

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di Laurea magistrale a ciclo unico in
MEDICINA VETERINARIA

**Il condizionamento operante come strumento per
ridurre lo stress, facilitare le misure e le
manipolazioni di routine nelle manze da latte**

Relatore

Prof. Giorgio Marchesini

Correlatore

Dott.ssa Silvia Pozzan

Laureando

Davide Quaresimin

Matricola n. 1146647

ANNO ACCADEMICO 2021/22

INDICE

| | |
|---|----|
| ABSTRACT..... | 5 |
| RIASSUNTO..... | 6 |
| 1. INTRODUZIONE | 7 |
| 1.1. Premessa..... | 7 |
| 1.2. Allevamento | 8 |
| 1.2.1. Allevamento delle manze..... | 8 |
| 1.2.1.1. Età al primo parto | 9 |
| 1.2.1.2. Accrescimento..... | 10 |
| 1.2.1.3. Fabbisogni nutrizionali..... | 12 |
| 1.2.2. Monitoraggio e standardizzazione..... | 13 |
| 1.2.3. Interazione e temperamento..... | 14 |
| 1.2.3.1. Temperamento | 14 |
| 1.2.3.2. Interazione uomo-animale..... | 15 |
| 1.3. Abitudine e condizionamento..... | 18 |
| 1.3.1. Abitudine..... | 18 |
| 1.3.2. Condizionamento classico..... | 19 |
| 1.3.2.1. Caratteristiche del condizionamento classico | 20 |
| 1.3.3. Condizionamento operante | 22 |
| 1.3.3.1. Rinforzo e punizione | 23 |
| 1.3.3.2. Schemi di rinforzo | 24 |
| 1.3.3.3. Tecniche di condizionamento | 24 |
| 1.3.3.4. Applicazione condizionamento operante | 26 |
| 1.4. Stress..... | 29 |
| 1.4.1. Asse ipotalamo-ipofisi-surrene | 30 |

| | |
|---|----|
| 1.4.2. Sistema simpatoadrenomidollare..... | 32 |
| 1.4.3. Stress acuto e cronico | 33 |
| 1.4.4. Effetti dello stress | 34 |
| 1.4.4.1. Difese immunitarie e suscettibilità ai patogeni | 34 |
| 1.4.4.2. Produzione di latte..... | 36 |
| 1.4.4.3. Accrescimento e digeribilità..... | 36 |
| 1.4.4.4. Riproduzione | 38 |
| 1.4.4.5. Comportamento..... | 39 |
| 1.4.5. Indicatori di stress..... | 39 |
| 1.4.5.1. Cortisolo | 40 |
| 1.4.5.2. Frequenza cardiaca e variabilità della frequenza cardiaca | 40 |
| 1.4.5.3. Parametri comportamentali | 41 |
| 2. OBIETTIVI DELLO STUDIO | 43 |
| 3. MATERIALE E METODI..... | 44 |
| 3.1. Animali, stabulazione, alimentazione e disegno sperimentale | 44 |
| 3.2. Misure e campionamenti all’inizio della prova, prima del condizionamento | 45 |
| 3.3. Procedure di condizionamento..... | 46 |
| 3.4. Procedure dopo il condizionamento..... | 49 |
| 3.5. Metodo analitico..... | 50 |
| 3.6. Analisi statistica..... | 50 |
| 4. RISULTATI E DISCUSSIONE..... | 52 |
| 5. CONCLUSIONI..... | 69 |
| 6. BIBLIOGRAFIA..... | 70 |

ABSTRACT

In recent years, dairy cattle farming has undergone a strong improvement, in order to combine dairy workers' needs and guarantee to animals a "life worth living" in respect of animal welfare. Different housing systems and farm management can affect animal welfare by increasing animal discomfort and increasing stress levels.

Another cause of stress for livestock could be interaction with humans during handling, movimentation and restraint procedures. Though still considered expensive, operant conditioning could be a useful tool in commercial farming to improve human-animal interaction, allowing the measure and control of heifers' growth, reducing the time needed during routine handling and the impacts of stress on animal productivity.

The aim of this study was to evaluate whether operant conditioning can be an effective tool to improve human-animal interaction and facilitating heifer handling, as well as reducing the animal's stress levels, decreasing the impact on farm productions.

The trial took place at a dairy farm in the province of Vicenza, and involved 60 heifers aged between nine and twelve months. Each animal was classified according to temperament, based on the avoidance distance test (ADT) (confident, neutral, non confident). Of these animals, 29 subjects (about ten for each temperament class) were subjected to an operant conditioning treatment using the target training technique. Behavioral observations, heart rate variability (RMSSD), and fecal cortisol metabolites (FCM) levels were analyzed. In addition, data on the conception rate of the heifers were collected.

The results show that operant conditioning is a useful tool to reduce the fear of animals towards humans by increasing animal relaxation, leading to an improvement in ADT results between the beginning and the end of the test ($P < 0.001$) and an increase in RMSSD values ($P = 0.001$). Furthermore, the target training also tended to be significant in increasing the RMSSD values ($P = 0.077$).

Furthermore, the study found that if operant conditioning is applied to a group of animals and not to a single individual, the time required by the farmer for the treatment is acceptable (5 minutes per day for a farm of 100 heifers), and doesn't seem to have a relevant influence on the increase in annoying behaviors.

RIASSUNTO

Negli ultimi anni l'allevamento della bovina da latte ha subito una forte evoluzione, necessaria per coniugare le esigenze lavorative dell'allevatore e garantire agli animali una vita degna di essere vissuta in rispetto del benessere animale. La stabulazione degli animali e l'organizzazione della stalla possono influenzare il benessere animale, aumentando sia il *discomfort* dell'animale che i livelli di stress.

Un'altra causa di stress per l'animale in allevamento può essere l'interazione con l'uomo durante le procedure di manipolazione, movimentazione e contenimento. Il condizionamento operante potrebbe essere uno strumento utile in allevamento, sebbene ancora considerato dispendioso, per migliorare l'interazione uomo-animale, consentendo la misurazione e il controllo dell'accrescimento, riducendo sia il tempo necessario nella gestione della mandria che gli effetti negativi dello stress sulla produttività degli animali.

Lo scopo dello studio è stato quello di valutare se il condizionamento operante possa risultare uno strumento efficace per migliorare l'interazione con l'uomo e facilitare le procedure di manipolazione e misurazione, oltre a ridurre i livelli di stress dell'animale, diminuendo gli effetti negativi sulla produttività della mandria.

La prova si è svolta in un allevamento di bovine da latte in provincia di Vicenza, e ha interessato 60 manze di età compresa tra i nove e i dodici mesi. Ogni esemplare è stato suddiviso in base al temperamento, utilizzando l'*avoidance distance test* (ADT) (confidenti, neutre, non confidenti). Di questi animali, 29 soggetti, circa dieci per ogni classe di temperamento, sono stati sottoposti ad un trattamento di condizionamento operante utilizzando la tecnica del *target training*. Si sono analizzate le osservazioni comportamentali, la variabilità della frequenza cardiaca (RMSSD), e i livelli di metaboliti fecali del cortisolo (FCM) e il tasso di concepimento delle manze.

Dai risultati ottenuti, il condizionamento operante risulta uno strumento utile per ridurre la paura degli animali nei confronti dell'uomo, portando gli animali ad essere più rilassati, comportando inoltre, tra l'inizio e la fine della prova, un miglioramento dei risultati dell'ADT ($P < 0,001$) e un aumento dei valori di RMSSD negli animali ($P = 0,001$). Inoltre, anche il *target training* è risultato essere tendenzialmente significativo nell'aumentare i valori di RMSSD ($P = 0,077$).

Inoltre, lo studio ha messo in luce che se il condizionamento viene applicato ad un gruppo di animali e non sul singolo individuo, il tempo richiesto all'allevatore per il trattamento è accettabile (5 minuti al giorno per un'azienda con 100 manze), e che non sembra avere un'influenza rilevante sull'aumento di comportamenti fastidiosi.

1. INTRODUZIONE

1.1. Premessa

Negli ultimi anni, il miglioramento dell'efficienza delle produzioni nell'allevamento della bovina da latte ha assunto sempre maggiore importanza come obiettivo chiave per andare incontro alle necessità produttive ed economiche, le esigenze di riduzione dell'impatto ambientale degli allevamenti e la salvaguardia del benessere e della salute animale che, secondo il principio di "One Health", influenzano la salute dell'uomo.

Alcuni studi hanno dimostrato che il condizionamento e l'introduzione graduale degli animali alla routine dell'allevamento possa aiutare a ridurre il tempo utilizzato per manipolare, movimentare e contenere gli animali. Inoltre, potrebbe essere uno strumento utile per migliorare l'interazione tra personale e animali e quindi abbassare i livelli di stress.

Le bovine da latte, infatti, sono quotidianamente esposte a molteplici situazioni stressanti, di maggiore o minore intensità, che possono andare a ridurre il benessere dell'animale e di conseguenza anche i parametri produttivi della mandria.

1.2. Allevamento

Durante gli ultimi decenni enormi miglioramenti sono stati apportati nell'allevamento della bovina da latte, con una migliore gestione della mandria e della nutrizione, salute e genetica degli animali, fattori che hanno portato ad un generale incremento della produttività (Connor, 2015). Gli allevamenti sono diventati più grandi, con un incremento della produzione di latte, così come dei parametri qualitativi, il tutto con una diminuzione della manodopera necessaria, grazie alla presenza di ausili tecnologici che hanno reso più veloce la mungitura e altre operazioni quotidiane (Mottram, 2016).

In aggiunta, la richiesta di prodotti derivanti dall'allevamento della bovina da latte aumenterà nei prossimi cinquant'anni, sia per una crescita della popolazione mondiale, sia per un incremento del reddito pro capite, fattori che faranno salire la richiesta di prodotti caseari, necessari per assicurare i nutrienti essenziali per una corretta alimentazione (Britt et al., 2018).

Per fare fronte ad una maggiore necessità di sostenibilità, sia in termini economici che ambientali, allevamenti intensivi e con una numerosità della mandria sempre maggiore, sembrerebbero essere i modelli di produzione più adatti (Britt et al., 2021).

Questa tendenza è spinta anche dalla necessità economica di investire su sistemi automatizzati all'interno della stalla (Britt et al., 2018). Grazie ad un costo delle componenti elettroniche, che fino ad un paio di anni fa era diventato più conveniente, ed allo sviluppo di sensori e componenti automatizzate (Mottram, 2016), nelle bovine in lattazione hanno già cominciato ad essere utilizzate tecniche di *precision livestock farming*, per monitorare la salute, produttività e fertilità degli animali, l'impatto ambientale dell'allevamento (Britt et al., 2018) e l'efficienza dell'alimentazione (Connor, 2015).

1.2.1. Allevamento delle manze

Uno degli aspetti fondamentali dell'allevamento del bovino da latte è la rimonta degli animali. Le vacche che vengono riformate devono essere sostituite da manze di alto valore genetico, nutrite adeguatamente e in salute (Heinrichs e Swartz, 2000). Il periodo che va dalla nascita della vitella fino all'inizio della produzione di latte da parte della bovina dopo il primo parto dura mediamente tra i due e i due anni e mezzo, in cui le risorse economiche investite non hanno un ritorno immediato, ma sono necessarie per raggiungere una produzione di latte stabile (Connor, 2015).

Data l'importanza di questi animali, le strutture di allevamento devono essere adeguate. Come riportato da Heinrichs e Swartz (2000), le manze devono essere divise in gruppi in base all'età e alla taglia, con un'alimentazione che può variare, se necessario, tra i diversi gruppi e i box devono permettere un'adeguata pulizia e l'accesso a zone di riposo. Gli animali devono essere facilmente osservabili e la presenza di autocatture è essenziale per permettere il contenimento e una manipolazione efficiente. Tali strutture possono essere usate per il monitoraggio dei parametri di crescita, vaccinazioni e trattamenti, diagnosi di gravidanza, sincronizzazione degli estri, *l'embryo-transfer* e la raccolta di materiale fecale per analizzare la digeribilità (Cortese et al., 2019). Le infrastrutture dell'allevamento devono permettere una facile movimentazione tra i diversi gruppi di manze, in quanto sono animali che vengono spostati in base alla loro crescita, pratica piuttosto stressante soprattutto per animali giovani (Soonberg et al., 2021).

Un monitoraggio regolare è quindi importante per tenere sotto controllo i parametri di crescita, fertilità e salute delle manze, per permettere una crescita ottimale e un'adeguata produzione di latte nella fase adulta (Svensson e Hultgren, 2008).

A supporto delle esigenze commerciali, negli ultimi vent'anni, c'è stato un importante incremento delle pubblicazioni per quanto riguarda la crescita, la nutrizione e il management delle manze (Heinrichs et al., 2017).

1.2.1.1. Età al primo parto

La maggior parte delle strategie di crescita delle manze mira a ridurre l'età al primo parto per ridurre i giorni non produttivi, senza interessare negativamente la futura produttività (Niekerk et al., 2021). Per massimizzare il profitto a vita delle manze, e bilanciare i costi di allevamento con la produzione latte, il primo parto dovrebbe avvenire quando l'animale ha tra i 23 e i 25 mesi (Risco et al., 2011). Fattori gestionali che aumentano l'efficienza di crescita delle manze, riducendo il tempo tra lo svezzamento dell'animale e il primo parto, senza impattare negativamente la futura produttività, potrebbero influenzare positivamente la redditività dell'allevamento. Negli allevamenti commerciali, in cui la Frisona è la razza maggiormente presente, l'età al primo parto potrebbe essere in media di 22 mesi, data l'attuale genetica di razza e le avanzate possibilità manageriali (Heinrichs et al., 2017). La riproduzione ad un'età inferiore deve essere accompagnata ad una precisa gestione dell'accrescimento, perché è stato dimostrato che un primo parto precoce, senza garantire un adeguato sviluppo fisico, riduce la produzione della prima lattazione (Heinrichs et al., 2017). È quindi

necessario che le manze rispettino dei precisi parametri di accrescimento, come il peso corporeo, l'altezza al garrese e il BCS.

1.2.1.2. Accrescimento

Secondo le linee guida per l'accrescimento delle manze, al momento del parto gli animali dovrebbero pesare tra i 550 e i 625 kg, circa l'82% del peso maturo, anche se studi recenti hanno riportato una maggiore produzione alla prima lattazione con pesi target tra il 73% e il 77%, senza che venga compromessa la produzione a lungo termine (Niekerk et al., 2021). L'altezza al garrese dovrebbe essere di 130 cm e il BCS tra 3,25-3,75 (in una scala da 1 a 5) (Risco et al., 2011).

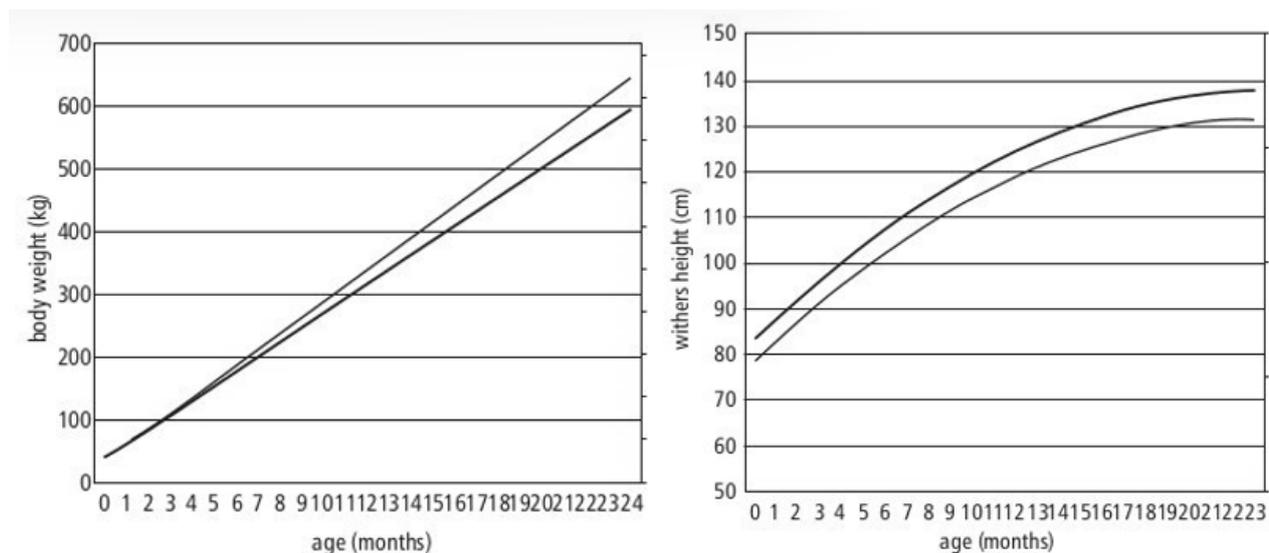


Figura 1.1: Range dell'incremento del peso corporeo e dell'altezza al garrese nelle manze di razza Frisone, (Risco et al., 2011), modificata

Di conseguenza, l'incremento ponderale giornaliero (IPG) dalla nascita al parto dovrebbe essere 0,7-0,8 kg/giorno, con un incremento ottimale di 799 g/giorno prima della pubertà (Heinrichs et al., 2017). Il monitoraggio degli animali è quindi di notevole importanza per controllarne la crescita, perché un incremento ponderale troppo basso o troppo alto potrebbe portare a problematiche legate allo sviluppo (Risco et al., 2011).

Con una velocità di crescita troppo limitata, l'animale va in calore più tardivamente e quindi si posticipano fertilizzazione e parto, riducendo le performance della mandria, inoltre le manze sottopeso hanno bisogno di maggiore assistenza al parto e hanno un maggior tasso di mortalità durante il parto e di nati morti (Risco et al., 2011). Inoltre, un basso BCS è associato allo sviluppo di endometriti, un periodo anovulatorio post-parto più lungo e un ridotto tasso di fertilità (Meier et al., 2020).

Se invece il tasso di accrescimento è troppo elevato c'è il rischio di avere animali in sovrappeso. Un BCS troppo alto comporta un maggior rischio di disturbi metabolici e di distocia, a causa del basso sviluppo pelvico e di un maggiore deposito di grasso a livello del canale del parto (Zaborski et al., 2009).

È importante tenere in considerazione anche il periodo di vita dell'animale per valutare l'incremento ponderale giornaliero e l'accrescimento. Infatti, manze che guadagnano più peso nei primi mesi di vita produrranno più latte alla prima lattazione, apparentemente per un epitelio mammario più sviluppato e che quindi produrrà più latte (Britt et al., 2018), ma una razione eccessivamente energetica potrebbe inficiare lo sviluppo del parenchima della ghiandola mammaria, causando il deposito di grasso prima del normale sviluppo del sistema duttale (Risco et al., 2011). Una nutrizione più spinta dopo lo svezzamento porta ad un maggior spessore endometriale, follicoli più grandi ed in numero più elevato, oltre a raggiungere la pubertà più velocemente (Niekerk et al., 2021), ma un aumento del numero di follicoli primordiali è stato osservato anche a seguito di un incremento ponderale ridotto poche settimane prima della pubertà (Britt et al., 2018). Manze gravide che crescono meno durante i primi stadi della gravidanza partoriranno vitelle con un numero di follicoli antrali più basso (Britt et al., 2018). Per quanto riguarda vacche primipare è anche provato che una nutrizione più spinta a fine lattazione ed una leggera restrizione durante l'ultimo mese di gestazione migliora il profilo metabolico all'inizio della lattazione successiva, con una riduzione dell'anestro post-parto e aumento della fertilità (Meier et al., 2020).

Per evitare che le manze siano in sovrappeso, i concentrati sono usati con cautela nella dieta per gli animali prepuberi, e vengono invece usati una maggiore quantità di foraggi che talvolta risultano essere anche di bassa qualità. Tuttavia, la durata ottimale di una dieta ad alto livello di concentrati e come questa impatti sull'accumulo di grasso, l'efficienza di conversione e la futura produzione di latte non sono ancora del tutto chiari (Niekerk et al., 2021). Troppo foraggio nella dieta però riduce l'ingestione di sostanza secca, e la qualità del fieno influenza la crescita dell'animale e l'efficienza del mangime (Heinrichs et al., 2017).

1.2.1.3. Fabbisogni nutrizionali

Una crescita adeguata si ottiene se sono soddisfatti i fabbisogni energetici e proteici, calcolati in base all'energia e alle proteine da depositare nei tessuti in accrescimento (Risco et al., 2011). L'utilizzo di proteine, da includere in una dieta ad alto livello di fibre, per la crescita dell'animale e dei tessuti è valorizzata solo se le proteine sono utilizzate in modo efficiente (Niekerk et al., 2021), e recenti studi hanno dimostrato un aumento lineare dell'efficienza di conversione (kg di aumento peso corporeo/kg di alimento ingerito), dell'aumento del peso giornaliero e della crescita strutturale dell'animale con l'aumento del rapporto tra proteine grezze e energia metabolizzata (CP:ME) (Heinrichs et al., 2017).

Se l'ingestione di proteine è inferiore a quella adeguata alla crescita della massa magra, l'energia in eccesso viene convertita in tessuto lipidico, inoltre un adeguato quantitativo di azoto utilizzato a livello ruminale è importante anche per la corretta crescita della flora microbica (Niekerk et al., 2021).

Heinrichs et al. (2017) riporta che l'efficienza di conversione dell'azoto sembrerebbe essere ottimizzata con un quantitativo di 1,67 g di N/kg di peso metabolico, indipendentemente dal livello dei foraggi nella dieta. Manze con un'alimentazione limitata ad alto livello di energia hanno una maggiore efficienza di conversione e crescita dei tessuti magri, producendo meno escrementi e quindi diminuendo l'escrezione di azoto attraverso una minore ingestione (Heinrichs et al., 2017).

I fabbisogni alimentari devono essere adeguati alle condizioni ambientali e manageriali, in quanto la temperatura ambientale influisce sull'energia necessaria per il mantenimento del metabolismo, tenendo in considerazione che vari fattori possono impattare negativamente sull'ingestione di sostanza secca (Risco et al., 2011).

