

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA



FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie

**CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN MEDICINA
VETERINARIA**

Tesi di Laurea

**UNA BREVE SOSPENSIONE DELLA
DISPONIBILITA' D'ACQUA NON INFLUENZA
SIGNIFICATIVAMENTE IL PATTERN
COMPORTAMENTALE DELLA BOVINA DA
LATTE IN CONDIZIONI DI CAMPO**

RELATORE: Prof. GIANFRANCO GABAI

CORRELATRICE: Dott.ssa SIMONA NORMANDO

LAUREANDA: Vanessa Lazzari

Anno Accademico 2009-2010

INDICE

Indice	1
Ringraziamenti	3
1. SCOPO DELLA RICERCA	4
2. INTRODUZIONE	5
2.1. <u>LO STRESS</u>	
2.1.1 STRESS: CENNI STORICI	5
2.1.2 ELEMENTI CHE PARTECIPANO ALL'EVENTO STRESSANTE	7
2.1.3 LA CHIMICA DELLO STRESS	8
2.2 <u>STRESS E BENESSERE ANIMALE</u>	11
2.3 <u>LA ZOOTECNICA IN ITALIA</u>	16
2.4 <u>BENESSERE NELL'ALLEVAMENTO INTENSIVO DELLA VACCA DA LATTE</u>	18
2.5 <u>L'ACQUA E LA BOVINA DA LATTE</u>	19
2.5.1 FABBISOGNI IDRICI DELLE BOVINE DA LATTE	21
2.5.2 SETE, ASSUNZIONE D'ACQUA ED EFFETTI DELLA SUA PRIVAZIONE	22
3. MATERIALI E METODI	26
3.1. <u>SETTING</u>	26
3.2. <u>DISEGNO SPERIMENTALE</u>	27
3.3. <u>RILIEVI SPERIMENTALI</u>	28
3.3.1 OSSERVAZIONI COMPORTAMENTALI	28
3.3.1.1 Etogramma	30
3.3.2 PRELIEVI DI SANGUE	31
3.3.3 PRODUZIONE LATTEA E ATTIVOMETRIA	32
3.4 <u>METODO DI ANALISI</u>	32
3.4.1 <u>RILIEVI COMPORTAMENTALI</u>	32
3.4.2 <u>DOSAGGIO DEL CORTISOLO</u>	33
3.4.2.1 Estrazione degli steroidi	33
3.4.2.2 Tampone R.I.A. (R.I.A. Buffer)	34
3.4.2.3 Anticorpo specifico e tracciante per il dosaggio sierico	34
3.4.2.4 Allestimento analisi	34
3.4.2.5 Separazione libero/legato	35

3.4.3	<i>ANALISI STATISTICA</i>	35
3.4.3.1	Analisi statistica dei dati comportamentali	35
3.4.3.2	Analisi statistica dei dati attivometrici	37
3.4.3.3	Analisi statistica dei parametri di mungitura	37
3.4.3.4	Analisi statistica dei valori di cortisolo	38
4.	RISULTATI E DISCUSSIONE	39
4.1	<u><i>RISULTATI E DISCUSSIONE DEI DATI COMPORTAMENTALI</i></u>	39
4.2	<u><i>RISULTATI E DISCUSSIONE DEI DATI ATTIVOMETRICI</i></u>	55
4.3	<u><i>RISULTATI E DISCUSSIONE DEI DATI PRODUTTIVI</i></u>	57
4.4	<u><i>RISULTATI E DISCUSSIONE DEI VALORI PLASMATICI DEL CORTISOLO</i></u>	60
5.	CONCLUSIONI	62
6.	BIBLIOGRAFIA	64
7.	APPENDICE	74

RINGRAZIAMENTI

“Homo quisque faber ipse fortunae suae”

Bestia, a te dedico questa tesi, perchè nella tua assenza, sei stato, sei e sarai il più presente di tutti. Però mi manchi lo stesso...

Cari genitori, anche a voi va una porzione di dedica perchè con la vostra eroica o forse rassegnata pazienza avete atteso questo giorno e finalmente posso chiudere questo capitolo e riaprirne di nuovi, che spero vi renderanno fieri di me.

A lei, Prof. Gabai, un profondo ringraziamento, perchè la comprensione dei tempi e delle vicissitudini degli studenti, è una qualità rara, propria solo dei veri Insegnanti.

A te, Simona, perchè la tua dedizione, impegno e presenza instancabile mi hanno permesso concretamente di far nascere questa tesi. Grazie per avermi accompagnata, tenendomi per mano, per tutto questo tempo.

A Voi Tutti, sia che mi abbiate vissuta per anni, sia che mi abbiate incrociata anche solo per poco, grazie! Perchè ogni singolo vostro contributo è intrecciato al Dna del mio cammino evolutivo.

1. SCOPO DELLA RICERCA

Negli allevamenti, gli animali possono essere sottoposti ad una serie di eventi stressogeni di varia entità, i quali possono condizionare la produzione e la riproduzione degli stessi. Le bovine da latte sono frequentemente sottoposte a stressor dovuti agli adattamenti fisiologici e metabolici a cui l'organismo deve far fronte, lungo tutta la loro carriera produttiva, e tali aspetti sono ampiamente approfonditi in letteratura. Le vacche lattifere però possono essere colpite anche da agenti stressanti dovuti a possibili modificazioni nella conduzione aziendale, come ad esempio problemi alla rete idrica o agli impianti di mungitura, che possono manifestarsi in modo improvviso e imprevedibile nell'azienda e alterare lo schema usuale di management. Questi eventi possono provocare stress di modesta e media entità, difficilmente rilevabili in allevamento, che agendo in sinergia con i fenomeni di adattamento fisio-metabolico potrebbero interferire in modo negativo sulla funzionalità produttiva e riproduttiva dei soggetti.

Con la presente tesi si sono volute analizzare le risposte comportamentali e fisiologiche ad uno stress ambientale di media entità, quale una breve sospensione nella somministrazione dell'acqua d'abbeverata. Ciò che è stato rilevato sono le risposte etologiche, le modificazioni della cortisolemia e le variabili relative alla mungitura e l'attivometria. Lo studio, oggetto della presente tesi, rientra in un progetto più ampio del Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie dell'Università di Padova, in cui sono stati analizzati gli effetti di altri due stress ambientali imprevedibili di media entità: il ritardo nella somministrazione dell'unifeed (Frasson, 2004) e il ritardo nella mungitura (Fancello, 2005).

2. INTRODUZIONE

2.1 LO STRESS

2.1.1 STRESS: CENNI STORICI

Il termine stress (dall'inglese: "sforzo") è impiegato in ingegneria e fisica per indicare la tensione e lo sforzo cui è sottoposto un materiale rigido in condizioni di sollecitazione.

In campo medico invece, tale concetto ha assunto negli anni diverse accezioni.

Gli studi scientifici condotti sull'argomento sono numerosi e partono dagli inizi del Novecento quando lo studioso Cannon iniziò ad occuparsi dello stress da un punto di vista psicosomatico introducendo il concetto di "reazione d'allarme", descrivendone alcuni aspetti emozionali e comportamentali, che aprirono la strada alla moderna psicofisiologia. In particolare per lo scienziato il concetto di stress indicava tutti gli stimoli fisici, chimici, emozionali che superando una certa soglia critica, interrompono un equilibrio interno dell'organismo. In specifico, Cannon fu tra i primi a studiare il legame tra l'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisario e la molteplicità dei fattori ambientali e fisiologici (Friend, 1991).

Verso la seconda metà del Novecento il fisiologo Selye ampliò le teorie sullo stress di Cannon, descrivendo con precisione i correlati fisiologici della malattia, concependo lo stress come "la risposta non specifica dell'organismo ad ogni condizione di cambiamento".

Significativi per la definizione di stress furono i suoi studi condotti sugli animali da laboratorio: iniettando agenti nocivi nei loro organismi, l'autore ne studiò gli effetti biochimici e morfologici.

In un articolo pubblicato sulla rivista scientifica Nature nel 1936, Selye teorizzò quella che sarebbe stata conosciuta negli anni come "Sindrome Generale di Adattamento" (G. A. S.).

