irrigidisce o mangia più velocemente, ma comunque si lascia allontanare la testa dalla ciotola (B), se mangia velocemente, controlla l'operatore con la coda dell'occhio e difficilmente si riesce ad allontanargli la testa dalla ciotola (C), se si irrigidisce, tenta di bloccare l'accesso alla ciotola ed è impossibile allontanarlo (D), se si dimostra aggressivo (F). Si ripete la prova se non si dimostra interessato al cibo.

3.4.10) Gioco / eccitabilità / recupero:



Foto 3-13: gioco

L'operatore coinvolge il cane nel gioco. È importante che agisca in maniera eccitata: trascinando il giocattolo sul pavimento, spostandolo avanti e indietro e in circolo per attirare il cane a giocare. Se il cane gioca, tirando, l'operatore aumenta l'intensità del gioco. Se il cane si agita molto, non va calmato. Il gioco consiste nel muovere il giocattolo da un lato all'altro e su e giù. L'operatore deve tentare di sollevare le zampe del cane dal terreno un paio di volte.

Dopo due minuti, lascia il gioco al cane, smettendo improvvisamente di giocare e si allontana. Quindi, toglie il gioco al cane (se necessario usando l'Assess-a-Hand), poi si siede e ignora il cane per due minuti. Deve ripetere la prova, ma coinvolgendo il cane in un gioco di inseguimento invece che di tiro alla fune. E di nuovo ferma il gioco dopo due minuti, si allontana, prende il gioco al cane e quindi si siede ignorandolo. Per la valutazione si presta attenzione se il cane gioca in modo controllato e se si ferma quando l'operatore smette di giocare, calmandosi velocemente (A), se dimostra scarso interesse verso il gioco, probabilmente è troppo spaventato o calmo e lascia che il gioco gli sia preso facilmente (B), durante il gioco si entusiasma molto, si calma lentamente e può non voler lasciare il giocattolo, ma senza diventare aggressivo (C), se gioca in

modo violento, si calma con difficoltà, non vuole lasciare il gioco e si irrigidisce quando questo viene preso (D), se diventa aggressivo (F).

3.4.11) Reattività alla manipolazione:

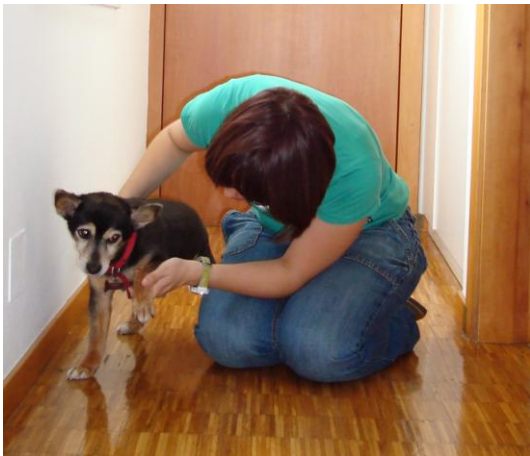


Foto n. 3-14: Manipolazione arto

L'operatore accarezza gentilmente le orecchie del cane, fa scorrere la mano lungo tutta la lunghezza della coda e tocca delicatamente una zampa anteriore e una posteriore.

Si controlla se l'animale è facile da esaminare, tollerante, rilassato (A), se si divincola o si oppone in qualche modo, ma rimane socievole (B), se è difficile da esaminare perché si divincola molto (C), se si irrigidisce e si gira di scatto verso la mano dell'operatore (D), se si dimostra aggressivo (F).



Foto n. 3-15: Manipolazione orecchie

3.4.12) Valutazione:

Nella valutazione finale si esegue la somma dei risultati delle varie prove. Il cane può passare il test con un voto finale complessivo che va da A a D, calcolato dal punteggio più rappresentato nelle varie prove, mentre se manifesta segni di aggressività (scoprendo i denti, ringhiando o tentando di mordere l'operatore) in una qualsiasi parte del test, lo fallisce e viene quindi valutato con una F. Nella scheda di valutazione (vedi allegato 1) è prevista una parte finale riservata ai commenti, per dare spazio all'operatore di annotare ulteriori caratteristiche del cane, non previste dalla scheda di valutazione del test.

La scheda di valutazione usata per questo test è riportata in allegato 1.

3.5) Cortisolo

3.5.1) Raccolta dei Campioni

Per lo svolgimento di questo lavoro sono stati utilizzati campioni di plasma di cane. I campioni sono stati raccolti presso il canile sanitario di Selvazzano. Per ciascun cane esaminato sono stati raccolti due campioni di plasma: uno durante il secondo giorno dall'ingresso al canile e l'altro al decimo giorno. Sono stati prelevati per ogni soggetto 5 ml di sangue in provette contenenti EDTA (acido etilendiaminotetracetico). Dopo il prelievo, il sangue è stato centrifugato a 2500 rpm per 10 minuti e il plasma così ottenuto stoccato a -20°C fino al momento delle analisi.

Sono stati esaminati 34 soggetti (vedi tabella n. 3-4), per un totale di 66 prelievi (per due cani è stato effettuato un singolo prelievo al giorno 2, in un caso perché l'animale era molto aggressivo e nell'altro perché il cane era stato restituito al proprietario). Di questi cani 20 erano maschi e 14 femmine, di età compresa tra i 2 mesi e i 9 anni (media=2,45 anni). L'età è stata stimata dai veterinari della struttura sulla base di caratteristiche morfologiche dell'animale, soprattutto tramite valutazione dello stato dei denti.

N. lab	N. Cane	Data	Sesso	Eta'	Razza
Pre	1	14/11/2006	M	5 anni	Meticcio
Post	1	22/11/2006	M	5 anni	Meticcio
Pre	2	14/11/2006	F	2 anni	Meticcio
Post	2	22/11/2006	F	2 anni	Meticcio
Pre	3	15/11/2006	F	10 mesi	Meticcio
Post	3	23/11/2006	F	10 mesi	Meticcio
Pre	4	04/12/2006	M	5 anni	Meticcio
Post	4	12/12/2006	M	5 anni	Meticcio
Pre	5	04/12/2006	F	3 mesi	Meticcio
Post	5	12/12/2006	F	3 mesi	Meticcio
Pre	6	04/12/2006	F	3 mesi	Meticcio
Post	6	12/12/2006	F	3 mesi	Meticcio
Pre	7	05/12/2006	M	4 anni	Meticcio
Post	7	13/12/2006	M	4 anni	Meticcio
Pre	8	21/03/2007	M	3 mesi	Meticcio
Post	8	29/03/2007	M	3 mesi	Meticcio
Pre	9	16/04/2007	F	6 mesi	Meticcio
Post	9	24/04/2007	F	6 mesi	Meticcio
Pre	10	18/04/2007	F	4 mesi	Meticcio
Post	10	26/04/2007	F	4 mesi	Meticcio
Pre	11	28/03/2007	M	7 anni	Meticcio
Post	11	05/04/2007	M	7 anni	Meticcio
Pre	12	07/05/2007	M	2 mesi	Meticcio
Post	12	15/05/2007	M	2 mesi	Meticcio
Pre	13	07/05/2007	F	2 mesi	Meticcio
Post	13	15/05/2007	F	2 mesi	Meticcio
Pre	14	09/05/2007	F	1,5anni	Meticcio
Post	14	17/05/2007	F	1,5anni	Meticcio
Pre	15	09/05/2007	M	4 anni	Meticcio
Post	15	17/05/2007	M	4 anni	Meticcio
Pre	16	22/05/2007	M	1,5anni	Meticcio
Post	16	30/05/2007	M	1,5anni	Meticcio
Pre	17	23/05/2007	M	2 anni	Meticcio
Post	17	31/05/2007	M	2 anni	Meticcio
Pre	18	05/06/2007	M	6 mesi	Meticcio
Post	18	13/06/2007	M	6 mesi	Meticcio
Pre	19	05/06/2007	M	4,5anni	Meticcio
Post	19	13/06/2007	M	4,5anni	Meticcio
Pre	20	25/06/2007	M	1,5anni	Meticcio
Post	20	03/07/2007	M	1,5anni	Meticcio
Pre	21	25/06/2007	F	6 mesi	Meticcio
Post	21	03/07/2007	F	6 mesi	Meticcio
Pre	22	28/06/2007	M	9 mesi	Meticcio
Post	22	06/07/2007	M	9 mesi	Meticcio
Pre	23	03/07/2007	M	4,5anni	Meticcio
Pre	24	02/07/2007	M	5,5anni	Meticcio
Post	24	10/07/2007	M	5,5anni	Meticcio
Pre	25	02/07/2007	M	4 mesi	Meticcio

N. lab	N. Cane	Data	Sesso	Eta'	Razza
Post	25	10/07/2007	M	4 mesi	Meticcio
Pre	26	04/07/2007	F	3 mesi	Meticcio
Post	26	12/07/2007	F	3 mesi	Meticcio
Pre	27	04/07/2007	M	4,5anni	Meticcio
Post	27	12/07/2007	M	4,5anni	Meticcio
Pre	28	02/10/2007	F	7 anni	Segugio
Post	28	10/10/2007	F	7 anni	Segugio
Pre	29	03/10/2007	M	9 anni	Meticcio
Post	29	11/10/2007	M	9 anni	Meticcio
Pre	30	09/10/2007	F	1 anno	Meticcio
Post	30	17/10/2007	F	1 anno	Meticcio
Pre	31	09/10/2007	F	5 anni	Segugio
Post	31	17/10/2007	F	5 anni	Segugio
Pre	32	11/10/2007	M	1,5anni	Meticcio
Post	32	19/10/2007	M	1,5anni	Meticcio
Pre	33	10/10/2007	F	3 mesi	Segugio
Pre	34	16/10/2007	M	2 anni	Meticcio
Post	34	24/10/2007	M	2 anni	Meticcio

Tabella n.3-4: elenco dei cani su cui è stato effettuato il prelievo

3.5.2) Analisi radioimmunologica (RIA)

Il dosaggio del cortisolo sui campioni è stato eseguito presso il laboratorio di Fisiologia del Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie. Il metodo di dosaggio usato è stato validato presso questo laboratorio.

È stata usata la metodica RIA in quanto adatta a misurare minime quantità di sostanze, presenti anche nell'ordine di nanogrammi o picogrammi, e dotata di elevata specificità e sensibilità, grazie all'uso di un anticorpo specifico che identifica e lega selettivamente la sostanza che si vuole misurare.

La metodica RIA si basa sulla competizione tra le molecole di antigene libero non marcato (Ag) con quelle dell'antigene marcato (Ag*), per un anticorpo specifico (Ab) comune (vedi Figura 3-1).

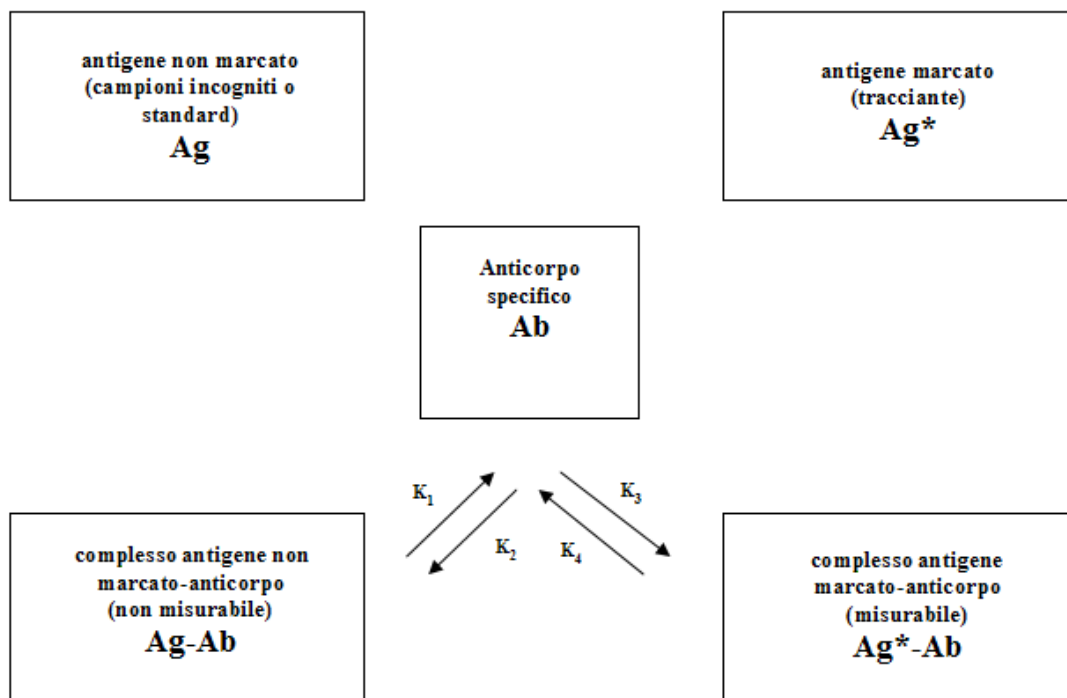


Figura n. 3-1: Rappresentazione schematica della reazione di competizione per l'anticorpo specifico (Ab) tra l'antigene marcato (Ag*) e non marcato (Ag).

Alla base di un dosaggio RIA vi sono alcune condizioni fondamentali:

1. l'anticorpo (Ab) è presente sempre in quantità costante ed in difetto, allo scopo di innescare la competizione tra antigene incognito (Ag) e antigene marcato (Ag*);
2. il tracciante (Ag*) è sempre in quantità costante e nota;
3. l'antigene standard e incognito devono avere la stessa struttura chimica e la reazione deve avvenire per entrambi in identiche condizioni;
4. il processo di marcatura dell'antigene non deve determinare nella molecola variazioni della sua struttura, tali da determinare variazioni delle costanti di affinità;
5. il metodo di separazione delle quote di immunocomplessi legati e liberi non deve alterare in maniera significativa quello che è l'equilibrio della reazione.

Si può usare come tracciante radioattivo una molecola iodinata (^{125}I) o triziata (^3H). Affinchè la reazione immunologica raggiunga l'equilibrio è necessario un periodo di incubazione a temperatura costante, si formano quindi i due immunocomplessi Ag-Ab e Ag*-Ab, mentre una quota di analita e di tracciante rimangono liberi. Separata la frazione di antigene marcato libero, quello legato all'anticorpo viene usato per il conteggio della radioattività: maggiore è la quantità di antigene non marcato presente,

minore è la quantità del complesso Ag^*-Ab che si forma e quindi della radioattività contata. La concentrazione di analita incognito è ricavata tramite una curva di taratura, realizzata inserendo quantità note, crescenti, di antigene non marcato (standard).

In questo studio è stata usata la metodica RIA in fase solida, cioè su una micropiastra in polistirene a 96 pozzetti (vedi dopo). La procedura prevede che vengano fatti adsorbire sulla superficie dei pozzetti anticorpi anti-IgG di coniglio (II-Ab), prodotti nella capra. In seguito si aggiunge un altro anticorpo specifico anti-cortisolo (I-Ab), prodotto nel coniglio, in modo che si formi un complesso IIAb-IAb. Quindi si aggiungono l'antigene standard, il campione incognito ed il tracciante radioattivo. Si fa incubare la piastra a una temperatura costante di 4°C perchè si formino gli immunocomplessi: Ag/Ab -anti-cortisolo e Ag^*/Ab -anti-cortisolo, in equilibrio dinamico tra loro e con gli antigeni ancora liberi nella soluzione (Ag e Ag^*). Tracciante e antigeni liberi sono quindi eliminati tramite dei lavaggi della piastra, mentre i complessi $Ab-Ag$ e $Ab-Ag^*$ rimangono ben adesi alle pareti dei pozzetti e si può quindi quantificare la radioattività del complesso $Ab-Ag^*$. La radioattività viene letta tramite un β -counter e confrontata a curve standard di riferimento (in cui l'antigene non marcato standard è presente in concentrazione nota).