Anche per le manze ha assunto sempre più importanza comprendere il fabbisogno di vitamine e minerali nella dieta. Vitamine e minerali sono indispensabili per un corretto sviluppo e accrescimento, e come supporto per la riproduzione, la salute e le difese immunitarie delle manze, e la componente di foraggi nella dieta contribuisce in modo significativo ai fabbisogni di vitamine e minerali degli animali (Heinrichs et al., 2017). Le manze dovrebbero avere libero accesso ai macro e micro elementi (Ca, P, Mg, Cl, Na, K, S, Zn, Cu, Fe) (Risco et al., 2011), mentre per quanto riguarda le vitamine dei gruppi B e C, sembrerebbe che le manze riescano a sintetizzarne in quantità sufficiente (Heinrichs et al., 2017).

1.2.2. Monitoraggio e standardizzazione

Lo sviluppo dell'animale inizia già al momento del concepimento, fase in cui la dinamicità dello sviluppo è al suo massimo, e quindi la gestione dell'alimentazione dalla fase intrauterina fino al primo parto potrebbe contribuire allo sviluppo completo della vitella e quindi migliorare la futura produzione lattea (Niekerk et al., 2021). Molti fattori possono andare ad influenzare la futura produzione della vitella durante tutta la crescita, come le strutture dell'allevamento, la razza, la presenza di diarree infantili e la gestione dell'alimentazione (Svensson e Hultgren, 2008). Capire il momento e il modo in cui è più opportuno svezzare la vitella, oltre a comprendere appieno i requisiti alimentari durante le prime fasi di vita è sicuramente un passo importante per migliorare lo sviluppo degli animali, anche se queste fasi non sembrerebbero avere primaria importanza nella redditività degli allevamenti (Niekerk et al., 2021).

Il miglioramento dell'efficienza delle produzioni durante tutta la fase di crescita dell'animale potrebbe essere raggiunto attraverso l'alimentazione di precisione implementabile attraverso una standardizzazione dell'allevamento (Niekerk et al., 2021) e il monitoraggio costante delle manze che spesso viene snobbato per una sottostima dell'importanza degli animali, per il poco tempo a disposizione e per la difficoltà di farlo.

In letteratura si trovano risultati talvolta contrastanti sulla corretta gestione alimentare delle manze, e questo è probabilmente dovuto alle notevoli differenze metodologiche nella frequenza di alimentazione, il livello di proteine, il periodo di studio e l'età al primo parto (Svensson e Hultgren, 2008) utilizzati nelle diverse ricerche. Le revisioni sistematiche e le meta-analisi sono complicate perché molti studi primari riguardanti la ricerca su vitelli e manze sono incompleti. La comunità scientifica impegnata nella ricerca delle bovine da latte dovrebbe seguire delle linee guida per la presentazione dei risultati delle prove effettuate sul bestiame, in modo da sviluppare una comprensione completa di come la nutrizione abbia un effetto sulla programmazione della crescita dell'animale (Niekerk et al., 2021). La mandria, infatti, è da considerare l'unità produttiva ed economica centrale nell'allevamento da latte, e gli animali dovrebbero essere gestiti nel migliore dei modi durante tutto l'arco di vita, dai trattamenti durante il post-parto fino alle ultime fasi di produzione (Britt et al., 2018).

1.2.3. Interazione e temperamento

Il monitoraggio frequente non è però semplice nelle manze, sia per le strutture di allevamento non sempre ottimali, sia perché il tempo a disposizione è limitato e gli esemplari non sono abituati all'essere manipolati. Animali che hanno visto raramente una persona sono spesso difficili da manipolare (Grandin, 1998). Le reazioni alla manipolazione e al contenimento sono parte della risposta "*flight or fight*" che è una delle principali componenti della risposta stressogena e associata ad uno stato emotivo di paura (Grandin, 1998). Le risposte di paura in una particolare situazione non sono facili da predire, perché le reazioni dell'animale sono governate da complesse interazioni tra fattori individuali ed esperienze pregresse (Grandin, 1997).

1.2.3.1. Temperamento

Per spiegare le differenze individuali vengono comunemente utilizzati i termini personalità o temperamento, con cui si indicano differenze di comportamento che sono stabili nel tempo e nei vari contesti (Sutherland et al., 2012). Il termine temperamento è anche usato per indicare le risposte comportamentali di un animale alle manipolazioni da parte dell'uomo (Neja et al., 2015).

Per via dei numerosi test utilizzati per classificare i tratti comportamentali, il temperamento è difficile da valutare e standardizzare, e le misure sono considerate spesso soggettive (Neja et al., 2015). Le risposte comportamentali usate per descriverlo includono risposte nei confronti delle persone, ad un ambiente nuovo e all'isolamento sociale (Hedlund e Løvlie, 2015). I test che comunemente sono utilizzati per descrivere la personalità sono l'*exit speed test* (EST) che misura il tempo impiegato per uscire da un dispositivo di contenimento, il *restraint test* (RT) in cui si osserva il comportamento dell'animale mentre è all'interno di un travaglio, l'*avoidance distance test* (ADT) in cui si misura quanto un operatore si può avvicinare all'animale prima che questo si sposti, effettuato sia con l'animale libero che in cattività, e il *voluntary approach test* (VAT) che prende in considerazione quanto un animale si avvicini volontariamente ad una persona già posizionata. Questi test, quindi, misurano diversi tratti del temperamento e del comportamento dell'animale, per cui l'ADT potrebbe essere più accurato per misurare il livello di paura nei confronti delle persone, mentre il VAT potrebbe dare più indicazioni sulla curiosità (Sutherland et al., 2012). In generale l'ADT può essere raccomandato, per via della sua affidabilità e validità convergente (Windschnurer et al., 2008).

La classificazione degli animali in base alla personalità non è quindi univoca, ma nei vari studi le suddivisioni usate sono simili e si basano sulla reattività degli individui e come interagiscono con l'ambiente. Alcune categorie utilizzate sono calmi; normali; eccitabili o aggressivi (Neja et al., 2015), *low responders* (LR); *medium responders* (MR); *high responders* (HR) (Sutherland et al., 2012), e *adequate*; eccitabile (Brandão e Cooke, 2021).

È stato dimostrato che variazioni del temperamento siano correlate con tratti rilevanti per la produzione zootecnica, come l'accrescimento e la suscettibilità alle malattie, e che vacche più nervose producono meno degli animali calmi (Hedlund e Løvlie, 2015). Ad esempio, uno studio di Neja et al. (2015) ha concluso che la produzione di latte totale, la produzione di latte giornaliera alla prima lattazione e la produzione di latte per giorni di età dipendono dal temperamento della vacca. Inoltre, una durata di vita e vita produttiva maggiore e un più alto numero di parti sono stati osservati in vacche con un temperamento calmo. Al contrario animali con un temperamento eccitabile sono più predisposti a mostrare reazioni di panico quando si confrontano con una nuova esperienza e quindi ad essere pericolosi per sé stessi e per il personale (Grandin, 1998).

Se però si vanno a confrontare più lavori i risultati sono a volte incongruenti, e questo potrebbe essere, almeno in parte, dovuto a differenze metodologiche e al confronto di diversi tratti, sia produttivi che comportamentali (Hedlund e Løvlie, 2015).

Le relazioni che si instaurano sono complesse, ma comprenderle potrebbe dare la possibilità di selezionare gli animali in base al loro temperamento con animali che si adattano meglio a situazioni stressanti (Sutherland et al., 2012), la cui importanza aumenta in allevamenti sempre più intensivi, in un'ottica sia di produzione ma soprattutto di benessere animale (Neja et al., 2015).

1.2.3.2. Interazione uomo-animale

Anche le esperienze pregresse hanno un ruolo nel comportamento dell'animale, in quanto possono imparare a predire, da alcuni segnali e stimoli, a che tipo di manipolazione andranno incontro e quindi mostrarne avversione (De Passillé et al., 1996). Inoltre, i bovini possono imparare ad associare un particolare trattamento avverso ad uno specifico luogo, associazione che a seguire è difficile da cambiare con un altro tipo di manipolazione (Rushen, 1996). Bovini che sono stati manipolati in modo tranquillo e calmo nell'allevamento di origine sono più facili da gestire rispetto ad animali che invece hanno subito manipolazioni brusche (Grandin, 1998). Allevatori di bovine da latte che parlano

e manipolano i loro animali in modo piacevole tendono ad avere esemplari più produttivi e che sono più facili da avvicinare e quindi da monitorare (Rushen, 1996). In aggiunta, le manipolazioni brusche sono sicuramente nocive e stressanti per animali che hanno un temperamento più eccitabile (Grandin, 1997).

L'interazione tra animale ed operatori è ancora più importante quando si prendono in considerazione le manze che, dopo il parto, vengono improvvisamente sottoposte a molte novità stressanti, come nuove gerarchie, routine gestionali più frequenti e alla mungitura (Sutherland et al., 2012). Durante queste manovre i bovini reagiscono agli stimoli ambientali e all'allevatore. Insieme al lavoro a stretto contatto con le vacche, la sala di mungitura è considerata l'area con il maggior rischio di infortuni sul lavoro per il personale di allevamento (Sorge et al., 2014). Animali stressati sono più portati a provare a scappare, e quindi scivolare ed infortunarsi, e questo porta anche ad infortuni del personale. Gli incidenti sul lavoro sono una parte importante nella perdita di giorni lavorativi, e negli allevamenti bovini degli Stati Uniti si sono verificati lavorando con gli animali nel 73.3% dei casi e sono in predominanza dovuti ad un errore nelle manipolazioni da parte degli operatori (Sorge et al., 2014). Il personale di allevamento è il fattore di maggior importanza per assicurare il benessere degli animali, e la mancanza di abilità o l'incapacità di gestire gli animali hanno grande rilievo nell'incidenza degli infortuni sul lavoro. Chi manipola i bovini deve essere preparato su come movimentarli, facendo attenzione a rispettare delle indicazioni di base. I bovini devono essere manipolati con tranquillità e movimentati lasciando libera la *flight zone* dell'animale, e usando aiuti per guidare gli animali come bastoni o aste, evitando movimenti bruschi e forti rumori. Può essere utile utilizzare comportamenti tipici della specie come il *following behavior*, inoltre è importante evitare il sovraffollamento di aree chiuse e avvicinarsi con cautela un animale isolato (Grandin, 1998). L'utilizzo di buone pratiche di sicurezza sul lavoro possono ridurre il numero di infortuni del personale e prevenire altre patologie, come quelle gastrointestinali attuando buone pratiche igieniche a seguito di contatto diretto con gli animali e le loro deiezioni (Juárez-carrillo et al., 2016). È riportato che gli allevamenti in cui gli operatori hanno seguito un corso sulle pratiche di allevamento hanno una media di produzione di latte per lattazione più alta rispetto agli allevamenti in cui non è stato effettuato (Sorge et al., 2014).

Secondo il principio di “One Health” una buona interazione tra gli animali e il personale ha un impatto non solo nelle performance dell’allevamento per quanto riguarda la produttività dei primi, ma anche riducendo il numero di giorni lavorativi persi e i costi sanitari. Una manipolazione poco stressante è cruciale sia per assicurare un buon livello di benessere animale che per promuovere il lavoro in sicurezza.

1.3. Abitudine e condizionamento

Un buon rapporto tra personale-animale e la placidità di questi ultimi anche durante le manipolazioni facilita notevolmente la routine manageriale dell'allevamento, tra cui la misurazione delle performance produttive. Un basso numero di animali spaventati che si bloccano, sfuggono alle manipolazioni o hanno atteggiamenti pericolosi verso il personale porta ad un risparmio di tempo per l'allevatore e ad una riduzione dello stress per gli animali stessi. Avere animali più calmi riduce il rischio di incidenti sul lavoro (Grandin, 1998) ed è correlato ad una maggiore produzione di latte nelle vacche (Hedlund e Løvlie, 2015).

Un modo per raggiungere questi obiettivi è quello di abituare gli animali alla presenza dell'uomo e di condizionarli alle manipolazioni. Perché ciò avvenga gli animali devono cambiare il proprio comportamento in base alla loro esperienza, devono cioè apprendere (Mellen e Ellis, 1996).

I principali tipi di apprendimento usati per addestrare gli animali sono l'apprendimento non associativo e quello associativo, che comprende il condizionamento classico e il condizionamento operante.

1.3.1. Abitudine

Nei processi di apprendimento non associativi come l'assuefazione, anche detta abitudine, e del suo opposto, sensibilizzazione, la frequenza di un comportamento esistente viene modificata in risposta a uno stimolo, che viene presentato ripetutamente. Nel caso dell'abitudine si ha un calo della risposta alla presenza dello stimolo. Il calo può essere lineare o esponenziale. Come tutto l'apprendimento, l'assuefazione è un processo reversibile e mostra un recupero spontaneo. L'assuefazione è molto importante negli allevamenti, perché far familiarizzare gli animali, attraverso un processo di apprendimento, alla presenza di nuovi oggetti o procedure nell'ambiente in cui vivono può ridurre lo stress e quindi migliorarne il benessere e le prestazioni produttive (Dirksen et al., 2020a).

Particolare interesse è stato riservato a come l'adattamento alla mungitura delle manze possa avere un effetto positivo per quanto riguarda la produzione di latte, i livelli di stress e i comportamenti alla mungitura. Alcuni risultati sono stati contrastanti, dovuti all'interferenza del temperamento dell'animale (Sutherland et al., 2012), al periodo di gravidanza delle manze (Kuhlberg et al., 2021), o alle tecniche utilizzate, in base alle quali tra gli animali addestrati e quelli di controllo sono state riportate differenze significative (Das e Das, 2004), differenze ma non sempre significative

(Bertenshaw et al., 2008), o nessuna differenza è stata riscontrata (Kutzer et al., 2015). In tutti questi casi è comunque riportato un miglioramento del comportamento in mungitura degli animali addestrati e quindi l'adattamento risulta una pratica con buone potenzialità.

1.3.2. Condizionamento classico

Tra i vari tipi di condizionamento possiamo trovare il classico, che è basato sull'associazione di uno stimolo inizialmente neutro (SN), che non causa una risposta, e uno stimolo incondizionato (SI) che invece causa una risposta spontanea (RI), questo permette che, una volta che l'animale è stato condizionato, lo stimolo originariamente neutro, ora diventato stimolo condizionato (SC), causi una risposta (RC) nell'animale anche senza la presenza del secondo stimolo (Strickland, 2001). Questo meccanismo è anche detto condizionamento Pavloviano, dal nome dello scienziato Ivan Pavlov che lo studiò e descrisse.

Generalmente il condizionamento classico è utilizzato per insegnare comportamenti involontari, risposte legate a riflessi, emozioni e motivazioni. Un esempio è l'associazione dei rumori della sala di mungitura all'eiezione di latte nelle vacche. Se inizialmente l'eiezione di latte (RI) è stimolata solo dall'allattamento simulato della mungitrice (SI), a seguito di un condizionamento riuscito, il suono proveniente dalla sala di mungitura è diventato lo SC che provoca l'espulsione del latte (RC) (Dirksen et al., 2020a).

Perché uno stimolo venga condizionato devono essere soddisfatte alcune condizioni. Lo stimolo neutro deve essere percepibile per l'animale e abbastanza saliente da non essere "nascosto" dall'ambiente circostante. Inoltre, è di notevole importanza che lo SN sia sempre seguito dallo SI, o almeno la maggior parte delle volte, in modo che ci sia una consequenzialità tra i due stimoli. Di estrema importanza per la buona riuscita dell'addestramento è anche la contiguità temporale tra SN e SI, in cui una maggiore efficacia si avrà se lo stimolo neutro compare appena prima che lo stimolo incondizionato venga presentato e in un breve lasso di tempo, o se lo stimolo neutro continua anche dopo la comparsa dello stimolo incondizionato. In questo modo non c'è il tempo per altri eventi per interferire sulla relazione predittiva (Mendl e Nicol, 2022). Quando l'intervallo di tempo si dilata il condizionamento generalmente perde di efficacia. In particolari circostanze però può passare parecchio tempo e l'associazione può risultare comunque forte, a patto che ci sia una forte probabilità per quanto riguarda la relazione tra i due stimoli. Questo è il caso dell'apprendimento dell'avversione al cibo a seguito dell'ingestione di un nuovo alimento, in cui

l'animale inizia a percepire disturbo anche alcune ore dopo il consumo della nuova sostanza in quanto è l'evento più biologicamente plausibile per la comparsa del malessere (Mendl e Nicol, 2022).

1.3.2.1. Caratteristiche del condizionamento classico

Una delle caratteristiche più importanti del condizionamento classico è sicuramente l'estinzione. Se infatti lo SC viene a presentarsi in più occasioni senza essere seguito dallo SI, a un certo punto la RC sarà indebolita fino a scomparire. Questo fenomeno è importante perché permette all'animale di adattarsi ad un ambiente mutevole (Dirksen et al., 2020a).

Anche se la risposta condizionata scompare, l'estinzione non è mai completa. A seguito di un intervallo di tempo abbastanza lungo se lo stimolo condizionato viene presentato nuovamente si avrà la ricomparsa della risposta condizionata precedentemente estinta, anche se in minor misura rispetto a prima dell'estinzione. Inoltre, in animali in cui un condizionamento è andato incontro ad estinzione, un nuovo addestramento sarà più veloce (Stangor e Walinga, 2014).

Fin dai primi esperimenti di Pavlov si è notato che a seguito del condizionamento può verificarsi il fenomeno della generalizzazione. L'organismo ha la tendenza a rispondere a stimoli che assomigliano all'originale stimolo condizionato.

L'altra faccia della medaglia è la discriminazione, in cui l'organismo risponde in maniera diversa a stimoli simili ma non identici, e la risposta condizionata è provocata solo da stimoli identici allo stimolo condizionato (Stangor e Walinga, 2014).

Entrambi questi fenomeni si sono verificati in un esperimento riportato da Wredle et al. (2004), in cui tre animali sono stati condizionati con un tono positivo e un tono negativo ad avvicinare la mangiatoia. In due animali si è notata generalizzazione tra i due diversi toni, mentre in uno si è osservata discriminazione.

Nelle realtà aziendali la generalizzazione potrebbe essere un fenomeno importante, se il condizionamento imparato in un determinato contesto si ripresentasse in un contesto simile. In questo modo animali già condizionati non dovrebbero ripetere l'addestramento se spostati in un altro box o area dell'allevamento. Dimostrazione di ciò è stata riportata per il riflesso di espulsione di latte nelle vacche (Dirksen et al., 2020a).

Durante un addestramento più stimoli neutri possono essere associati in modo da formare una catena, in cui uno stimolo condizionato non è strettamente contingente con lo stimolo incondizionato. Se uno SC esistente funge da SI per un abbinamento con un nuovo SC, il processo prende il nome di condizionamento di ordine superiore (Stangor e Walinga, 2014).

Se gli stimoli neutri vengono associati prima del condizionamento si parla di pre-condizionamento, mentre se lo sono contemporaneamente allo stimolo neutro si parla di condizionamento seriale.

Più stimoli neutri possono però andare incontro a fenomeni di interferenza che condizionano la buona riuscita del condizionamento. Nel caso dell'*overshadowing*, la presenza di due stimoli con diversa salienza diventerà stimolo condizionato quello più percepibile o importante, come per esempio il rumore del motore che distribuisce l'alimento rispetto ad un tono usato come stimolo neutro (Wredle et al., 2004).

Un altro esempio di interferenza è il blocco, in cui il condizionamento di un nuovo stimolo neutro è inibito se viene presentato in contemporanea ad uno stimolo condizionato già in precedenza. Ad esempio, se un cane ha subito un condizionamento per cui a seguito di un suono (SC) associato al cibo (SN), risponde con la salivazione (RC), e dopo varie sessioni insieme al suono viene mostrato all'animale un nuovo stimolo neutro, come una luce, quest'ultimo non diventerà stimolo condizionato e il cane non saliverà se la luce viene presentata come unico stimolo (Vandbakk et al., 2020).

Inoltre, anche se una RC è stata addestrata con successo a presentarsi a seguito di uno SC, uno stimolo come un rumore molto forte ne può inibire la risposta se compare più o meno nello stesso momento. La rilevanza biologica di ciò è data dalla necessità di eseguire una risposta antipredatoria anche durante azioni che prevedono risposte basate sui riflessi (Dirksen et al., 2020a).

Un'ultima caratteristica cruciale del condizionamento classico è che la sequenza degli eventi non è dipendente dal comportamento dell'animale (Mellen e Ellis, 1996), quindi le tecniche di condizionamento classico possono essere utili nelle realtà di allevamenti automatizzati, senza il bisogno di un'osservazione diretta e costante del comportamento dell'animale. È da tenere comunque in considerazione che l'uso del condizionamento Pavloviano è meno efficace del condizionamento operante, e che i risultati possono essere fortemente influenzati dal modo in cui viene svolto l'addestramento (Wredle et al., 2004).

1.3.3. Condizionamento operante

Un secondo tipo di apprendimento associativo è il condizionamento operante, anche detto strumentale (dall'inglese *instrumental* con il significato di "utile a, determinante per"), per cui un animale dirige un suo comportamento ad una nuova parte del suo ambiente o impara ad eseguire un comportamento, in modo da ottenere una ricompensa (Mendl e Nicol, 2022).

Al contrario del condizionamento classico, il condizionamento operante è fortemente dipendente dal comportamento dell'animale, che "opera" sull'ambiente per ricevere una ricompensa o evitare una punizione (Mellen e Ellis, 1996). Altra differenza è che generalmente il condizionamento strumentale è associato all'addestramento dei comportamenti volontari (Dirksen et al., 2020a).