Secondo tale teoria gli animali organizzano le loro difese nei confronti di qualsiasi sollecitazione a cui vengano sottoposti tramite risposte biologiche non specifiche; tali eventi possono essere cumulativi. Stressor o agente stressante è il fattore che spinge l'organismo all'adattamento (Farnè, 1999).

Secondo le concettualizzazioni di Selye, il processo stressogeno si articola in tre possibili livelli di risposta: una prima fase di allarme, in cui l'animale prende coscienza dello stressor e mobilita le sue risorse per rispondergli; una seconda fase di resistenza in cui si stabilizzano le sue condizioni e si verifica un adattamento alle nuove richieste; infine una fase conclusiva, di esaurimento energetico,

con il calo progressivo delle difese dell'animale e la comparsa di sintomi aspecifici: spossatezza, depressione del sistema immunitario, ansia, senso di impotenza e frustrazione (Selye, 1936).

L'importanza della teoria del fisiologo è legata al fatto che per la prima volta viene stabilita una relazione tra stimoli esterni dannosi o pericolosi e una reazione endogena dell'organismo.

Negli anni cinquanta e sessanta gli studi pionieristici di Mason, Levine e Weiss, identificarono alcuni aspetti chiave dello stress fisiologico, scoprendo che esso si acutizza se non c'è sfogo alla frustrazione, se manca il sostegno sociale e se non vi sono speranze di un miglioramento.

L'asse ipotalamo-ipofisi surrene, insieme alle catecolamine, è considerato come il sistema endocrino di prima risposta allo stress. La sua attivazione culmina nell'aumento della secrezione di ormoni glicocorticoidi, tra cui il cortisolo, che vengono riversati nel torrente circolatorio. Mason (1968) pose l'attenzione sul fatto che la reazione di stress non coinvolge però solo gli ormoni dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, ma è caratterizzata da una risposta multi-ormonale, il cui significato principale è quello di consentire l'adattamento dell'individuo ai vari eventi stressogeni e di favorire, di conseguenza, la sopravvivenza dello stesso (Mason, 1968).

Sebbene una moltitudine di eventi stressanti possa attivare l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, gli stress psicologici risultano essere più efficaci di quelli indotti da danni fisici (Mason, 1975).

Nel 1966, Lazarus ha sviluppato il concetto di stress psicologico, sostenendo che in alcune situazioni la risposta dipende dalla valutazione iniziale dello stimolo: lo stress psicologico deriva dal rapporto tra la valutazione o percezione soggettiva delle richieste dell'ambiente e la valutazione soggettiva delle nostre capacità o risorse. In altri tipi di stress la reazione segue ad un'azione diretta dello stressor sui tessuti (Lazarus, 1966).

Tra gli eventi traumatici di natura psichica sono stati segnalati: l'esposizione ad ambienti nuovi (Ader, 1967; Friedman et al., 1967); la separazione da oggetti fonte di attaccamento (Mendoza e Mason, 1986; Hennessy, 1997) e l'imprevedibilità degli eventi esterni (Muir e Pfister, 1987).

E' inoltre importante sottolineare come la prolungata e/o ripetuta esposizione ad elevati livelli di ormoni secreti dall'asse ipotalamo-ipofisi-surrene possa spesso comportare pericolose conseguenze quali varie forme di patologie psichiatriche (ad esempio disordini ansiosi) e vere e proprie malattie con ripercussioni cerebrali (Sapolsky, 1992; Sapse, 1997).

Per alcuni Autori queste conseguenze patologiche potrebbero essere ricondotte ad un'incompleta espressione del potenziale genetico di un organismo (Dobson e Smith, 2002).

Sulla base delle precedenti considerazioni, secondo Broom e Fraser (1990) la condizione di stress si verifica ogni qualvolta un individuo si trova ad affrontare una situazione avversa o un potenziale pericolo che, per essere combattuto, richiede un aumento della quota di energia disponibile, attraverso la mediazione del surrene. Con lo stress l'animale dà una risposta biologica complessa

allo stimolo stressante. Tale risposta è di tipo comportamentale e fisiologico nello stesso tempo, capace di scatenare una reazione immediata ad una situazione di allarme o d'emergenza. Si riduce così al minimo il danno che il fattore stressante potrebbe provocare, allo scopo di riportare il soggetto alle condizioni iniziali, cioè ad una situazione di omeostasi (Broom e Fraser, 1990).

2.1.2 ELEMENTI CHE PARTECIPANO ALL'EVENTO STRESSANTE

L'adattamento ad un evento stressante si compone di tre elementi, rappresentati dall'agente stressante, dal soggetto dello stress e dall'ambiente (Costa, 2005).

L'agente stressante o stressor va considerato nella sua natura, nella sua durata, intensità, frequenza, prevedibilità e grado di novità per l'individuo.

La natura dello stress è una caratteristica importante; esistono stress fisici, psicologici, psico-sociali e metabolici. Ciascuno di questi ultimi attiva i meccanismi effettori della risposta, ma è caratterizzato dalla preferenziale stimolazione di uno o più sistemi.

L'intensità, la frequenza e la durata dello stimolo sono anch'essi elementi fondamentali nel condizionare il grado della risposta: stressor troppo potenti, prolungati e frequenti possono superare la resistenza dell'individuo e innescare un processo patologico (Costa, 2005).

Altro fattore fondamentale è la prevedibilità di uno stimolo. In studi effettuati sui ratti si è osservato che se gli animali non ricevono alimento negli orari e tempi stabiliti, tendono a sviluppare un aumento delle risposte adrenergiche (Levine, 1972). Perciò le risposte a stimoli imprevedibili, piuttosto che a quelli prevedibili, potrebbero portare ad un aumento dei disturbi funzionali degli animali. Stimoli imprevedibili e incontrollabili possono provocare l'attivazione del sistema limbico (in particolare dell'ippocampo) e dell'asse ipotalamo-midollare del surrene, portando in tal maniera, ad un'alterazione dei comportamenti normali del soggetto (Von Borrel, 2000).

Alcuni esperimenti hanno palesato come eventi imprevedibili e incontrollabili possano scatenare una grande varietà di disturbi. Un esempio classico sono le neurosi dei cani descritte da Pavlov agli inizi del Novecento. Le ipotesi che sono nate, pongono l'attenzione sul legame esistente tra le varie nevrosi sperimentali, presenti in letteratura, e l'imprevedibilità e incontrollabilità di eventi incisivi per la vita di un individuo (Mineka e Kihlstrom, 1978). Infine si può affermare che la prevedibilità e il controllo sugli eventi sono sicuramente relazionabili, poiché ciò che può essere controllato, può essere predetto. Sono stati infatti dimostrati i vantaggi sulla possibilità di un animale di prevedere gli eventi ambientali. In particolare, in test effettuati su primati non umani, si è potuto notare che quando gli animali hanno un controllo sulle presentazioni di eventi nel loro ambiente, si verificano un gran numero di benefici comportamentali (Hanson et al., 1976; Mineka et al., 1986). Infatti, non

si verifica mai che una situazione di prevedibilità possa essere molto più stressante rispetto all'imprevedibilità (Bloomsmith e Lambert, 1995).

Il soggetto dello stress reagisce in maniera individuale agli stressor e ciò dipende dai meccanismi di difesa adottati dall'individuo (caratteristiche della personalità, esperienze passate, stile di risposta emozionale), dai parametri biologici determinati geneticamente, ma anche da un processo di "imprinting psicobiologico", ovvero dalla modificazione della propria reattività in seguito all'esposizione, in periodi critici di sviluppo, a stressors di varia natura (Costa, 2005).

L'ambiente costituisce infine la terza fondamentale componente dello stress, rappresentando il punto da cui originano gli stimoli. In particolare, lo scopo della presente tesi, è analizzare l'ambiente zootecnico in cui sono inserite le vacche da latte, con tutte le modificazioni impreviste della normale routine aziendale (come ad esempio la sospensione nella somministrazione dell'acqua). Ci proponiamo in definitiva di osservare e successivamente analizzare in quale misura queste variabili possano influenzare il benessere animale, la produttività e l'economia dell'allevamento.