Nel presente studio è stata usata la seguente sequenza di lavoro:

- 1 adsorbimento dell'anticorpo anti-IgG di coniglio alla micropiastra;
- 2 incubazione con l'anticorpo specifico anti-cortisolo;
- 3 estrazione degli steroidi non coniugati dai campioni di plasma;
- 4 allestimento della curva di taratura;
- 5 incubazione con il campione e gli standard;
- 6 separazione libero-legato;
- 7 conteggio della radioattività;
- 8 elaborazione dei dati.

3.5.2.1) Adsorbimento dell'anticorpo anti-IgG di coniglio alla micropiastra (II-Ab).

Si è usato un antisiero, contenente anti-IgG di coniglio (Anti-Rabbit RGG). Questo è stato diluito 1:1000 con tampone sodio acetato (0,15 mM, pH 9) ed è stato distribuito in

94 pozzetti (200 µl/pozzetto). Dopo un'incubazione a + 4°C per 24 ore, la piastra è stata svuotata e a ciascun pozzetto sono stati aggiunti 200 µl di tampone RIA (Ph 7.2).

Il tampone RIA è costituito da:

- Na₂HPO₄·12H₂O (21,85 g/l),
- NaH₂PO₄·H₂O (4,38 g/l),
- NaCl (9 g/l).

I sali sono stati sciolti in un litro d'acqua distillata; al momento dell'uso si è aggiunta BSA (albumina bovina sierica) allo 0,1%.

Dopo un ulteriore periodo d'incubazione (1 ora, a 4°C), la piastra è stata nuovamente svuotata, rilavata con tampone RIA e mantenuta ad una temperatura di -20°C per un massimo di 3 settimane.

3.5.2.2) Incubazione con l'anticorpo specifico (I-Ab).

Per questo studio sono stati utilizzati anticorpi anti-cortisolo-CMO Rabbit (Byogenesys A907/R1Y) alla diluizione 1:20000.

Nei pozzetti contenenti IAb sono stati aggiunti 200 µl di antisiero e si è lasciata la piastra ad incubare per 24 ore a 4°C, tranne nei pozzetti destinati ad indicare l'attività totale (AT) e il *Non Specific Bound* (NSB),.

Le caratteristiche di specificità (*cross reactivity*) degli anticorpi anti-cortisolo sono le seguenti: cortisolo 100%, prednisolone 44,3%, 11-desossicortisolo 13,9%, cortisone 4,95%, corticosterone 3,5%, prednisone 2,7%, 17-idrossiprogesterone 1%, 11-desossicorticosterone 0,3%, desametasone 0,1%, progesterone < 0,01%, 17-idrossipregnenolone < 0,01%, pregnenolone < 0,01%.

3.5.2.3) Estrazione del cortisolo dal plasma.

Il cortisolo è un ormone steroideo e pertanto lipofilo, quindi si scioglie bene nei solventi organici. Tra i vari solventi, l'etere dietilico è risultato il migliore nell'estrarre gli steroidi senza denaturarne la struttura chimica.

Dai campioni di plasma stoccati sono stati prelevati 50 µl ciascuno a cui sono stati

aggiunti 8 ml di etere dietilico. Le provette sono quindi state fatte agitare per 15 minuti a temperatura ambiente, per permettere al solvente di estrarre efficacemente gli steroidi. In seguito, sono state centrifugate a 2500 giri per 5 minuti a 5 °C e infine messe a congelare in freezer a – 20°C per 24 ore.

Il surnatante ottenuto, dopo essere stato separato dalla fase solida congelata, è stato decantato in provette coniche di vetro e portato a secco sotto corrente d'azoto. In ciascuna provetta è stato poi aggiunto 1 ml di etere dietilico, per lavare le pareti, e di nuovo tutte le provette sono state portate a secco. Il residuo secco è stato ripreso quindi con 500 µl di tampone RIA+BSA ed agitato su agitatore orizzontale per 10 minuti.

3.5.2.4) Allestimento della curva di taratura

Per conoscere le quantità degli steroidi presenti nei campioni è necessario costruire una curva di taratura con dei riferimenti standard a cui poi confrontare i risultati ottenuti dai campioni..

La curva viene creata utilizzando delle soluzioni, appositamente preparate, con quantità note e decrescenti di analita standard (Hydrocortisone SIGMA H-4001).

I punti di curva sono stati preparati partendo dalla concentrazione di 100 ng/ml di steroide in etanolo (SOL C) diluita successivamente con tampone RIA+BSA (vedi tabella n. 3-5). Di ognuna di queste soluzioni vengono dosati 50 µl per pozzetto, in doppio.

40 µl sol C (100 ng/ml) + 960 µl RIA buffer	C7	200 pg/50 µl
300 µl C7 + 300 µl RIA buffer	C6	100 pg/50 µl
300 µl C6 + 300 µl RIA buffer	C5	50pg/50µl
300 µl C5 + 300 µl RIA buffer	C4	25 pg/50 µl
300 µl C4 + 300 µl RIA buffer	C3	12.5 pg/ 50 µl
300 µl C3 + 300 µl RIA buffer	C2	6.25 pg/50 µl
300 µl C2 + 300 µl RIA buffer	C1	3.125 pg/50 µl

Tabella n. 3-5: Soluzioni della curva di taratura

3.5.2.5) Incubazione di campione e standard.

La piastra, che contiene l'Ab specifico in tutti i pozzetti tranne in AT e in NSB, viene lavata per quattro volte con il tampone RIA+BSA (200 µl/pozzetto), in seguito viene svuotata, asciugata e infine allestita per l'incubazione (vedi tabella n. 3-6). Infine viene agitata a bassa velocità per tre minuti, chiusa con pellicola trasparente e lasciata incubare per 24 ore a 4°C.

Come tracciante è stato usato: 1,2,6,7-³H cortisolo della ditta Duport Nen. Ogni steroide marcato era stato precedentemente diluito in etanolo assoluto per formare la cosiddetta "stock solution", ed è stato ulteriormente diluito con il tampone RIA+BSA, a formare la "working solution", in modo tale che in 10 µl (volume di lavoro) fossero presenti circa 6000 CPM (colpi per minuto).

	AT	NBS	Co	Curva	Controllo	Campioni
Tampone RIA	-	200 µl	200 µl	150 µl	100 µl	100 µl
Standard	-	-	-	50 µl	-	-
Campione	-	-	-	-	-	100 µl
Controllo	-	-	-	-	100µl	-
Tracciante*	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
TOT	10 µl	210 µl	210 µl	210 µl	210 µl	210 µl

Tabella n.3-6: Volumi d'incubazione per l'allestimento della piastra.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AT	AT	100	100	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.
B	NSB	NSB	200	200	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.
C	C0	C0	CTRL	CTRL	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.
D	3	3	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.
E	6	6	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.
F	12	12	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.
G	25	25	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.
H	50	50	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.	Camp.

Figura n.3-2: micropiastra a 96 pozzetti

AT (attività totale): pozzetto che non contiene nessun anticorpo e che non verrà lavato, qui viene inserito solo il tracciante radioattivo (Ag*). Quindi qui il contatore leggerà la quantità massima di radioattività.

NSB (legame non specifico): oltre all'Ag*, è presente anche l'anticorpo secondario (IIAb). Quindi se il contatore dovesse registrare un'attività in questo pozzetto, c'è la possibilità che ci sia stato un legame non specifico senza alcuna relazione con la presenza di cortisolo.

C0: Oltre all'Ag* e all'anticorpo secondario, in questi pozzetti, è presente anche l'Ab-anti-cortisolo (IAb), ma manca l'analita.

3-200: si riferisce alla curva di taratura, sono infatti quei pozzetti in cui l'antigene non marcato standard è presente ad una concentrazione nota e i risultati ottenuti in questi pozzetti saranno poi confrontati dal computer con quelli dei campioni per determinare la loro concentrazione.

CTRL (Controllo): è stato utilizzato del plasma bovino per determinare la ripetibilità inter-saggio delle analisi

3.5.2.6) Separazione legato-libero.

Terminate le 24 ore di incubazione, si procede alla separazione tra Ag e Ag* liberi e quelli legati all'anticorpo. Fatta eccezione per il pozzetto AT, viene aspirata la fase liquida, in modo da allontanare le frazioni ancora libere di Ag e Ag*, quindi i pozzetti vengono lavati per quattro volte consecutive con tampone RIA+BSA), poi sempre eliminato per aspirazione.

3.5.2.7) Conteggio della radioattività ed elaborazione.

Infine la piastra viene preparata per il conteggio della radioattività. Ad ogni pozzetto sono aggiunti 200 µl di liquido scintillante (Microscint 20 – Packard), la piastra viene quindi sigillata con l'apposita pellicola termosaldabile (Topseal S – Packard) e infine messa nel β -counter (Topcount – Packard) che elabora al termine della lettura per ciascuna piastra la curva di taratura e fornisce direttamente i risultati dell'analisi.

3.6) Analisi statistica:

Sui dati raccolti è stata prima eseguita un'analisi descrittiva per avere una visione complessiva del campione, quindi i dati raccolti sono stati analizzati con il Software Statistica 8.0 (Statsoft Inc.).

Per i dati sul comportamento complessivo è stata svolta una GLM per misure ripetute per tenere conto del disegno sperimentale che era diviso in due periodi di osservazione. Le variabili considerate sono state il periodo (2 livelli), il comportamento (9 livelli rappresentanti le 9 categorie comportamentali, mutuamente esclusive, prese in esame) e infine la caratteristica del soggetto di interesse (età o genere, che non sono state analizzate in un'unica GLM a causa delle dimensioni relativamente ridotte del campione).

Le differenze in stazione totale e decubito totale sono state analizzate mediante test U Mann-Whitney (sesso) e ANOVA Kruskal-Wallis (classe di età).

Per quanto riguarda i comportamenti considerati segnale di stress e il cortisolo plasmatico sono stati usati più tipi di analisi a seconda che si considerasse il genere o la classe d'età. Per vedere se c'erano delle differenze significative nei due sessi si è usato il test U Mann-Whitney per i dati non distribuiti normalmente e il t test per quelli distribuiti normalmente. Nell'analisi delle classi d'età si è usato l'ANOVA Kruskal-Wallis per i dati non distribuiti normalmente e l'ANOVA a una via per quelli distribuiti normalmente. Per controllare le correlazioni tra i comportamenti indicatori di stress, il cortisolo, le differenze tra periodo uno e due e l'età si è usata la correlazione per ranghi di Spearman per i dati non distribuiti normalmente e la correlazione di Pearson per quelli che presentavano distribuzione normale.

Infine, per valutare le differenze di *sex ratio* tra i gruppi di cani delle diverse classi di

età, sono stati eseguiti test χ^2 .

In tutti i casi alfa è stato posto uguale a 0,05.

Capitolo 4:

Risultati e Discussione

4.1) Analisi del campione:

Dei 34 cani presi in esame, uno è stato restituito ai proprietari, tra il quinto e il nono giorno dall'entrata nella struttura e quattro sono stati sterilizzati al decimo giorno anziché al dodicesimo. Solo 29 cani, quindi, hanno potuto completare l'intero iter previsto dal protocollo, che prevedeva osservazioni fino all'undicesimo giorno di permanenza al canile.

Per l'analisi del comportamento complessivo sono stati utilizzati i dati dei 29 cani di cui si disponeva di tutte e sei le osservazioni comportamentali. Tutti i cani invece sono stati usati nell'analisi dello stress nel primo periodo di permanenza in canile, mentre per il secondo periodo si sono inclusi solo quei 29 cani che erano rimasti in canile per tutto il tempo previsto dal protocollo. I due prelievi di sangue per la determinazione della cortisolemia sono stati effettuati su tutti i cani, tranne su quello restituito ai proprietari e su un altro animale che era risultato essere troppo aggressivo (32 cani). Il test comportamentale è stato eseguito su tutti i cani, tranne su quello restituito ai proprietari, su uno dei cani sterilizzati al decimo giorno (sugli altri tre è stato eseguito con qualche giorno di ritardo, prima del passaggio all'altro canile) e su altri tre cani che sono risultati essere troppo aggressivi per poter eseguire il test (29 cani, per maggiori dettagli, vedere tabella n. 4-1).

#	Nome	Gene- re	Età	Clas- se d'età	Osservazioni comporta- mentali	Corti- solo	Test Compor- tamen- tale	Analisi del compor- tamento comples- sivo	Analisi dello stress
1	Sgombro	M	5 anni	3	Si	Si	Si	Si	Si
2	Maggie	F	2 anni	2	Si	Si	Si	Si	Si
3	Mina	F	10 mesi	2	Solo fino al 10° giorno	Si	No	No	Solo per il 1° periodo
4	Roll	M	5 anni	3	Si	Si	Si	Si	Si
5	Nero	F	3 mesi	1	Si	Si	Si	Si	Si
6	Fulvo	F	3 mesi	1	Si	Si	Si	Si	Si
7	Flipper	M	4 anni	3	Si	Si	Si	Si	Si
8	Billy	M	3 mesi	1	Si	Si	Si	Si	Si
9	Pagge	F	6 mesi	1	Si	Si	Si	Si	Si
10	Sally	F	4 mesi	1	Si	Si	Si	Si	Si
11	Miro	M	7 anni	3	Si	Si	No	Si	Si
12	Lolo	M	2 mesi	1	Solo fino al 10° giorno	Si	Si	No	Solo per il 1° periodo
13	Lola	F	2 mesi	1	Solo fino al 10° giorno	Si	Si	No	Solo per il 1° periodo
14	Mami	F	1,5 anni	2	Solo fino al 10° giorno	Si	Si	No	Solo per il 1° periodo
15	Biondo	M	4 anni	3	Si	Si	Si	Si	Si
16	Rufus	M	1,5 anni	2	Si	Si	Si	Si	Si
17	Bianco	M	2 anni	2	Si	Si	Si	Si	Si
18	Rosso	M	6 mesi	1	Si	Si	Si	Si	Si
19	Bug	M	4,5 anni	3	Si	Si	Si	Si	Si
20	Hansel	M	1,5 anni	2	Si	Si	Si	Si	Si
21	Gretel	F	6 mesi	1	Si	Si	Si	Si	Si
22	Atomo	M	9 mesi	2	Si	Si	Si	Si	Si
23	Rambo	M	4,5 anni	3	Si	Solo 1° prelievo	No	Si	Si
24	Billo	M	5,5 anni	3	Si	Si	Si	Si	Si
25	Dick	M	4 mesi	1	Si	Si	Si	Si	Si
26	Betty	F	3 mesi	1	Si	Si	Si	Si	Si
27	Dom	M	4,5 anni	3	Si	Si	Si	Si	Si
28	Farina	F	7anni	3	Si	Si	Si	Si	Si
29	Argo	M	9 anni	3	Si	Si	No	Si	Si
30	Volpe	F	1 anno	2	Si	Si	Si	Si	Si
31	Selva	F	5 anni	3	Si	Si	Si	Si	Si
32	Tom	M	1,5 anni	2	Si	Si	Si	Si	Si
33	Furia	F	3 mesi	1	Solo fino al 4° giorno	Solo 1° prelievo	No	No	Solo per il 1° periodo
34	Tommy	M	2 anni	2	Si	Si	Si	Si	Si

Tab. n.4-1: Elenco degli animali osservati nel corso dello studio e di quali parti di protocollo hanno completato.