Il primo a formalizzare questo meccanismo di condizionamento fu lo psicologo americano Edward Thorndike, attraverso gli esperimenti condotti con l'utilizzo della "*puzzle box*". Un gatto inserito in un box impara per prove ed errori il comportamento da eseguire per uscire, in questo caso abbassare una leva, per uscire dal box motivato dalla presenza di cibo. Nei tentativi successivi il gatto ci metterà meno tempo a toccare la leva e il numero di tentativi diminuirà fino a scomparire (Thorndike, 1905). Sulla base di esperimenti simili a questo, Thorndike formulò la "legge dell'effetto", secondo cui:

"Le risposte, emesse in una determinata situazione, seguite da una soddisfazione avranno più probabilità di essere ripetute, mentre le risposte seguite da un fastidio avranno meno probabilità di essere emesse" (Gray, 2011).

Basandosi su questi concetti, il comportamentista B.F. Skinner coniò il concetto di condizionamento operante, in cui con operante si riferiva ad un qualsiasi comportamento attivo che ha un effetto sull'ambiente circostante. Skinner, infatti, sosteneva che, per capire un comportamento, il modo migliore fosse quello di guardare alle cause esterne e alle sue conseguenze (McLeod, 2015).

Skinner distingueva tra due tipologie di comportamento, comportamenti del rispondente e comportamenti operanti. I primi sono quelli che occorrono automaticamente e di riflesso, e quindi fanno riferimento al condizionamento classico. I secondi invece sono i comportamenti che sono sotto il controllo cosciente. Possono verificarsi spontaneamente o intenzionalmente, ma sono le conseguenze di queste azioni a far sì che si verifichino in futuro o meno (Cherry e Gans, 2019).

1.3.3.1. Rinforzo e punizione

Similmente a Thorndike anche Skinner studiò il condizionamento operante conducendo degli esperimenti attraverso le “*Skinner box*”, delle gabbie che potevano contenere un piccolo animale come un ratto o un piccione. Inoltre, erano presenti delle leve che gli animali potevano premere in modo da ricevere una risposta (Cherry e Gans, 2019).

Skinner introdusse quindi i concetti che stanno alla base del condizionamento operante:

- Rinforzo: risposta piacevole dall’ambiente che aumenta la frequenza di emissione di quel comportamento;
- Punizione: risposta spiacevole dall’ambiente che diminuisce la frequenza di emissione o porta alla scomparsa di quel comportamento.

È inoltre difficile prevedere pienamente quali stimoli o situazioni saranno gratificanti o avversi per un individuo, e solo a posteriori si potrà capire se un determinato comportamento sia aumentato o diminuito di frequenza (Mendl e Nicol, 2022).

In aggiunta, sia per il rinforzo che per la punizione si può parlare di positivo e negativo. Questi due termini non fanno riferimento alla conseguenza nella sua valenza gratificante o avversa, ma indicano la comparsa o la scomparsa di uno stimolo a seguito di un dato comportamento.

Quindi nel caso di rinforzo positivo una ricompensa compare a seguito di un comportamento (es. elargire del cibo appena il ratto abbassa una leva nella *Skinner box*), mentre per il rinforzo negativo uno stimolo spiacevole scompare (es. una corrente elettrica viene spenta se il ratto abbassa la leva). In entrambi i casi il comportamento aumenta.

Al contrario la punizione positiva porta alla comparsa di un evento avverso in risposta ad un comportamento (es. comparsa della corrente elettrica se il ratto abbassa la leva), mentre per quanto riguarda la punizione negativa la ricompensa viene tolta (es. anche se il ratto preme la leva non viene più rilasciato il cibo). In questi casi il comportamento diminuisce (Mcleod, 2015).

Per quanto riguarda la punizione, e in particolar modo la punizione positiva, se non viene attuata in modo corretto può portare a problemi come un aumento dell’aggressività e paura. Il comportamento punito non è dimenticato ma semplicemente soppresso, e inoltre la punizione non guida al comportamento desiderato, come invece fa il rinforzo (Mcleod, 2015). Per evitare questi

problemi è meglio che il tempo tra comportamento e punizione sia breve e sarebbe da evitare la punizione fisica. Inoltre, per il programma di punizione deve essere continuo.

1.3.3.2. Schemi di rinforzo

Come per il condizionamento classico anche per quello operante sono cruciali alcuni aspetti, come la contiguità e la contingenza ma si è visto che diversi schemi, o programmi, di rinforzo hanno effetti sul condizionamento.

Nello schema di rinforzo continuo il comportamento desiderato è premiato (rinforzo positivo) ogni volta che viene eseguito. Questo tipo di programma è preferibile nelle fasi iniziali di condizionamento perché la contingenza è alta. Se però il rinforzo viene a mancare, il comportamento andrà ad estinguersi, come per il condizionamento classico, velocemente.

Per evitare che l'estinzione sia troppo veloce si possono utilizzare programmi a rinforzo parziale. La ricompensa non viene data ogni volta a seguito del comportamento.

Negli schemi parziali fissi il rinforzo viene assegnato solo dopo un specifico numero di manifestazione del comportamento, e viene detto schema a rapporto fisso, o se a seguito di un specifico intervallo di tempo l'animale lo esprime almeno una volta, in questo caso si dice schema a intervallo fisso. In entrambi i casi l'intervallo di tempo o il numero di manifestazioni è fisso e deciso dall'operatore.

Gli schemi di rinforzo possono essere anche variabili, nello schema a rapporto variabile il rinforzo viene dato dopo un numero variabile di comportamenti corretti, mentre se il tempo che si fa passare prima di premiare una risposta corretta cambia si fa riferimento allo schema ad intervalli variabili.

Lo schema di rinforzo a rapporto variabile risulta essere quello con la velocità di apprendimento più elevata. Inoltre, con i comportamenti appresi con programmi di rinforzo variabili sono meno soggetti all'estinzione e l'animale persiste a manifestarli per più tempo. Questo perché i soggetti sono più allenati a rispondere anche di fronte al mancato rinforzo (Mellen e Ellis, 1996).

1.3.3.3. Tecniche di condizionamento

Per avere il massimo dell'efficacia del condizionamento è importante che il rinforzo sia biologicamente pertinente all'animale da addestrare. L'efficacia dei rinforzi primari, come acqua, cibo e calore, può variare a seconda della specie e delle sue caratteristiche. Il cibo è considerato un buon rinforzo anche per sessioni di addestramento lunghe per le giraffe, in quanto sono animali che

passano in natura gran parte del loro tempo foraggiando (Dadone et al., 2016), e lo stesso concetto può essere traslato anche per i bovini, magari utilizzando del mangime più appetibile rispetto a quello a cui sono abituati. Per definizione però i rinforzi primari possono perdere di efficacia a causa della sazietà (Mellen e Ellis, 1996). Si possono introdurre quindi dei rinforzi secondari, cioè degli stimoli neutri che vengono associati al rinforzo primario attraverso un meccanismo di condizionamento classico, e sono detti anche “ponte” in quanto fanno da collegamento tra il comportamento desiderato e il rinforzo primario (Mellen e Ellis, 1996).

Fondamentale nelle pratiche di addestramento è anche lo stimolo discriminativo, definito come stimolo che precede un comportamento ed è legato al comportamento stesso e alla sua conseguenza, generalmente il rinforzo. Segni con le mani, comandi vocali e toni o vibrazioni possono essere utilizzati come stimoli discriminativi (Mellen e Ellis, 1996).

Utilizzando i due strumenti appena descritti, rinforzi secondari e stimolo discriminativo, è possibile insegnare ad un individuo comportamenti complessi, attraverso il metodo del concatenamento, fino a formare una sequenza in cui solo l'ultimo comportamento riceve un rinforzo.

In questo processo, ciascuna unità comportamentale appresa serve da rinforzo condizionato per la risposta precedente e da stimolo discriminativo per la risposta successiva.

Il concatenamento prevede di suddividere il comportamento complesso in unità più piccole che possono essere condizionate passo per passo usando un concatenamento anterogrado o retrogrado. Nel primo caso si inizia condizionando il primo comportamento, dopodiché viene aggiunto l'elemento comportamentale successivo dopo che il primo è stato appreso e così via. Nel concatenamento retrogrado, invece, si inizia addestrando l'ultimo comportamento della sequenza (Dirksen et al., 2020b). Sebbene non ci siano evidenze su quale sia più funzionale, il secondo è quello più comunemente utilizzato (Mellen e Ellis, 1996).

Un esempio virtuoso di tale metodo è riportato da Dirksen et al. (2020b), in cui delle manze sono state addestrate ad utilizzare come latrina una specifica parte della stalla. Attraverso un sistema integrato di condizionamento classico e condizionato gli animali hanno imparato a urinare nella latrina. In primo luogo, sono stati insegnati i comportamenti volontari (condizionamento operante) e in seguito sono state incorporate le risposte legate ai riflessi di minzione (condizionamento classico).

Altri esempi di applicazione tecnica del condizionamento sono il controcondizionamento e la desensibilizzazione.

Nel controcondizionamento uno stimolo con valenza negativa o positiva è accoppiato con uno stimolo di valenza opposta per modificare la valenza dello stimolo originale e la risposta comportamentale ad esso. Generalmente le aspettative negative sono sostituite con un rinforzo positivo. È stato provato come i vitelli si sottopongono volontariamente ad iniezioni se queste sono associate alla somministrazione di latte (Ede et al., 2018), inoltre a seguito della tosatura delle pecore tornano al luogo della procedura in minor tempo se è stato somministrato dell'orzo (Rushen, 1996).

Per desensibilizzazione invece si intende una graduale e progressiva esposizione a uno stimolo con valenza negativa e, almeno inizialmente, ad un livello che non provoca la risposta indesiderata. In questo modo si avrà una diminuzione della risposta.

In combinazione con il condizionamento operante, le tecniche di controcondizionamento e desensibilizzazione vengono spesso utilizzate per superare le risposte di paura quando si addestrano comportamenti volontari negli animali. Ripetute esposizioni all'area di manipolazione, così come un graduale aumento della sensazione negativa accoppiata ad un rinforzo positivo, permette agli animali di sapere cosa aspettarsi durante una sessione di addestramento e di formare un'aspettativa complessivamente positiva (Lomb e Keyserlingk, 2021).

1.3.3.4. Applicazione condizionamento operante

Quando si programma un percorso di condizionamento è importante tenere in considerazione la predisposizione biologica dell'animale a svolgere l'addestramento. Alcuni comportamenti sono facilmente appresi, altri invece sono appresi con difficoltà o non possono essere appresi affatto, in base a quanto riflettono i comportamenti espressi naturalmente. Anche il mondo sensoriale della specie è fondamentale nell'addestramento. Se lo stimolo non è percepibile dall'animale il compito richiesto è difficile che verrà svolto. Il colore non è uno stimolo sempre ottimale, dato che molti animali non sono in grado di distinguerli. Diverse colorazioni della tuta da lavoro sono state utilizzate da De Passillé et al. (1996) per massimizzare la discriminazione tra gli operatori da parte dei vitelli testati, ma il colore dei vestiti potrebbe non essere stato l'unico segnale con cui gli animali riuscivano a distinguere le persone. Diversi studi hanno dimostrato che è possibile utilizzare il condizionamento operante con segnali visivi, acustici o vibrazionali come stimoli discriminatori (Dirksen et al., 2020a).

L'abilità di apprendimento è migliore negli animali giovani, che rispetto ai soggetti più anziani possono essere addestrati più velocemente, questo perché sono in una fase di sviluppo comportamentale e sono suscettibili alle modificazioni. Animali adulti sono in grado di mantenere l'apprendimento di un comportamento per circa un mese (Wredle et al., 2004).

Inoltre, anche la predisposizione individuale influenza in modo significativo quanto un animale è portato al condizionamento. Per esempio, l'addestramento può essere influenzato dalla paura, dalla socialità, dal comportamento esplorativo e dalla risposta alle novità. È quindi importante anche la personalità dell'animale, definita come quelle caratteristiche dell'individuo che descrivono pattern temporaneamente stabili di affetto, cognizione e comportamento (Cardoso et al., 2021).

Il condizionamento operante è principalmente utilizzato negli zoo o per i mammiferi marini, in modo da facilitare le manualità insegnando loro determinati movimenti. È nella maggior parte dei casi applicato all'apprendimento di individui singoli, che vengono addestrati a collaborare con gli operatori ad eseguire comportamenti utili per la gestione routinaria e sanitaria. Addestrare un animale può anche fungere da arricchimento ambientale e quindi aumentarne il benessere (Mellen e Ellis, 1996). Questo tipo di metodica richiede molto tempo speso con l'animale e una persona dedicata e individuale ed un piano di addestramento dettagliato e specifico, ma che deve essere dinamico in base alle performance individuali (Dadone et al., 2016). Per questo motivo non viene molto utilizzata nelle realtà allevatoriali, perché considerata eccessivamente dispendiosa.

Se ben programmato e reso efficiente, il condizionamento potrebbe diventare un ottimo strumento per gli allevamenti commerciali, infatti il tempo da dedicare alle sessioni di condizionamento non sembra essere eccessivamente dispendioso; in studi sull'abitudine infatti, 30 sessioni di massaggio delle mammelle durante il parto sono sufficienti per familiarizzare le manze al nuovo ambiente e un numero maggiore di sessioni non migliora significativamente la produzione (Das e Das, 2004). In aggiunta, per sfruttare il carattere sociale e da gregario della specie bovina, sessioni di addestramento in gruppo potrebbero favorirne l'efficacia, data la capacità di imparare semplici comportamenti osservando altri individui eseguire il compito (Mellen e Ellis, 1996).

I vantaggi di lavorare con animali calmi supera di gran lunga gli svantaggi dati dall'aumento di tempo dedicato all'addestramento.

Condizionare le manze potrebbe essere un valido metodo per facilitarne l'allevamento, riducendo il tempo necessario per le movimentazioni e le operazioni di prelievo, monitoraggio, inseminazione

artificiale e trattamento. Inoltre, migliorando l'interazione con gli operatori si possono diminuire i rischi sanitari connessi alla manipolazione. Gli animali condizionati in strutture zoologiche hanno mostrato minor *distress* rispetto a quelli non addestrati (Lomb e Keyserlingk, 2021).

1.4. Stress

Data la scarsa abitudine all'essere manipolate, le manze sono una categoria che maggiormente subisce le ripercussioni negative dello stress, in particolare dovuto alle movimentazioni e ai cambi di gruppo, e quindi all'instaurarsi di nuove gerarchie (Soonberg et al., 2021). Inoltre, dopo il parto, le vacche primipare vengono sottoposte improvvisamente e contemporaneamente a molteplici stimoli stressanti come mungitura, nuove e più frequenti routine gestionali (Sutherland et al., 2012). L'imprevedibilità di queste circostanze è riconosciuta per suscitare stress negli animali (Doerfler et al., 2016), ma il condizionamento delle manze alle procedure di routine e l'abitudine alle manipolazioni possono aiutare a ridurre le risposte a stimoli stressanti (Grandin, 1998).

Durante gli anni Trenta del '900, Hans Selye fu il primo scienziato ad introdurre il termine "stress" nella comunità medica, definito come risposta fisiologica dell'organismo nel tentativo di mantenere l'omeostasi, indipendentemente dal tipo di stimoli (Carroll e Forsberg, 2007).

Gli stimoli che vengono percepiti come una minaccia possono essere definiti come *stressor* (Moberg, 2000). Generalmente, per quanto riguarda l'allevamento bovino, gli *stressor* possono essere raggruppati come stress psicologici (paura, cambi di gruppo, novità ambientali, rumori forti o insoliti, contenimento, trasporto), stress fisiologici (restrizione o carenze alimentari, disordini ghiandolari, disturbi endocrini) e stress fisici (infortuni, caldo, freddo, fame, sete, fatica e malattie). Alcuni sono evitabili attraverso un cambio delle pratiche gestionali, mentre altri, come lo stress termico, sono più difficili da prevenire e hanno un impatto significativo sull'economia dell'allevamento (Carroll e Forsberg, 2007).

In varie pubblicazioni è stata proposta la differenziazione tra due tipologie di stress, il primo per riferirsi alle risposte stressogene che favoriscono l'interazione con l'ambiente e che non sono una minaccia per l'individuo (che possiamo denominare *eustress*), mentre il secondo per indicare le risposte con effetti deleteri sul benessere dell'individuo poiché causano nell'animale scompensi nell'attività fisica, produttiva ed emotiva (*distress*) (Moberg, 2000).

Il dibattito riguardo la definizione e la misura quantitativa dello stress è ancora in corso, soprattutto se correlato con la produttività degli animali e data la sempre maggiore importanza che ricopre nella valutazione del benessere animale. Ad oggi il termine "stress" è largamente utilizzato in biologia, ma non è ancora chiara una definizione comprensiva di tutti gli aspetti relativi alle funzioni corporee coinvolte e continua ad indicare la somma delle reazioni biologiche a stimoli fisiologici, emotivi o

mentali che disturbano l'omeostasi dell'individuo (Carroll e Forsberg, 2007). Una volta che l'animale percepisce uno stimolo come una minaccia, il corpo risponde per ristabilire l'omeostasi attraverso l'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA), l'attivazione del sistema nervoso autonomo (SNA), in particolare della componente simpatica (Carroll e Forsberg, 2007) e manifestando risposte comportamentali specie-specifiche (Jensen e Toates, 1997).

1.4.1. Asse ipotalamo-ipofisi-surrene

L'asse ipotalamo-ipofisi-surrene è un sistema neuroendocrino che regola la secrezione dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH) e quindi del cortisolo (Doerfler et al., 2016). In risposta a stimoli interni ed esterni l'ipotalamo rilascia l'ormone rilasciante corticotropina (CRH) e l'ormone antidiuretico (ADH), anche detto vasopressina (Sjaastad et al., 2019). Entrambi gli ormoni possono stimolare il rilascio di ACTH anche in modo indipendente, ma generalmente agiscono insieme per controllare l'intensità della risposta, con il CRH come lo stimolatore principale e la vasopressina che agisce come potenziatore (Carroll e Forsberg, 2007).

L'ipotalamo è in comunicazione con l'ipofisi attraverso il peduncolo ipofisario, formando la struttura di collegamento tra il sistema nervoso e il sistema endocrino.

L'ipofisi è una piccola ghiandola endocrina collocata alla base dell'encefalo ed è suddivisa in lobo anteriore, lobo posteriore e lobo intermedio, quest'ultimo rudimentale nei mammiferi e con ruolo specie-specifico. Il lobo posteriore è composto da tessuto neurale, e funge da sito di stoccaggio e rilascio per l'ossitocina (OXT) e la vasopressina (ADH) che sono sintetizzati da neuroni specializzati nell'ipotalamo (Sjaastad et al., 2019). Il lobo anteriore è di origine epiteliale ed è costituito da tessuto endocrino composto da cinque diversi tipi cellulari che sintetizzano ormoni trofici in grado di stimolare la proliferazione e l'attività di cellule endocrine periferiche:

- cellule somatotrope → ormone della crescita (GH) → fegato e altri tessuti;
- cellule lattotrope → prolattina (PRL) → ghiandola mammaria;
- cellule gonadotrope → ormone luteinizzante (LH) e ormone follicolo stimolante (FSH) → gonadi;
- cellule tireotrope → ormone tireotropina (TSH) → ghiandola tiroide;
- cellule corticotrope → ormone adrenocorticotropo (ACTH) → ghiandola surrenale.

A seguito di situazioni stressanti le concentrazioni plasmatiche di questi ormoni vengono modificate e l'organismo ne è influenzato in modo più o meno significativo (Sjaastad et al., 2019), ma l'ormone di maggiore importanza nella risposta agli *stressor* è l'ACTH (Moberg, 2000). L'ACTH è un polipeptide a catena singola formato da 39 aminoacidi, ed è prodotto a partire da un feromone precursore detto proopiomelanocortina (POMC), da cui originano anche tre endorfine (alfa-, beta-, gamma-endorfina) e tre ormoni stimolanti i melanociti.

Il CRH e l'ADH si legano a specifici recettori di membrana delle cellule corticotrope, il primo attivando la protein-chinasi A, che con l'adenilatociclastasi produce l'AMP ciclico, mentre il secondo attivando la protein-chinasi C. In entrambi i casi si ha un aumento di calcio intracellulare che sembrerebbe essere il segnale che attiva il rilascio di ACTH (Carroll e Forsberg, 2007). Entrambi i segnali possono andare incontro a desensibilizzazione e *down-regulation* in risposta a stimolazioni croniche (Carroll e Forsberg, 2007).

Si ha quindi un aumento della concentrazione plasmatica di ACTH, la cui azione primaria è stimolare la sintesi e il rilascio dei glucocorticoidi dalle ghiandole surrenali, oltre ad altre azioni metaboliche.

Le ghiandole surrenali possono essere suddivise in una corticale e una midollare.

La corticale è a sua volta composta dalla zona glomerulare in cui si formano i mineralcorticoidi, la zona fascicolata che secerne i glucocorticoidi e la zona reticolata che produce gli ormoni sessuali.

Gli ormoni sessuali prodotti dalla surrenale sembrano avere un ruolo marginale nelle performance riproduttive, mentre i mineralcorticoidi e i glucocorticoidi sono essenziali per la sopravvivenza (Carroll e Forsberg, 2007). I mineralcorticoidi sono chiamati così per gli effetti cruciali che hanno sull'omeostasi di importanti ioni inorganici (Sjaastad et al., 2019).

Tra i glucocorticoidi, denominati così per il loro ruolo sul metabolismo glucidico, troviamo il corticosterone e il cortisolo, che nella maggior parte dei mammiferi è quello di primaria importanza ed è considerato il più importante ormone dello stress (Carroll e Forsberg, 2007). Oltre all'azione dell'ACTH, che promuove la secrezione del cortisolo attraverso l'attivazione dell'adenilatociclastasi, anche il CRH e l'ADH possono avere un ruolo per via paracrina (Carroll e Forsberg, 2007).

I glucocorticoidi sono essenziali per la vita dell'animale e hanno un ruolo importante nella gluconeogenesi durante la risposta di attacco e fuga, oltre a supportare altri processi essenziali nella risposta di difesa primaria in associazione con le catecolamine. Inoltre, suscitano molteplici effetti

sull'organismo con alterazioni della crescita e della riproduzione, influenzano il sistema immunitario e regolano le risposte stressogene (Carroll e Forsberg, 2007).