Lo studio di questi tre elementi dello stress, delle loro modificazioni, dei loro parametri (biochimici, fisici, comportamentali) consente di valutare una risposta allo stress nelle sue caratteristiche di normalità o patologia, nel suo pattern temporale e nella sua entità (Costa, 2005).

2.1.3 LA CHIMICA DELLO STRESS

La risposta fisiologica dello stress permette all'organismo sano di fronteggiare minacce immediate avvertite come destabilizzanti del proprio equilibrio psicofisico. In sostanza questa risposta prepara a "combattere o fuggire" di fronte ad un pericolo (Cannon, 1914). L'innesco della reazione di stress avviene in seguito all'esposizione a stimoli che possono rivestire il significato di agenti stressanti. Tale proprietà viene tuttavia data, nella maggior parte dei casi, dal significato che lo stimolo assume per il singolo individuo. La risposta stressante è pertanto influenzata da almeno due ordini di fattori che sono: il tipo di evento da fronteggiare (l'entità oggettiva dello stimolo) ed il significato che lo stimolo assume per il singolo soggetto (Degni, 2006).

La maggior parte delle risposte di fronte al pericolo non avvengono a livello cosciente; le abitudini, le capacità, le preferenze individuali e gli stessi stati emotivi non sono controllati dalla coscienza, ma governano il nostro comportamento e contribuiscono alla definizione della nostra personalità (Mishkin e Appenzeller 1987; LeDoux 1998; Kandel 2002).

Lo stress attiva tutto il nostro corpo, in particolare, mette in moto il sistema endocrino, il sistema nervoso autonomo e il sistema immunitario. In specifico, legami tra stress e sistema immunitario

sono stati trovati da Kiecolt-Glaser et al. nel 1984, in studi su modelli umani. In seguito, studi svolti da Dantzer e Kelley nel 1989, hanno messo in luce come l'effetto dello stress sul sistema immunitario non sia solamente mediato dai glucocorticoidi, ma anche da catecolamine, oppioidi endogeni, da ormoni ipofisari come il GH, dalla prolattina, e da endorfine (Moberg, 1985; Barnett e Hutson, 1987). Inoltre studi intrapresi sui ratti da Sonnenfeld, Mandel et al., nel 1992, hanno evidenziato come si siano verificate soppressioni nella produzioni di cellule linfatiche T e B, di IFN- γ e IL-2 e dell'attività di cellule natural-killer.

Quando l'equilibrio esterno è incrinato, gli organismi cambiano i loro equilibri interni in accordo con le modificazioni esteriori (Atkinson et al., 1996; Levine, 1987).

Questo evento viene considerato una risposta acuta allo stress e può durare da qualche minuto a qualche ora. Le manifestazioni del "combatti o fuggi" passano principalmente attraverso due canali: il ramo simpatico del sistema nervoso autonomo e il sistema endocrino, entrambi strettamente interconnessi (Atkinson et al, 2001). Il sistema nervoso autonomo innesca molte funzioni corporee, istantaneamente e direttamente, mentre gli ormoni hanno un più lento e ampio effetto sul corpo (Gross, 1998).

In situazioni stressanti, si verifica uno spostamento del metabolismo verso il catabolismo con attivazione ortosimpatica del sistema neurovegetativo. Questo porta alla liberazione di adrenalina, il neuroormone della paura, che spinge all'azione, alla fuga o all'aggressività difensiva. Essa ha un'azione vasocostrittrice in precisi distretti vascolari. Altro ormone è la noradrenalina, il neuroormone dell'attesa carica di tensione, dell'angoscia risultante dall'impossibilità di controllare attivamente l'ambiente (Laborit, 1985).

Quest'ultima produce, nelle terminazioni nervose simpatiche, una centralizzazione metabolica verso l'apporto di fonti di energia rapidamente disponibile, concretamente di glucosio, che servirà a soddisfare il bisogno del muscolo quando si trova in una situazione di stress acuto (Scheurink et al., 1989). Invece i glicocorticoidi, formati nelle surrenali, esercitano importanti funzioni fisiologiche tra le quali: un'azione metabolica (ad esempio l'azione iperglicemizzante per demolizione proteica), l'azione permissiva sulle catecolamine, l'azione antinfiammatoria e quella immunodepressiva; infine svolgono effetti sul metabolismo minerale, su altri sistemi endocrini e un'azione tossica per i processi neurologici (Aguggini e Beghelli, 1998, Munk et al., 1984; Von Borrell, 1995).

Questi ormoni inoltre, hanno il compito di controllare l'iperattivazione dell'asse neuroendocrino dello stress che sarebbe pericoloso per la vita.

Altro ormone particolarmente implicato nel circuito dello stress è la serotonina il cui alterato funzionamento può compromettere la regolazione dell'orologio biologico interno, dei ritmi sonno-veglia e di molte altre funzioni tra cui la risposta muscolare, la regolazione dell'automatismo

intestinale e della pressione arteriosa. Interviene anche nei processi allergici e infiammatori. Inoltre la secrezione di endorfine, fornisce un' istantanea difesa contro il dolore (Atkinson et al., 1996; Hanson, 1986; Kandel, 1991).

Studi recenti hanno rimarcato il ruolo fondamentale di un altro ormone nella modulazione dello stress: il CRH, il fattore di rilascio delle corticotropine, (isolato da Vale e al. nel 1981), prodotto dai nuclei paraventricolari ipotalamici. In seguito ad eventi stressanti il CRH viene secreto dall'ipotalamo e attraverso il sistema portale ipofisario, viene convogliato all'ipofisi craniale dove stimola la produzione di ACTH, l'ormone adrenocorticotropo, che va ad agire sulle cellule della zona reticolare e fascicolata del corticosurrene, inducendo la secrezione di cortisolo e androgeni surrenali (La Brocca, 2006). L'importanza di tale ormone non è legata solo a questo suo ruolo di attivatore del sistema ipotalamo-ipofisi-surrenalico, ma anche nel suo ruolo di mediatore nell'encefalo (Von Borrell, 1995). I recettori per il CRH sono stati individuati in diverse aree dell'encefalo in particolare quelle coinvolte nei processi cognitivi e nella zona libica, la quale è implicata nell'elaborazione degli stimoli sensoriali e nella produzione della risposta motoria, oltre che nel consolidamento della memoria (DeSouza et al., 1991).

Quando però la condizione di stress è troppo prolungata, il meccanismo di protezione attuato dal corpo, si deteriora e si produce in tal modo un eccesso di ormoni da stress in circolo con una elevazione dei livelli d'ansia (Degni, 2006).

Pertanto, se in condizioni normali l'ansia può costituire una reazione fisiologica volta a mobilitare le risorse individuali, quando raggiunge livelli d'intensità eccessivi, non è più funzionale al superamento di ostacoli o al conseguimento di obiettivi, ma produce una drastica diminuzione della performance individuale e di conseguenza costituisce un ostacolo al conseguimento dei risultati (Breazile, 1988).

Molte sono le possibili conseguenze nocive sull'unità psicosomatica, tra cui si possono menzionare: l'aumento dei trigliceridi ed il colesterolo nel sangue, la perdita di minerali con il rischio di osteoporosi, l'incremento della resistenza all'insulina con il pericolo del diabete II, l'alterazione dei circuiti nervosi con conseguente danno alle strutture dell'ippocampo (perdita della memoria) e all'ipotalamo (ansia, depressione, insonnia), l'alterazione della risposta immunitaria con la possibile comparsa di malattie autoimmuni, allergie e stati cronici d'infiammazione, riduzione delle performance produttive (Hemsworth e Coleman, 1998).

Se infine l'agente stressante di lieve entità viene rimosso, gli eventi fisiologici scompaiono, senza innescare alcun sintomo evidente di patologia, fatta eccezione di una deplezione di elevate quantità di riserve corporee. Invece se lo stressor si mantiene costante nel tempo, si avrà a livello

neurologico un declino nella capacità di risposta a stimoli ripetuti e in generale si svilupperà una risposta a lungo termine e quindi ad una situazione cronica, patologica (Guyton, 1991).