Dei 34 cani, i cui dati sono stati utilizzati nello studio, 14 erano femmine intere e 20 maschi interi. I soggetti, 4 segugi e 30 meticci, erano di età compresa tra i due mesi e i nove anni, con un'età media di 2,45 anni.

I cani sono stati divisi in tre fasce d'età (vedi grafico n. 4-1):

1. fino ai sei mesi: dodici cani di cui otto femmine e quattro maschi;
2. dai sei mesi ai due anni: dieci cani di cui quattro femmine e sei maschi;
3. oltre i due anni: dodici cani di cui due femmine e dieci maschi.

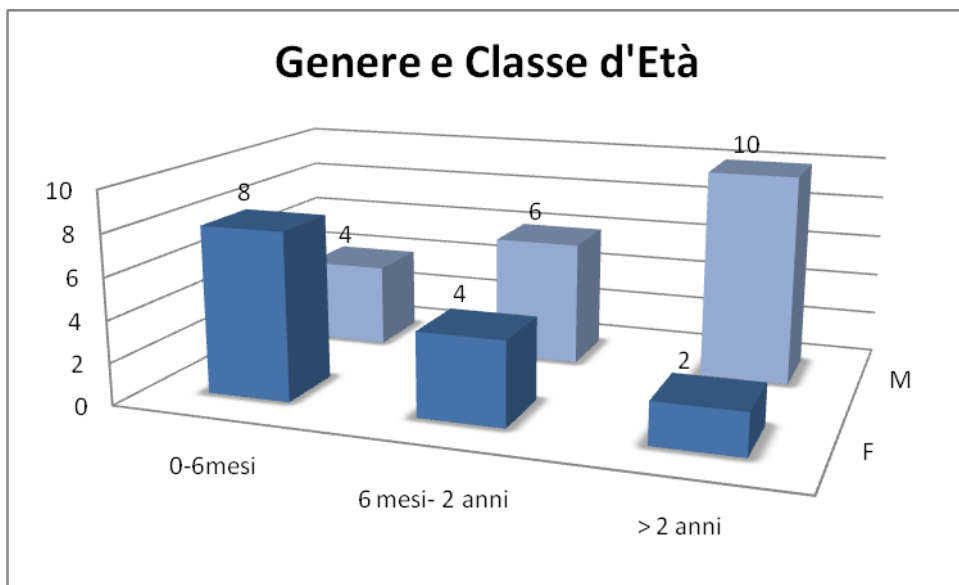


Grafico n. 4-1: Distribuzione secondo età e genere dei 34 cani esaminati

Vi è quindi una differenza significativa ($\chi^2=6,20$; $p=0,045$) tra classi d'età nella prevalenza di un genere sull'altro: nella classe 1 le femmine sono il doppio rispetto ai maschi, nella classe 2 i maschi sono prevalenti essendo una volta e mezzo maggiori rispetto alle femmine e nella classe 3 i maschi superano le femmine con un numero cinque volte maggiore.

Considerando solo i 29 cani che hanno completato l'iter previsto dal protocollo, 10 sono femmine intere e 19 sono maschi interi. L'età media è di 2,77 anni.

La divisione in classi d'età per i 29 cani che hanno completato il protocollo sperimentale è la seguente (vedi grafico n. 4-2):

1. fino ai sei mesi: nove cani di cui sei femmine e tre maschi;
2. dai sei mesi ai due anni: otto cani di cui due femmine e sei maschi;
3. oltre i due anni: dodici cani di cui due femmine e dieci maschi.

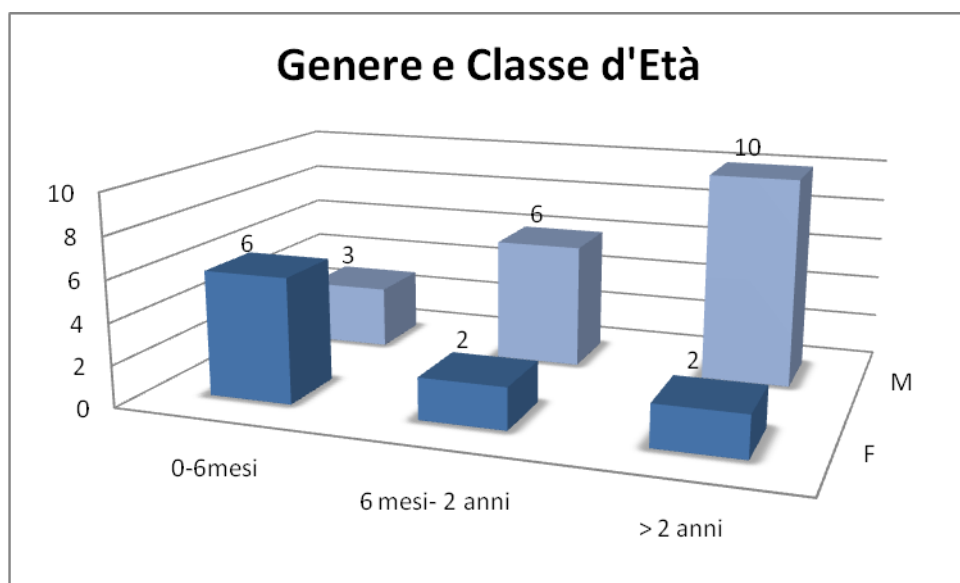
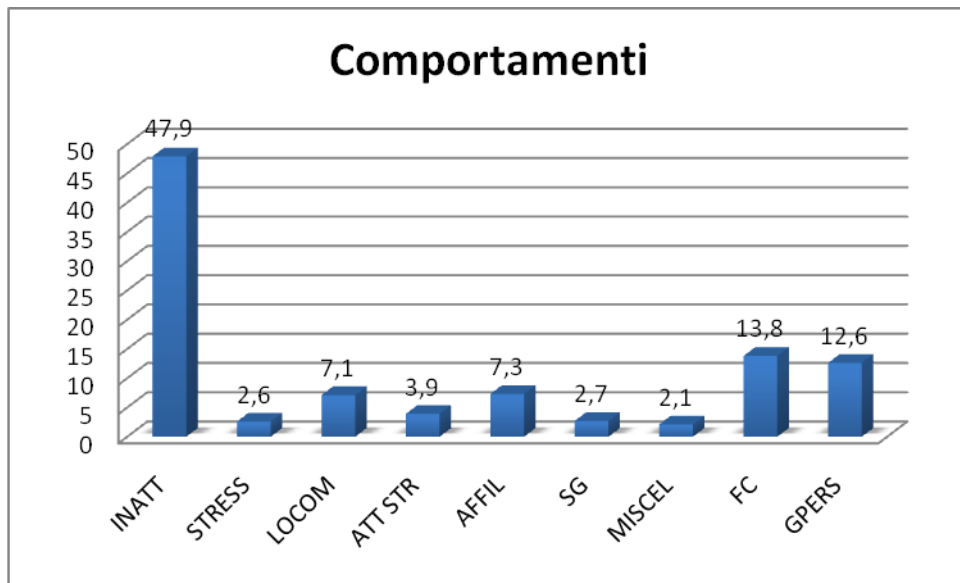


Grafico n. 4-2: Distribuzione secondo età e genere dei 29 cani esaminati per l'intero iter previsto dal protocollo

Anche in questo caso vi è una differenza significativa ($\chi^2=6,13$; $p=0,043$) tra classi d'età nella prevalenza di un genere sull'altro: le femmine sono in numero doppio rispetto ai maschi nella classe 1, mentre risultano essere minori (un terzo e un quinto rispettivamente) nelle classi 2 e 3.

4.2) Analisi complessiva dei comportamenti rilevati in box

Come precedentemente accennato, l'analisi sul comportamento complessivo è stata condotta sui 29 cani che avevano completato tutte le osservazioni comportamentali. Le principali categorie di comportamenti sono state elencate nell'etogramma (tab. 3-3). I comportamenti maggiormente espressi dagli animali nell'intero periodo di osservazioni durante la loro permanenza in canile sono rimanere inattivi (47,9% nei due periodi), restare nascosti (13,8%), guardare le persone (12,6%), comportamenti di tipo affiliativo (7,3%) e locomotorio (7,1%). Gli altri comportamenti analizzati comprendono quelli riguardanti lo stress (2,6%), l'attività esplorativa verso le strutture (3,9%), il *self-grooming* (2,7%) e le altre attività (2,1%) (vedi grafico n. 4-



3).

Grafico n.4-3: Comportamenti espressi dai cani nei due periodi considerati (in percentuale). Att Str= attività esplorativa verso le strutture, SG= self grooming, Miscel= altro, FC= non visibile all'operatore, GPers= guarda le persone.

Si è notato come tra primo e secondo periodo comportamenti come inattività (49,9% vs 46%) e guardare le persone (15,2% vs 10%) siano diminuiti; mentre gli altri sono tutti aumentati, specialmente comportamenti come l'attività locomotoria (6,4% vs 7,8%), il comportamento affiliativo (6% vs 8,7%) e il restare nascosti (12,4% vs 15,3%) (vedi grafici n. 4-4 e 4-5)

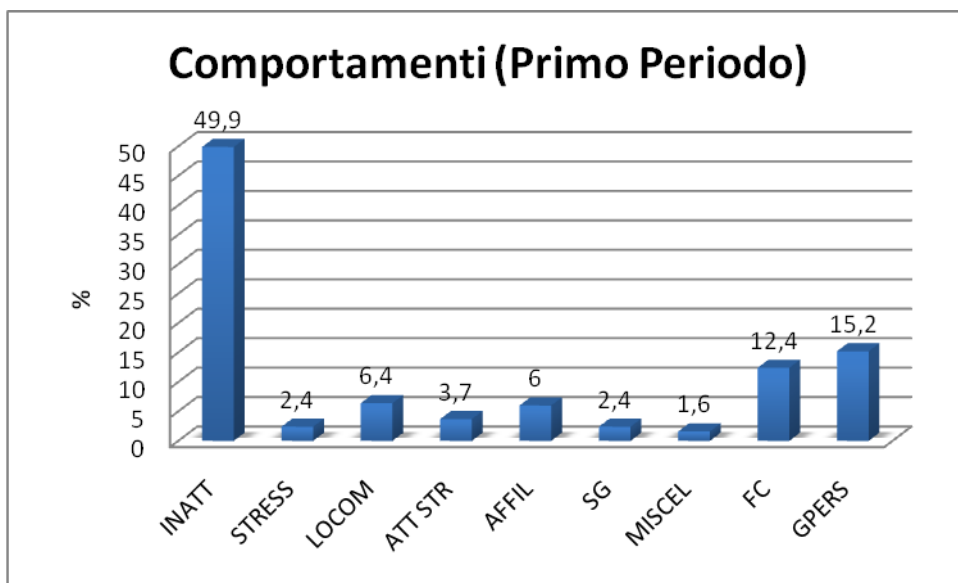


Grafico n. 4-4: Comportamenti espressi dai cani nel primo periodo (in percentuale). Att Str= attività esplorativa verso le strutture, SG= self grooming, Miscel= altro, FC= non visibile all'operatore, GPers= guarda le persone.

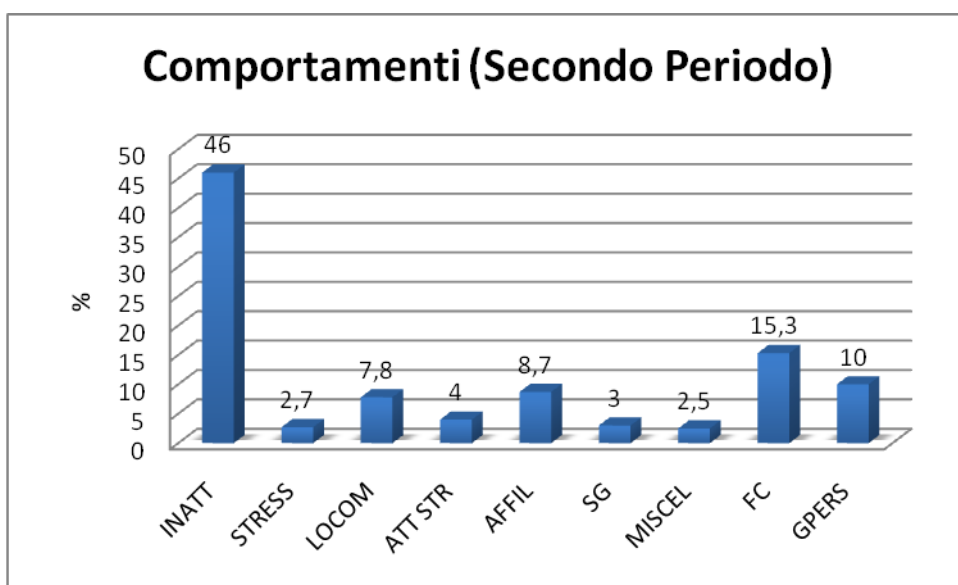


Grafico n.4-5: Comportamenti espressi dai cani nel secondo periodo (in percentuale). Att Str= attività esplorativa verso le strutture, SG= self grooming, Miscel= altro, FC= non visibile all'operatore, GPers= guarda le persone.

Si è osservato, in entrambi i periodi, che le percentuali di decubito e stazione si sono mantenute costanti: il 65% dei comportamenti è stato svolto in decubito, il 24% in stazione. La somma delle due categorie, in stazione e in decubito, non è del 100%, la

percentuale mancante è da attribuire al fuori campo, cioè a quelle situazioni in cui l'animale non era visibile all'osservatore e quindi non si poteva stabilire se il soggetto fosse in decubito o in stazione.

4.2.1) Comportamento e classe d'età

L'analisi dei dati relativi al comportamento rilevato tramite *instantaneous focal sampling* ha messo in luce una differenza significativa tra classi d'età nell'espressione di alcuni comportamenti, quali l'essere fuori campo ($F=3,558$; $p=0,0430$) e il guardare le persone ($F=3,390$; $p=0,0491$). In particolare si è osservato come i cani di età superiore ai due anni risultassero significativamente più spesso fuori campo nel secondo periodo (30,2%) dei cani di età diversa ($p=0,000199$), e che i cani di età inferiore ai sei mesi erano più spesso (8,19%) non visibili all'operatore di cani di età compresa tra sei mesi e due anni (0,7%) ($p=0,000199$) (vedi grafico n. 4-6). In maniera analoga è risultata significativa la differenza tra le tre classi d'età e il guardare le persone ($p=0,0491$; $F=3,390$), infatti si è notato come i cani di età superiore a due anni risultavano guardare le persone nel secondo periodo (6,8%) in misura minore rispetto a cani di età diversa ($p=0,000199$) e che i cani di età inferiore ai sei mesi (10,8%) guardavano le persone meno rispetto ai cani di età compresa tra sei mesi e due anni (13,7%) ($p=0,000199$) (vedi grafico n. 4-7).