L'esposizione cronica ad alte concentrazioni di cortisolo può causare problemi sia fisiologici che psicologici deleteri per l'organismo e quindi l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene è dotato di un sistema a feedback negativo in risposta ad una elevata concentrazione di cortisolo. Gli stessi glucocorticoidi inibiscono la produzione di CRH, ADH e ACTH a livello di ipotalamo e ipofisi (Carroll e Forsberg, 2007).

1.4.2. Sistema simpatoadrenomidollare

Stimoli avversi possono attivare anche il sistema simpatoadrenomidollare (SA) del sistema nervoso autonomo (Doerfler et al., 2016). Il sistema nervoso simpatico (SNS) è la componente del sistema nervoso autonomo (SNA) che regola la cosiddetta reazione di paura-attacco-fuga e l'attività del sistema nervoso simpatico aumenta in situazioni che determinano stress o pericolo per l'animale (Sjaastad et al., 2019).

Nel SNA tra il sistema nervoso centrale e le cellule effettrici sono presenti in serie due neuroni, con la sinapsi tra primo e secondo neurone che è situata nei gangli autonomi. Nel caso del SNS i neuroni pregangliari hanno il corpo cellulare nelle corna laterali dei segmenti toracici e nei segmenti lombari più rostrali. Gli assoni dei neuroni pregangliari simpatici possono essere ramificati e formare sinapsi con molti neuroni postgangliari, sia nel ganglio di ingresso sia in quelli adiacenti. Gli assoni pregangliari sono brevi mentre quelli dei neuroni postgangliari sono lunghi e raggiungono gli organi bersaglio. L'unica eccezione è rappresentata dalla midollare del surrene, che riceve assoni pregangliari direttamente dal midollo spinale che formano sinapsi con le cellule secretorie, assimilabili a neuroni post gangliari modificati. Così come i neuroni postgangliari del SNS anche la midollare secerne le catecolamine, cioè epinefrina (E), anche detta adrenalina, e norepinefrina (NE), anche detta noradrenalina. Le catecolamine sono rilasciate direttamente nel sistema circolatorio, rendendo la midollare una ghiandola endocrina e quindi potenziando gli effetti diffusi del SNS (Sjaastad et al., 2019).

Le catecolamine aumentano la frequenza e la forza cardiaca, la vasocostrizione e la broncodilatazione, oltre ad aumentare il metabolismo e ridistribuire la perfusione sanguigna (Carroll e Forsberg, 2007). Queste reazioni sono finalizzate a massimizzare l'apporto di sangue ricco di

ossigeno ed energia ai muscoli scheletrici in modo che l'animale sia pronto all'attacco o alla fuga (Sjaastad et al., 2019).

L'asse HPA e il sistema SA sono integrati e si influenzano a vicenda nella risposta allo stress, con le catecolamine che regolano anche la secrezione dei neuroormoni ipotalamici, dell'ACTH dall'ipofisi e la stimolazione del cortisolo, con quest'ultimo che a sua volta supporta la sintesi e il rilascio di epinefrina e norepinefrina (Carroll e Forsberg, 2007). Inoltre, sia per l'asse HPA che per il SNS, sembra ci sia un controllo a livello di SNC che regola l'intensità della risposta stressogena che può cambiare per ciascun individuo, in base al tipo di *stressor* e allo stato fisiologico dell'animale (Carroll e Forsberg, 2007).

1.4.3. Stress acuto e cronico

Le risposte stressogene possono essere intese come reazioni adattative del corpo per riuscire a sopravvivere (Doerfler et al., 2016). Nel corso di queste risposte l'animale va ad attingere alle proprie risorse biologiche per fare fronte, ad esempio, all'aumento del catabolismo del glicogeno, e quando il costo della reazione va ad inficiare altre funzioni biologiche si può parlare di *distress*, o più comunemente stress (Moberg, 2000).

Lo stress, in base al tipo di *stressor* e alla risposta dell'organismo, può essere diviso in acuto o cronico.

Lo stress acuto è generalmente considerato un'esposizione relativamente breve ad un singolo *stressor*, ma con un'intensità tale da compromettere le altre funzioni biologiche dell'organismo. Stress acuti come il trasporto, il contenimento o l'isolamento sono stati associati ad un'alterazione della riproduzione, in quanto possono interferire sul preciso tempismo ormonale che regola l'ovulazione, e ad uno scorretto accrescimento, per il diverso utilizzo delle risorse da parte dell'animale (Moberg, 2000).

Le strategie a breve termine prevedono adattamenti fisiologici e alterazioni comportamentali (Doerfler et al., 2016) che sono principalmente governate dall'azione del sistema nervoso simpatico (Sjaastad et al., 2019).

Nel caso dello stress cronico l'animale è sottoposto ad un continuo stress di lunga durata, anche se al di fuori degli ambienti sperimentali controllati è difficile identificare un singolo *stressor* cronico. Nella maggior parte dei casi gli animali subiscono una serie di stress acuti anche di lieve intensità, i

cui costi biologici si accumulano fino ad alterare le funzioni dell'organismo e quindi portare ad uno stato patologico. Anche se uno stimolo stressante continuo non dovrebbe avere un effetto sulle normali funzionalità dell'animale, l'accumulo dei costi adattativi può risultare in una situazione di *distress*; in aggiunta, può accadere che l'organismo non sia in grado di affrontare la spesa biologica di un secondo *stressor*. Gli animali nelle realtà allevatoriali sono più vulnerabili a questo tipo di stress, a causa delle molte pratiche gestionali a cui sono sottoposti, come vaccinazioni, confinamento, movimentazioni e cambi di dieta (Moberg, 2000). Nel lungo periodo gli stimoli attivano maggiormente l'asse HPA (Doerfler et al., 2016), con un aumento del cortisolo che mantiene la risposta adattativa dell'organismo allo stress (Sjaastad et al., 2019).

Sia gli stress di breve durata che quelli che permangono nel lungo periodo hanno degli effetti negativi nella gestione e nella produttività dell'animale (Malašauskienė et al., 2019) e possono portare ad un aumento di cortisolo che può diventare critico per il mantenimento di uno stato di benessere. Tali stress possono tuttavia essere controllati attraverso buone pratiche di allevamento e di gestione (Moberg, 2000).

1.4.4. Effetti dello stress

Lo stress suscita un grande numero di effetti biologici nell'organismo, che includono cambiamenti del metabolismo di carboidrati e proteine, alterazioni dei sistemi ormonali che regolano la crescita e la riproduzione, e alterazione delle difese immunitarie. Nel bestiame questi effetti si possono tradurre in ridotte performance riproduttive, una crescita sub-ottimale, riduzione della produzione di latte e una soppressione del sistema immunitario che potrebbe aumentare la suscettibilità ai patogeni (Carroll e Forsberg, 2007).

1.4.4.1. Difese immunitarie e suscettibilità ai patogeni

Da diverso tempo è noto nella comunità scientifica che gli *stressor* ambientali possono avere un effetto sui meccanismi di difesa dell'organismo: un aumento di indicatori di stress nei bovini sono stati associati ad un tasso più elevato dell'incidenza di trattamenti per le mastiti nelle mandrie (Holtenius et al., 2004) e ad un tasso di guarigione più basso (Ivemeyer et al., 2018). Nei primi studi i risultati erano a volte contrastanti ed equivoci, per cui la suscettibilità degli animali a diverse patologie aumentava o diminuiva in base ai diversi fenomeni stressogeni (Kelley, 1980). Più recentemente si è distinto tra il diverso effetto dello stress acuto in contrasto con l'effetto dello

stress cronico ed a lungo termine, con il primo che sembrerebbe immuno-potenziante, mentre il secondo immunosoppressivo (Carroll e Forsberg, 2007).

In caso di stress acuto gli ormoni sono associati con l'innescamento del sistema immunitario in modo da preparare l'organismo all'entrata di potenziali patogeni, attraverso la stimolazione della secrezione di citochine, la differenziazione e proliferazione di cellule immunitarie.

Le cellule immunitarie come linfociti, macrofagi e granulociti sono più responsive a elevate concentrazioni di glucocorticoidi (Carroll e Forsberg, 2007).

Inoltre, la secrezione di citochine pro-infiammatorie stimola a sua volta il rilascio di cortisolo, andando a formare un segnale a feedback positivo (Carroll e Forsberg, 2007).

In caso di stress prolungato l'effetto degli ormoni dello stress passa da essere un evento preparatorio ad una serie di eventi soppressivi, dapprima a livello cellulare fino a coprire tutto lo spettro del sistema immunitario. Le cellule riducono la loro funzione sotto una continua stimolazione dei glucocorticoidi, fino a diventare potenzialmente tolleranti a futuri aumenti del cortisolo e a perdere la responsività (Carroll e Forsberg, 2007). A livello molecolare il cortisolo si lega con il recettore dei glucocorticoidi e interferisce con l'attività trascrizionale di vari fattori, tra cui il NF- κ B, regolando l'espressione di varie citochine, come interleuchina-4 (IL-4), IL-5, IL-6, IL-12, interferone γ (IFN γ), e il *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) (Bagath et al., 2019).

In risposta a situazioni di stress prolungato il numero totale di leucociti e la conta leucocitaria differenziale viene alterata (Bagath et al., 2019), e a livello del timo le cellule precursori dei linfociti T e B manifestano un'accelerata morte cellulare programmata, ciò causa la riduzione dei linfociti che si formano e un'atrofia del timo (Carroll e Forsberg, 2007).

Diversi studi hanno evidenziato anche un ruolo immunomodulatore delle catecolamine, che, come il cortisolo, possono aumentare o diminuire l'efficienza del sistema immunitario (Carroll e Forsberg, 2007).

Gli effetti combinati dei glucocorticoidi e delle catecolamine agiscono in modo unisono per prevenire la sovra-stimolazione dell'immunità innata e delle citochine e contemporaneamente per preparare la risposta immunitaria umorale attraverso la stimolazione dei linfociti T *helper 2* (Carroll e Forsberg, 2007).

1.4.4.2. Produzione di latte

Un fattore produttivo molto importante nell'allevamento di bovine da latte è la produzione lattea. Un'eiezione di latte non regolare è comune durante la prima lattazione e lo stress è sicuramente uno delle principali cause, poiché inibisce il rilascio di ossitocina, l'ormone di maggiore importanza nel riflesso di eiezione del latte (Bruckmaier e Blum, 1998). Prima della mungitura il tono simpatico aumenta, causando la contrazione del muscolo sfintere del capezzolo e inibendo la fuoriuscita di latte, mentre durante la mungitura il tono simpatico diminuisce (Bruckmaier e Blum, 1998). In situazioni stressanti, un aumento dell'attività simpatica e il relativo rilascio di catecolamine interferisce nell'eiezione di latte, sia a livello periferico che inibendo a livello centrale il rilascio di ossitocina (Van Reenen et al., 2002).

L'inibizione periferica dell'eiezione di latte è caratterizzata da una diminuita efficacia dell'ossitocina a livello di ghiandole mammarie, in risposta al blocco dei recettori dell'ossitocina da parte delle catecolamine (Van Reenen et al., 2002).

L'inibizione del riflesso di espulsione del latte a livello del sistema nervoso centrale e quindi l'inibizione della secrezione di OXT è dimostrato in vacche primipare a seguito del parto e in animali che vengono spostati in ambienti sconosciuti, ed è associato ad un aumento della concentrazione plasmatica di cortisolo e beta-endorfina, anche se l'importanza che queste molecole hanno nel disturbo dell'eiezione di latte non è ancora del tutto chiara (Bruckmaier e Blum, 1998). Inoltre, la frazione di latte residua è correlata negativamente con l'ossitocina rilasciata dopo l'attaccamento alla mungitrice, evidenziando una possibile inibizione della secrezione di OXT nelle primipare con ridotta produzione di latte (Van Reenen et al., 2002).

Uno studio di Van Reenen et al. (2002) ha correlato l'inibizione dell'eiezione di latte ad un aumento della frequenza cardiaca, suggerendo un'associazione tra l'attivazione del SNS e la diminuita produzione lattea.

1.4.4.3. Accrescimento e digeribilità

Tra le funzioni corporee bilanciate dall'azione dell'ipotalamo sono inclusi il metabolismo, la fame e la sazietà (Marco-Ramell et al., 2016). Il cortisolo ha un ruolo importante nella gluconeogenesi, stimolando il fegato a degradare il tessuto adiposo e le proteine in piruvato, lattato, glicerolo e aminoacidi che sono a loro volta convertiti in glucosio, aumentandone la concentrazione plasmatica per fornire l'energia che l'organismo necessita nelle situazioni stressanti (Carroll e Forsberg, 2007).

Inoltre, durante lo stress, è stato riportato che la NE e il CRH sopprimono l'appetito, mentre il cortisolo è noto per stimolare l'appetito ma anche per generare preferenza per alimenti più appetibili e molto energetici e quindi potrebbe portare a condizioni di obesità (Torres e Nowson, 2007). Lo stress ha un impatto maggiore negli animali giovani, in cui il rapido accrescimento richiede una notevole quantità di risorse energetiche, e che quindi una modifica del metabolismo a causa di uno *stressor* può portare ad una crescita non ottimale degli animali (Moberg, 2000). L'eccessivo utilizzo e mobilitazione delle fonti di energia che porterebbero ad un esaurimento del glucosio e degli acidi grassi è comunque contrastato da un aumento del rilascio dell'ormone GH (Sjaastad et al., 2019).

Un accrescimento sub-ottimale può essere inoltre influenzato anche dall'aumentata attività del sistema nervoso simpatico e degli ormoni corticosurrenali che influiscono negativamente sulla digestione (Sjaastad et al., 2019). Anche se i meccanismi non sono ancora del tutto chiari, il CRH sembra inibire lo svuotamento gastrico e stimolare la motilità del colon, oltre ad aumentare la permeabilità dell'intestino e l'infiammazione al colon (Trevisi et al., 2007). Situazioni stressanti, come movimentazioni e cambi di gruppo, sono dimostrati diminuire il tempo che gli animali passano a ruminare, e ad una riduzione dell'ingestione (Schirrmann et al., 2011).

In aggiunta, il sistema nervoso enterico (SNE) che controlla il tratto digerente è in comunicazione con il sistema nervoso centrale (SNC) attraverso il SNS e il SNP, e stimoli stressanti come paura, dolore o esercizio intenso riducono il tono vagale dell'animale riducendo quindi la digestione, in modo da utilizzare l'energia per la risposta di attacco-fuga (Bhatia e Tandon, 2005).

Un tempo di ruminazione maggiore è associato all'aumento della produzione di saliva ed una migliore salute del rumine (Malašauskienė et al., 2019), ed è fondamentale per la scomposizione delle fibre e la digestione microbica necessarie per il passaggio dell'alimento attraverso il tubo digerente (Schirrmann et al., 2011), andando potenzialmente a compromettere l'ingestione volontaria e l'accrescimento.

Un aumento dei livelli di cortisolo nei bovini è associato al ridotto tempo di ruminazione (Malašauskienė et al., 2019), oltre alla ridotta mobilità dell'abomaso (Trevisi et al., 2007), suggerendo un legame tra le condizioni stressanti e le funzionalità del tratto gastro-intestinale.

1.4.4.4. Riproduzione

Eventi stressanti possono portare alterazioni nella normale fisiologia riproduttiva degli animali (Carroll e Forsberg, 2007), in quanto l'asse HPA e l'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (HPG) non sono sistemi isolati, ma hanno un legame molto forte (Dobson e Smith, 2000).

Durante la fase follicolare di un normale ciclo estrale, il pattern di rilascio dell'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH) da parte dell'ipotalamo comporta un aumento a livello ipofisario della secrezione pulsatile dell'ormone luteinizzante (LH), che insieme all'ormone follicolo stimolante (FSH) controlla la crescita follicolare e la produzione di estradiolo, fino a generare un picco di LH preovulatorio e quindi l'ovulazione (Sjaastad et al., 2019). Le situazioni stressanti riducono la fertilità interferendo con il meccanismo che regola il preciso tempismo degli eventi durante la fase follicolare, come provato durante episodi di ipoglicemia (Dobson e Smith, 2000) e a seguito del trasporto (Moberg, 2000), e ciò comporta una diminuzione delle performance riproduttive, tra cui il tasso di successo alla prima inseminazione (Hemsworth et al., 2000).

Gli *stressor* attivano l'asse HPA che comporta una riduzione della secrezione di GnRH interferendo a livello ipotalamico o nei centri di controllo superiori, e riducendo il rilascio ipofisario di LH a causa di un peggioramento della sensibilità al GnRH (Tilbrook et al., 2000). Entrambi questi meccanismi comportano una carenza di LH a supporto del follicolo ovarico e una ridotta produzione di estrogeni, con la formazione di tre possibili scenari. Nel primo caso la frequenza della pulsazione di GnRH e LH è troppo lenta e il ciclo estrale si blocca non permettendo la crescita follicolare, nel secondo invece il supporto di LH è sufficiente per l'ovulazione e la crescita follicolare ma la scarsa integrità dell'ocita e delle cellule della granulosa non permettono la corretta progressione della gravidanza. Il terzo scenario comporta la formazione di cisti ovariche, per cui un follicolo che ha raggiunto gli ultimi stadi di sviluppo troppo lentamente non fornisce la corretta quantità di estrogeni, comportando un picco di LH inadeguato all'ovulazione e alla luteinizzazione (Dobson e Smith, 2000).

I mediatori fondamentali degli effetti inibitori dello stress sulla riproduzione sono i glucocorticoidi, che agiscono principalmente a livello ipotalamico modificando la secrezione di GnRH e sull'ipofisi alterando la secrezione di LH e FSH; gli effetti diretti sulle gonadi sembrano essere di minore importanza (Tilbrook et al., 2000).

1.4.4.5. Comportamento

Per comprendere a fondo lo stress e l'impatto che ha nell'allevamento è essenziale comprendere le reazioni dell'animale a stimoli dannosi, includendo, oltre alle variabili fisiologiche, anche le modificazioni comportamentali degli individui esposti agli stimoli (Jensen e Toates, 1997). Molti studi si sono focalizzati sull'investigazione dei cambiamenti comportamentali che possono essere indicatori di stress, in quanto gli animali tendono a contrastare uno stimolo ambientale avverso alterando il loro comportamento (Doerfler et al., 2016). In molti casi il comportamento è la prima risposta che l'animale attua per evitare uno *stressor* (Moberg, 2000). In alcuni casi l'animale può evitare lo stimolo stressogeno semplicemente allontanandosi dalla minaccia, come nel caso della fuga da un predatore o la ricerca di una zona d'ombra se la temperatura corporea è troppo elevata (Cardoso et al., 2021). Naturalmente la risposta comportamentale non può essere sempre adeguata a tutti gli *stressor*, e gli animali potrebbero trovarsi in situazioni in cui le opzioni comportamentali sono limitate, soprattutto nel caso siano all'interno di un travaglio o in cattura (Moberg, 2000). Anche se in queste situazioni la risposta comportamentale non allevia lo stress, alcuni comportamenti manifestati durante le manipolazioni e il contenimento sono parte della reazione di attacco-fuga, una delle componenti principali della risposta stressogena (Grandin, 1998). La possibilità dell'animale di esprimere l'azione comportamentale influisce nella dannosità dello *stressor* (Doerfler et al., 2016), e se lo stress è intenso può portare anche alla comparsa di disordini comportamentali, come l'insorgenza di stereotipie (Malašauskienė et al., 2019), cioè la continua esibizione di un elemento comportamentale senza che l'animale sia in grado di portare a compimento l'obiettivo di tale comportamento (Jensen e Toates, 1997).

Data la notevole quantità di effetti che stimoli avversi possono provocare nell'organismo, lo stress può essere visto come la somma dei disturbi nell'animale, comprendendo sia gli aspetti fisiologici che quelli psicologici (Jensen e Toates, 1997).

1.4.5. Indicatori di stress

Degli indicatori misurabili sono essenziali per valutare il livello di stress a cui sono sottoposti gli animali e quindi anche per misurare il benessere animale all'interno dell'allevamento, in modo da migliorare le produzioni e l'apprezzamento da parte dei consumatori (Marco-Ramell et al., 2016).

1.4.5.1. Cortisolo

Il parametro più frequentemente utilizzato è il cortisolo, considerato il ruolo centrale che hanno i glucocorticoidi nella risposta a situazioni stressanti (Palme, 2019). Nei mammiferi il cortisolo è stato tradizionalmente misurato da campioni di sangue, ma per ridurre lo stress e le pratiche non necessarie sono stati individuati altri metodi non invasivi come la saliva, più utilizzata nei cavalli abituati ad essere manipolati nella bocca, il latte, campionabile solo per animali in lattazione, i peli, che sembrano però indicare solamente i livelli di stress da radiazioni sulla pelle e non sistemici, e gli escrementi cioè urine, di difficile raccolta, e le feci (Palme, 2012) che sono di facile raccolta senza stressare eccessivamente l'animale (Möstl et al., 2002) ed in cui si cercano i metaboliti del cortisolo (FCM) (Ebinghaus et al., 2020). I glucocorticoidi sono principalmente metabolizzati dal fegato e rilasciati tramite la bile nell'intestino, dove vengono ulteriormente metabolizzati e possono anche essere parzialmente riassorbiti (Palme, 2019). I metaboliti compaiono nelle feci dopo un periodo di tempo specie-specifico e che corrisponde al tempo di passaggio intestinale, e che è stato calcolato utilizzando studi di radiometabolismo (Palme, 2019). I FCM possono essere considerati degli indicatori di stress a medio termine nei bovini, perché riflettono l'aumento di cortisolo per un periodo maggiore rispetto al sangue e alla saliva, con un ritardo di 9-15h dato dal tempo di passaggio intestinale e con meno variazioni durante la giornata (Ebinghaus et al., 2020).