2.2 STRESS E BENESSERE ANIMALE

Negli anni, sono state elaborate diverse definizioni di benessere (welfare) animale in considerazione, soprattutto, dell'evoluzione delle conoscenze sulla fisiologia degli animali; in particolare si è relazionato il concetto di benessere con la capacità dell'organismo di percepire l'ambiente e, quindi, di reagire ad esso mediante stati emozionali, fino a sviluppare una sofferenza mentale-psichica oltre che fisica (Verga, Le Neindre, Moynagh, 1999).

Nell'ambito dell'allevamento intensivo, la ricerca sulla valutazione del benessere degli animali ha tratto impulso, in origine, dalle considerazioni riportate nel Brambell Report (1965), pubblicato nel Regno Unito, in cui si esponevano una serie di indicazioni sui problemi che tale tipo di allevamento può comportare per l'organismo e la sua capacità di adattamento.

Le discussioni sull'esame scientifico del benessere animale sono state e sono sempre più varie ed articolate (vedi ad esempio: Appleby e Hughes, 1998), sia in merito al significato di tale studio in ambito teorico, sia in ambito pratico e per quanto riguarda la possibilità di applicare i risultati anche nella gestione dell'allevamento (Verga, Le Neindre, Moynagh, 1999). L'indagine scientifica sulla valutazione del welfare è in effetti molto complessa, in quanto gli indicatori da considerare sono vari e spesso possono essere in contrasto tra loro, come si rileva talvolta nel caso delle relazioni tra comportamento e stato sanitario.

Tra i problemi che si incontrano in questo settore, si possono citare i seguenti (Mason e Mendl, 1993):

- le diverse misure non variano sempre nello stesso senso. Ad esempio ovaiole che mostrano tempi elevati di immobilità tonica, il che significa elevati livelli di timore verso l'uomo, producono più uova rispetto a soggetti con tempi di immobilità tonica ridotti, e quindi sono teoricamente meno sensibili allo stressor della manipolazione (Bredbacka, 1988);

- il significato delle misurazioni può essere di interpretazione difficile. Ad esempio, in vitelli sottoposti a stress acuto ed allevati in box individuale, si è rilevata attività corticosurrenale più elevata rispetto a quelli allevati in box di gruppo (Trunkfield et al., 1991); tuttavia in altre ricerche, sempre su vitelli, tale reattività non è risultata correlata al tipo di stabulazione (Rushen, 1991).

Anche la frequenza cardiaca può aumentare in risposta ad un agente stressante, in seguito ad

attivazione simpatica (Ladewig e von Borell, 1988), ma si può anche manifestare bradicardia in correlazione ad uno stato di freezing, quindi di estremo stress (Manser, 1992);
- la ripetibilità delle misurazioni può essere scarsa, in funzione di diverse situazioni di valutazione. Ad esempio, le variazioni dei livelli di corticosterone in ovaiole allevate a terra od in batteria, hanno fornito risultati contrastanti (Rushen, 1991).

Nonostante le difficoltà, le numerose ricerche, riferite alle diverse specie allevate, hanno fornito risultati e conclusioni spesso chiari, come ad esempio nel caso degli effetti dell'interazione tra animali ed uomo in allevamento (Hemsworth *et al.*, 1987; Verga e Carenzi, 1998).

La ricerca sul benessere animale segue, a livello internazionale ed in relazione alle varie scuole di pensiero, tre approcci principali (Verga, Le Neindre, Moynagh, 1999):

- 1) la considerazione dei feelings, cioè le sensazioni soggettive degli animali;
- 2) la considerazione della normalità delle funzioni biologiche degli animali;
- 3) la considerazione della possibilità per l'animale di esprimere il proprio repertorio comportamentale naturale.

Il primo approccio ritiene che gli animali possano avere esperienze soggettive, quali stati affettivi od emozioni, e quindi percepire le diverse situazioni come piacevoli o spiacevoli (quasi uno stato di "felicità" od "infelicità" individuale). Tale posizione si richiama all'antico quesito sulla possibilità del "soffrire" da parte degli animali (Bentham, 1789), ripreso da autori ben noti nel panorama etico-animalista (Singer, 1977). Alcuni ricercatori, come ad esempio Dawkins (1988), ritengono importante la verifica delle sensazioni soggettive. Anche Duncan (1993) ritiene che il benessere non dipenda "né dallo stato sanitario, né dalla mancanza di stress, né dal livello di fitness", ma solo da quello che un organismo "sente". La metodologia utilizzata in tale approccio, comporta sia l'uso di test di preferenza che di indicatori comportamentali e fisiologici di stati emotivi. I test di preferenza assumono che l'animale scelga, tra situazioni diverse, quella che percepisce come più gradevole, e sia motivato a compiere una serie di azioni per ottenerla. Anche in questo caso il protocollo sperimentale deve considerare soprattutto i seguenti aspetti:

- a) le scelte dell'animale devono riflettere realmente le sue preferenze, e non l'effetto di altri fattori quali l'età, le esperienze precedenti od altre fonti di variazione che possono confondere il risultato;
- b) va verificata l'intensità della preferenza, misurando la quantità di azioni, cioè di lavoro, che un soggetto è disposto a compiere per ottenere un vantaggio preciso tra una serie di possibilità che gli vengono presentate;
- c) l'interpretazione del risultato deve tenere in considerazione che non sempre la scelta corrisponde ad un reale miglioramento del benessere anche a lungo termine.

Infine l'uso di tali test deve mirare a comprendere le motivazioni alla base della scelta, da integrare con gli altri indicatori, sia fisiologici che comportamentali, di stati soggettivi (Morton e Griffiths, 1985).

Problemi nell'uso di tale approccio di ricerca stanno soprattutto nella difficoltà di verificare le sensazioni soggettive, in quanto la critica ritiene che solo ciò che è direttamente osservabile rientra nello scientifico, in quanto oggettivabile e non passibile di interpretazioni (Verga, Le Neindre, Moynagh, 1999).

Il secondo approccio si basa sulla valutazione del funzionamento dei sistemi biologici. Quindi la presenza di patologie, di lesioni, di malnutrizione sono associati a scarso welfare, che è invece, a livelli più elevati, in relazione ad alti livelli di accrescimento, di fertilità e di fitness. Al fine di adattarsi all'ambiente, l'organismo deve anche mettere in atto meccanismi fisiologici e comportamentali, che gli consentano di contrastare gli stressors, non solo in allevamento, ma anche in natura. La quantità di sforzi finalizzati e necessari all'adattamento, ed il loro successo od insuccesso, determinano il livello di benessere (Verga, Le Neindre, Moynagh, 1999). Ciò comporta, metodologicamente, l'esigenza di quantificare gli indicatori di benessere tramite quattro categorie, riportate di seguito:

- a) indicatori patologici, ad esempio: presenza di patologie manifeste o latenti;
- b) indicatori fisiologici, ad esempio: livelli ormonali; frequenza cardiaca; "heart rate variability" (Conny *et al.*, 1993);
- c) indicatori comportamentali, ad esempio: manifestazione dell'etogramma; risposta a test comportamentali;
- d) indicatori produttivi, ad esempio: livelli di accrescimento, fertilità e mortalità.

Secondo McGlone (1993): "un animale è in uno stato di scarso benessere quando i suoi sistemi fisiologici sono talmente disturbati da danneggiare le sue possibilità di sopravvivere e di riprodursi". Curtis (1987) ritiene che nella determinazione dello stato di benessere siano importanti soprattutto le esigenze fisiologiche e, successivamente, quelle di sicurezza e comportamentali.

I modelli di riferimento utilizzabili in questo caso si rifanno alle teorie sullo stress, precedentemente citate, proposte inizialmente da Cannon (1914) e da Selye (1932), sull'attivazione dei due assi di risposta allo stimolo (Henry e Stephens, 1977):

- a) asse simpatico-medullo-surrenale (incremento di catecolamine): reazione attiva di "lotta- fuga";
- b) asse ipofisi-cortico-surrenale (incremento di corticosteroidi): reazione passiva di "depressione".