Questi risultati sono interessanti anche perché i comportamenti coinvolti, cioè la visibilità e il guardare le persone, possono influenzare l'adottabilità dei cani, infatti, come riportato da Wells e Hepper (1992), le persone che vanno in canile per adottare un cane preferiscono quegli animali che si mostrano visibili e che in qualche modo interagiscono con i visitatori. La poca visibilità dei cani di età superiore a 2 anni, rilevata in questo studio potrebbe essere una delle ragioni per cui i cani più giovani sono preferiti dal pubblico. Una preferenza per l'adozione di cani giovani è stata infatti riscontrata in diversi studi (Lepper et al., 2002; Normando et al., 2006). Secondo lo studio di Lepper e coautori (2002), sono i cani di età inferiore all'anno quelli con la massima probabilità di adozione, mentre per i cani tra uno e due anni questa probabilità si dimezza, per quelli tra i tre e i cinque si riduce ad un terzo ed è bassissima per i cani sopra i cinque anni. Oltre all'età, inoltre, per le persone che cercano un cane in canile, il temperamento, e soprattutto come questo viene percepito dai visitatori del canile, è una caratteristica fondamentale e quindi il modo in cui questi cani si presentano (se

interessati alle persone che visitano il canile o se nascosti alla loro vista) può influire notevolmente sulle decisioni di futuri proprietari. Nel presente studio, i cani di età superiore a due anni sono quelli che stanno più nascosti alla vista e che non dimostrano interesse verso le persone, assumendo così un comportamento che può venir percepito come meno desiderabile, con una conseguente ulteriore diminuzione delle loro possibilità di adozione. Per quanto riguarda il guardare le persone, uno studio (Wells e Hepper, 1999) aveva riscontrato una differenza nel modo in cui i cani di canile di diverso sesso si relazionavano ad uno sconosciuto. Si era visto che, nel secondo minuto di interazione, i cani maschi fissavano le persone più a lungo rispetto alle femmine, soprattutto se chi li osservava era un uomo piuttosto che una donna, ma fino ad ora, non sembrerebbe essere stata descritta una differenza dovuta all'età degli animali.

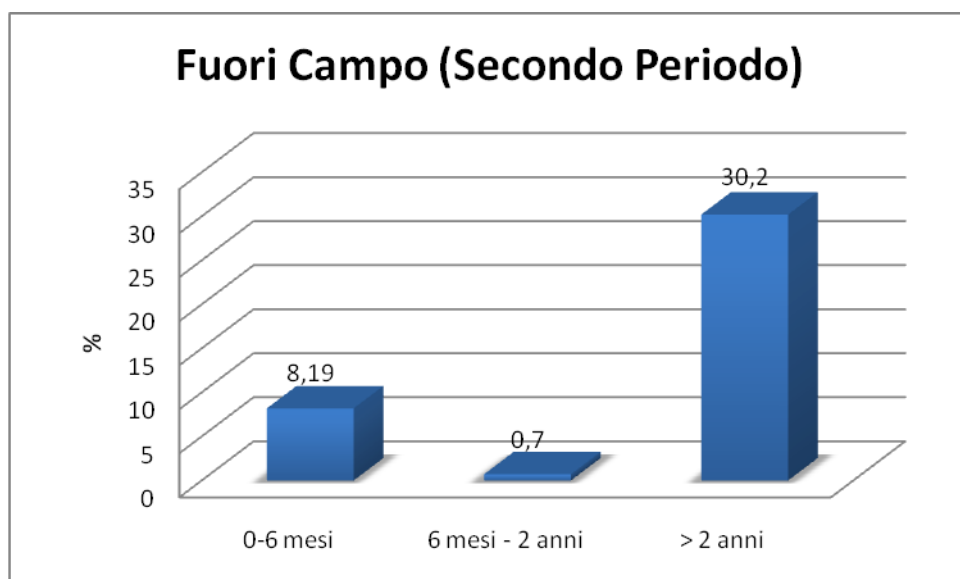


Grafico n.4-6: Percentuale di restare nascosti nel secondo periodo nelle tre classi d'età.

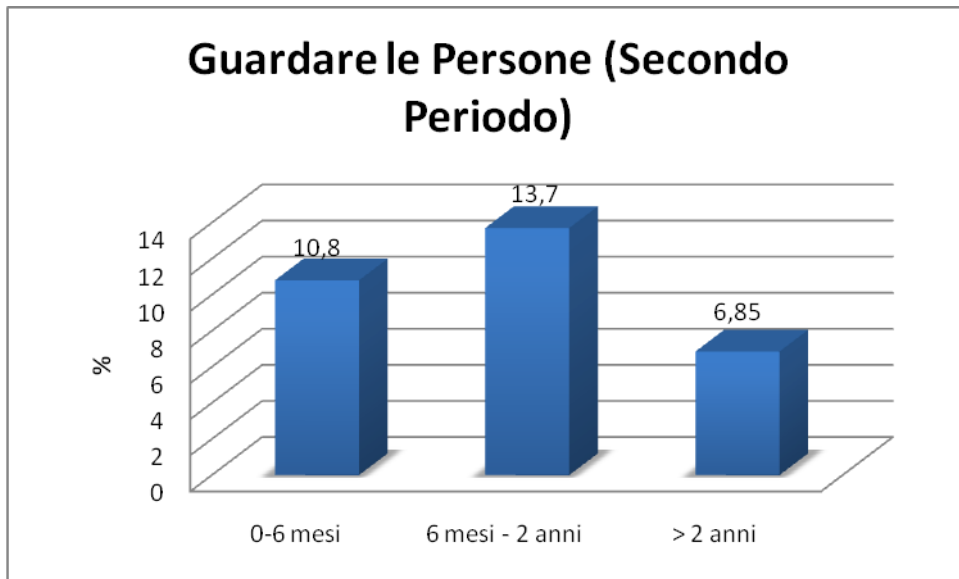


Grafico n.4-7: Percentuale di guardare le persone nel secondo periodo nelle tre classi d'età.

Per le altre variabili esaminate non si sono evidenziate differenze significative ascrivibili all'età.

4.2.2) Comportamento e genere

Per quanto riguarda l'effetto del genere dei soggetti, si è riscontrata una differenza significativa nell'attività esplorativa verso le strutture ($F=5,659$; $p=0,0246$). Si è, infatti, notato come le femmine esprimano questo comportamento in percentuale decisamente maggiore rispetto ai maschi (6,16% vs 2,91%) (vedi grafico n. 4-8).

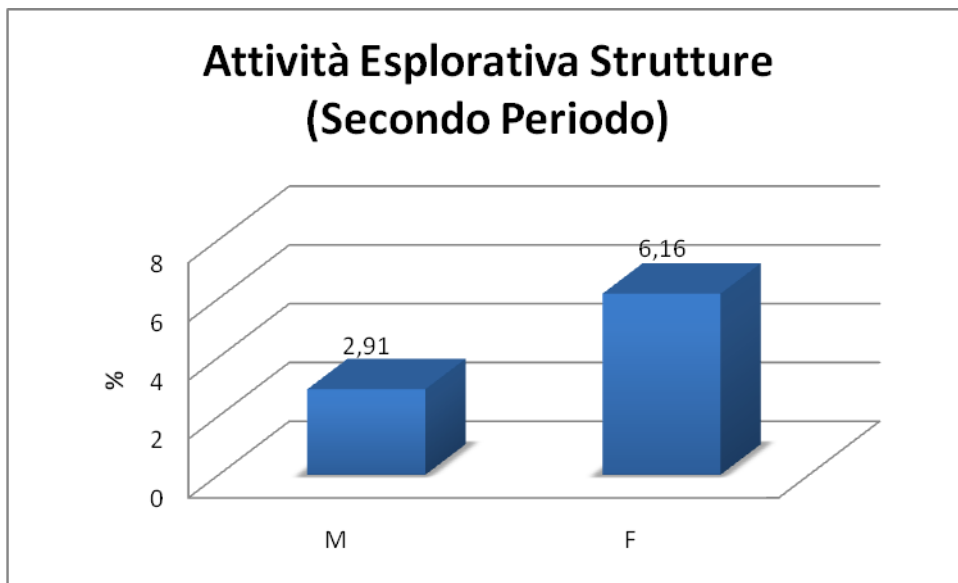


Grafico n.4-8: differenze di genere nell'attività esplorativa verso le strutture nel periodo 2

Le altre variabili esaminate non hanno presentato differenze significative ascrivibili al sesso del soggetto. Questo contrasta con quanto trovato da Wells e Hepper (1999), che hanno riscontrato come i cani maschi guardino di più le persone.

Non è stata riscontrata nessuna differenza invece nella visibilità e nel guardare l'operatore. È quindi da escludere che le differenze riscontrate tra soggetti di età diversa siano attribuibili alla differenza di distribuzione di maschi e femmine nelle varie classi d'età.

4.3) Analisi dei dati riguardanti lo stress

I comportamenti indicatori di stress (leccarsi le labbra, sbadigliare, alzare la zampa, assumere posture basse, camminare in cerchio) sono stati analizzati in maniera più dettagliata, usando i dati di 34 cani, per le analisi riguardanti i dati del primo periodo, e i dati di 29 cani per quelle del secondo periodo e per i confronti tra i due periodi.

Si discuteranno prima i risultati relativi ai dati registrati con la metodica *instantaneous focal animal sampling* ogni 15 secondi, mentre quelli che si riferiscono alla frequenza totale (e.g., *behavioural sampling*: episodi registrati ai *sample points* più quelli registrati durante gli intervalli campione) verranno trattati brevemente in un paragrafo dedicato alla fine del capitolo.

Nel primo periodo (34 cani) i comportamenti di stress maggiormente rappresentati (vedi grafico n. 4-9), considerando i dati del *focal sampling*, sono stati camminare in cerchio (1,02% del totale, 42,7% dei comportamenti di stress nel primo periodo) e leccarsi le labbra (0,65% del totale, 27% dei comportamenti di stress nel primo periodo). Questi due comportamenti sono risultati essere i più frequentemente registrati anche mediante *behavioural sampling*, ancorché in ordine inverso. Tale discrepanza è facilmente spiegabile tenendo conto delle diverse caratteristiche di queste metodiche di osservazione e registrazione del comportamento e di quelle dei comportamenti considerati.

Gli altri comportamenti erano sollevare una zampa (0,3% del totale, 12,4% dei comportamenti di stress), assumere una postura bassa (0,3% del totale, 12,4% dei comportamenti di stress), sbadigliare (0,13% dei comportamenti totali e 5,5% dei comportamenti di stress).

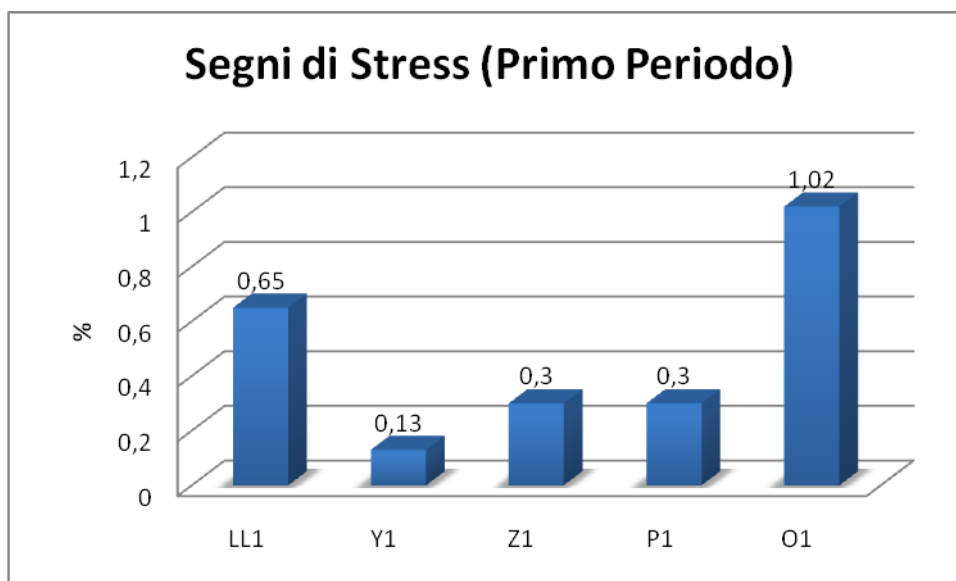


Grafico n. 4-9: Percentuale dei segni comportamentali di stress nel periodo 1 calcolati sul totale di 34 cani (LL=leccarsi le labbra, Y=sbadigliare, Z=sollevare un arto, P=postura bassa, O=camminare in cerchio, 1=periodo 1, *sample points*).

Nel secondo periodo (29 cani), sempre considerando i dati del *focal sampling*, camminare in cerchio aveva una percentuale del 0,88% (che rappresenta il 32,8% dei comportamenti di stress del secondo periodo), leccarsi le labbra aveva una percentuale del 0,77% (28,8% dei comportamenti di stress), sollevare una zampa 0,48% (18% dei comportamenti di stress), assumere una postura bassa 0,33% (12,4% dei comportamenti

di stress) e sbadigliare 0,21% (8% dei comportamenti di stress) (vedi grafico 4-10).

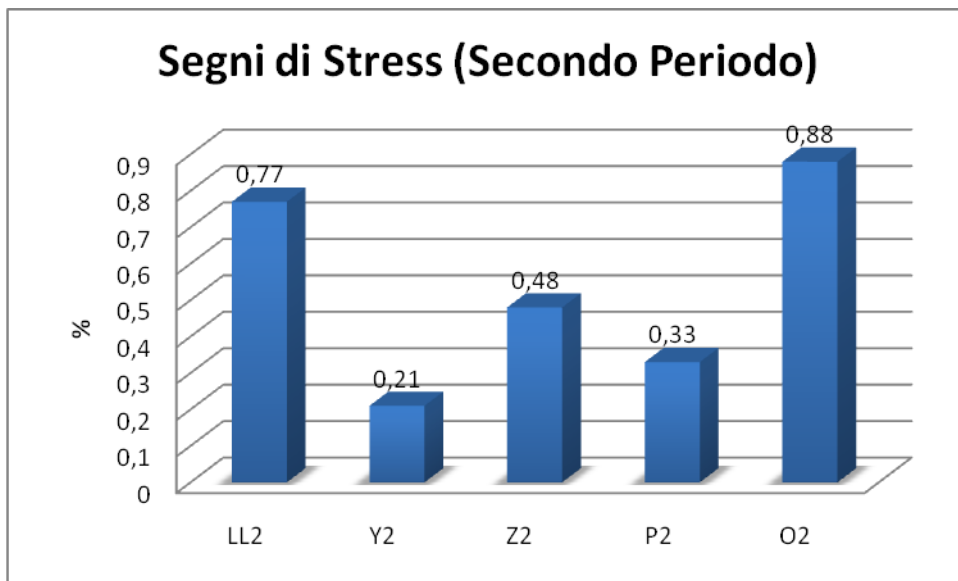


Grafico n. 4-10: Percentuale dei segni comportamentali di stress nel periodo 2 calcolati su 29 cani (LL=leccarsi le labbra, Y=sbadigliare, Z=solleverare un arto, P=postura bassa, O=camminare in cerchio, 2=periodo 2, *sample points*).

Anche nello studio di Stephen e Ledger (2002) si era osservato come uno dei comportamenti più eseguiti fosse camminare in cerchio, anche se in percentuale decisamente maggiore rispetto a questo studio (7%). Gli altri comportamenti evidenziati dalle autrici non corrispondono invece a quelli riscontrati in questo studio (vocalizzazioni e saltare ripetutamente contro il muro).