La misurazione dei FCM può essere fatta con metodi cromatografici in associazione alla spettrometria di massa (LC-MS) o con dosaggi immunologici, anche detti *immunoassay*, marchiati radioattivamente (RIA) o enzimatici (EIA), come riportato da Palme (2019). Un metodo ben consolidato è quello EIA sviluppato da Möstl et al. (2002) e devono essere seguite delle precise metodiche di analisi e conservazione (Ebinghaus et al., 2020). Una raccolta e gestione dei campioni non corrette potrebbero portare a risultati scorretti e conclusioni fuorvianti. Nel protocollo di raccolta dei campioni e nell'interpretazione dei risultati sono da tenere in considerazione le variazioni di produzione di cortisolo giornaliera (Palme, 2019), e quelle legate allo stato fisiologico dell'animale (Kuhlberg et al., 2021). In aggiunta, alcuni *stressor* potrebbero non essere abbastanza significativi da essere riflessi da un aumento dei FCM (Ebinghaus et al., 2020).

1.4.5.2. Frequenza cardiaca e variabilità della frequenza cardiaca

Un ulteriore indicatore di stress è la frequenza cardiaca (HR) ed in particolare l'analisi della variabilità della frequenza cardiaca (HRV) che possono dare indicazioni per capire la risposta ad uno stress

psicologico e dei processi di regolazione dell'omeostasi negli animali da allevamento (Wierig et al., 2018). La frequenza cardiaca è controllata dall'azione bilanciata delle branche del SNS e del sistema nervoso parasimpatico (SNP) (Sutherland et al., 2012). Durante il riposo l'azione nervo vagale, nervo del SNP, prevale sull'attività simpatica, la quale invece aumenta in risposta allo stress, cioè quando le richieste fisiologiche dell'organismo non possono essere più soddisfatte dal solo SNP (Kim et al., 2018). In risposta ad uno *stressor* il SNS promuove la reazione di attacco-fuga ed in contemporanea il SNP riduce l'effetto inibitorio che esercita sull'attività simpatica; quindi, un'attività del SNS aumentata e diminuita del SNP comporta un'accelerazione della frequenza cardiaca (Kim et al., 2018). La HR è stata usata per misurare l'attivazione dei SNS, ma le analisi della HRV sembrano essere più accurate per valutare la regolazione del sistema nervoso autonomo (Sutherland et al., 2012). La variabilità della frequenza cardiaca è la fluttuazione di lunghezza degli intervalli tra i battiti ed è sensibile ai cambiamenti dell'attività del SNA, dipende in modo particolare dalla modulazione vagale e quindi la misurazione del tono parasimpatico può servire da indice per valutare lo stress (Kim et al., 2018). Bassi valori di HRV indicano una ridotta capacità dell'animale a fronteggiare *stressor* interni ed esterni (Kim et al., 2018).

I parametri di HRV che vengono utilizzati più comunemente sono la deviazione standard degli intervalli interbattito (SDNN), che mostra l'attività del SNA, e la radice quadrata della media dei quadrati delle differenze tra intervalli adiacenti (RMSSD), che è un indicatore del SNP e quindi un marker del rilassamento (Wierig et al., 2018). Valori bassi di RMSSD rappresentano un ridotto tono vagale per una dominanza maggiore del SNS (Sutherland et al., 2012), mentre animali più rilassati avranno un valore di RMSSD più elevato (Wierig et al., 2018).

Il valore di HRV può quindi dare informazioni sul livello di nervosismo e le risposte stressogene degli animali durante le varie procedure allevatorie come, ad esempio, la mungitura (Kutzer et al., 2015).

1.4.5.3. Parametri comportamentali

Una completa valutazione dello stress non può essere affidabile considerando solamente le variabili ormonali (Jensen e Toates, 1997), e oltre agli indicatori fisiologici anche i parametri comportamentali possono essere usati per identificare le risposte allo stress nell'allevamento bovino (Doerfler et al., 2016). Una valutazione comportamentale qualitativa (QBA) permette di classificare il linguaggio corporeo dell'animale per valutare lo stress durante il trasporto e altre manipolazioni (Ebinghaus et al., 2016). Questo tipo di valutazione prevede che gli animali vadano

osservati e descritti utilizzando una lista di aggettivi, e gli animali vengono poi classificati utilizzando delle matrici di analisi (Ebinghaus et al., 2016), o l'utilizzo di software per l'osservazione comportamentale (Van Reenen et al., 2002). La QBA può essere associata ad altri test comportamentali più quantitativi come il *restraint test* (RT) o l'*exit speed test* (EST) già descritti nei paragrafi precedenti. Il comportamento durante le manipolazioni, come ad esempio la mungitura, può essere usato per avere una misura del livello di stress dell'animale, considerando comportamenti di paura e nervosismo come il sollevamento dello zoccolo (Sutherland et al., 2012), e il numero di step e calci (Kutzer et al., 2015). Sono considerati degli indicatori comportamentali di stress anche la curvatura della schiena, la posizione di coda, testa e orecchie e l'apertura dell'occhio (Kutzer et al., 2015). Altri parametri utili sono il tempo che l'animale passa in cuccetta, in stazione, camminando, in mangiatoia (Doerfler et al., 2016), o ruminando (Malašauskienė et al., 2019).

È comunque da tenere in considerazione che i parametri comportamentali sembrano essere più stabili nella vita dell'individuo e non sempre sono correlati ad altri indicatori di stress fisiologici (Van Reenen et al., 2002; Ebinghaus et al., 2020).

L'utilizzo di più indicatori è comunque essenziale per stabilire i livelli di stress che gli animali soffrono, identificando buone pratiche di gestione per aumentare il benessere negli allevamenti.

2. OBIETTIVI DELLO STUDIO

Scopo dello studio è investigare se, in condizioni di allevamento commerciale, la tecnica del condizionamento operante sia applicabile per manze con un diverso temperamento, in modo da facilitare le misurazioni, i campionamenti e le manipolazioni sugli animali riducendo il tempo speso dall'allevatore per effettuare tali procedure. Viene valutata anche l'efficacia del condizionamento operante sulla riduzione della risposta stressoria dovuta all'interazione tra uomo e animale, la digeribilità e le performance riproduttive. Inoltre, è stata considerata l'eccessiva confidenza nei confronti dell'operatore che il condizionamento potrebbe provocare, comportando disturbo nella gestione dell'animale.

3. MATERIALE E METODI

3.1. Animali, stabulazione, alimentazione e disegno sperimentale

La prova sperimentale si è svolta in un allevamento di bovine da latte, situato in provincia di Vicenza (Veneto, Nord-Est Italia), ospitante 230 vacche in lattazione, con il 40% di primipare, produzione media di latte di 33 L/vacca e una media di 2,1 lattazioni per animale. L'azienda è dotata di sistemi di ventilazione verticale.

Lo studio ha coinvolto un gruppo di manze di razza Frisona Italiana (n = 60) divise, in base all'età, in "giovani" (n = 24; 291 ± 39 giorni) e "mature" (n = 36, 397 ± 26 giorni) e stabulate in due box diversi ma contigui. Gli animali sono stati allevati nello stesso capannone, in stabulazione libera, con pavimentazione in grigliato di cemento. Ciascun box era dotato di 40 cuccette e 24 posti in mangiatoia con autocattura. Gli animali venivano alimentati con unifeed, anche detto *total mixed ration* (TMR), una volta al giorno intorno alle 07:00 del mattino e l'acqua fresca era sempre disponibile. Il TMR era formato da un nucleo proteico con vitamine e minerali (92% farina di soia, 3,8% bicarbonato, 2,7% sale, 1,6% vitamine), e tre diversi tipi di insilati (frumento, mais, sorgo). La composizione è riportata nella Tabella 3.1.

Tabella 3.1: Ingredienti e composizione dell'unifeed

| Ingredienti (kg) | |
|----------------------|------|
| Nucleo | 1,45 |
| Insilato di frumento | 7,62 |
| Insilato di mais | 1,87 |
| Insilato di sorgo | 6,75 |
| Composizione (%) | |
| SS % | 40,2 |
| PG %SS | 12,0 |
| NDF %SS | 45,7 |
| ADL %SS | 3,92 |
| AMIDO %SS | 15,2 |

SS: sostanza secca; PG: proteine grezze; NDF: fibra acido detersa; ADL: lignina acido detersa

Tutti i 60 animali sono stati classificati in tre classi di temperamento, in base al risultato nell'*avoidance distance test* (ADT): confidente, neutro e non confidente. Più o meno la metà delle manze per ciascuna classe di temperamento è stata sottoposta ad un trattamento di

condizionamento operante (Tr, n=29) mentre il resto è stato considerato come il gruppo di controllo (nTr, n=31). I gruppi Tr e nTr erano omogenei per l'ADT medio. Gli animali del gruppo Tr sono stati addestrati a farsi manipolare e a non evitare il contatto con l'operatore utilizzando una tecnica di condizionamento operante, nello specifico la tecnica del *target training*, e ciascuna sessione di *training* è durata un tempo massimo di 2 minuti per animale. Al termine del processo di condizionamento l'ADT è stato ripetuto su tutte le manze. Per tutte le manze sono stati misurati il peso corporeo e l'altezza al garrese all'inizio e alla fine della prova.

3.2. Misure e campionamenti all'inizio della prova, prima del condizionamento

Il primo giorno di prova tutte le manze sono state testate due volte per identificare il temperamento, utilizzando un adattamento della versione dell'*avoidance distance test* utilizzato da Kutzer et al. (2015). Gli animali sono stati avvicinati da una persona sconosciuta mentre si trovavano in mangiatoia e in autocattura, alla velocità di un passo al secondo partendo da una distanza di circa 4 metri. Quando gli animali hanno iniziato ad allontanarsi, l'operatore si è fermato e la distanza dalla mano dell'operatore al muso è stata registrata utilizzando un misuratore laser (BOSCH DLE 50, Robert Bosch S.p.A, Milano, Italia). L'ADT è stato ripetuto immediatamente dopo la fine della prima misura e tra i due valori di distanza dell'*avoidance distance test* è stata calcolata la media per ciascuna manza. La distanza veniva registrata come 0,05 m se l'animale si lasciava toccare il muso ma tentava immediatamente di scappare, mentre se una manza poteva essere accarezzata sul muso per almeno 5 secondi, la distanza veniva registrata come 0 m (Kutzer et al., 2015). Gli animali sono stati classificati in tre gruppi di temperamento in base al valore di ADT misurato: confidente, con valori di ADT bassi (n=20, $ADT \leq 0,45$ m), neutro, con valori di ADT medi (n=21, $0,45 < ADT \leq 1,05$ m) o non confidente, con valori di ADT alti (n = 19, $ADT > 1,05$ m).

Per ciascun animale sono stati quindi raccolti tre campioni di feci a giorni alterni per tre volte, circa 4 ore dopo la distribuzione della razione alimentare per valutare i metaboliti fecali del cortisolo (FCM) e misurare il valore basale di cortisolo per ciascuna manza (Palme, 2019). Se il campionamento di feci fresche dal terreno non era possibile, i campioni fecali sono stati raccolti direttamente dall'ampolla rettale. Tutti i campioni sono stati immediatamente congelati e conservati a -20°C fino al momento dell'analisi.

L'altezza al garrese è stata misurata in tutte le manze, mentre per calcolare il peso dell'animale è stata misurata la circonferenza toracica, utilizzando la formula suggerita da Heinrichs et al. (1992).

$$Y = 102,71 - 2,876x + 0,02665x^2$$

In cui Y indica il peso corporeo (kg) e x la circonferenza toracica (cm).

Durante le misurazioni sono state registrate le osservazioni comportamentali, come riportato da Kutzer et al. (2015):

- *stepping*: spostamento del baricentro con il piede sollevato a meno di 15 cm da terra, registrato contando il numero di passi durante le procedure;
- *kicking*: zoccolo sollevato di almeno 15 cm in qualsiasi direzione, registrato contando il numero di calci durante le procedure;
- Postura del corpo: osservazione della linea dorsale, registrata linea dorsale dritta o schiena in cifosi;
- Posizione della coda: osservazione della coda, registrata coda in posizione naturale rilassata o coda schiacciata tra il treno posteriore
- Posizione delle orecchie: osservazione delle orecchie, registrate orecchie pendenti e rivolte in avanti o orecchie appiattite e portate all'indietro;
- Posizione della testa: osservazione della testa, registrata posizione della testa rilassata o testa abbassata;
- Apertura dell'occhio: osservazione dell'occhio, registrati occhi semiaperti o occhi spalancati.

3.3. Procedure di condizionamento

Come si può vedere in Figura 3.1 sono state effettuate dodici sessioni di condizionamento in undici giorni per ogni manza Tr. Durante le prime tre settimane sono state eseguite due sessioni di condizionamento a settimana (martedì e venerdì), e poi, durante le ultime quattro settimane, le sessioni di *training* sono state ridotte a una alla settimana poiché le manze hanno dimostrato di eseguire e ricordare facilmente i comportamenti richiesti. Complessivamente, quindi, il condizionamento è stato eseguito per otto settimane durante le quali il *training* si è focalizzato su diversi aspetti che verranno descritti in seguito.

Figura 3.1: Procedure durante il condizionamento

| Settimane di prova | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--|------|--------|---|---|---|-----|---|---|---|--------|----|----|
| Sessioni di <i>target training</i> | | | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | | | | | |
| Sessioni <i>training</i> tocco al muso | | | | 2 | 2 | 1 | 1 | | | | | |
| Sessioni <i>training</i> mano sulla groppa | | | | | | | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| | ADT | | | | | | | | | ADT | | |
| | Feci | Feci | | | | | | | | Feci | | |
| | | Misure | | | | | | | | Misure | | |
| | | Comp | | | | | | | | Comp | | |
| | | | | | | ECG | | | | ECG | | |
| | | | | | | | | | | | NT | NT |

ADT: *avoidance distance test*; Feci: raccolta feci; Misure: misurazione altezza al garrese e circonferenza toracica; Comp: osservazione comportamentale; ECG: elettrocardiogramma; NT: *nagging test*;

Il metodo per il condizionamento è stato il *target training*, una tecnica molto usata negli animali da zoo (Dadone et al., 2016). Il *target*, una pallina da tennis incollata sulla punta di un bastone di bambù, veniva avvicinato al muso della manza che veniva premiata ogni volta che toccava la pallina con il naso. L'obiettivo per ogni sessione di condizionamento, per le prime 8 sessioni, era che l'animale toccasse il *target* tre volte in meno di 2 minuti ed è stato registrato il tempo necessario per raggiungere l'obiettivo. Quando l'obiettivo non veniva raggiunto, è stato riportato il numero di tocchi ottenuti entro 2 minuti. Per tutte le manze addestrate è stato inizialmente utilizzato il rinforzo positivo, e la ricompensa consisteva in mezza manciata di pellet per i vitelli o di TMR per le vacche in asciutta a seconda delle loro preferenze. Per le manze (N = 11) a cui la presenza dell'operatore provocava disagio, al rifiuto della ricompensa veniva applicato un rinforzo negativo. Quest'ultimo consisteva nell'eliminare la presenza indesiderata della persona, facendo un passo indietro e smettendo di guardare l'animale per alcuni secondi (Wergård, et al., 2015).

Le prime tre sessioni di condizionamento sono state fatte con gli animali chiusi nelle catture. Poi, quando gli animali si sono abituati alla procedura, le autocatture sono state lasciate aperte, lasciando le manze libere di allontanarsi in qualsiasi momento. Siccome il numero di animali era

maggiore del numero di postazioni nella corsia di alimentazione, ogni sessione è durata abbastanza a lungo da consentire a tutte le manze di avvicinarsi alla mangiatoia.

Per quegli animali che non si presentavano alle autocatture per carenza di desiderio, la procedura di condizionamento veniva effettuata avvicinando la manza all'interno del box e addestrandola mentre era in cuccetta in posizione di riposo. Nelle analisi del tempo di *training* sono state prese in considerazione solo le registrazioni effettuate in condizioni standard, cioè con gli animali in mangiatoia.

Dalla terza sessione, per sei sessioni, oltre al *target training* si è cercato di toccare il muso delle manze con una mano, per vedere quali di esse si lasciassero toccare volentieri e quali no.

Inoltre, oltre al *target training* e al tocco del muso, è stato registrato anche il tempo che ciascuna manza ha concesso ad un secondo operatore di farsi toccare sotto la coda e sulla groppa, per un massimo di 15 secondi, durante le ultime quattro sessioni di condizionamento, per simulare alcune manipolazioni come la palpazione rettale e il prelievo di sangue dalla vena della coda.

Per ogni animale sono state misurate la frequenza cardiaca (FC) e la radice quadrata media delle differenze tra intervalli adiacenti (RMSSD), parametro per valutare la variabilità della frequenza cardiaca e che indica l'attività vagale (Kutzer et al., 2015). Tali parametri sono stati misurati una prima volta alla sesta settimana di prova in un giorno in cui non c'erano attività di *training* o di nessun altro tipo, per cogliere un valore basale, e una seconda volta alla fine della prova sperimentale, durante le misurazioni, per determinare l'effetto del condizionamento sulla frequenza cardiaca e sull'attività vagale durante una condizione potenzialmente stressante.

Le misure sono state effettuate al mattino, a seguito della distribuzione dell'unifeed, utilizzando la Polar Equine Belt, con sensore Polar H10 e l'App Polar Equine (Polar Electro Oy, Kempele, Finlandia) come già utilizzato da Wierig et al. (2018), dotando le manze di una cintura toracica elastica con i due elettrodi sul lato sinistro del corpo, aggiungendo del gel da ecografia tra l'animale e gli elettrodi per migliorare la trasmissione del segnale. Le manze sono state lasciate adattarsi alla presenza della cintura e poi è stata avviata la registrazione che è durata 6 minuti per ogni animale.

Per calcolare il RMSSD sono stati presi gli intervalli RR, cioè la distanza tra due picchi R (ms), da cui sono stati rimossi gli *outlayers*, ovvero i valori maggiori di cento unità rispetto a quelli immediatamente precedenti, come raccomandato da Wierig et al. (2018).

L'RMSSD è stata calcolata su 297 intervalli RR per ogni animale attraverso la formula suggerita da Wierig et al. (2018):

$$RMSSD = \sqrt{\frac{1}{N-1} \left(\sum_{i=1}^{N-1} (RR_{i+1} - RR_i)^2 \right)}$$

In cui N è il numero di dei termini dell'intervallo RR

3.4. Procedure dopo il condizionamento

L'ADT è stato misurato nuovamente una volta terminato il periodo di condizionamento, una volta con una persona sconosciuta e una seconda volta con un operatore noto, prima di effettuare le operazioni di misura, ECG e raccolta feci.

Al termine della prova, la circonferenza cardiaca è stata nuovamente misurata in tutte le manze per calcolare l'aumento di peso medio giornaliero. È stata misurata una seconda volta anche l'altezza al garrese. Durante le misure sono stati registrati HR e RMSSD per individuare differenze rispetto alle condizioni precedenti. Le osservazioni comportamentali sono state registrate durante tutti questi passaggi.

Circa 12 ore dopo le procedure appena descritte, la sera degli stessi giorni, sono stati raccolti campioni di feci per valutare il FCM.

Seguendo l'impressione dell'allevatore, il quale riportava che durante le settimane di svolgimento della prova gli animali erano diventati molto più facili da manipolare e movimentare, ma che alcune manze esibivano comportamenti fastidiosi, e cercavano di leccare, spingere e strofinarsi sugli operatori che entravano nel recinto, dopo le misurazioni di fine prova è stato eseguito un ulteriore test, che è stato chiamato "*nagging test*", per valutare se gli animali condizionati potessero risultare più fastidiosi degli altri. Il *nagging test* è stato eseguito due volte al giorno la mattina intorno alle 9:00 e la sera alle 20:00 per 8 giorni. Una persona si è fermata in 4 posizioni dentro i recinti, in modo da coprire l'intero recinto, stazionando per 2 minuti in ogni punto.

Sono stati registrati gli animali che toccavano l'operatore (toccandolo, leccandolo, mordendolo o strofinandosi su di lui) e per dissuaderli dal farlo è stata spruzzata dell'acqua (1 spruzzo) sul muso degli animali, registrando il numero di spruzzate necessarie ad evitare il contatto, per ogni animale venuto in contatto.

Sono stati inoltre registrati i dati sul comportamento delle manze durante le inseminazioni e i prelievi di sangue per eseguire il test di gravidanza dividendo gli animali in agitati o calmi. A 12 ore di distanza dal prelievo di sangue sono stati raccolti campioni fecali per valutare il FCM e valutare se l'addestramento potesse influenzare la risposta stressogena a seguito di uno stimolo negativo verificatosi molto tempo dopo il condizionamento.

Inoltre, attraverso il software di gestione utilizzato nell'azienda sono stati elaborati i dati relativi al numero di tentativi di inseminazione necessarie affinché la fecondazione avesse successo.

La digeribilità è stata valutata a inizio e fine prova per ogni manza, analizzando il rapporto tra i diversi nutrienti e il contenuto in lignina del TMR e delle feci di ciascun animale, secondo le seguenti formule, come riportato da Cortese et al. (2020).

$$digSS = \frac{\text{marker nelle feci (g/kgSS)} - \text{marker nel mangime (g/kgSS)}}{\text{marker nelle feci (g/kgSS)}}$$

$$digN = 1 - \frac{\text{marker nella dieta (g/kgSS)} \times N \text{ nelle feci (g/kgSS)}}{\text{marker nelle feci (g/kgSS)} \times N \text{ nella dieta (g/kgSS)}}$$

dove N è il nutriente e digN è la digeribilità del nutriente.

3.5. Metodo analitico

Immediatamente dopo la raccolta, i campioni di feci sono stati congelati a -20° C per l'estrazione del FCM. Le feci sono state sospese in 5 ml di metanolo all'80%, centrifugate e quindi un'aliquota del surnatante è stata diluita con tampone di analisi e infine trasferita nell'EIA. Un EIA 11-oxoetiocholanolone, che misura gli 11,17-diossoandrostani, è stato utilizzato per misurare l'FCM (Möstl et al., 2002).