Inoltre, va citata la successiva concezione di Mason (1975) sulla specificità delle reazioni psicologico-emozionali. Attualmente sono anche sufficientemente evidenti le relazioni tra stress e patologie condizionate: alterazioni di alcune risposte immunitarie, diminuzione dell'attività

riproduttiva ed aumento dell'aggressività sociale possono considerarsi stati pre-patologici, indicatori di scarso benessere.

Una notevole varietà di indicatori viene utilizzata in tale approccio: particolarmente interessanti sono le indagini epidemiologiche atte a valutare le relazioni tra livelli di adattamento e lo stato sanitario. Queste possono anche fornire utili informazioni sui fattori di maggiore rischio per il benessere stesso. Tali informazioni possono fornire degli strumenti per prevenire l'insorgenza di fenomeni di stress cronico, i quali possono indurre alterazioni comportamentali o sanitarie spesso irreversibili, come ad esempio stereotipie o drastica riduzione della possibilità di contrastare alcuni agenti patogeni (Verga, Le Neindre, Moynagh, 1999).

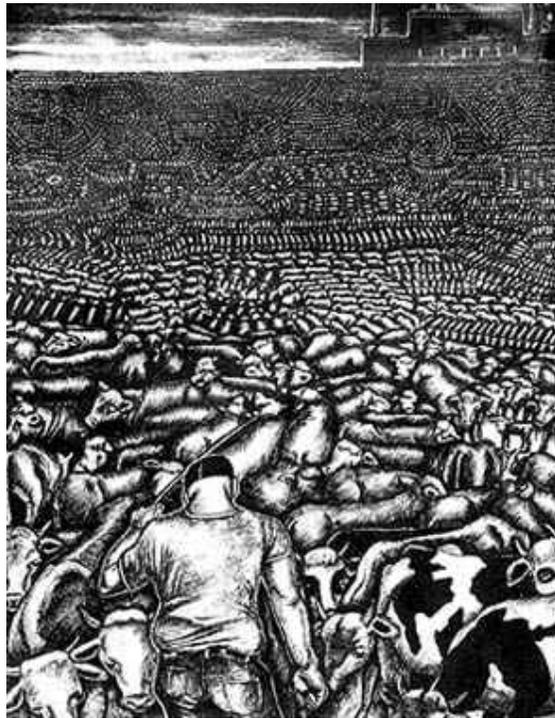
Tra gli indicatori di stress acuto, costituito ad esempio dalla cattura, dal contenimento e dalla manipolazione dell'animale, sono comprese le modificazioni acute dei livelli di catecolamine, del cortisolo e della frequenza cardiaca. Gli indicatori di stress cronico possono comportare l'analisi della modificazione nei livelli corticosteroidi indotta da ACTH (Terlouw *et al.*, 1996), lo stress cronico può anche determinare situazioni patologiche a livello cardiovascolare (Sundin *et al.*, 1995), gastrointestinale, e riduzione di funzioni immunitarie quali la proliferazione linfocitaria (Ferrante *et al.*, 1998; Ekkel *et al.*, 1995; Coppinger *et al.*, 1991), sebbene in alcuni casi vi sia un incremento di alcune funzioni immunitarie in risposta allo stressor (Dubreuil *et al.*, 1993).

Altri indicatori fisiologici e comportamentali di stress sono costituiti, da un lato, dall'analisi dei livelli di prolattina, come nel caso di stress acuto nei suini (Rushen *et al.*, 1993), della temperatura corporea (Terlouw *et al.*, 1996, Marazziti *et al.*, 1992), ad esempio in situazioni di stress da trasporto (Terlouw *et al.*, 1994); dall'altro, dalla manifestazione di comportamenti anormali quali le stereotipie, che possono indicare senso di fame, di noia da ipostimolazione, o tendenza ad evitare una situazione sgradevole (Rushen *et al.*, 1993; Wemesfelder, 1993).

Tale approccio trova applicazioni pratiche anche in zootecnia, in quanto notevoli riduzioni del welfare, conseguenti a stress cronico, sono in grado di indurre scadimento delle produzioni. Inoltre questa metodologia ha il vantaggio di avvalersi di variabili più analizzabili e misurabili rispetto alle sensazioni soggettive. Tuttavia anch'essa non è esente da problemi, quali talvolta la non concordanza reciproca dei diversi indicatori (Verga, Le Neindre, Moynagh, 1999).

Nel terzo caso, l'assunto di base è che "gli animali abbiano la possibilità di manifestare tutti i loro comportamenti naturali" (Webster *et al.*, 1986; Kiley-Worthington, 1989). Risulta tuttavia evidente che i problemi insiti in tale approccio consistono soprattutto nella difficoltà di identificare il significato di "naturale" per animali sottoposti al processo di domesticazione (Mattiello, 1998). In questo caso, molte attività che consentono l'adattamento in natura, hanno funzioni e quindi utilità scarse o nulle, come nel caso della distanza di fuga davanti all'uomo o l'accettazione di ripari o

fonti di cibo direttamente forniti, il che riduce tutti i comportamenti connessi alla ricerca dell'alimento. Altri esempi sono costituiti dai comportamenti riproduttivi e di cura parentale. In natura, al contrario, comportamenti finalizzati alla ricerca del cibo ed alla difesa dai predatori sono estremamente necessari per la sopravvivenza individuale e della specie. In allevamento sono stati effettuati tentativi di ricreare condizioni più simili a quelle naturali, ad esempio per i suini (Stolba e Wood-Gush, 1984). Non va tuttavia neppure trascurato l'effetto della selezione genetica, che, sebbene non possa influire in modo sostanziale sul comportamento complesso, plasmato per la maggior parte dall'ambiente, può comunque condizionare in certa misura le tendenze reattive di base, e quindi il substrato su cui si innestano poi le manifestazioni comportamentali e gli effetti dell'esperienza individuale (Verga, Le Neindre, Moynagh, 1999).



2.3 LA ZOOTECNICA IN ITALIA

Dai risultati del Censimento Generale dell'Agricoltura 2000 è emersa una radicale trasformazione della nostra zootecnica da latte: nel decennio 1990-2000 il numero di aziende detentrici di bovine lattifere si sono considerevolmente ridotte, mantenendo nel contempo una struttura fortemente frammentata. L'allevamento bovino si concentra nell'area del Nord, dove risiede oltre il 77% della mandria nazionale, e dove si è registrata l'evoluzione strutturale più importante: mantenimento dell'allevamento di dimensioni contenute nelle aree montane e forte sviluppo in pianura con il raggiungimento di dimensioni aziendali ragguardevoli. Nelle regioni del Centro chiudono gli allevamenti di piccole dimensioni e si registra un forte aumento della dimensione media, mentre al Sud e nelle isole il panorama rimane eterogeneo con aree come quella della Sardegna dove sopravvivono solo le grosse stalle o altre come la Campania dove la struttura rimane ancora frammentata, anche se probabilmente, spesso gli allevamenti bovini cedono il posto all'allevamento bufalino (Censimento Generale dell'Agricoltura, 2000).

Secondo le statistiche ufficiali dell'AIA del 2005, in Italia sono presenti 22 526 allevamenti di bovine da latte controllati, nei quali si allevano 1 341 863 capi, distribuiti su allevamenti di dimensione decisamente variabili. Nel biennio 2003-2005, l'ampiezza media degli allevamenti è aumentata di ben 26 unità (da 34 a 60 capi), rispetto agli anni precedenti.

Nel 1990 la dimensione media degli allevamenti italiani era pari a meno della metà di paesi come Francia, Germania o Irlanda e a un settimo di quelle britanniche. Nel 2003 la stalla media italiana, con 35 vacche allevate, ha una taglia molto simile a quella tedesca e francese e ha ridotto lo scarto anche con i colleghi britannici (fonte ufficiale AIA 2005).