Per quanto riguarda i dati sulla cortisolemia, ottenuti da due prelievi, uno il secondo e uno il decimo giorno di permanenza al canile, sono stati eseguiti su 32 cani e i risultati sono elencati in tabella n. 4-2.

#	Nome	Razza	Genere	Età	Cortisolo Pre (ng/ml)	Cortisolo Post (ng/ml)	Differenza Percentua le
1	Sgombro	Meticcio	M	5 anni	5,96	15,76	164,35
2	Maggie	Meticcio	F	2 anni	18,89	11,90	-36,98
3	Mina	Meticcio	F	10 mesi	8,83	17,45	97,63
4	Roll	Meticcio	M	5 anni	3,04	6,88	126,56
5	Nero	Meticcio	F	3 mesi	1,11	11,27	915,58
6	Fulvo	Meticcio	F	3 mesi	3,04	10,17	234,33
7	Flipper	Meticcio	M	4 anni	9,46	4,16	-56,01
8	Billy	Meticcio	M	3 mesi	2,44	18,79	669
9	Pagge	Meticcio	F	6 mesi	37,60	6,01	-84,01
10	Sally	Meticcio	F	4 mesi	9,82	1,88	-80,80
11	Miro	Meticcio	M	7 anni	17,22	5,16	-70,02
12	Lolo	Meticcio	M	2 mesi	6,75	2,56	-62,10
13	Lola	Meticcio	F	2 mesi	14,97	3,28	-78,12
14	Mami	Meticcio	F	1,5 anni	11,21	7,71	-31,18
15	Biondo	Meticcio	M	4 anni	12,38	12,93	4,44
16	Rufus	Meticcio	M	1,5 anni	2,15	1,76	-18,38
17	Bianco	Meticcio	M	2 anni	5,37	4,11	-23,55
18	Rosso	Meticcio	M	6 mesi	21,57	1,36	-93,70
19	Bug	Meticcio	M	4,5 anni	10,82	11,99	10,82
20	Hansel	Meticcio	M	1,5 anni	4,98	9,29	86,26
21	Gretel	Meticcio	F	6 mesi	10,44	3,61	-65,38
22	Atomo	Meticcio	M	9 mesi	7,69	2,01	-73,90
24	Billo	Meticcio	M	5,5 anni	10,56	6,87	-34,89
25	Dick	Meticcio	M	4 mesi	3,32	4,76	43,41
26	Betty	Meticcio	F	3 mesi	9,00	1,17	-86,97
27	Dom	Meticcio	M	4,5 anni	2,96	14,42	387,67
28	Farina	Segugio	F	7 anni	5,13	9,81	91,26
29	Argo	Meticcio	M	9 anni	20,69	9,77	-52,80
30	Volpe	Segugio	F	1 anno	15,71	5,73	-63,54
31	Selva	Segugio	F	5 anni	4,40	10,11	129,64
32	Tom	Meticcio	M	1,5 anni	20,48	7,56	-63,10
34	Tommy	Meticcio	M	2 anni	11,15	8,72	-21,82

Tab.4-2: Concentrazione plasmatica di cortisolo.

Si è notato come il cortisolo plasmatico scenda in 19 animali e salga in 13 dal periodo 1 al periodo 2 (vedi grafico n. 4-11). Questo risultato può essere dovuto a diverse ragioni quali lo stress dovuto alla cattura, il tipo di vita condotto prima della cattura, per cui alcuni animali possono trovare la vita in un canile meno stressante, la capacità di adattarsi all'ambiente che può essere diversa da soggetto a soggetto, etc. (Stephen e Ledger, 2005).

Questo risultato è in accordo con quanto riscontrato da Stephen e Ledger nel loro studio del 2006 nel quale si evidenziava una grande variabilità nei livelli di cortisolo urinari dei cani esaminati: in alcuni (14%) il cortisolo aumentava fino al secondo giorno, in altri (24%) fino al quinto, in altri ancora (33%) fino al decimo e in alcuni (29%) diminuivano fino al quinto giorno per poi aumentare di nuovo.

È in parte in contrasto con quanto trovato da Hennessy e collaboratori (1997) che hanno evidenziato come i livelli di cortisolo plasmatico diminuiscano dopo i primi tre giorni di permanenza in canile e la differenza risulti significativa soprattutto nel confronto con i prelievi fatti dopo il decimo giorno.

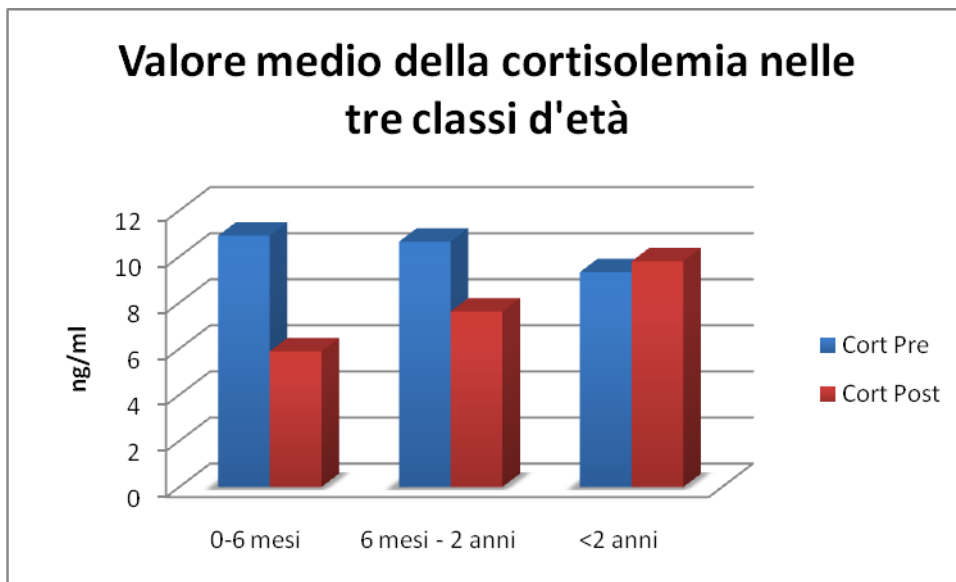


Grafico n.4-11: valore medio della cortisolemia (ng/ml) nei due prelievi (pre e post) nelle tre classi d'età considerate (32 cani).

La tabella 4-3 riassume le correlazioni tra i vari comportamenti indicativi di stress nei due periodi e la cortisolemia. Si può notare come l'espressione di alcuni comportamenti,

come assumere postura bassa e camminare in cerchio, correli positivamente tra primo e secondo periodo, mentre all'interno dello stesso periodo l'unica correlazione evidenziata tra comportamenti diversi è quella tra leccarsi le labbra e sbadigliare, che correlano tra loro in entrambi i periodi. I livelli di cortisolo plasmatico non correlano con nessuno dei comportamenti esaminati all'interno dello stesso periodo.

	LL1	LL2	Y1	Y2	Z1	Z2	P1	P2	O1	O2	Cort1	Cort2
LL1	-	-0,429	0,480	-0,471	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
LL2	-0,429	-	-0,378	0,771	N.S.	0,50	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Y1	0,480	-0,378	-	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Y2	-0,471	0,771	N.S.	-	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Z1	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Z2	N.S.	0,50	N.S.	N.S.	N.S.	-	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
P1	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-	0,390	N.S.	N.S.	N.S.	0,418
P2	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	0,390	-	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
O1	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-	0,552	N.S.	N.S.
O2	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	0,552	-	N.S.	N.S.
Cort1	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-	N.S.
Cort2	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	0,418	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-

Tabella 4-3: correlazioni tra i vari comportamenti indicativi di stress (*sample points*) nei due periodi e la cortisolemia (in grassetto corsivo= Pearson, in grassetto=Spearman; LL=leccarsi le labbra, Y=sbadigliare, Z=solleverare un arto, P=postura bassa, O=camminare in cerchio, Cort=cortisolo, 1=periodo 1, 2=periodo 2, *sample points*).

È altresì da notare che il comportamento di assumere una postura bassa nel primo periodo correla con i livelli della cortisolemia del secondo periodo (vedi grafico n. 4-12) e quindi questo comportamento potrebbe essere un predittore della capacità di adattamento del cane all'ambiente del canile. Infatti più gli animali eseguono questo comportamento nel primo periodo maggiori saranno i loro livelli di cortisolo plasmatico nel secondo periodo. Bisogna, però, considerare che il valore assoluto di cortisolemia ha valore limitato in quanto è stato ricavato tramite un unico prelievo per periodo e quindi potrebbe non essere effettivamente rappresentativo dei reali livelli di cortisolo del

periodo (per avere un valore accurato sarebbero serviti più prelievi nel corso della stessa giornata e dei diversi giorni considerati, ma ciò non era fattibile all'interno del canile).

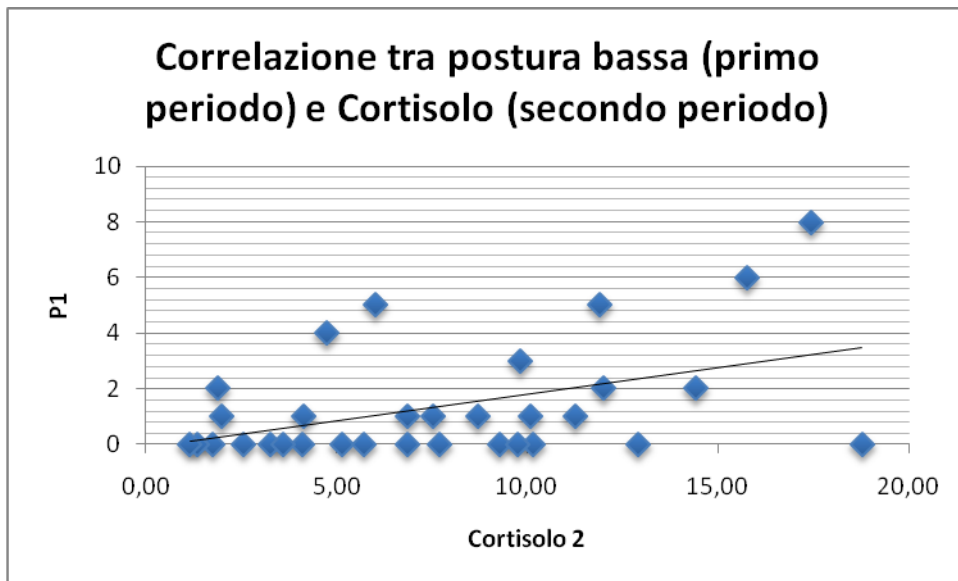


Grafico n.4-12: Correlazione tra cortisolo del secondo periodo e postura bassa del primo periodo (34 cani, sample points, P1=postura bassa, primo periodo).

4.3.1) Età e segni di stress

I comportamenti di stress che sembrano più risentire delle caratteristiche del soggetto prese in esame (età e sesso) sono il leccarsi le labbra e lo sbadigliare. Infatti, per quanto riguarda l'età si sono notati dei risultati interessanti in questi due comportamenti e nel camminare in cerchio.

C'è una correlazione tra leccarsi le labbra nel primo periodo e l'età degli animali (Pearson, $P=0,385$ $p<0,05$) (vedi grafico n. 4-13). Sono i cani più vecchi ad esprimere maggiormente questo comportamento, questo potrebbe significare che risentono maggiormente dello stress rispetto ai cani più giovani e potrebbe essere una spiegazione del fatto che nel periodo successivo passano più tempo nascosti e minor tempo a guardare le persone rispetto agli altri cani.

cani sbadigliano nel primo periodo (Kruskal-Wallis ANOVA, $H=8,2$; $p=0,0162$); differenza dovuta prevalentemente al comportamento di sbadigliare da seduti (Kruskal-Wallis ANOVA, $H=7,2$; $p=0,0273$). In particolare, il comportamento di sbadigliare nel primo periodo è maggiore nei cani di classe 2 e 3 (0,41% e 0,38% rispettivamente), quindi di età maggiore di 6 mesi, rispetto ai cani di classe 1 (0-6 mesi) in cui è quasi completamente assente (0,034%) (vedi grafico 4-15). Questo potrebbe essere dovuto al fatto che i cani giovani e adulti sentano di più lo stress al momento dell'ingresso al canile, o lo manifestino più apertamente rispetto ai cuccioli. Potrebbe anche essere dovuto anche al fatto che i cuccioli sono stati stabulati in gruppo o almeno in coppia e questo potrebbe aver influenzato la loro risposta allo stress. Secondo lo studio di Beerda e coautori (1999) gli animali stabulati insieme e non singolarmente risentono meno dello stress legato all'ambiente e la comparsa di stereotipie è minore. Nello studio gli animali stabulati singolarmente assumevano posture più basse e eseguivano maggiormente comportamenti quali l'auto-grooming, sollevare una zampa, vocalizzazioni, coprofagia e stereotipie.

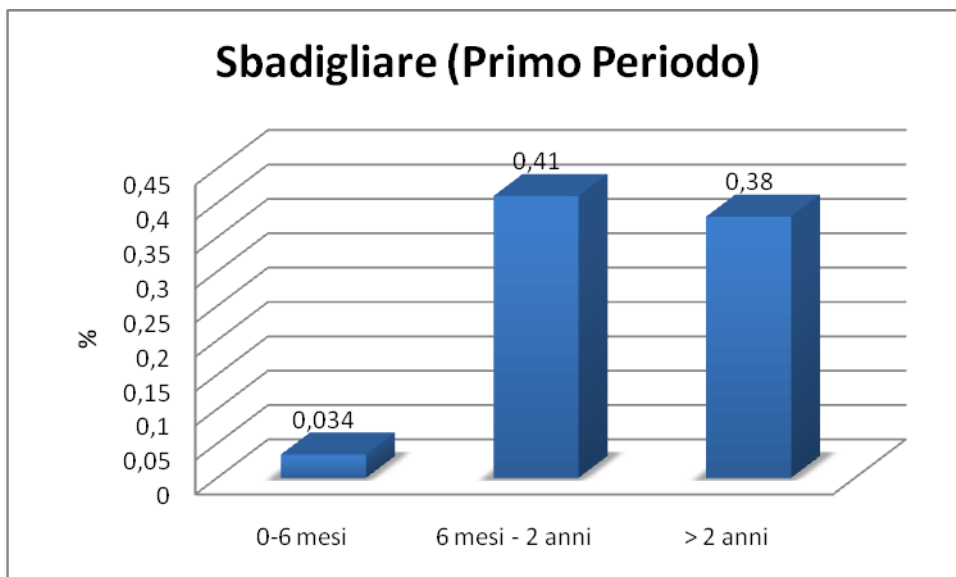


Grafico n.4-15: distribuzione del comportamento sbadigliare nel primo periodo nelle tre classi d'età (sample points, 34 cani)

Si è notato un effetto dell'età anche sulla differenza di espressione del comportamento di sbadigliare nei due periodi (Kruskal-Wallis ANOVA, $p=0,0217$). In particolare la differenza è maggiore nei cuccioli (0-6 mesi), rispetto alle altre classi d'età (vedi grafico n. 4-16).

Un'altra differenza significativa tra classi d'età si è evidenziata nel comportamento di camminare in cerchio nel secondo periodo (Kruskal-Wallis ANOVA, $p=0,0479$).