3.6. Analisi statistica

Tutti i dati sono stati elaborati utilizzando il software SAS (2012, release 9.4; SAS Institute Inc., Cary, NC). I dati relativi al tempo impiegato dagli animali per assolvere al *target training* (8 sessioni) dopo essere stati trasformati col logaritmo naturale per renderli normalmente distribuiti, sono stati analizzati mediante ANOVA considerando gli effetti fissi, età (9 o 12 mesi), temperamento (amichevole, normale o timido) e sessione di *training* (8 livelli) e le loro interazioni. Lo stesso modello è stato utilizzato anche per il *training* relativo al tocco sulla groppa (4 sessioni). L'analisi della differente difficoltà di *training* di animali con temperamento diverso è stata effettuata valutando la

necessità di usare il rinforzo negativo e la facilità a farsi toccare dagli operatori tramite confronto tra K porzioni. I dati relativi a peso corporeo, digeribilità, ADT, frequenza cardiaca e RSMMD, sono stati analizzati tramite ANOVA, considerando gli effetti fissi, età (9 o 12 mesi), temperamento (confidente, neutro o non confidente), *training* (Tr o nTr) e periodo (pre- o post- condizionamento) e per le loro interazioni. I dati sono stati inoltre covariati per i giorni di età degli animali a inizio prova. Un modello ANOVA simile, ma senza la variabile Periodo è stato utilizzato per analizzare i dati di cortisolo basale, picco di cortisolo dopo le misurazioni a fine prova e per le variabili del *nagging test*. Infine, per valutare la differenza di comportamento (*stepping, kicking, postura, postura della coda, posizione delle orecchie, posizione della testa e apertura dell'occhio*) durante le procedure di misurazione tra inizio e fine prova si è utilizzato il Test esatto di Fisher.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Con questa prova è stata applicata la tecnica del condizionamento operante ad un gruppo di manze con diverso temperamento in un allevamento commerciale. Si è voluto verificare se il condizionamento operante potesse essere uno strumento utile per facilitare le procedure di routine in allevamento, oltre a valutare come cambia il livello di stress durante le manipolazioni tra gli animali sottoposti al *target training* (Tr) e quelli non trattati (nTr). In aggiunta si è andato a vedere se il temperamento individuale potesse avere un effetto sull'efficacia del condizionamento. Malgrado questa in questa prova si siano andati a misurare anche parametri di accrescimento e digeribilità, in questa tesi ci si è limitati a discutere sulla fattibilità dell'applicazione del condizionamento operante e sui suoi effetti sui livelli di stress degli animali.

Il condizionamento operante non viene generalmente utilizzato negli allevamenti commerciali perché considerata una metodica dispendiosa sia in termini di tempo che di occupazione del personale. Questa metodica di addestramento è principalmente utilizzata negli zoo o nei parchi acquatici per facilitare la manipolazione degli animali, insegnare movimenti specifici, oltre ad essere utilizzato come arricchimento ambientale (Mellen e Ellis, 1996). In questi ambiti il *training* viene impegnato su singoli animali e anche segnare compiti tendenzialmente semplici può richiedere diverso tempo. In uno studio di Dadone et al. (2016) un gruppo di giraffe sono state addestrate a posizionare lo zoccolo su un gradino per facilitare la cattura di un'immagine radiografica. Sebbene il compito non fosse particolarmente difficile da apprendere, il tempo impiegato per completare il *training* è stato di una singola sessione per alcuni esemplari e fino a sei mesi per altri. Inoltre, la predisposizione individuale gioca un ruolo importante nella percezione degli stimoli discriminativi e secondari e nell'efficacia dei rinforzi utilizzati durante il condizionamento (Mellen e Ellis, 1996), e talvolta è richiesto di adattare il piano di addestramento in base alla responsività dell'animale (Dadone et al., 2016).

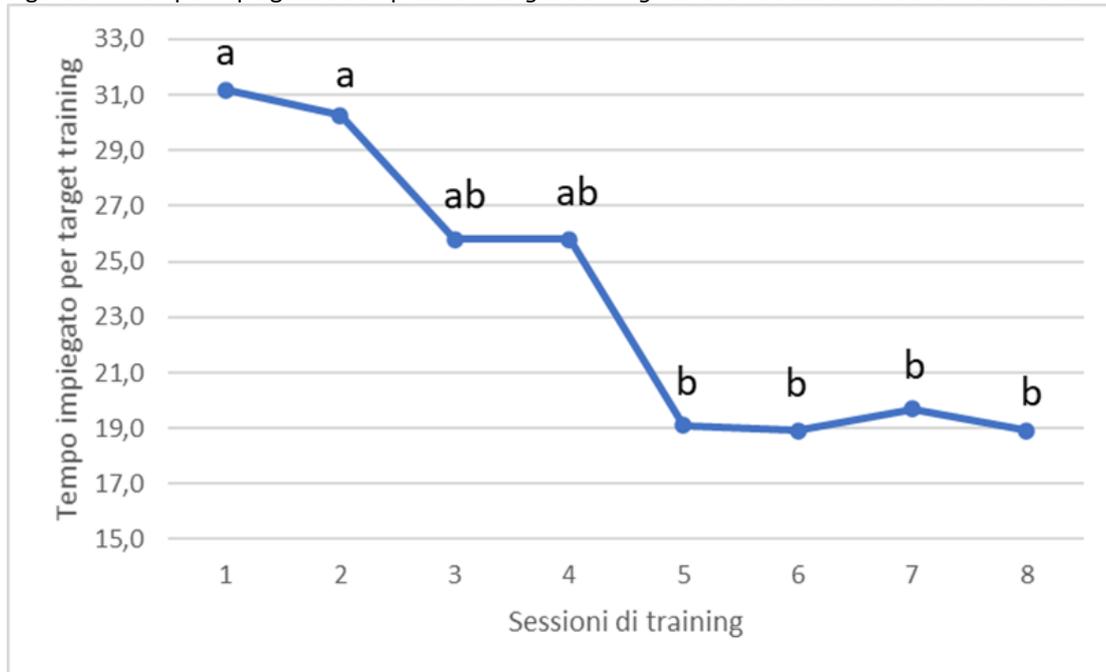
In aggiunta, un condizionamento appreso deve essere mantenuto allenato, altrimenti la risposta condizionata rischia di scomparire, andando incontro al fenomeno dell'estinzione (Dirksen et al., 2020a), e questo richiederebbe all'allevatore un ulteriore impegno.

L'utilizzo del condizionamento operante con gli animali tenuti in gruppo ha dato risultati soddisfacenti e, sebbene durante le prime sessioni di condizionamento con gli animali in mangiatoia con la cattura chiusa alcune manze si rifiutavano di effettuare i tre tocchi ed in particolare il 70%

delle manze non confidenti e il 45% delle neutre non accettassero il rinforzo positivo probabilmente per paura o diffidenza, alla fine della prova tutti gli animali hanno completato con successo il *target training*, eseguendo i tre tocchi entro i 2 minuti concessi. Il completamento dei tre tocchi durante le sessioni di *training* da parte di tutte le manze indipendentemente dal temperamento è un buon risultato perché indica che tutti gli animali hanno preso confidenza con gli operatori durante la prova. Il tempo impiegato per completare una sessione di *target training* è stato in media di 23,5 secondi per due volte a settimana. Quindi, ipotizzando che un allevatore abbia inizialmente 100 manze e le voglia condizionare tutte, suddividendo le procedure in 6 giorni a settimana con una frequenza di sessioni pari a due volte a settimana per le prime 3 settimane e poi di una volta a settimana per le successive 2, impiegherebbe, secondo i risultati di questa prova, in media 10,4 minuti al giorno per 5 settimane, e quindi il condizionamento, anche se viene ritenuta una pratica dispendiosa in termini di tempo, potrebbe essere accettabile se portasse ad una facilitazione delle manipolazioni di routine degli animali, quali movimentazione, approccio per le fecondazioni, i prelievi di sangue, il prelievo di feci e le misurazioni di accrescimento.

Come mostrato in Figura 3.1 dopo la quinta sessione di condizionamento il tempo medio per completare il *target training* è stato di 19 secondi. Non si è riusciti ad andare sotto questo tempo medio per i 3 tocchi perché c'è un limite fisiologico per l'animale per vedere dov'è il *target*, toccarlo e ricevere il rinforzo. Poiché però oltre la quinta sessione (3° settimana) non si sono visti miglioramenti, si potrebbe far durare la sessione di *training* per 5 sessioni, anziché 8, facendo risparmiare ulteriore tempo all'allevatore. A supporto di ciò, è stato riportato in letterature, seppur per scopi diversi e con metodiche differenti, più di 30 sessioni non sono necessarie per abituare le manze alla mungitura durante il parto (Das e Das, 2004). Inoltre, per evitare che gli animali dimentichino il compito appreso, è riportato che il condizionamento debba essere ripetuto circa ogni 6 settimane (Wredle et al., 2004), senza continuare con le sessioni all'infinito, portando ad un'ulteriore riduzione del tempo che l'allevatore deve dedicare agli animali. Un altro fattore importante da ricordare è che dopo le prime 3 sessioni (1.5 settimane) in cui le catture erano bloccate e quindi gli animali non potevano ritirarsi dalla prova, ma tutt'al più solamente rifiutarsi di partecipare, nelle successive sessioni gli animali avevano le catture aperte e quindi sono tutti volontariamente rimasti a completare il *training*, a riprova dell'aumentata confidenza.

Figura 3.1: Tempo impiegato a completare il *target training* nelle varie sessioni di condizionamento



Valori senza lettere in comune sono statisticamente diversi ($P < 0,05$)

Come riportato in Tabella 3.1 il tempo impiegato dalle manze per completare il *target training* è influenzato significativamente solo dal numero di sessioni di *training* e dal temperamento. Gli animali confidenti sono stati leggermente più veloci rispetto agli animali neutri, mentre il tempo impiegato è significativamente minore rispetto agli animali non confidenti. Le manze neutre hanno impiegato tempi di poco maggiori rispetto a quelle confidenti, mentre sono state molto più veloci degli animali non confidenti. Le manze non confidenti sono state le più lente a completare il *target training*.

Siccome i tempi di completamento delle sessioni sono stati simili tra le manze confidenti e quelle neutre, è risultata significativa solamente la differenza tra il tempo degli animali confidenti e neutre rispetto a quelli non confidenti. Queste ultime, infatti, hanno impiegato in media circa il 38% di tempo in più per completare le sessioni di condizionamento.

La differenza di età non è risultata significativa nel modificare il tempo impiegato per completare il *target training*, così come l'interazione tra età e temperamento.

Tabella 3.1: Effetto di età, temperamento e loro interazione sul tempo impiegato a completare il *target training*

| | | Tempo (s) |
|---------------------|-----------------------|------------------|
| Età | Mature | 24,2 |
| | Giovani | 22,2 |
| Temperamento | Confidenti | 20,1b |
| | Neutre | 21,8b |
| | Non confidenti | 28,5a |
| SEM | | 1,08 |
| P | Età | 0,279 |
| | Temperamento | 0,004 |
| | Giorno | <0,001 |

Valori senza lettere in comune sono stati statisticamente diversi ($P < 0,05$)

Le interazioni non significative non sono state inserite in tabella

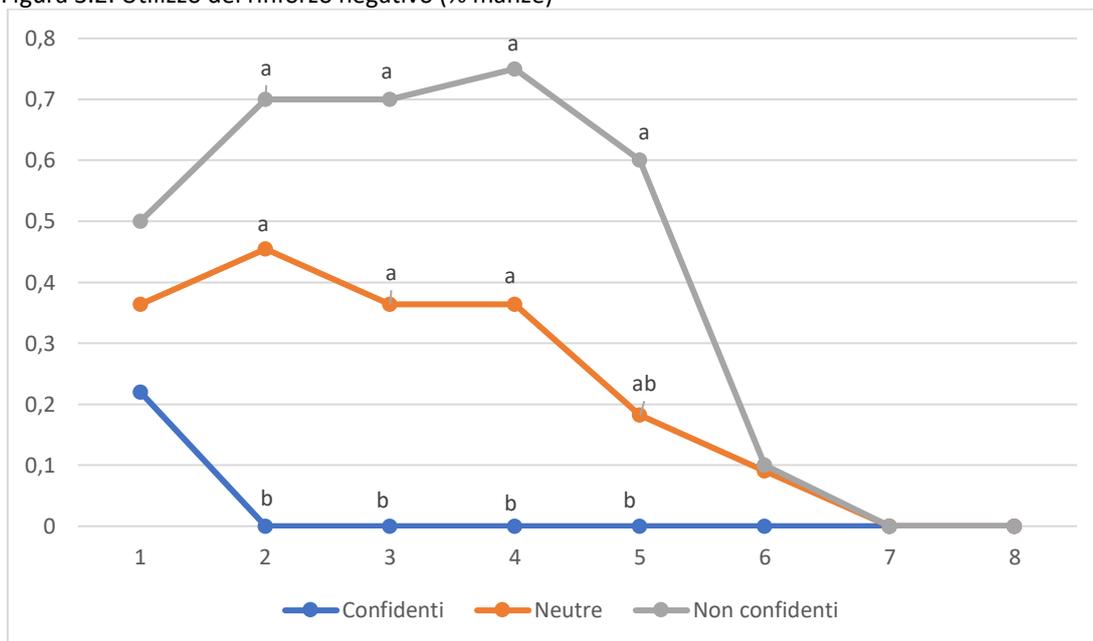
Come si vede in Figura 3.2, la percentuale di manze che hanno avuto bisogno di un rinforzo negativo, cioè l'allontanamento dell'operatore senza interagire ulteriormente con la manza (Wergård et al., 2015), è cambiato nel corso delle sessioni. Poiché la prima sessione può essere considerata poco rilevante perché la procedura rappresenta una novità per tutti gli animali, è interessante notare che dalla seconda sessione di *training* è significativamente diverso il numero di manze confidenti che hanno bisogno del rinforzo negativo rispetto alle altre categorie di temperamento ($P < 0,05$).

Dal secondo giorno in poi le manze confidenti non hanno avuto più bisogno del rinforzo negativo e hanno sempre accettato il rinforzo positivo, cioè la somministrazione di una manciata di mangime. Al contrario, per gli animali dal temperamento neutro e non confidenti, c'è stato bisogno di un numero maggiore di sessioni affinché tutte accettassero il rinforzo positivo e quindi l'interazione ravvicinata. La differenza significativa tra le manze confidenti e gli altri due temperamenti è rimasta invariata fino alla quinta sessione di condizionamento. Per le manze con temperamento neutro, infatti, la significatività sparisce a seguito della quinta sessione. Dal sesto giorno di *training* anche per le manze non confidenti la differenza di animali con cui si è ricorso al rinforzo negativo non è stata più significativa. Dal settimo giorno di condizionamento tutte le manze sono state avvicinate e hanno accettato il rinforzo positivo, e quindi il condizionamento è proseguito senza più ricorrere al rinforzo negativo.

Le manze confidenti hanno avuto bisogno di molte meno sessioni per accettare il rinforzo positivo rispetto alle manze neutre e non confidenti, probabilmente questo è dovuto alla propensione per

un'interazione a distanza ravvicinata, che la somministrazione del rinforzo positivo richiede, delle manze confidenti, come confermato dal basso valore di ADT. Il cessato bisogno di utilizzare un rinforzo negativo nel corso della prova è, come per il completamento dei tre tocchi, un indice dell'aumentata confidenza delle manze nei confronti degli operatori. Il corretto utilizzo del rinforzo positivo e del rinforzo negativo con i diversi animali è fondamentale per non rischiare che il tentativo di condizionamento fallisca, in particolare negli animali più diffidenti che beneficerebbero maggiormente delle conseguenze positive del *training*. L'utilizzo di tecniche di condizionamento con rinforzo positivo in combinazione con il rinforzo negativo si è visto essere un metodo di addestramento più efficace del solo rinforzo positivo in un gruppo di femmine di macaco rhesus (*Macaca mulatta*) (Wergård et al., 2015). In aggiunta, forzare gli animali ad eseguire un determinato comportamento o ad accettare un premio può essere controproducente per il tempo necessario a completare il condizionamento, oltre a comportare un rischio per la sicurezza dell'operatore (Dadone et al., 2016). È quindi importante tenere in considerazione il temperamento e i segnali comportamentali degli animali durante le sessioni di condizionamento.

Figura 3.2: Utilizzo del rinforzo negativo (% manze)

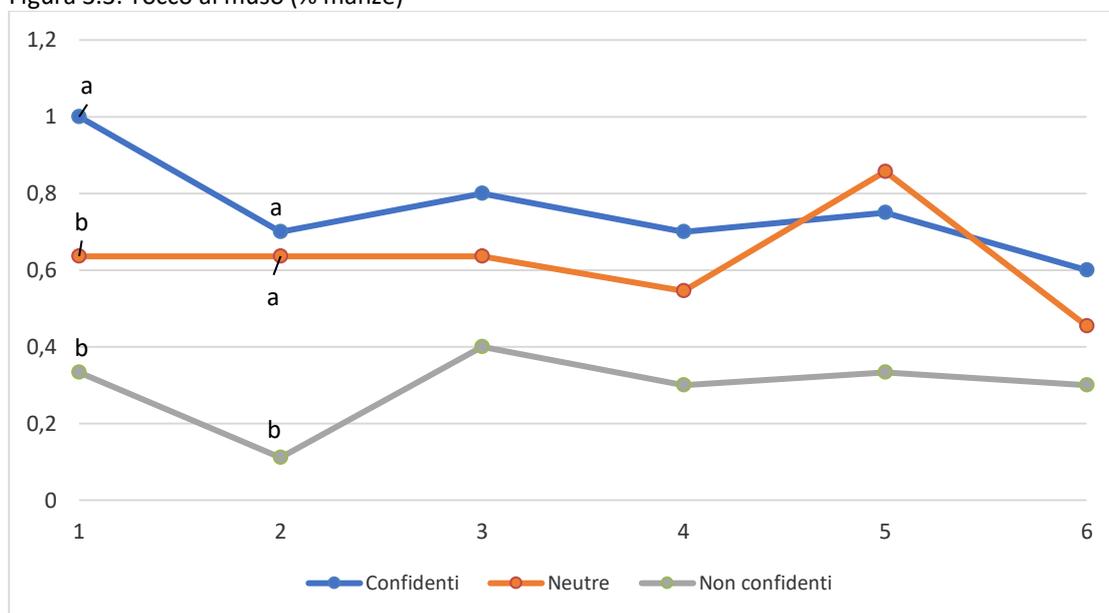


Valori senza lettere in comune sono statisticamente diversi ($P < 0,05$)

L'interazione ravvicinata è stata possibile per tutti gli animali, a differenza della disponibilità delle manze ad essere toccate nel muso che invece è risultata più difficile durante le 6 sessioni di condizionamento che miravano a questo obiettivo.

Come mostrato in Figura 3.3, il primo giorno di *training* il 100%, 62% e 38% rispettivamente delle manze confidenti, neutre e non confidenti, si sono lasciate toccare il muso volontariamente. Le manze confidenti sono generalmente state più tolleranti all'essere toccate rispetto a quelle neutre e non confidenti ma tale differenza è stata significativa solo durante le prime rilevazioni, a causa dell'elevata variabilità di questo comportamento tra le classi di temperamento.

Figura 3.3: Tocco al muso (% manze)



Valori senza lettere in comune sono statisticamente diversi ($P < 0,05$)

Con il passare del tempo non è aumentata la percentuale di animali disposti a farsi toccare sul muso, a differenza della percentuale di animali che hanno accettato il rinforzo positivo durante il condizionamento, e alcuni animali non sono mai stati disponibili a lasciarsi toccare. Questo implica che in base ai risultati ottenuti e a quanto mostrato in Figura 3.1 e Figura 3.2, le sessioni di condizionamento si potrebbero ridurre da otto a sei. Si è infatti visto che sei sessioni sono sufficienti per ridurre il tempo medio necessario al completamento dei tre tocchi e per fare accettare il rinforzo positivo alle manze non confidenti. Inoltre, prolungare il trattamento fino ad otto sessioni non sembra migliorare la percentuale di manze che si lascia toccare il muso.

Come riportato in Tabella 3.2, sul tempo in cui gli animali hanno accettato di essere toccati sulla groppa da un secondo operatore che simulava operazioni di routine sull'animale, c'è stato un effetto significativo da parte del numero della sessione. Infatti, nella prima il tempo medio di permanenza era di 9,2 secondi, mentre nella quarta e ultima si è arrivati a 15 s, ovvero il massimo tempo richiesto dal *training*. A questo proposito si ricorda che gli animali erano liberi e quindi avevano la possibilità

di andarsene. Gli animali giovani in media sono rimasti per tempi leggermente più lunghi rispetto alle manze più mature, denotando probabilmente una maggiore tendenza alla confidenza nei riguardi dell'operatore di animali più giovani. Infine, non si è notata una differenza significativa tra animali di temperamento diverso, ma questo è dovuto al fatto che queste sessioni sono state eseguite per ultime e quindi l'effetto del condizionamento delle sessioni precedenti ha probabilmente portato tutti gli animali ad avere una maggiore confidenza nei confronti degli operatori.