Da questi dati si evince che la zootecnia lattifera in Italia è caratterizzata da una netta prevalenza di allevamenti medio- piccoli, con meccanizzazione ridotta e spesso a gestione familiare. Il costante aumento che c'è stato negli ultimi 15 anni, nella percentuale di allevamenti di grandi dimensioni, fa presagire che in futuro l'allevamento italiano si avvicinerà sempre di più alla situazione nordeuropea e nordamericana, contraddistinta da una netta prevalenza di allevamenti intensivi di grandi dimensioni. Un altro fenomeno che può portare a questa conclusione è la "mortalità" delle aziende con vacche da latte che dal dopoguerra ad oggi è oscillata dal 2 al 5 % annui con una tendenza all'aumento negli ultimi anni (Bittante, Andrighetto, Ramanzin, 1999).

L'allevamento di bovine lattifere in Italia si svolge prevalentemente in stalle a stabulazione libera, con una zona di riposo a lettiera permanente o più spesso a cuccette, zona di alimentazione su pavimento pieno o su grigliato (meno diffuso), e annesso paddock esterno di dimensioni variabili. Attualmente, l'indirizzo nella progettazione dei locali per la stabulazione è quello di razionalizzare

gli spazi rendendo ottimale il rapporto tra gli spazi e le funzioni che si svolgono nelle stalle (Boschetti 2000). Soprattutto, l'allevamento di animali a stabulazione libera consente agli stessi di gestire autonomamente le fasi di alimentazione, riposo e movimentazione, garantendo una migliore situazione di benessere, nonché una produzione migliore, probabilmente legata alla riduzione dello stress (Bittante, Andrighetto, Ramanzin, 1999).

L'alimentazione della vacca da latte è un elemento di primaria importanza nella conduzione degli allevamenti bovini da latte, basti pensare che il costo alimentare incide mediamente per il 40-50 % sul costo totale di produzione del latte (Bittante, Andrighetto, Ramanzin, 1999). Noi tratteremo solo gli aspetti fondamentali.

Nella formulazione di una dieta per vacche lattifere bisogna tenere conto primariamente di due fattori: i fabbisogni (energetici, proteici, vitaminici, minerali) degli animali, e la capacità di ingestione. Sulla base di questi dati, si può formulare una dieta che garantisca apporti nutritivi adeguati non solo al mantenimento, ma anche alla produzione. La produzione media italiana attualmente si aggira attorno a 83 q di latte per vacca allevata (relazione annuale AIA 2005-2006). È evidente che per sostenere una produzione così elevata le bovine debbano ingerire un'elevata quantità di energia. Va rimarcato anche il fatto che le sostanze nutritive ingerite dagli animali possono essere utilizzate, dopo il soddisfacimento dei fabbisogni di mantenimento, per diversi tipi di attività: deposizione di riserve energetiche, gravidanza, locomozione, lattazione. Lo scopo del nutrizionista è quello di fare in modo che una maggior quota possibile di nutrienti venga utilizzata per la produzione. Attualmente negli allevamenti specializzati si utilizza per la somministrazione dell'alimento la tecnica dell'unifeed (o piatto unico), in opposizione alle tecniche di somministrazione separata degli alimenti foraggeri e concentrati. La tecnica dell'unifeed prevede che tutti i componenti della dieta vengano inseriti in un carro trincia-miscelatore, che li mescola e li sminuzza fino ad un valore prestabilito. Successivamente l'alimento viene somministrato al bestiame, che non è in grado di operare una selezione dei vari componenti. Tale tecnica alimentare è basata sul principio che, ad ogni prensione del cibo, l'animale deve ingerire un campione di alimento rappresentativo della razione. In questo modo il rapporto tra i vari componenti della dieta non varia, e questo consente al pH ruminale di restare costante, migliorando le condizioni fisiologiche delle bovine. Con la somministrazione dei foraggi separatamente dai mangimi concentrati, invece, si verifica una variazione significativa di pH ruminale che può provocare anche situazioni patologiche negli animali (Bittante, Andrighetto, Ramanzin, 1999).

2.4 BENESSERE NELL' ALLEVAMENTO INTENSIVO DELLA VACCA DA LATTE

Il Trattato di Amsterdam (protocollo sulla protezione e il benessere degli animali, 97/C 340/01) identifica l'animale da reddito come un individuo senziente che deve essere protetto da forme di maltrattamento e al quale devono essere conferite le migliori condizioni di allevamento perché si realizzi il massimo livello di benessere. Nell'ambito dell'allevamento intensivo della bovina da latte, la misurazione del benessere ha assunto un ruolo importante. Numerosi studi sono stati effettuati allo scopo di individuare le condizioni maggiormente stressanti per gli animali e le conseguenze che ne potevano derivare in termini comportamentali, fisiologici, produttivi, riproduttivi e soprattutto di benessere animale (programma operativo su benessere animali da reddito negli allevamenti e degli animali da macello, 2003).

I fattori che concorrono a determinare stress negli animali sono legati ai rapporti dell'animale con i suoi consimili, con l'uomo e con l'ambiente che lo circonda. I principali stress sono riassunti nella tabella sottostante (tabella 2.1).

PRINCIPALI CATEGORIE DI STRESS PRESENTI IN ALLEVAMENTO		
INTERAZIONI		
ANIMALE-ANIMALE	ANIMALE-UOMO	ANIMALE-AMBIENTE
<p>Interazione sociale: dominanti/dominati</p> <p>Stati fisiologici: -Pubertà; -Accoppiamento; -Estro; -Gravidanza; -Lattazione</p> <p>-Grado di pulizia animale -Salute (morbilità, mortalità, eventi traumatici)</p>	<p>-Confinamento; -Formazione di gruppi; -Immissione in ambienti nuovi; -Sovraffollamento; -Separazione dalla madre; -Svezzamento; -Interventi vaccinali e terapeutici; -Trasporto; -Modalità di abbattimento; -Fattore uomo (stockmanship); facility management.</p>	<p>Fattori climatici -Temperatura; -Umidità; -Ventilazione; -Luce; -Rumori.</p> <p>-Fattori strutturali: alloggiamenti.</p>

Tabella 2.1 Principali categorie di stress in allevamento intensivo (Napolitano e De Rosa, 1997; 37 th Congress of The ISAE, 2003).

2.5 L'ACQUA E LA BOVINA DA LATTE

H. Selye ha individuato due tipi di stress: uno positivo è necessario per la vita l'EUSTRESS (dal greco "eu", bene, buono), che serve a "rendere l'essere vivente in grado di aumentare la capacità di comprensione e concentrazione, di decidere con grande rapidità di mettere i muscoli in condizione di muoversi subitaneamente (per attaccare, difendersi, fuggire), di avere a disposizione l'energia adatta ad agire, e così via", ed uno stress nocivo, cronico, che è negativo e devastante. Quest'ultimo definito DISTRESS si correla alla mancata soddisfazione dei bisogni vitali, all'esperienza del dolore e della paura, al contrario quello vitalizzante è necessario per l'esistenza ed è correlato alla soddisfazione dei bisogni vitali e alla stimolazione delle aree del piacere del sistema limbico (Svegliado, 2006).

Scopo della presente tesi è di studiare gli effetti di un particolare procedura che potrebbe provocare una forma di distress: la sospensione nella somministrazione di acqua di bevanda nella bovina da latte.

Tale sospensione può essere legata a diversi fattori, ad esempio problemi alle strutture aziendali (danni alle impianti di rifornimento d'acqua, falle negli abbeveratoi) oppure errori di management o dell'operatore di stalla. Inoltre ci possono essere svariate cause patologiche che spingono l'animale a non abbeverarsi in modo consono alle sue esigenze (zoppie, mastiti, patologie infettive ecc.).

L'organismo animale assume l'acqua di cui necessita da tre fonti: acqua di bevanda, dall'acqua di costituzione degli alimenti e da quella cosiddetta metabolica, che si origina, in varia misura, nelle reazioni di ossidazioni cui sono soggetti carboidrati, proteine e grassi.

Il mantenimento del bilancio idrico è determinato dalle perdite di acqua attraverso feci, urina, saliva, sudorazione, evaporazione dalla superficie corporea e dalle vie respiratorie e attraverso le produzioni, in particolar modo di latte (Rossi, Gastaldo, 2005).