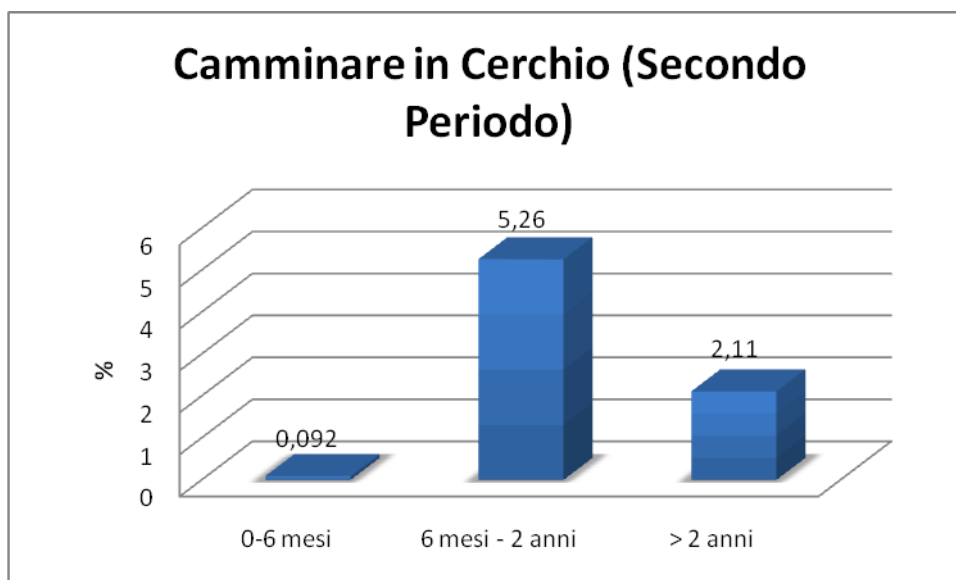


Grafico n.4-16: Distribuzione del comportamento camminare in cerchio nel secondo periodo nelle tre classi d'età (sample points, 29 cani)

Questo comportamento viene espresso prevalentemente dagli animali di età compresa tra 6 mesi e 2 anni (classe 2, 5,26%) e in percentuale minore dagli animali adulti anziani (2,11%), mentre è un comportamento quasi totalmente assente nei cuccioli (0,092%). Anche questo risultato può essere dovuto al fatto che i cuccioli sono stabulati in numero minimo di due. È interessante notare come sia comunque bassa la percentuale di camminare in cerchio per gli animali di classe 3 (2,11%). È probabile che siano gli animali più giovani a risentire di più del fatto di essere confinati in un box da soli, rispetto ad animali più anziani. Questo sarebbe in linea con quanto riscontrato nello studio di Siwak e coautori (2001) in cui veniva evidenziato come fossero gli animali più giovani (2-4 anni) più curiosi e attivi rispetto agli anziani (9-15 anni) e in un altro studio di Siwak e collaboratori (2002) in cui veniva evidenziato come gli animali più anziani in un ambiente familiare si muovessero meno rispetto ad animali più giovani, e questo potrebbe spiegare perché i cani giovani sono più portati ad assumere comportamenti come camminare in cerchio rispetto agli anziani.

4.3.2) Genere e comportamenti segnale di stress

L'espressione dei comportamenti di leccarsi le labbra e sbadigliare è influenzata anche del sesso del soggetto. In particolare è stato evidenziato un effetto significativo di tale parametro sulla differenza del comportamento di leccarsi le labbra (Test U Mann-Whitney, $Z=-2,248$; $p=0,0245$) e di sbadigliare (Test U Mann-Whitney, $Z=-2,500$; $p=0,0123$) tra primo e secondo periodo.

Un altro comportamento di stress influenzato dal genere è stato il sollevare la zampa. In particolare si è evidenziata una differenza significativa tra maschi e femmine nella differenza di espressione del comportamento tra primo e secondo periodo (Test U Mann-Whitney, $Z=-2,294$; $p=0,0276$) (vedi tabella n. 4-4).

	DiffLL		DiffY		DiffZ	
Genere	M	F	M	F	M	F
Mediana	-1	6	0	2	0	2,5
Min	-6	-24	-3	-1	-19	0
Max	18	26	4	7	24	10

Tab. 4-4: mediana e range dei dati riguardanti le differenze nei due periodi di leccarsi le labbra, sbadigliare e sollevare una zampa.

È interessante notare che in tutte e tre le categorie considerate (differenza tra i due periodi nel leccarsi le labbra, sbadigliare e sollevare la zampa) i maschi risultavano avere una differenza tra i due periodi minore rispetto alle femmine. Differenze di comportamento nei due sessi, ancorché non precipuamente nei segnali di stress, erano state notate anche da Wells e Hepper (1999), in particolare per i comportamenti di guardare le persone e abbaiare. Nel presente studio, per altro, l'espressione del comportamento di guardare le persone si è dimostrata influenzata dall'età, ma non dal sesso dei soggetti.

I risultati del presente studio, che sottolineano come le femmine sembrano risentire maggiormente dello stress rispetto ai maschi, in quanto la loro risposta allo stress si attenua più lentamente, trovano riscontro nello studio di Garnier e collaboratori (1990), in cui le cagne presentavano un livello basale di cortisolo maggiore due giorni dopo l'ingresso nella struttura e una risposta maggiore alla somministrazione di ACTH 5 e 12 settimane dopo l'ingresso.

4.3.3) Cortisolo e segni di stress rilevati mediante behavioural sampling

Le analisi dei dati totali di stress hanno confermato una correlazione tra alcuni segni di stress all'interno dello stesso periodo. Anche in questo caso, infatti, come per i dati raccolti tramite *instantaneous focal animal sampling*, esiste una correlazione positiva statisticamente significativa tra il comportamento di leccarsi le labbra e quello di sbadigliare sia nel periodo 1 (in cui la correlazione si estende anche al comportamento di sollevare la zampa) sia nel periodo 2, come riportato in dettaglio in tabella 4-5

	LLT1	LLT2	YT1	YT2	ZT1	ZT2
LLT1	-	0,699	0,714	0,469	0,423	N.S.
LLT2	0,699	-	0,514	0,710	N.S.	N.S.
YT1	0,714	0,514	-	0,462	0,448	N.S.
YT2	0,469	0,710	0,462	-	N.S.	N.S.
ZT1	0,423	N.S.	0,448	N.S.	-	N.S.
ZT2	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-

Tabella 4-5: correlazioni tra i vari comportamenti indicativi di stress (T=*sample* ed *extra points*) nei due periodi (LL=leccarsi le labbra , Y=sbadigliare, Z=sollevare un arto, P=postura bassa, O=camminare in cerchio).

Si è inoltre confermata l'influenza della classe di età sull'espressione del comportamento di camminare in cerchio nel secondo periodo (ANOVA Kruskal-Wallis, $H=6,1$; $p=0,048$), già apparsa nell'analisi dei dati registrati mediante *instantaneous focal animal sampling*.

Inoltre è stata messa in luce una correlazione positiva tra cortisolemia e frequenza del comportamento di sbadigliare nel primo periodo ($R=0,34$; $p=0,047$; grafico n. 4-17), che non era stata evidenziata nei dati dell'*instantaneous focal animal sampling*, probabilmente a causa della scarsa frequenza con cui il comportamento di sbadigliare era stato rilevato ai *sample points*.

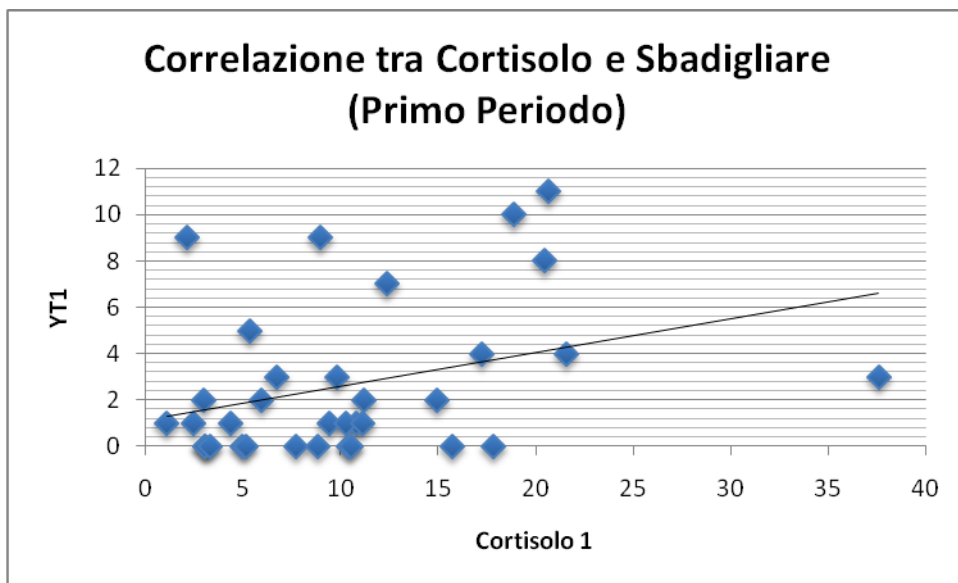


Grafico n.4-17: Correlazione tra cortisolo e sbadigliare nel primo periodo (sample ed extra points, 34 cani)

In questo caso c'è concordanza tra uno dei segni comportamentali, cioè sbadigliare, e il dato funzionale della cortisolemia, ma non c'è correlazione con gli altri parametri comportamentali, probabilmente anche per il fatto che sono stati fatti due soli prelievi in tutto il periodo dello studio.

D'altra parte la possibilità che parametri funzionali e comportamentali non correlino è già stata messa in evidenza da Hiby e coautori (2006) per quanto riguarda alti livelli di movimento (considerati segno di stress) e il rapporto Cortisolo/Creatinina urinari (C/C) a livello individuale.

Non sono state trovate correlazioni tra i comportamenti rilevati tramite *focal sampling* e il totale rilevato tramite *focal* e *continuous sampling*, tranne che per un dato, cioè la differenza nel camminare in cerchio tra primo e secondo periodo ($R=0,39$; $p=0,034$), mentre si è evidenziata una tendenza alla correlazione tra i dati che si riferiscono al camminare in circolo nel primo periodo ($R=0,30$; $p=0,08$). Questo non è inaspettato e può essere dovuto ai limiti intrinseci dei tipi di metodica usata per le osservazioni: le osservazioni focali non sono le più adatte per rilevare tutti i comportamenti di stress, mentre è complesso affiancare un *behavioural sampling* ad un *instantaneous focal animal sampling* ogni 15 secondi durante osservazioni dirette.

4.4) Test comportamentale

Infine sui cani è stato condotto un test comportamentale (vedi allegato 1). I cani sottoposti al test sono stati 29, in quanto 1 era stato reso ai proprietari, 1 sterilizzato e 3 erano troppo aggressivi per essere sottoposti al test.

Ventotto dei 29 cani esaminati hanno superato il test (26 con A e 2 con B). Il cane che ha fallito non ha superato la parte riguardante l'aggressività possessiva. Non sono state riscontrate significative differenze di età o genere nei risultati ottenuti nel test (vedi grafico n. 4-18).

Il fatto, comunque, che un cane che non si dimostrava apertamente aggressivo, anzi molto amichevole, abbia fallito il test nella parte di aggressività possessiva (ha reagito al tentativo di allontanare l'osso che stava mangiando, situazione molto comune, pericolosa soprattutto in famiglie con bambini) sottolinea l'importanza di un minimo screening comportamentale prima di rendere i cani disponibili all'adozione (van der Borg, 1991; Seagurson et al, 2005; Diederich e Giffroy, 2006; Bollen e Horowitz, 2007).

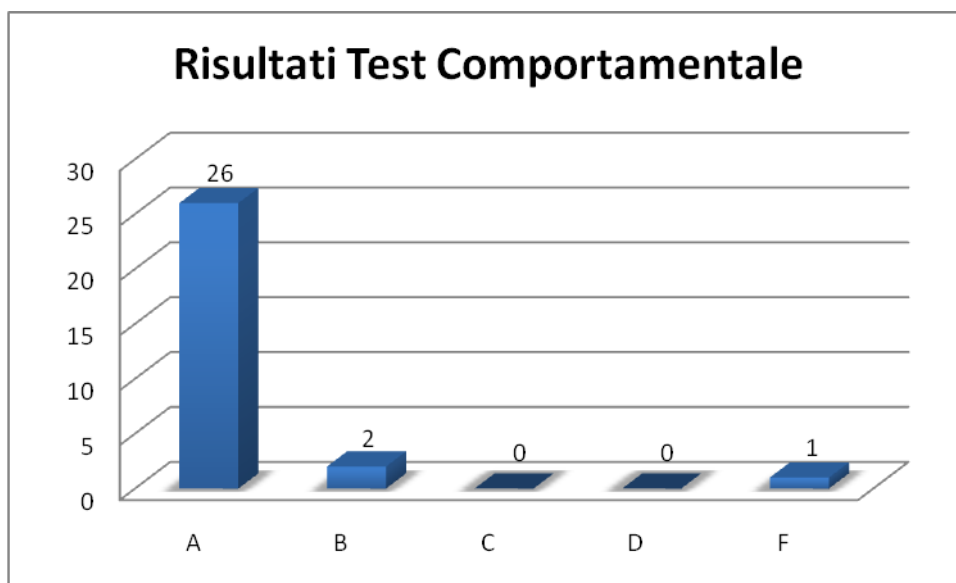


Grafico n.4-18: Risultati del test comportamentale

Capitolo 5:

Conclusioni

Lo studio ha evidenziato come età e genere influenzino la risposta adattativa dei cani presenti in canile.

Per quanto riguarda i dati sul comportamento complessivo sono di particolare importanza i comportamenti influenzati dall'età degli animali. È emerso, infatti, che gli animali anziani passano più tempo nascosti e meno tempo a guardare le persone, comportamenti che possono influenzare negativamente le loro chance di adozione.

Si è notato inoltre un effetto dell'età e del genere sui segnali di stress. Per quanto riguarda l'età, si è notato, infatti, come i cuccioli dimostrino meno i segnali di stress, anche se la causa di questo potrebbe essere dovuta non solo all'età, ma anche al tipo di stabulazione, che, nel canile considerato, era diversa per i cuccioli (in gruppo o in coppia) rispetto agli adulti (stabulati singolarmente). Questo effetto risulta significativo per alcuni comportamenti quali leccarsi le labbra nel primo periodo, comportamento espresso soprattutto negli animali oltre i due anni, sbadigliare nel primo periodo e camminare in cerchio nel secondo periodo espressi soprattutto dagli animali giovani tra sei mesi e due anni.

Il genere ha un'influenza sull'evoluzione nel tempo dell'espressione dei segnali di stress, soprattutto per quanto riguarda comportamenti quali sollevare un arto, leccarsi le labbra e sbadigliare. Il fatto che ci sia un effetto del genere ci può far ipotizzare, in accordo anche con altri studi, che le femmine siano più sensibili allo stress.

Per quanto riguarda le correlazioni tra cortisolo e comportamento, è risultata particolarmente interessante quella tra la postura bassa nel primo periodo e il cortisolo del secondo periodo. Tale comportamento potrebbe quindi essere predittivo della

capacità di adattamento degli animali all'ambiente del canile.

I risultati dovrebbero essere approfonditi, con un campione più numeroso, ma sono indicativi di alcuni problemi degli animali presenti in canile che potrebbero essere in parte attenuati o risolti mediante provvedimenti adeguati (ad esempio spostando le cucce nella parte frontale della gabbia per gli animali che tendono a passare più tempo nascosti, concentrandosi di più sulle categorie che si suppone siano maggiormente sensibili allo stress del canile).