Tabella 3.2: Effetti del numero di sessioni, età e temperamento sul tempo in cui gli animali hanno accettato di farsi toccare sulla groppa

| | | Tempo (s) |
|---------------------|-----------------------|------------------|
| Sessione | 1 | 9,20b |
| | 2 | 13,2a |
| | 3 | 14,2a |
| | 4 | 15,2a |
| Età | Mature | 11,8b |
| | Giovani | 14,0a |
| Temperamento | Confidenti | 13,5 |
| | Neutre | 13,2 |
| | Non confidenti | 12,0 |
| SEM | | 2,27 |
| P | Sessioni | <0,001 |
| | Età | 0,010 |
| | Temperamento | 0,280 |

Valori senza lettere in comune sono statisticamente diversi ($P < 0,05$)

Abituare gli animali a rimanere calmi mentre sono manipolati e a lasciarsi toccare, può essere utile per migliorare l'interazione e diminuire il rischio di infortuni (Mellen e Ellis, 1996). Per la maggior parte dei prelievi e delle operazioni di routine, infatti, è necessario avvicinare gli animali dalla zona posteriore mentre sono in cattura, e avere animali che rimangono tranquilli evita possibili calci ed infortuni agli operatori. In particolare, per le manze, avere animali calmi mentre vengono manipolati da un operatore all'interno del box, potrebbe aiutare a rendere più fattibili e sicure le operazioni di misurazione, fondamentali per capire l'accrescimento, soprattutto se non sono presenti le autocatture in allevamento.

Potrebbe essere utile valutare se con un periodo di condizionamento più prolungato si possano ottenere dei risultati migliori anche per quanto riguarda la disponibilità degli animali nel lasciarsi toccare sul muso. La durata del condizionamento è comparabile alla durata di altri studi che però si concentravano sull'abituare le manze alla lattazione usando diverse metodiche. I miglioramenti sono stati osservati con 30 sessioni di massaggio delle mammelle durante gli ultimi due mesi di gravidanza (Das e Das, 2004), con 4 visite al giorno al robot di mungitura per quattro settimane (Kuhlberg et al., 2021), mentre è riportato che anche dieci giorni prima del parto sono sufficienti per abituare le manze alla mungitura (Kutzer et al., 2015). Per quanto riguarda gli studi di condizionamento operante i tempi si dilatano; 10 sessioni da circa mezz'ora l'una sono necessarie per condizionare le manze a recarsi in mangiatoia a seguito di un segnale uditivo (Wredle et al., 2004), mentre per addestrare delle manze a rimanere calme durante un'iniezione, con l'ausilio di tecniche di controcondizionamento, sono state necessarie fino a $85 \pm 4,6$ sessioni per una durata della prova di ventuno settimane con circa 4 sessioni a settimana (Lomb e Keyserlingk, 2021). In aggiunta, per addestrare un gruppo di manze a spostarsi in una specifica zona dell'allevamento prima di espellere le deiezioni, il tempo per condizionare gli animali è decisamente maggiore, con la necessità di più di 10 sessioni da 20-30 minuti al giorno solo per insegnare alle manze a spostarsi nella zona di deiezione a seguito dello stimolo scelto (Dirksen et al., 2020b).

Ad inizio sperimentazione gli animali sono stati classificati per tre diversi temperamenti in base al risultato ottenuto nell'ADT usato come criterio di confidenza degli animali (Kutzer et al., 2015), di conseguenza le manze confidenti hanno valori di ADT inferiori rispetto alle manze neutre e non confidenti ($P < 0,001$).

Come riportato dalla Tabella 3.3 l'*avoidance distance test* è stato influenzato significativamente dal temperamento, in quanto gli animali sono stati divisi in base ai risultati ottenuti, dal periodo e dall'interazione di questi due parametri. Prima del condizionamento (P1) l'ADT è stato maggiore rispetto al secondo periodo (P2), alla fine della prova sperimentale, con una significatività elevata ($P < 0,001$), probabilmente dovuta all'abitudine delle manze alla presenza del personale e alla ripetizione del test. La riduzione dei risultati dell'ADT negli animali non addestrati è probabilmente dovuta a fenomeni di apprendimento non associativo, come l'abitudine, e di apprendimento sociale (Mellen e Ellis, 1996). I bovini, in quanto animali gregari, tendono ad imitare o adeguarsi ai comportamenti degli altri individui del gruppo, probabilmente anche per una capacità di

apprendimento per imitazione. A supporto di un ruolo dell'apprendimento sociale nei bovini, uno studio di Munksgaard et al. (2001) ha osservato che le vacche che osservavano un altro esemplare ricevere una manipolazione positiva, tendevano a ridurre la distanza rispetto all'operatore, suggerendo che la risposta delle "osservatrici" può essere influenzata dalla risposta delle vacche trattate.

Anche l'interazione tra temperamento e periodo è risultata altamente significativa ($P < 0,001$), e sta ad indicare che le manze confidenti non hanno mostrato particolari cambiamenti nel risultato dell'ADT, avendo già in partenza valori molto bassi, mentre per quanto riguarda le manze neutre e non confidenti, i valori dell'ADT si sono ridotti dimostrando un'abitudine dell'animale alla presenza dell'uomo (Kutzer et al., 2015).

Così come l'ADT anche l'RMSSD è stato influenzato in modo significativo dal periodo; infatti, durante P1 i valori di RMSSD sono stati minori rispetto ai valori durante il secondo periodo ($P = 0,001$), indice di un minore livello di stress durante il secondo periodo, probabilmente grazie all'assuefazione delle manze alla presenza umana e all'effetto del *training* sulle manze addestrate. Per quanto riguarda il condizionamento, le manze Tr hanno avuto valori di RMSSD più alti rispetto alle manze nTr, con una differenza tendente alla significatività ($P = 0,077$).

L'RMSSD, indice della variabilità di frequenza cardiaca, indica l'attivazione vagale e quindi una maggiore rilassatezza (Wierig et al., 2018). La registrazione di valori più elevati di RMSSD durante il secondo periodo e negli animali Tr, dimostra che il condizionamento e il contatto frequente con l'operatore rende gli animali più rilassati alla presenza dell'uomo. Un aumento dei valori di RMSSD sono infatti riportati a seguito dell'adattamento ad uno *stressor* (Doerfler et al., 2016).

I valori di RMSSD simili tra animali di diverso temperamento, e numericamente maggiori nelle manze non confidenti sono probabilmente dovuti ad una maggiore eccitazione degli esemplari confidenti alla presenza dell'operatore. In uno studio di Kovács et al. (2015) una minore reattività nei confronti dell'uomo è riportata essere associata ad una maggiore attività vagale e ad una bassa attività simpatica. La reattività nei confronti del personale è stata calcolata usando una formula in cui l'ADT era il principale componente. Una maggiore reattività indicava che l'animale ricercava maggiormente l'interazione con l'uomo, mentre gli animali meno reattivi erano più calmi e schivi con gli operatori che entravano nel box per le misurazioni.

La frequenza cardiaca, anche se può essere utilizzata per individuare l'attività del SNA (Hagen et al., 2005), non è un parametro particolarmente importante per la misurazione dello stress ed infatti non è influenzata né dal temperamento, né dal condizionamento, come individuato già in altri studi (Kovács et al., 2015). Un'influenza è stata individuata per quanto riguarda l'età, con manze più giovani su cui è stata misurata una HR più alta rispetto alle manze più anziane ($P < 0,001$), probabilmente dovuto ad un metabolismo più veloce negli animali più giovani. Se invece si confrontano le vacche in età adulta, la frequenza cardiaca è maggiore per gli animali con un peso corporeo più elevato (Hagen et al., 2005).

Considerati i risultati ottenuti, potrebbe essere utile valutare quanto l'ADT e l'RMSSD siano indicativi del livello di stress degli animali in allevamento, che è dovuto a molteplici cause, come fattori strutturali, sanitari, manageriali e valutare che impatto possano avere con la produttività reale della mandria. Le caratteristiche comportamentali basate sui test di diffidenza, infatti, non sono necessariamente legati alle risposte fisiologiche dello stress (Kovács et al., 2015) e non tutte le risposte stressogene devono essere interpretate come necessariamente negative, e sono da considerare *distress* solo se impattano sul benessere dell'animale (Moberg, 2000).

Tabella 3.3: Effetto di condizionamento, età, temperamento, periodo e la loro interazione su ADT, frequenza cardiaca e RMSSD

| | | ADT (m) | Freq. Cardiaca (battiti/minuto) | RMSSD (ms) |
|------------------------|-----------------------------------|--------------------|--|-----------------------|
| Condizionamento | nTr | 0,518 | 86,59 | 14,2b |
| | Tr | 0,480 | 83,7 | 16,9a |
| Età | Mature | 0,520 | 80,9b | 16,8 |
| | Giovani | 0,477 | 89,4a | 14,3 |
| Temperamento | Confidenti | 0,180c | 85,0 | 15,9 |
| | Neutre | 0,464b | 84,3 | 14,7 |
| | Non confidenti | 0,852a | 86,1 | 16,0 |
| Periodo | P1 | 0,825a | 85,8 | 12,9b |
| | P2 | 0,173b | 84,4 | 18,2a |
| SEM | | 0,046 | 2,13 | 1,62 |
| P | Condizionamento | 0,400 | 0,173 | 0,077 |
| | Età | 0,335 | <0,001 | 0,271 |
| | Temperamento | <0,001 | 0,770 | 0,735 |
| | Periodo | <0,001 | 0,158 | 0,001 |
| | Temperamento x Periodo | <0,001 | 0,343 | 0,491 |

Valori senza lettere in comune sono stati statisticamente diversi ($P < 0,05$)

Le interazioni non significative non sono state inserite in tabella

Alla luce della diminuzione di ADT anche nelle manze non condizionate, in cui la confidenza nei confronti del personale è aumentata probabilmente per l'abitudine e l'apprendimento sociale, potrebbe essere possibile per l'allevatore condizionare solo la metà degli animali del gruppo, comportando un'ulteriore riduzione del tempo e del personale impiegato per il trattamento.

In Tabella 3.4 sono riportati i valori basali di cortisolo fecale (FCM) e in seguito a procedure di manipolazione.

Il livello basale di FCM ad inizio prova è legato al temperamento delle manze ($P = 0,039$), con valori minori nelle manze confidenti, intermedi nelle manze neutre e più elevato nelle manze non confidenti. Le manze non confidenti possono essere più stressate rispetto agli animali neutri e confidenti. Il livello basale di stress più elevato nelle manze non confidenti potrebbe indicare che questi esemplari siano meno in grado di adattarsi all'ambiente di stabulazione. Gli animali, infatti,

sono sottoposti a molteplici *stressor*, come l'interazione uomo-animale, le gerarchie all'interno del gruppo e la competizione per l'alimento, considerato che nei box in cui erano tenute le manze durante la prova il numero di postazioni in mangiatoia era inferiore rispetto al numero di animali. Si potrebbe quindi suggerire una certa relazione tra l'ADT e il FCM, al contrario di quanto riscontrato da Ebinghaus et al. (2020), mentre una relazione tra l'ADT e i livelli di stress è stata individuata per indicatori di stress che rispecchiano una risposta stressogena più acuta, come ad esempio la concentrazione sierica di cortisolo (Breuer et al., 2003). Siccome il livello di cortisolo basale è stato valutato all'inizio della prova sperimentale, il condizionamento non è risultato, giustamente, avere un effetto su questo parametro, perché quando sono stati raccolti i campioni le sessioni di *training* non erano ancora iniziate.

Per quanto riguarda i livelli di FCM a seguito di procedure stressanti, è stato notato un effetto significativo del temperamento ($P < 0,05$), ma con livelli di FCM più alti nelle manze confidenti, intermedi in quelli neutri e bassi negli animali non confidenti. Anche per quanto riguarda il condizionamento sono stati notati dei livelli più alti di FCM nelle manze Tr, anche se la differenza non è significativa ($P = 0,125$). Una possibile spiegazione potrebbe essere una minore responsività della ghiandola surrenale ad uno stimolo stressante.

A supporto di tale ipotesi, è stato riportato da Curley et al. (2008) che a seguito della somministrazione farmacologica di CRH o ACTH, in modo da simulare un ipotetico *stressor*, la concentrazione sierica di cortisolo è simile tra due gruppi di vacche con temperamento diverso. Se però si considera la variazione di cortisolo a seguito dell'iniezione, nelle manze calme, in cui il livello di cortisolo basale è più basso, l'incremento è maggiore rispetto agli animali con temperamento più agitato. Anche a parità di funzione ipofisaria la risposta della ghiandola surrenale è smorzata negli animali che sono stati più veloci all'*exit speed test* e che avevano valori basali di cortisolo più alti. Probabilmente ciò è dovuto ad una depressione della risposta surrenale in animali in cui l'asse HPA è attivato più frequentemente perché più sensibili ai vari *stressor* presenti in allevamento (Curley et al., 2008).

Tabella 3.4: Effetto di condizionamento, età, temperamento e la loro interazione su sul livello basale di cortisolo fecale (FCM) e il livello a seguito di procedure stressanti

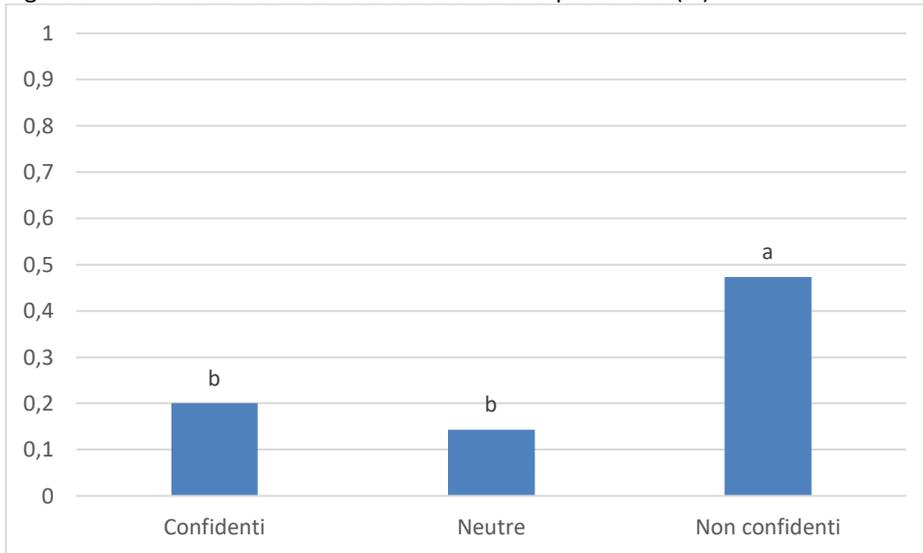
| | | Valore basale cortisolo (ng/g) | Valore cortisolo dopo procedure stressanti (ng/g) |
|------------------------|------------------------|-----------------------------------|---|
| Condizionamento | nTr | 34,3 | 40,5 |
| | Tr | 30,9 | 46,8 |
| Età | Mature | 33,0 | 42,0 |
| | Giovani | 32,2 | 45,3 |
| Temperamento | Confidenti | 29,1b | 49,7a |
| | Neutre | 30,3ab | 44,6ab |
| | Non confidenti | 38,4a | 36,7b |
| SEM | | 10,3 | 13,55 |
| P | Condizionamento | 0,281 | 0,125 |
| | Età | 0,796 | 0,685 |
| | Temperamento | 0,039 | 0,041 |

Valori senza lettere in comune sono stati statisticamente diversi ($P < 0,05$)

Le interazioni non significative non sono state inserite in tabella

Durante la misurazione degli animali per verificarne l'accrescimento, sono state rilevati i comportamenti come suggerito da Kutzer et al. (2015). L'analisi di tali osservazioni non ha dato risultati significativi a causa di un'elevata variabilità dei dati raccolti. L'unica eccezione è stata il numero di animali che presentavano il *clumping* della coda, tenevano cioè la coda schiacciata tra il treno posteriore, con una differenza tra le diverse classi di temperamento. I risultati sono mostrati in Figura 3.4. Nelle manze non confidenti la percentuale di *clumping* della coda è stata significativamente maggiore rispetto alle manze confidenti e neutre.

Figura 3.4: Manze con coda schiacciata tra il treno posteriore (%)



Valori senza lettere in comune sono stati statisticamente diversi ($P < 0,05$)

Gli altri risultati sulle osservazioni comportamentali sono stati tralasciati per non rendere questo elaborato eccessivamente ridondante.

La produttività delle manze è stata valutata analizzando i tentativi di fecondazione per quanto riguarda il condizionamento, il temperamento e l'età ad inizio prova, riportati nella Tabella 3.5.

In uno studio di Hemsworth et al. (2000) il tasso di concepimento alla prima inseminazione è stato correlato all'interazione con il personale di allevamento e il temperamento dell'animale. Un'interazione uomo-animale positiva è riportata avere una correlazione positiva con il tasso di concepimento, mentre una correlazione negativa è stata trovata se si utilizzano delle interazioni tattili spiacevoli nei confronti delle vacche. Similmente un atteggiamento più curioso e confidente delle vacche è correlato positivamente al tasso di concepimento, mentre è più basso in quegli animali che hanno mostrato un comportamento più schivo e diffidente nei confronti del personale che ha preso parte allo studio. La correlazione tra il livello di cortisolo nel latte e il tasso di concepimento non è risultato significativo (Hemsworth et al., 2000).

I risultati mostrano che sono state individuate solo differenze numeriche tra i diversi effetti considerati e nessuna differenza è risultata significativa.

Tabella 3.5: Effetto di condizionamento, età, temperamento, periodo e la loro interazione sul numero di tentativi di fecondazione per ottenere esito positivo di gravidanza

| | N tentativi fecondazione per gravidanza | |
|------------------------|--|-------|
| Condizionamento | nTr | 1,50 |
| | Tr | 1,30 |
| Età | Mature | 1,43 |
| | Giovani | 1,37 |
| Temperamento | Confidenti | 1,36 |
| | Neutre | 1,34 |
| | Non confidenti | 1,50 |
| SEM | | 0,409 |
| P | Condizionamento | 0,349 |
| | Età | 0,755 |
| | Temperamento | 0,793 |

Valori senza lettere in comune sono stati statisticamente diversi ($P < 0,05$)

Le interazioni non significative non sono state inserite in tabella

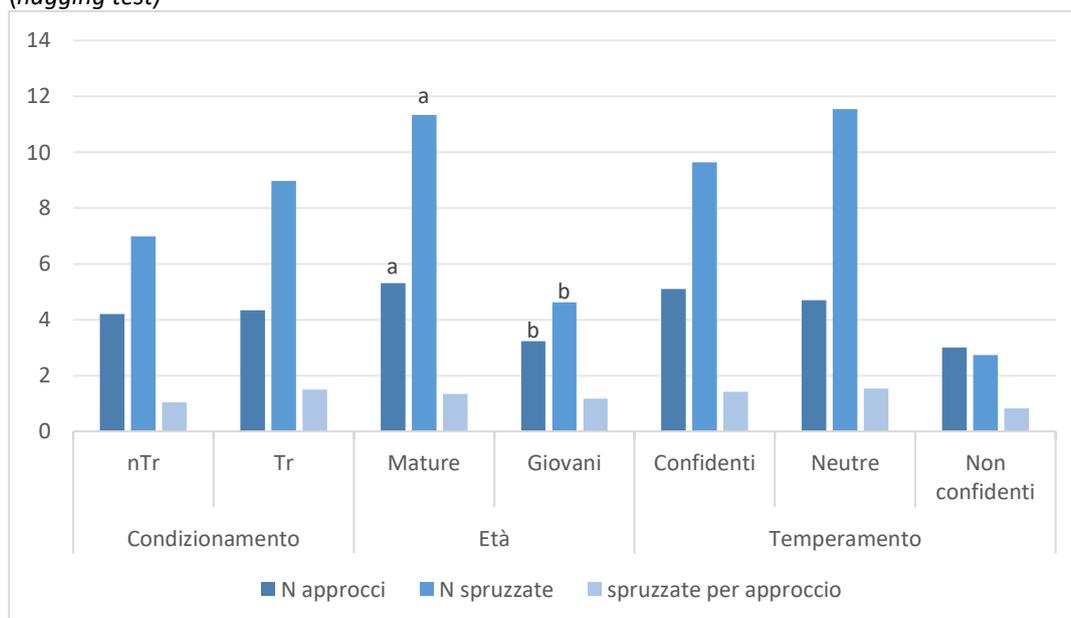
Il numero di tentativi di fecondazione è un parametro riproduttivo pratico e facile da reperire, ma tutt'altro che esaustivo per misurare l'effetto del condizionamento e del temperamento sull'efficienza riproduttiva delle manze. Anche se un'analisi della relazione tra la riproduzione e lo stress è di difficile attuazione negli allevamenti commerciali, in futuro potrebbe essere interessante approfondire maggiormente questo aspetto, considerando più animali ed eseguendo un'indagine più approfondita sul profilo ormonale (Dobson e Smith, 2000), sulla suscettibilità alle infezioni durante il postparto e i ritardi nella ripresa dell'attività ciclica (Huszenicza et al., 2004).

Oltre agli effetti positivi del condizionamento, come una facilità maggiore nelle procedure di manipolazione e movimentazione delle manze, che durante la prova riuscivano ad essere spostate tra i diversi box con minore difficoltà, gli operatori dell'allevamento hanno evidenziato una maggiore predisposizione degli animali a manifestare comportamenti fastidiosi, cercando di leccare, spingere e strofinarsi sugli operatori mentre questi erano all'interno del box.

Per valutare i comportamenti fastidiosi delle manze, che l'allevatore aveva notato durante le procedure di movimentazione degli animali è stato effettuato il *nagging test*, i cui risultati sono riportati in Figura 3.5.

Lo scopo di tale test è stato quello di capire se il condizionamento potesse avere un effetto nella predisposizione delle manze a manifestare comportamenti fastidiosi nei confronti degli operatori. Come mostra la Figura 3.5 i comportamenti evidenziati dall'allevatore non sembrano essere dovuti al trattamento di condizionamento ma ad essere piuttosto casuali. Nessuna relazione è stata individuata tra le misurazioni effettuate durante il *nagging test* e le procedure di condizionamento, con un numero di approcci e un'insistenza lievemente maggiore nelle manze Tr, ma non significativamente rilevante ($P>0,1$). Anche il temperamento non è risultato significativo, mentre un ruolo è risultato averlo l'età iniziale delle manze, con gli animali più anziani che si sono avvicinati maggiormente all'operatore ($P=0,039$) e sono tendenzialmente più insistenti ($P=0,0887$).