Mentre per ogni altro principio nutritivo, l'organismo presenta riserve più o meno rilevanti, per l'acqua le riserve dirette sono praticamente nulle e il "digiuno" idrico comporta conseguenze sicuramente più rapide e gravi di quelle alimentari: l'organismo non sopravvive alla perdita del 10% di acqua, mentre può perdere tutto il grasso di deposito e metà delle proteine (Crpa, 1995). L'acqua quindi è un elemento essenziale per garantire il benessere degli animali allevati e favorire il raggiungimento delle migliori performance produttive e riproduttive aziendali. A tale proposito, la direttiva 98/58/Ce riguardante la protezione degli animali negli allevamenti stabilisce che "tutti gli animali devono avere accesso ad un'appropriata quantità d'acqua, di qualità adeguata, o devono poter soddisfare le loro esigenze di liquidi in altro modo" e che "le attrezzature per la somministrazione di mangimi e di acqua devono essere concepite, costruite e installate in modo da

ridurre al minimo le possibilità di contaminazione degli alimenti e dell'acqua e le conseguenze negative derivanti da rivalità tra animali” (Rossi, Gastaldo, 2005).

L'entità dei fabbisogni idrici degli animali è influenzata da:

- ❑ Caratteristiche dell'animale (età, peso, attività, stadio fisiologico, stato sanitario);
- ❑ Livello alimentare, composizione della razione e tipo di alimento;
- ❑ Tecnica di allevamento e modalità di stabulazione;
- ❑ Microclima dell'ambiente d'allevamento (temperatura, umidità, velocità dell'aria);
- ❑ Caratteristiche dell'acqua (Rossi, Gastaldo, 2005).

L'assunzione di liquidi è positivamente correlata all'ingestione di sostanza secca ed è legata, quindi, a tutti i fattori che condizionano quest'ultima azione. Il fabbisogno idrico è fortemente influenzato dalla composizione della razione: l'ingestione di alimenti ricchi di acqua, ad esempio il latte, riduce l'assunzione volontaria di acqua di bevanda. D'altra parte, il consumo d'acqua cresce all'aumentare della concentrazione salina e proteica della razione.

In particolare, l'eccesso di un elemento minerale può essere in parte eliminato dall'organismo con l'aumento della diuresi che, a sua volta, provoca un aumento del consumo di acqua.

I fabbisogni idrici aumentano con l'innalzamento della temperatura ambientale, in quanto l'acqua rappresenta l'elemento fondamentale per la dispersione di calore; a parità di temperatura i consumi scendono con l'aumentare del grado di umidità. Allorquando la temperatura supera i 30°C si evidenziano sensibili e più rapidi incrementi nelle esigenze idriche (tabella 3.1) (Rossi, Gastaldo, 2005).

Valori indicativi della quantità d'acqua totale Ingerita (l/giorno per capo) da bovini al variare Della temperatura ambientale (Smith, 2002)		
TIPO DI ANIMALE	TEMPERATURA AMBIENTALE	
	21°C	32°C
Vacca in lattazione (1)	97	114
Vacca in lattazione (2)	119	137
Vacca in asciutta	68	83

Tabella 2.2 Valori d'acqua giornaliera ingerita, in funzione della temperatura dell'ambiente (Smith, 2002).

(1) peso vivo di 450 kg e produzione di 20 kg/giorno di latte;

(2) peso vivo di 650 kg e produzione di 30 kg/giorno di latte.

Le caratteristiche qualitative dell'acqua di bevanda (salinità totale, durezza, pH, ecc.) possono influenzare in maniera significativa l'entità del consumo.

Anche la temperatura dell'acqua di abbeverata influenza l'entità dei fabbisogni idrici e le produzioni. In linea generale, non si dovrebbe somministrare agli animali acqua con temperatura

inferiore ai 15°C, mentre per gli esemplari più giovani è consigliabile una temperatura dell'acqua di circa 20-22°C. Al contrario, animali adulti ad intenso metabolismo, quali le vacche da latte ad elevata produzione, sembrano beneficiare di somministrazione di acqua fresca (10÷15°C) durante i periodi estivi (migliore termoregolazione, minore stress, maggiori produzioni) (Gastaldo, Rossi, 2005).

Le richieste idriche variano anche in funzione dello stato fisiologico degli animali. Un soggetto che sta costruendo nuovi tessuti e sta aumentando di peso richiede maggiori quantità di acqua di uno in dimagrimento; lo stato di gravidanza comporta un maggior fabbisogno idrico (aumento di peso della madre e del feto). Il fabbisogno idrico per la produzione di latte è legato essenzialmente alla quantità di latte prodotto e, quindi, alla quantità di acqua persa per questa via; nelle bovine da latte ad elevata produzione, in particolar modo nei mesi caldi, esso è legato anche alla dispersione del calore proveniente dall'energia metabolizzata per sostenere le alte produzioni (Gastaldo, Rossi, 2005).

È noto che gli animali sofferenti, anche se mangiano poco o addirittura digiunano, nella maggior parte dei casi continuano ad abbeverarsi. Particolari situazioni sanitarie, per esempio stati febbrili o diarroici, comportano aumenti dei fabbisogni idrici giornalieri. Ciò spiega, fra l'altro, l'interesse e l'efficacia della tecnica della medicazione dell'acqua. (Rossi, Gastaldo, 2005).

2.5.1 FABBISOGNI IDRICI DELLE BOVINE DA LATTE

I fabbisogni idrici medi per le diverse categorie di bovini da latte suddivise in base a età, fase di lattazione e livello di produzione di latte, sono riportati in tabella 3.1; tali valori sono ovviamente riferiti a bovini allevati in condizioni microclimatiche ottimali, dato che le alte temperature e/o bassi livelli idrometrici dell'aria possono comportare aumenti nell'assunzione di acqua anche del 100% (Rossi, Gastaldo, 2005).

Secondo INRA (1988) l'acqua totale assunta giornalmente da una vacca in lattazione, comprensiva di acqua degli alimenti e acqua di bevanda, varia da 4,5 a 5,5 kg per 1 kg di sostanza secca ingerita; quando la temperatura dell'aria è di 15°C, i valori aumentano del 30%, a 20°C, del 50% a 25°C e del 100% a 30°C. In pratica, per le lattifere con produzioni di 25÷30 kg/giorno di latte, alimentate a fieno e concentrati, il consumo pro capite di acqua di bevanda può variare da 70 kg/giorno in situazione di benessere termico, fino a oltre 200 Kg/giorno in situazione di stress da caldo (Gastaldo, Rossi, 2005).

Durante la stagione estiva, quindi, è particolarmente importante che acqua fresca e abbondante sia messa a disposizione delle vacche; nelle stalle libere ciò si ottiene predisponendo un certo numero

di abbeveratoi a vasca di grande portata, collocati preferibilmente nella zona di alimentazione (Crpa, 2002).

Fabbisogni idrici indicativi per le diverse categorie di bovine da latte (Grant, 1993 modificata).	
CATEGORIA DI BOVINO	FABBISOGNI IDRICI (L/GIORNO PER CAPO) ⁽⁵⁾
Vitella di 1 mese	5÷7,5
Vitella di 3 mesi	8÷11
Vitella di 6 mesi	14÷18
Manza 15÷18	22÷27
Manza 18÷24	27÷37
Vacca ⁽¹⁾	55÷65
Vacca ⁽²⁾	91÷102
Vacca ⁽³⁾	144÷159
Vacca ⁽⁴⁾	182÷197
Vacca in asciutta	34÷49

Tabella 2.3 Fabbisogni idrici in diverse categorie di bovine lattifere.

(1) produzione di 13,5 kg/giorno di latte;
 (2) produzione di 23 kg/giorno di latte;
 (3) produzione di 36 kg/giorno di latte;
 (4) produzione di 45 kg/giorno di latte;
 (5) consumo a temperatura ambientale compresa fra 10 e 27°C.

2.5.2 SETE, ASSUNZIONE D'ACQUA ED EFFETTI DELLA SUA PRIVAZIONE

L'assunzione di acqua è regolata in modo distinto da quella degli alimenti, anche se in modo non totalmente indipendente. La sensazione della sete è essenzialmente provocata da due fattori: il volume del liquido extracellulare e la sua concentrazione di sostanze osmoticamente attive. Quest'ultima è percepita direttamente da centri ipotalamici, cui pervengono anche informazioni da recettori periferici. Recettori presenti nel cuore e nel circolo informano principalmente sulla volemia (Aguggini, Beghelli, 1998).