Bibliografia:

- Albert A., Bulcroft K., 1988. Pets, families and the life course. *Journal of marriage and family* 50: 543-552.
- Anderson S.M., Saviolakis G.A., Bauman R.A., Chu K.Y., Ghosh S., Kant G.J., 1996. Effects of chronic stress on food acquisition, plasma hormones, and the estrous cycle of female rats. *Physiology & Behavior* 59: 741-748.
- Archer J., 1997. Why Do people love their pets? *Evolution and Human Behavior* 18: 237-259.
- Bailey G.P., Hetherington J.D., Sellors J., 1997. Survey to measure the success of rescue dog placement at a re-homing center where a full behavioural service is offered. *ISAZ Newsletter* 13: 10-12.
- Barbero R., Badino P., Odore R., Girardi C., Re G., Ozella L., Osella M.C., Savarino P., Bergamasco L., 2006. Effects of human-animal interaction on the behaviour and saliva cortisol levels of dogs kept in animal shelter long term. *Journal of Veterinary Pharmacology Therapy* 29 (Suppl.1): 47-59.
- Beerda B., Schilder M.B.H., Van Hoff J.A.R.A.M., De Vries H.W., 1997. Manifestations of chronic and acute stress in dogs. *Applied Animal Behavior Science* 52: 307-319.
- Beerda B., Schilder M.B.H., Van Hoff J.A.R.A.M., De Vries H.W., Mol J.A.,

1998. Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. *Applied Animal Behavior Science* 58: 365-381

- Beerda B., Schilder M.B.H., Van Hoff J.A.R.A.M., De Vries H.W., Mol J.A., 1999. Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restrictions. I. Behavioral responses. *Physiology & Behavior* 66(2): 233-242.
- Beerda B., Schilder M.B.H., Van Hoff J.A.R.A.M., De Vries H.W., Mol J.A., 1999b. Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restrictions. II. Hormonal and immunological responses. *Physiology & Behavior* 66(2): 243-254.
- Bollen K.S., Horowitz J., 2007. Behavioral evaluation and demographic information in the assessment of aggressiveness in shelter dogs. *Applied Animal Behaviour Science*: doi: 10.1016/j.applanim.2007.07.007
- Bono G., 2000. Discomfort and stress indicators in farm animals. LIV Convegno della Società Italiana per le Scienze Veterinarie, Riva del Garda (TN), 28-30 Settembre 2000. Tavola Rotonda: “Il ruolo del medico veterinario nel controllo del benessere degli animali da reddito”. S.I.S.Vet. Annual Meeting Selected Abstracts. Anno III, 2001, 18-30.
- Bracke M.B.M., Spruijt B.M., Metz J.H.M., 1999. Overall animal welfare assessment reviewed. Part 1: Is it possible? *Netherlands Journal of Agricultural Science* 47: 279-291.
- Broom D.M., 1991. Animal Welfare: Concepts and measurements. *Journal of Animal Science* 69: 4167-4175.
- Camerini A., 2008 “Esperienza della gestione di un canile” Incontro – Dibattito “Mi Affido a Fido - Adottalo” - Verona 07/03/08.
- Christensen E., Scarlett J., Campagna M. Albro Hout K., 2007. Aggressive behavior in adopted dogs that passed a temperament test. *Applied Animal Behaviour*

Science 106: 85-95.

- Cizza G., Calogero A.E., Brady L.S., Bagdy G., Bergamini E., Blackman M.R., Chrousos G.P., Gold P.W., 1994. Male Fischer 344/N rats show a progressive central impairment of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis with advancing age. *Endocrinology* 134 (4): 1611-1620.
- Coover G.D., Heybach J.P., Lenz J., Miller J.F., 1979. Corticosterone “basal levels” and response to ether anesthesia in rats on a water deprivation regimen. *Physiology & Behavior* 22 (4): 653-656
- Coppola C.L., Enns R.M., Grandin T., 2006. Noise in the animal shelter environment: building design and the effects of daily noise exposure. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 9 (1): 1-7
- Coppola C.L., Grandin T., Enns R.M., 2006. Human interaction and cortisol: can human contact reduce stress for shelter dogs? *Physiology and Behaviour* 87: 537-541.
- Dawkins M.S., 1998. Evolution and animal welfare. *The Quarterly Review of Biology* 73 (3): 305-328.
- Dawkins M.S., 2003. Behavior as a tool in the assessment of animal welfare. *Zoology* 106: 383-387.
- Dawkins M.S., 2006. A user’s guide to animal welfare science. *Trends In Ecology and Evolution* 21 (2): 77-82.
- Di Nardo A., Candeloro L., Budke C.M., Slater M.R., 2007. Modeling the effect of sterilization rate on owned dog population size in central Italy. *Preventive Veterinary Medicine* 82: 308-313.
- Diederich C., Giffroy J.-M., 2006. Behavioural testing in dogs: A review of

methodology in search for standardisation. *Applied Animal Behaviour Science* 97: 51-72.

- Diesel G., Pfeiffer D.U., Brodbelt D, 2008. Factors affecting the success of rehoming dogs in UK during 2005. *Preventive Veterinary Medicine*: doi:10.1016/j.prevetmed.2007.12.004
- Engelmann M., Landgraf R., Wotjak C.T., 2004. The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Frontiers in neuroendocrinology* 25: 132-149.
- Feldman E.C., Nelson R.W., 1998. *Endocrinologia e riproduzione del cane e del gatto*. Edizioni UTET, Torino, 205-291.
- Felicetti G., 2005. Seconda mappa del randagismo e dei canili nella provincia di Roma, giornata di studio e iniziativa sulla tutela degli animali domestici e sulla prevenzione del randagismo, 19/12/2005. Ufficio tutela degli animali – Assessorato Agricoltura e Ambiente della Provincia di Roma.
- Ferrari E., Cravello L., Chytiris S., Falvo F., Solerte S.B., Fioravanti M., Magri F., 2004. Modificazioni neuroendocrine ed invecchiamento. *Giornale di Gerontologia* 52: 528-538.
- Frank J., 2004. An interactive model of human companion animal dynamics: the ecology and economics of dog overpopulation and the human costs of addressing the problem. *Human Ecology* 32(1): 107-130.
- Frank JM, Carlisle-Frank PL, 2007. Analysis of programs to reduce overpopulation of companion animals: d adoption and low-cost spay/neuter programs merely causes substitution of sources? *Ecological Economics* 62: 740-746.
- Friedmann E., Thomas S.A., 1995. Pet ownership, social support, and one-year survival after acute myocardial infarction in the cardiac arrhythmia suppression trial

(CAST). *The American Journal of Cardiology* 76: 1213-1217.

- Friedmann E., Thomas S.A., Cook L.K., Tsai C.C., Picot S.J., 2007. A friendly dog as a potential moderator of cardiovascular response to speech in older hypertensives. *Anthrozoos* 20 (1): 51-63.
- Gacsi M., Topal J., Miklosi A., Doka A., Csanyi V., 2001. Attachment behavior of adult dogs (*Canis familiaris*) living at rescue centers: forming new bonds. *Journal of Comparative Psychology* 115 (4): 423-431.
- Garnier F., Benoit E., Virat M., Ochoa R., Delatour P, 1990. Adrenal cortical response in clinically normal dogs before and after adaptation to a housing environment. *Laboratory Animals* 24: 40-43.
- Gazzano A, Mariti C., Himmelmann M, Calderisi L., Niccolini A., Ruggeri G., Guidi G., Ducci M., Martelli F., Sighieri C., 2004. Valutazione della cortisolemia in cani ospitati in canile sanitario, *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria*, LVII/2004, ISSN 0365-4729, 189-196.
- Graham L., Wells D.L., Hepper P.G., 2005. The influence of visual stimulation on the behaviour of dogs housed in a rescue shelter. *Animal Welfare* 14: 143-148.
- Gust D.A., Wilson M.E., Stocker T., Conrad S., Plotsky P.M., Gordon T.P., 2000. Activity of the Hypothalamic-pituitary-adrenal axis is altered by aging and exposure to social stress in female rhesus monkeys. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 85 (7): 2556-2563.
- Haugher R.L., Thirvikraman K.V., Plotsky P.M., 1994. Age-related alterations of Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in male fischer 344 rats. *Endocrinology* 134 (3): 1528-1536.
- Hennessy M.B., Davis H.N., Williams M.T., Mellott C., Douglas C.W., 1997. Plasma cortisol levels of dogs at a County Animal Shelter. *Physiology & Behavior*

62 (3): 485-490.

- Hennessy M.B., Morris A., Linden F., 2006. Evaluation of the effects of a socialization program in a prison on behavior and pituitary-adrenal hormone levels of shelter dogs. *Applied Animal Behaviour Science* 99: 157-171.
- Hennessy M.B., Voith V.L., Hawke J.L., Young T.J., Centrone J., McDowell A.L., Linden F., Davenport G.M., 2002a. Effects of a program of human interaction and alterations in diet composition on activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in dogs housed in a public animal shelter. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 221 (1): 65-71.
- Hennessy M.B., Voith V.L., Mazzei S.J., Buttram J., Miller D.D., Linden F., 2001. Behavior and cortisol levels of dogs in a public animal shelter, and an exploration of the ability of these measures to predict problem behavior after adoption. *Applied Animal Behaviour Science* 73: 217-233.
- Hennessy M.B., Voith V.L., Young T.L., Hawke J.L., Centrone J., McDowell A.L., 2002b. Exploring human interaction and diet effects on the behavior of dogs in a public animal shelter. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 5 (4): 253-273.
- Hennessy M.B., Williams M.T., Miller D.D., Douglas C.W., Voith V.L., 1998. Influence of male and female petters on plasma cortisol and behaviour: can human interaction reduce the stress of dogs in a public animal shelter? *Applied Animal Behaviour Science* 61: 63-77.
- Hetts S, Clark J.D., Calpin J.P., Arnold C.E., Mateo J.M, 1992. Influence of housing conditions on beagle behaviour. *Applied Animal Behaviour Science* 34: 137-155.
- Hiby E.F., Rooney N.J., Bradshaw J.W.S., 2006. Behavioural and physiological responses of dogs entering re-homing kennels. *Physiology & Behavior* 89: 385-391.
- Hubrecht C.R., Serpell J.A., Poole T.B., 1992. Correlates of pen size and

housing conditions on the behaviour of kennelled dogs. *Applied Animal Behaviour Science* 34: 365-383.

- Hubrecht R.C., 1993. A comparison of social and environmental enrichment methods for laboratory housed dogs. *Applied Animal Behaviour Science* 37: 345-361.
- Kass P.H., New J.C.J., Scarlett J.M., Salman M.D., 2001. Understanding animal companion surplus in the United States: relinquishment of nonadoptables to animal shelter for euthanasia. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 4 (4): 237-248.
- Kobelt A.J., Hemsworth P.H., Barnett J.L., Butler K.L., 2003. Sources of sampling variation in saliva cortisol in dogs. *Research In Veterinary Science* 75: 157-161.
- Landsberg G., Araujo J.A., 2005. Behavior problems in geriatric pets. *Veterinary Clinics Small Animal Practice* 35: 675-698.
- Landsberg G., Hunthausen W., Ackerman L., 2003. *Handbook of behavior problems of the dog and the cat*. Elsevier Saunders Ed., Second edition, 269-304.
- Lepper M., Kass P.H., Hart L.A., 2002. Prediction of Adoption versus euthanasia among dogs and cats in a California Animal Shelter. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 5(1): 29-42.
- Loveridge G.G., 1998. Environmentally enriched dog housing. *Applied Animal Behaviour Science* 59: 101-113.
- Lucidi P., Bernabò N., Panunzi M., Dalla Villa P., Mattioli M., 2005. Ethotest: A new model to identify (shelter) dogs' skills as service animals or adoptable pets. *Applied Animal Behaviour Science* 95: 103-122.
- Luescher A.U., Medlock R.T., Beck A.M., 2007. The effects of training and

environmental alterations on adoption success of shelter dogs. *Journal of Veterinary Behavior* 2 (3): 98.

- Marston L.C., Bennet P.C., 2003. Reforging the bond - towards successful canine adoption. *Applied Animal Behaviour Science* 83: 227-245.
- Martin P., Bateson P., 1986. *Measuring behaviour: an introductory guide*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Mondelli F., Prato Previde E., Verga M., Levi D., Magistrelli S., Valsecchi P., 2004. The bond that never developed: adoption and relinquishment of dogs in a rescue shelter. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 7 (4): 53-266.
- Mormède P., Andanson S., Aupèrin B., Beerda B., Guèmenè D., Malmkvist J., Manteca X., Manteuffel G., Prunet P., Van Reenen C.G., Richard S., Veissier I., 2007. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiology & Behavior* 92: 317-339.
- Neidhart L., Boyd R., 2002. Companion animal adoption study. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 5 (3): 175-192.
- Netto J.W., Planta D.J.U., 1997. Behavioural testing for aggression in domestic dogs. *Applied Animal Behaviour Science* 52: 243-263.
- New J.C.J., Salman M.D., King M., Scarlett J.M., Kass P.H., Hutchinson J.M., 2000. Characteristics of shelter-relinquished animals and their owners compared with animals and their owners in U.S. pet-owning households. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 3 (3): 179-201.
- New J.C.J., Salman M.D., Scarlett J.M., Kass P.H., Vaughn J.A., Scherr S., Kelch W.J., 1999. Moving: characteristics of dogs and cats and those relinquishing them to 12 U.S. animal shelters. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 2 (2): 83-96.

- Normando S., Stefanini C., Meerst L., Adamelli S., Coultis D., Bono G., 2006. Some factors influencing adoption of sheltered dogs. *Anthrozoos* 19 (3): 211-223.
- Odendaal J.S.J., 2000. Animal assisted therapy – magic or medicine? *Journal of Psychosomatic Research* 49: 275-280.
- Overall K.L., 2001. *La clinica comportamentale del cane e del gatto*. CG Edizioni Medico Scientifiche, 15-65.
- Pal S.K., Ghosh B., Roy S., 1998. Agonistic behavior of free ranging dogs (*Canis familiaris*) in relation to season sex and age. *Applied Animal Behaviour Science* 59: 331-348.
- Rothuizen J., Reul J.M.H.M., Van Sluijs F.J., Mol J.A., Rijnberk A., De Kloet E.R., 1993. Increased neuroendocrine reactivity and decreased brain mineral corticoid receptor-binding capacity in aged dogs. *Endocrinology* 132 (1): 161-168.
- Salman M.D., Hutchinson R, Ruch-Gallie R., Kogan L., New J.C.J., Kass P.H., Scarlett J.M., 2000. Behavioral reasons for relinquishment of dogs and cats to 12 shelters. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 3 (2): 93-106.
- Salman M.D., New J.C.J., Scarlett J.M., Kass P.H., Ruch-Gallie R., Hetts S., 1998. Human and animal factors related to the relinquishment of dogs and cats in 12 selected animal shelters in the United States. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 1 (3): 207-226.
- Scarlett J.M., Salman M.D., New J.G.J., Kass P.H., 1999. Reasons for relinquishment of companion animals in U.S. animal shelters: selected health and personal issues. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 2 (1): 41-57.
- Schipper L.L., Vinke C.M., Schilder M.B.H., Spruijt B.M., 2008. The effect of feeding enrichment toys on the behaviour of kennelled dogs (*Canis familiaris*). *Applied Animal Behaviour Science*: doi: 10.1016/j.applanim.2008.01.001

- Segurson S.A., Serpell J.A., Hart B.L., 2005. Evaluation of a behavioural assessment questionnaire for use in the characterization of behavioural problems of dogs relinquished to animal shelters, *Journal of the American Veterinary Medical Association* 227 (11): 1755-1761.
- Serpell J.A., 1990. Evidence for long term effects of pet ownership on human health. *Waltham Symposium 20: Pets, Benefits and Practice*.
- Shore E.R., 2005. Returning a recently adopted companion animal: adopter's reasons for and reactions to the failed adoption experience. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 8 (3): 187-198.
- Shore E.R., Petersen C.L., Douglas D.K. 2003. Moving as a reason for pet relinquishment: a closer look. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 6 (1): 39-52.
- Siwak C.T., Murphey H.L., Muggenburg B.A., Milgram N.W., 2002. Age-dependent decline in locomotor activity in dogs is environment specific. *Physiology & Behavior* 75: 65-70.
- Siwak C.T., Tapp P.D, Milgram N.W., 2001. Effect of age and level of cognitive function on spontaneous and exploratory behaviors in the beagle dog. *Learning & Memory* 8: 317-325.
- Stephen J., Ledger R.A., 2005. An Audit of behavioral indicators of poor welfare in kennelled dogs in the United Kingdom. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 87 (2): 79-95.
- Stephen J.M., Ledger R.A., 2006. A longitudinal evaluation of urinary cortisol in kennelled dogs, *Canis familiaris*. *Physiology & Behavior* 87: 911-916.
- Stephen J.M., Ledger R.A., Stanton N., 2002. Stress in kennelled dogs: the

incidence of behavioral indicators of stress. Proc CABTSG/AWSELVA Study Day.