Figura 3.5: Effetto di condizionamento, età e temperamento e loro interazione sui comportamenti fastidiosi delle manze (*nagging test*)



Valori senza lettere in comune sono stati statisticamente diversi ($P<0,05$)

Le interazioni non significative non sono state inserite

È comunque da tenere in considerazione che il *nagging test* è stato svolto solamente alla fine della prova sperimentale, momento in cui tutti gli animali si erano abituati alla presenza umana e non è stato possibile valutare i risultati con l'inizio della prova, in modo da confrontare le differenze prima e dopo le procedure di condizionamento.

L'azienda in cui si è svolta la prova sperimentale ha un buon livello di gestione delle manze e i box di stabulazione dotati di autocatture, caratteristica non scontata e fondamentale per facilitare lo svolgimento della sperimentazione. Inoltre, l'azienda è stata scelta per la sensibilità dell'allevatore

nei confronti del benessere animale e dei temi trattati in questo elaborato. Risultati più eclatanti si sarebbero potuti trovare se il livello iniziale di benessere non fosse stato così elevato.

Per non rendere la tesi eccessivamente lunga non sono stati inseriti i dati relativi all'accrescimento degli animali e alla digeribilità dell'alimento.

Inoltre, sarebbe da verificare quanto frequentemente sia necessario rinforzare il condizionamento affinché permanga nel lungo periodo, ma questo tipo di analisi non è stata implementata in questo studio. In letteratura è indicato che nei bovini l'apprendimento permanga se rinforzato ogni 6 settimane (Wredle et al., 2004).

5. CONCLUSIONI

I risultati dello studio hanno evidenziato che il condizionamento operante può essere uno strumento utile per migliorare l'interazione uomo-animale e quindi ridurre uno dei fattori di stress per gli animali in allevamento. Attraverso l'applicazione di tecniche di condizionamento le manze si possono abituare alla presenza dell'operatore e alle manipolazioni, evitando che il passaggio di gruppo con le vacche in produzione e l'aumentata interazione con l'uomo sia un forte *stressor*.

È stato visto che applicando il condizionamento operante su un gruppo di animali, invece che sul singolo animale, il tempo richiesto non è eccessivo per l'allevatore, grazie al fatto che anche gli animali non trattati si abituano alla presenza dell'operatore all'interno del box. Inoltre, il tempo per completare una sessione di condizionamento si riduce dopo i primi giorni, rendendo la procedura sempre meno importante in termini di impegno da parte dell'allevatore.

L'utilizzo del condizionamento sembra poter ridurre la paura degli animali nei confronti dell'uomo e rendere gli animali più rilassati, portando ad un aumento del tono vagale.

Le funzioni dell'organismo (*biological functioning*), la percezione e le sensazioni provate (*affective state*) e il comportamento naturale (*natural living*) sono tre aspetti fondamentali nel benessere animale, e quindi la diminuzione dello stress dato dall'interazione uomo-animale può essere un fattore importante non solo per migliorare la qualità di vita degli animali ma, in un'ottica di "One Health", anche per migliorare le produzioni e facilitare il lavoro del personale di allevamento.

In letteratura, particolare interesse è stato riservato all'utilizzo dell'apprendimento non associativo, come ad esempio l'abitudine, come strumento per migliorare la produttività degli animali, e sono ancora pochi gli studi che prendono in considerazione il condizionamento operante come strumento utile nell'allevamento.

Ulteriori studi potrebbero aiutare a capire l'impatto di tecniche di condizionamento operante nel modulare lo stress negli allevamenti di vacche da latte, prendendo in considerazione anche altri parametri produttivi come la produzione di latte o la suscettibilità degli animali ai patogeni.

6. BIBLIOGRAFIA

- Bagath, M., Krishnan, G., Devaraj, C., Rashamol, V. P., Pragna, P., Lees, A. M., Sejian, V. (2019). The impact of heat stress on the immune system in dairy cattle : A review. *Research in Veterinary Science*, 126(March), 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.08.011>
- Bertenshaw, C., Rowlinson, P., Edge, H., Douglas, S., Shiel, R. (2008). The effect of different degrees of “positive” human-animal interaction during rearing on the welfare and subsequent production of commercial dairy heifers. *Applied Animal Behaviour Science*, 114(1–2), 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2007.12.002>
- Bhatia, V., Tandon, R. K. (2005). Stress and the gastrointestinal tract. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 20(3), 332–339. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2004.03508.x>
- Brandão, A. P., Cooke, R. F. (2021). Effects of temperament on the reproduction of beef cattle. *Animals*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/ani11113325>
- Breuer, K., Hemsworth, P. H., Coleman, G. J. (2003). The effect of positive or negative handling on the behavioural and physiological responses of nonlactating heifers. *Applied Animal Behaviour Science*, 84(1), 3–22. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(03\)00146-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(03)00146-1)
- Britt, J. H., Cushman, R. A., Dechow, C. D., Dobson, H., Humblot, P., Hutjens, M. F., ... Stevenson, J. S. (2018). Invited review: Learning from the future—A vision for dairy farms and cows in 2067. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3722–3741. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14025>
- Britt, J. H., Cushman, R. A., Dechow, C. D., Dobson, H., Humblot, P., Hutjens, M. F., ... Stevenson, J. S. (2021). Review : Perspective on high-performing dairy cows and herds. *Animal*, 15, 100298. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100298>
- Bruckmaier, R. M., Blum, J. W. (1998). Oxytocin Release and Milk Removal in Ruminants. *Journal of Dairy Science*, 81(4), 939–949. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(98\)75654-1](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(98)75654-1)
- Cardoso, C. S., Keyserlingk, M. A. G. V., Carlos, L., Machado, P., Jos, M. (2021). Dairy Heifer Motivation for Access to a Shaded Area, 1–11.
- Carroll, J. A., Forsberg, N. E. (2007). Influence of Stress and Nutrition on Cattle Immunity. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 23(1), 105–149. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2007.01.003>
- Cherry, K., Gans, S. (2019). What is operant conditioning and how does it work. How reinforcement and punishment modify behavior. <https://doi.org/10.1093/jnci/87.4.247>

- Connor, E. E. (2015). Invited review: Improving feed efficiency in dairy production: Challenges and possibilities. *Animal*, 9(3), 395–408. <https://doi.org/10.1017/S1751731114002997>
- Cortese, M., Brščić, M., Ughelini, N., Andrighetto, I., Contiero, B., Marchesini, G. (2020). Effectiveness of Stocking Density Reduction on Mitigating Lameness in a Charolais Finishing Beef Cattle Farm. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 10(7), 1147. <https://doi.org/10.3390/ani10071147>
- Cortese, M., Segato, S., Andrighetto, I., Ughelini, N., Chinello, M., Schiavon, E., Marchesini, G. (2019). The Effects of Decreasing Dietary Crude Protein on the Growth Performance, Feed Efficiency and Meat Quality of Finishing Charolais Bulls. *Animals*, 1–13.
- Curley, K. O., Neuendorff, D. A., Lewis, A. W., Cleere, J. J., Welsh, T. H., Randel, R. D. (2008). Functional characteristics of the bovine hypothalamic–pituitary–adrenal axis vary with temperament. *Hormones and Behavior*, 53(1), 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.08.005>
- Dadone, L. I., Schilz, A., Friedman, S. G., Bredahl, J., Foxworth, S. (2016). Training Giraffe (*Giraffa camelopardalis reticulata*) for Front Foot Radiographs and Hoof Care, 236(February), 228–236. <https://doi.org/10.1002/zoo.21279>
- Das, K. S., Das, N. (2004). Pre-partum udder massaging as a means for reduction of fear in primiparous cows at milking, 89, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.06.005>
- De Passillé, A. M., Rushen, J., Ladewig, J., Petherick, C. (1996). Dairy Calves' Discrimination of People Based on Previous Handling. *Journal of Animal Science*, 74(5), 969–974. <https://doi.org/10.2527/1996.745969x>
- Dirksen, N., Langbein, J., Matthews, L., Puppe, B., Elliffe, D., Schrader, L. (2020). Conditionability of 'voluntary' and 'reflexive-like' behaviors, with special reference to elimination behavior in cattle. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 115(May 2020), 5–12. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.05.006>
- Dirksen, N., Langbein, J., Schrader, L., Puppe, B., Elliffe, D., Siebert, K., ... Matthews, L. (2020). How can cattle be toilet trained? Incorporating reflexive behaviours into a behavioural chain. *Animals*, 10(10), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ani10101889>
- Dobson, H., Smith, R. F. (2000). What is stress, and how does it affect reproduction?, 743–752.
- Doerfler, R. L., Lehermeier, C., Kliem, H., Möstl, E., Bernhardt, H. (2016). Physiological and behavioral responses of dairy cattle to the introduction of robot scrapers. *Frontiers in Veterinary Science*, 3(NOV), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00106>

- Ebinghaus, A., Ivemeyer, S., Rupp, J., Knierim, U. (2016). Identification and development of measures suitable as potential breeding traits regarding dairy cows' reactivity towards humans. *Applied Animal Behaviour Science*, 185, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2016.09.010>
- Ebinghaus, A., Knierim, U., Simantke, C., Palme, R., Ivemeyer, S. (2020). Fecal cortisol metabolites in dairy cows: A cross-sectional exploration of associations with animal, stockperson, and farm characteristics. *Animals*, 10(10), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ani10101787>
- Ede, T., Keyserlingk, M. A. G. V., Weary, D. M. (2018). Approach-aversion in calves following injections. *Scientific Reports*, (March), 6–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27669-7>
- Grandin, T. (1997). Assessment of Stress during Handling and Transport. *Journal of Animal Science*, 75(1), 249–257. <https://doi.org/10.2527/1997.751249x>
- Grandin, Temple. (1998). HANDLING METHODS AND FACILITIES TO REDUCE STRESS, 14(2). [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30257-7](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30257-7)
- Gray, P. O. (2011). *Psychology*. (2010 Worth, Ed.).
- Hagen, K., Langbein, J., Schmied, C., Lexer, D., Waiblinger, S. (2005). Heart rate variability in dairy cows—influences of breed and milking system. *Physiology & Behavior*, 85(2), 195–204. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.03.019>
- Hedlund, L., Løvlie, H. (2015). Personality and production : Nervous cows produce less milk. *Journal of Dairy Science*, 98(9), 5819–5828. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8667>
- Heinrichs, A. J., Rogers, G. W., Cooper, J. B. (1992). Predicting Body Weight and Wither Height in Holstein Heifers Using Body Measurements. *Journal of Dairy Science*, 75(12), 3576–3581. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)78134-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)78134-X)
- Heinrichs, A. J., Swartz, L. A. (2000). *Management of Dairy Heifers*. Pennsylvania State University, 1–35.
- Heinrichs, A. J., Zanton, G. I., Lascano, G. J., Jones, C. M. (2017). A 100-Year Review: A century of dairy heifer research. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10173–10188. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12998>
- Hemsworth, P. H., Coleman, G. J., Barnett, J. L., Borg, S. (2000). Relationships between human-animal interactions and productivity of commercial dairy cows. *Journal of Animal Science*, 78(11), 2821–2831. <https://doi.org/10.2527/2000.78112821x>

- Holtenius, K., Persson Waller, K., Essén-Gustavsson, B., Holtenius, P., Hallén Sandgren, C. (2004). Metabolic parameters and blood leukocyte profiles in cows from herds with high or low mastitis incidence. *The Veterinary Journal*, 168(1), 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2003.09.015>
- Huszenicza, G., Jánosi, S., Gáspárdy, A., Kulcsár, M. (2004). Endocrine aspects in pathogenesis of mastitis in postpartum dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 82–83, 389–400. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.029>
- Ivemeyer, S., Simantke, C., Ebinghaus, A., Poulsen, P. H., Sorensen, J. T., Rousing, T., ... Knierim, U. (2018). Herd-level associations between human–animal relationship, management, fecal cortisol metabolites, and udder health of organic dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 101(8), 7361–7374. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13912>
- Jensen, P., Toates, F. M. (1997). Stress as a state of motivational systems. *Applied Animal Behaviour Science*, 53(1–2), 145–156. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(96\)01156-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(96)01156-2)
- Juárez-carrillo, P. M., Liebman, A. K., Reyes, I. A. C. (2016). Training for Hispanic Immigrant Dairy Workers, 505–515. <https://doi.org/10.1177/1524839916683668>
- Kelley, K. W. (1980). Stress and immune function: a bibliographic review. *Annales de Recherches Veterinaires*, 11(4), 445–478.
- Kim, H. G., Cheon, E. J., Bai, D. S., Lee, Y. H., Koo, B. H. (2018). Stress and heart rate variability: A meta-analysis and review of the literature. *Psychiatry Investigation*, 15(3), 235–245. <https://doi.org/10.30773/pi.2017.08.17>
- Kovács, L., Kézér, F. L., Tőzsér, J., Szenci, O., Póti, P., Pajor, F. (2015). Heart Rate and Heart Rate Variability in Dairy Cows with Different Temperament and Behavioural Reactivity to Humans. *PLOS ONE*, 10(8), e0136294. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136294>
- Kuhlberg, M. K. V., Gottschalk, J., Wagner, T., Herrmann, N., Einspanier, A. (2021). The effects of a training program using a phantom to accustom heifers to the automatic milking system. *Journal of Dairy Science*, 104(1), 928–936. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18715>
- Kutzer, T., Steilen, M., Gygax, L., Wechsler, B. (2015). Habituation of dairy heifers to milking routine- Effects on human avoidance distance, behavior, and cardiac activity during milking. *Journal of Dairy Science*, 98(8), 5241–5251. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8773>
- Lomb, J., Keyserlingk, M. A. G. V. (2021). Effects of positive reinforcement training for heifers on responses to a subcutaneous injection. *Journal of Dairy Science*, 104(5), 6146–6158. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19463>

- Malašauskienė, D., Televičius, M., Juozaitienė, V., Antanaitis, R. (2019). Rumination time as an indicator of stress in the first thirty days after calving. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, vol.22(No 2), 363–368. <https://doi.org/10.24425/pjvs.2019.129229>
- Marco-Ramell, A., Almeida, A. M. D., Cristobal, S., Rodrigues, P., Roncada, P., Bassols, A. (2016). *Molecular BioSystems Proteomics and the search for welfare and*, 2024–2035. <https://doi.org/10.1039/c5mb00788g>
- Mcleod, S. (2015). Skinner - Operant Conditioning BF Skinner : Operant Conditioning, (1948), 1–12.
- Meier, S., Kay, J. K., Heiser, A., Mitchell, M. D., Crookenden, M. A., Riboni, M. V., ... Roche, J. R. (2020). Effects of far-off and close-up transition cow feeding on uterine health, postpartum anestrus interval, and reproductive outcomes in pasture-based dairy cows, 8, 1–11.
- Mellen, J., Ellis, S. (1996). Animal learning and husbandry training. *Wild Mammals in Captivity: Principles and Techniques*, (August), 88–99.
- Mendl, M., Nicol, C. J. (2022, September 1). *Learning and cognition*. CABI Books. CABI Books. <https://doi.org/10.1079/9781786391650.0062>
- Moberg, G. P. (2000). Biological Response to Stress: Implications for Animal Welfare. In *Biological Response to Stress* (pp. 1–21). Wallingford, UK: CAB International.
- Möstl, E., Maggs, J. L., Schrötter, G., Besenfelder, U., Palme, R. (2002). Measurement of cortisol metabolites in faeces of ruminants. *Veterinary Research Communications*, 26(2), 127–139. <https://doi.org/10.1023/A:1014095618125>
- Mottram, T. (2016). Animal board invited review : precision livestock farming for dairy cows with a focus on oestrus detection. *Animal, The International Journal of Animal Biosciences*, 10(10), 1575–1584. <https://doi.org/10.1017/S1751731115002517>
- Munksgaard, L., DePassillé, A. M., Rushen, J., Herskin, M. S., Kristensen, A. M. (2001). Dairy cows' fear of people: social learning, milk yield and behaviour at milking. *Applied Animal Behaviour Science*, 73(1), 15–26. [https://doi.org/10.1016/s0168-1591\(01\)00119-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1591(01)00119-8)
- Neja, W., Sawa, A., Jankowska, M., Bogucki, M., Krężel-Czopek, S. (2015). Effect of the temperament of dairy cows on lifetime production efficiency. *Archiv Tierzucht*, 58, 193–197. <https://doi.org/10.5194/aab-58-193-2015>
- Niekerk, J. K. V., Wilms, J. N., Hare, K. S., Welboren, A. C., Lopez, A. J., Yohe, T. T., ... Steele, M. A. (2021). ADSA Foundation Scholar Award: New frontiers in calf and heifer nutrition — From

- conception to puberty. *Journal of Dairy Science*, 104(8), 8341–8362.
<https://doi.org/10.3168/jds.2020-20004>
- Palme, R. (2012). Monitoring stress hormone metabolites as a useful, non-invasive tool for welfare assessment in farm animals. *Animal Welfare*, 21(3), 331–337.
<https://doi.org/10.7120/09627286.21.3.331>
 - Palme, Rupert. (2019). Non-invasive measurement of glucocorticoids: Advances and problem. *Physiology and Behavior*, 199, 229–243.
 - Risco, C. A., Retamal, P. M., Drost, M. (2011). *Dairy Production Medicine*. Dairy Production Medicine.
<https://doi.org/10.1002/9780470960554>
 - Rushen, J. (1996). Using Aversion Learning Techniques to Assess the Mental State , Suffering , and Welfare of Farm Animals 1 ABSTRACT :, 1990–1995.
 - Schirmann, K., Chapinal, N., Weary, D. M., Heuwieser, W., von Keyserlingk, M. A. G. (2011). Short-term effects of regrouping on behavior of prepartum dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 94(5), 2312–2319. <https://doi.org/10.3168/JDS.2010-3639>
 - Sjaastad, O. V., Sand, O., Hove, K. (2019). *Fisiologia degli animali domestici / edizione italiana a cura di Carlo Tamanini. Fisiologia degli animali domestici / Ø. V. Sjaastad, O. Sand, K. Hove ; edizione italiana a cura di Carlo Tamanini. CEA.*
 - Soonberg, M., Kass, M., Kaart, T., Barraclough, R., Haskell, M. J., Arney, D. R. (2021). Effect of grouping on behaviour of dairy heifers and cows in the transition period. *Journal of Dairy Research*, 88(1), 45–51. <https://doi.org/10.1017/S0022029921000066>
 - Sorge, U. S., Cherry, C., Bender, J. B. (2014). Perception of the importance of human-animal interactions on cattle flow and worker safety on Minnesota dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 97(7), 4632–4638. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7971>
 - Stangor, C., Walinga, J. (2014). Learning by Association: Classical Conditioning. In *Introduction to Psychology – 1st Canadian Edition*. BCcampus. Retrieved from <https://opentextbc.ca/introductiontopsychology/>
 - Strickland, B. B. (2001). *The Gale encyclopedia of psychology*. Detroit, MI: Gale Group. Detroit, MI: Gale Group.
 - Sutherland, M. A., Rogers, A. R., Verkerk, G. A. (2012). The effect of temperament and responsiveness towards humans on the behavior, physiology and milk production of multi-parous

- dairy cows in a familiar and novel milking environment. *Physiology and Behavior*, 107(3), 329–337. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.07.013>
- Svensson, C., Hultgren, J. (2008). Associations between housing, management, and morbidity during rearing and subsequent first-lactation milk production of dairy cows in southwest Sweden. *Journal of Dairy Science*, 91(4), 1510–1518. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0235>
 - Thorndike, E. L. (1905). *The elements of psychology*.
 - Tilbrook, A. J., Turner, A. I., Clarke, I. J. (2000). Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. *Reviews of Reproduction*, 5(2), 105–113. <https://doi.org/10.1530/ROR.0.0050105>
 - Torres, S. J., Nowson, C. A. (2007). Relationship between stress, eating behavior, and obesity. *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, Calif.), 23(11–12), 887–894. <https://doi.org/10.1016/J.NUT.2007.08.008>
 - Trevisi, E., Lombardelli, R., Minuti, A., Bertoni, G. (2007). Change of digesta passage rate in dairy cows after different acute stress situations. *Italian Journal of Animal Science*, 6(SUPPL. 1), 377–379. <https://doi.org/10.4081/IJAS.2007.1S.377>
 - Van Reenen, C. G., Van der Noordhuizen, J. P. T. M., Blokhuis, H. J. (2002). Individual Differences in Behavioral and Physiological Responsiveness of Primiparous Dairy Cows to Machine Milking. *Journal of Dairy Science*, 85(10), 2551–2561. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74338-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74338-5)
 - Vandbakk, M., Olaff, H. S., Holth, P. (2020). Blocking of Stimulus Control and Conditioned Reinforcement. *The Psychological Record*, 70(2), 279–292. <https://doi.org/10.1007/s40732-020-00393-3>
 - Wergård, E.-M., Temrin, H., Forkman, B., Spångberg, M., Fredlund, H., Westlund, K. (2015). Training pair-housed Rhesus macaques (*Macaca mulatta*) using a combination of negative and positive reinforcement. *Behavioural Processes*, 113, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2014.12.008>
 - Wierig, M., Büscher, W., Plümer, L. (2018). Recording Heart Rate Variability of Dairy Cows to the Cloud — Why Smartphones Provide Smart Solutions, 1–16. <https://doi.org/10.3390/s18082541>
 - Windschnurer, I., Schmied, C., Boivin, X., Waiblinger, S. (2008). Reliability and inter-test relationship of tests for on-farm assessment of dairy cows' relationship to humans. *Applied Animal Behaviour Science*, 114(1–2), 37–53. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2008.01.017>

- Wredle, E., Rushen, J., De Passillé, A. M., Munksgaard, L. (2004). Training cattle to approach a feed source in response to auditory signals. *Canadian Journal of Animal Science*, 84(4), 567–572. <https://doi.org/10.4141/A03-081>
- Zaborski, D., Grzesiak, W., Szatkowska, I., Dybus, A., Muszynska, M., Jedrzejczak, M. (2009). Factors affecting dystocia in cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(3), 540–551. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01123.x>