- Swenson M.J., Reece W.O., 2002. Duke's Fisiologia degli animali domestici. Edizioni IDELSON-GNOCCHI, 736-769.
- Takeuchi T, Harada E., 2002. Age-related changes in sleep-wake rhythm in dog. Behavioral Brain Research 136: 193-199.
- Taylor K.D., Mills D.S., 2006. The development and assessment of temperament tests for adult companion dogs. Journal of Veterinary Behavior 1: 94-108.
- Tod E., Brander D., Waran N., 2005. Efficacy of dog appeasing pheromone in reducing stress and fear related behaviour in shelter dogs. Applied Animal Behaviour Science 93: 295-308.
- Tuber D.S., Miller D.D., Caris K.A., Halter R., Linden F., Hennessy M.B., 1999. Dogs in animal shelters: problems, suggestions and needed expertise. Psychological Science 10 (5): 379-386.
- Tuber D.S., Sanders S., Hennessy M.B., Miller J.A., 1996. Behavioral and glucocorticoid responses of adult domestic dogs (*Canis familiaris*) to companionship and social separation. Journal of Comparative Psychology 110 (1): 103-108.
- Valsecchi P., Mondelli F., Montanari S., Prato Previde E., 2002. Dogs' Behaviour in two different Italian shelters: environmental influence on behavior. Integration of research on human welfare and animal welfare, poster 78.
- Valsecchi P., Pattacini O., Beretta V., Bertozzi J., Zannoni S., Viggiani R., Accorsi P.A., 2007. Effects of a human social enrichment program on behavior and welfare of sheltered dogs. Journal of Veterinary Behavior 2(3): 88-89.
- Van Der Borg J.A.M., Netto J.W., Planta D.J.U., 1991. Behavioural testing of dogs in animal shelters to predict problems behavior. Applied Animal Behaviour Science 32: 237-251.

- Wells D.L., 2004a. A review of environmental enrichment for kennelled dogs, *Canis familiaris*. *Applied Animal Behaviour Science* 85: 307-317.
- Wells D.L., 2004b. The influence of toys on the behaviour and welfare of kennelled dogs. *Animal Welfare* 13: 367-373
- Wells D.L., Graham L., Hepper P.G., (2002), The influence of length of time in a rescue shelter on the behaviour of kennelled dogs; *Animal Welfare*, 11, 317-325.
- Wells D.L., Hepper P.G. 2000a. The influence of environmental change on the behaviour of sheltered dogs. *Applied Animal Behaviour Science* 68: 151-162.
- Wells D.L., Hepper P.G., 1999. Male and female dogs respond differently to men and women. *Applied Animal Behaviour Science* 61: 341-349.
- Wells D.L., Hepper P.G., 2000. Prevalence of behaviour problems reported by owners of dogs purchased from an animal rescue shelter. *Applied Animal Behaviour Science* 69: 55-65.
- Wells D.L., Hepper P.G., 2001. The behavior of visitors towards dogs housed in an animal rescue shelter. *Anthrozoos* 14 (1): 12-18.
- Wells D.L., Hepper, P.G., 1992. The behaviour of dogs in a rescue shelter. *AnimalWelfare* 1: 171-186.
- Wells, D.L., Hepper P.G., 1998. A note on the influence of visual conspecific contact on the behaviour of sheltered dogs. *Applied Animal Behaviour Science* 60: 83-88.

Siti Internet Consultati:

- 1) <http://www.avma.org/reference/marketstats/ownership.asp>, ultimo accesso 13/06/08
- 2) http://www.enpa.it/it/animali_e_legge/Legge_281.html, ultimo accesso 04/04/08
- 3) <http://www.ministerosalute.it/caniGatti/paginaInternaMenuCani.jsp?id=280&menu=abbandono>, ultimo accesso 13/06/08
- 4) <http://www.oipaitalia.com/randagismo/cifre.htm>, ultimo accesso 08/04/08
- 5) <http://www.petnet.com.au/petstatistics.asp>, ultimo accesso 13/06/08

TEST COMPORTAMENTALE

INFORMAZIONI GENERALI			
Nome:	ID#:	Tester:	Data:
OSSERVAZIONI IN GABBIA			
<input type="checkbox"/> Di solito siede tranquillo <input type="checkbox"/> Trema e va a fondo gabbia <input type="checkbox"/> Ignora le persone che passano di fronte alla gabbia <input type="checkbox"/> Si scaglia contro/ringhia ai cani che passano di fronte alla gabbia ripetutamente		<input type="checkbox"/> Salta sulla porta della gabbia di frequente <input type="checkbox"/> Abbaia eccessivamente <input type="checkbox"/> Mangia il cibo velocemente <input type="checkbox"/> Si scaglia contro/ringhia alle persone che passano di fronte alla gabbia ripetutamente	
APPROCCIO AL CANE IN GABBIA		MANO SULLA PORTA DELLA GABBIA	
<input type="checkbox"/> Entusiasta, amichevole, scodinzola, l'allineamento del corpo non è frontale <input type="checkbox"/> Trema o va a fondo gabbia, cerca di nascondersi, coda tra le gambe, posizione del corpo bassa <input type="checkbox"/> Ignora l'operatore <input type="checkbox"/> Sta fermo, con testa abbassata, occhi spaventati, accucciato, il pelo sul collo potrebbe essere irto, è allerta, nervoso, rigido, l'allineamento del corpo è frontale <input type="checkbox"/> Scopre i denti, ringhia, tenta di mordere STOP TEST.		<input type="checkbox"/> Si avvicina per annusare, toccare, leccare la mano dell'operatore <input type="checkbox"/> Ignora la mano dell'operatore <input type="checkbox"/> Scopre i denti, ringhia, tenta di mordere STOP TEST.	
INGRESSO NELLA GABBIA/FAR CAMMINARE IL CANE A GUINZAGLIO			
<input type="checkbox"/> Facile da mettere a guinzaglio, esce dalla gabbia con l'operatore in modo entusiasta, cammina bene. <input type="checkbox"/> Difficile da mettere a guinzaglio perché continua a muoversi, iperattivo, tira molto camminando anche fuori dalla gabbia. <input type="checkbox"/> Potrebbe essere spaventato dal guinzaglio, riluttante a camminare, potrebbe tirare per cercare di nascondersi/scappare, ma risponde a gentili incoraggiamenti, potrebbe strisciare più che camminare a guinzaglio. <input type="checkbox"/> Difficile da mettere a guinzaglio perché evita il contatto, cammina senza entusiasmo, non risponde a gentili incoraggiamenti, non ha la coda tra le gambe. <input type="checkbox"/> Impossibile mettergli il guinzaglio. STOP TEST. Ragione: _____			
SOCIEVOLEZZA – in piedi			
<input type="checkbox"/> Cerca il contatto con l'operatore in meno di un minuto, sembra dipendente, anche se spaventato, orecchie indietro <input type="checkbox"/> Cerca moderatamente il contatto con l'operatore in più di un minuto, ma in meno di due <input type="checkbox"/> Cerca brevemente o minimamente il contatto con l'operatore entro i due minuti, potrebbe saltare sull'operatore <input type="checkbox"/> Non cerca un contatto entro i due minuti, sembra completamente indipendente			
SOCIEVOLEZZA – seduti			
<input type="checkbox"/> Approccia l'operatore immediatamente, potrebbe strofinarsi contro l'operatore, tentare di saltare o saltare sulle ginocchia dell'operatore, sedersi tra le gambe dell'operatore <input type="checkbox"/> Fare le stesse cose descritte sopra, ma più timidamente, potrebbe nascondersi sotto la sedia scodinzolando. <input type="checkbox"/> Mette le zampe sulle gambe dell'operatore, ma guarda in giro, non verso l'operatore <input type="checkbox"/> Ignora l'operatore, non sembra notare che questo si è seduto, potrebbe mettere le zampe sull'operatore			

TOLLERANZA ALLE MANIPOLAZIONI

Accarezzare la schiena del cane (3 volte):

- Si muove più vicino all'operatore, scodinzola di più, guarda verso l'operatore, tira indietro le orecchie. Se trema è accettabile
- Il comportamento non cambia in maniera apprezzabile, sembra neutrale o distratto, potrebbe tentare di interagire con la bocca .
- Se ne va o tenta di evitare le manipolazioni, diventa agitato
- Si irrigidisce, si immobilizza, smette di scodinzolare
- Non permette di essere accarezzato, scopre i denti, ringhia, tenta di mordere **STOP TEST.**

Controllo dei denti:

- Facile da esaminare, tollerante, potrebbe essere rilassato o buttarsi per terra e girarsi a pancia in su, potrebbe tremare
- Si divincola/resiste ma rimane socievole
- Molto difficile da esaminare, scuote la testa violentemente o fa in modo di scrollarsi le mani lontano dalla faccia, potrebbe diventare meno socievole
- Si irrigidisce, si immobilizza, la coda potrebbe essere alta, orecchie in avanti, perde tutta la sua precedente socievolezza
- Scopre i denti, ringhia, tenta di mordere **STOP TEST.**

Abbraccio (durante):

- Rilassato o tollerante
- Si divincola un po', poi si calma
- Si irrigidisce, si immobilizza, si oppone o viene preso dal panico
- Scopre i denti, ringhia, tenta di mordere **STOP TEST.**

Abbraccio (dopo):

- Potrebbe leccare le mani dell'operatore, scodinzolare con la coda bassa, lanciare occhiate all'operatore e distogliere lo sguardo velocemente, appoggiarsi all'operatore, indugiare o iniziare a giocare dolcemente
- Ignora l'operatore e non ritorna neanche se incoraggiato

AGGRESSIVITA' POSSESSIVA

oggetto usato: _____

- Interessato all'oggetto ma lo lascia stare in cambio di attenzioni, non è necessario spingere la testa via dall'oggetto.
- Fa resistenza nel lasciare l'oggetto, potrebbe andare lontano dall'operatore lentamente, ma senza ringhiare o scoprire i denti, si può facilmente allontanare la testa dall'oggetto.
- Blocca l'accesso all'oggetto, potrebbe sobbalzare quando viene toccato sulla testa, è difficile allontanarlo dall'oggetto.
- Si irrigidisce o immobilizza, si vede la sclera, impossibile allontanarlo dall'oggetto.
- Scopre i denti, ringhia, tenta di mordere **STOP TEST.**
- Non interessato all'oggetto **RETEST**

AGGRESSIVITA' LEGATA AL CIBO

- Scodinzola con la coda bassa o rilassata, può girarsi verso l'operatore, potrebbe sollevare la testa o smettere di mangiare spontaneamente o lasciare facilmente che gli sia spostata la testa fuori dalla ciotola
- Coda in basso, ma non scodinzola né tiene la coda tra le gambe, ha le orecchie indietro, potrebbe irrigidirsi o mangiare un po' più velocemente, è possibile allontanargli la testa dalla ciotola.
- Ingoia il cibo velocemente, osserva l'operatore con la coda dell'occhio, difficilmente si riesce a allontanargli la testa dalla ciotola
- Si irrigidisce o immobilizza, tenta di bloccare l'accesso al cibo, orecchie in avanti, impossibile allontanargli la testa dalla ciotola
- Scopre i denti, ringhia, tenta di mordere **STOP TEST.**
- Non interessato all'oggetto **RETEST**

GIOCO / ECCITABILITA' E RECUPERO		Gioco/Giocattolo preferito: _____			
<input type="checkbox"/> Gioca in modo controllato, si ferma immediatamente quando l'operatore si ferma, e si calma velocemente <input type="checkbox"/> Scarso interesse per il giocattolo o il gioco. Forse troppo spaventato, o anche solo calmo. Lascia che il gioco gli sia preso facilmente <input type="checkbox"/> Si entusiasma molto giocando, si calma lentamente, potrebbe non voler lasciare il giocattolo, ma senza dimostrare aggressività quando questo viene preso <input type="checkbox"/> Gioca in modo molto violento, molto difficile da calmare, non vuole lasciare il giocattolo e potrebbe irrigidirsi quando questo viene preso <input type="checkbox"/> Scopre i denti, ringhia, tenta di mordere STOP TEST.					
REATTIVITA' ALLE MANIPOLAZIONI (orecchie, zampe, coda):					
<input type="checkbox"/> Facile da esaminare, molto tollerante, rilassato, potrebbe buttarsi per terra e rotolare a pancia in su, potrebbe tremare <input type="checkbox"/> Si divincola/si oppone in qualche modo o all'inizio, potrebbe sobbalzare e tentare di fuggire, potrebbe tentare di prendere in bocca la mano dell'operatore, ma rimanere socievole <input type="checkbox"/> Difficile da esaminare, si divincola violentemente, potrebbe interagire con la bocca <input type="checkbox"/> Si irrigidisce, si immobilizza, la coda potrebbe essere alta, orecchie in avanti, potrebbe girare la testa velocemente verso la mano dell'operatore <input type="checkbox"/> Scopre i denti, ringhia, tenta di mordere STOP TEST.					
VALUTAZIONE COMPLESSIVA (cerchiarne una, alla fine del test)					
A	B	C	D	E	F
Commenti/ Raccomandazioni:					

Allegato n.1: Test comportamentale – scheda di valutazione

Ringraziamenti:

Volevo ringraziare la Dott.ssa Normando per avermi dato la possibilità di svolgere questo lavoro, per tutto l'aiuto e i consigli, per le email e le telefonate quando ero nel panico; la Dott.ssa Marinelli per avermi aiutato nella stesura della tesi, per i consigli e le spiegazioni; i tecnici di laboratorio del Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie per la disponibilità, l'aiuto e i caffè; il Dott. Costa, il Dott. Bortolini e tutti quanti al canile di Selvazzano per l'assistenza che mi hanno dato durante la raccolta dei dati.