La regolazione dei liquidi corporei, di cui la sete e l'assunzione di acqua rappresentano il momento comportamentale, è devoluta ad un controllo neurovegetativo ed endocrino con l'ormone ADH (antidiuretico) ed il sistema renina-angiotensina-aldosterone come principali agenti. E' opportuno ricordare la potente azione dipsogena dell'angiotensina, fattore che raccorda la regolazione endocrina con quella comportamentale. Dal punto di vista comportamentale, oltre ai segnali endogeni provenienti dal sangue, hanno importanza segnali provenienti dall'apparato digerente, riguardanti la concentrazione osmotica e lo stato fisico dell'alimento. Gli stimoli gastrici e orali hanno particolare importanza. La qualità dell'alimento, la sua secchezza o succosità, influisce perciò in modo rilevante sull'assunzione di acqua e la secchezza delle fauci è uno stimolo orale particolarmente importante (Aguggini, Beghelli, 1998).

La temperatura ambientale influenza sensibilmente l'assunzione di acqua. E' opportuno ricordare che l'evaporazione a livello cutaneo, respiratorio, buccale è il principale meccanismo di

termoregolazione contro il caldo in tutti gli animali. L'adattamento richiede all'animale ingenti introduzioni d'acqua.

Gli erbivori domestici, in condizioni normali, si abbeverano spontaneamente due volte al giorno. Alcune razze di erbivori in zone aride, possono abbeverarsi molto raramente (una volta ogni 2-3 giorni). L'assunzione di acqua e di cibo sono sovente collegate. Animali affamati tendono a bere come attività di spostamento, animali assetati evitano di assumere cibi secchi e polverulenti.

L'assunzione di acqua e di alimento coincide nei lattanti. (Aguggini, Beghelli, 1998).

La bibliografia riguardante gli effetti della privazione d'acqua nelle bovine da latte è piuttosto variegata.

Uno studio di Little e Collis del 1980, effettuato su bovine frisone inglesi, ha osservato gli effetti della privazione d'acqua sul metabolismo, produzione di latte e composizione ematica; inoltre sono state esaminate le risposte comportamentali. L'esperimento è durato 14 giorni con una riduzione del 50 % della normale dose d'acqua. Le osservazioni comportamentali hanno fatto notare un'elevata aggressività attorno agli abbeveratoi e un maggior tempo spesso nelle sue vicinanze. Le vacche hanno passato meno tempo coricate rispetto al gruppo di vacche di controllo. (Little, Collis et al., 1980).

In un altro esperimento di Little e Sansom del 1984, 4 vacche frisone sono state private d'acqua per 72 ore. Durante questo periodo si è verificata una perdita di 100 kg sul peso vivo, principalmente legata ad una perdita dell'acqua contenuta in latte, urina, feci ed aria respirata. La temperatura media è aumentata di 0.5 °C ma la frequenza cardiaca non è cambiata significativamente.

L'assunzione di sostanza secca, in particolare di fieno, si è ridotta rapidamente del 10% rispetto alla norma durante il terzo giorno. La produzione di latte si è ridotta solo un po' durante le prime 24 ore ma al terzo giorno la produzione media era solo il 28% del normale; la composizione di latte non è cambiata significativamente. Ci sono stati progressivi aumenti nella concentrazione sierica di sodio (dopo 4 ore dalla privazione d'acqua), osmolalità (dopo 24 ore), urea (dopo 38 ore), rame (dopo 48 ore), magnesio e nella concentrazione totale proteica (dopo 62 ore). Nonostante la disidratazione, le vacche non hanno dimostrato segni di stress. Nel 24 ore successive all'esperimento, durante le quali è stato garantito libero accesso all'acqua, il peso, l'appetito, la produzione di latte, la composizione del sangue sono ritornati pressoché completamente normali. (Little, Sansom et al., 1984).

Altri studi in Israele, effettuati da Silanikove e Tadmor, hanno messo in evidenza le conseguenze della disidratazione nelle vacche da latte, su volume ruminale, sul flusso di saliva e sull'omeostasi dei fluidi sistemici. I risultati hanno confermato come nei precedenti studi che una riduzione dell'ingestione d'acqua porta ad una riduzione nell'assunzione volontaria di cibo. La secrezione di saliva è risultata direttamente proporzionale a quest'ultima e inversamente proporzionale alla

osmolalità plasmatica. La riduzione del volume di acqua immagazzinata nel ruminale ha contribuito in gran parte (55%) alla perdita totale di acqua. L'utilizzazione dell'acqua intestinale ha attenuato la crescita dell'osmolalità plasmatica, e questo può essere connesso con un'abilità dell'animale di mangiare nonostante la disidratazione (Silanikove e Tadmor, 1989).

Fluharty, Loerch, Dehority, dell'università dell'Ohio, hanno condotto due esperimenti per determinare gli effetti della privazione da cibo e acqua sui microbi ruminali e sulle caratteristiche del prestomaco. I risultati hanno dimostrato che se la privazione è contenuta, le modificazioni ruminali si verificano per 4 giorni per poi non esserci più modificazioni significative (Fluharty, Loerch, Dehority, 1996).

Nel 1996, Senn e Gross-Luem hanno analizzato le conseguenze di una privazione totale d'acqua, della durata di 24 ore, sul comportamento alimentare di 12 bovine lattifere, alimentate con erba e pellet di cereali ad libitum. La privazione d'acqua ha ridotto l'ingestione del cibo significativamente, con una riduzione dell'assunzione di pellet più precoce rispetto all'assunzione di erba. La privazione d'acqua ha anche ridotto il peso vivo e la produzione di latte, rispettivamente del 12% e del 30%. Tutti i parametri sono ritornati ai livelli base con la reidratazione. Quindi i risultati dimostrano che la privazione d'acqua porta rapidamente ad una prematura conclusione del pasto. Questo è in linea con l'assunto che un accresciuto incremento prandiale di osmolalità nei fluidi ruminali contribuisce nell'ipofagia disidratazione-indotta. Comunque ulteriori studi sono necessari per provare quest'affermazione e per meglio capire le complesse relazioni tra l'atto del mangiare e quello del bere nei ruminanti (Senn, Gross-Luem, et al., 1996).

Steiger Burgos e Senn nel 2001, hanno studiato gli effetti della restrizione d'acqua sull'alimentazione e sul metabolismo a lungo termine. L'esperimento consisteva nel ridurre per 8 giorni, di un quarto e successivamente di metà, il quantitativo di acqua messa a disposizione alle vacche in esame. Si è osservato che l'ingestione di cibo e il peso corporeo si sono ridotti nei primi 3 giorni. Il bilancio energetico non è stato intaccato dalla restrizione del 50% di acqua, ma l'equilibrio dell'azoto è diventato negativo, poiché, rispetto all'assunzione, l'escrezione di azoto via urina e latte è risultata maggiore. La bassa introduzione di energia durante il periodo di restrizione del 50% dell'acqua, è stato compensato da una più bassa produzione di latte, una più alta digeribilità della sostanza secca ed energia e un'apparente più efficiente utilizzo energetico. Attraverso questi cambiamenti, le vacche hanno raggiunto un nuovo equilibrio ad un più basso livello di turnover dell'acqua che ha permesso gli animali di far fronte ad un'assunzione dimezzata d'acqua (Steiger Burgos, Senn et al., 2001).

Oltre che sulle vacche da latte, sono stati effettuati studi sulla parziale privazione di liquidi nei vitelli. Questi studi, portati avanti da Igbokwe e successivamente da Kamphues, hanno evidenziato

una riduzione nell'ingestione alimentare, problemi comportamentali (assunzione di altri liquidi che possono essere critici dal punto di vista igienico), indebolita termoregolazione, ridotta escrezione renale dei prodotti metabolici di scarto, e un'aumentata concentrazione di urina e feci (Igbokwe, 1997, Kamphues, 2000).

Altre indagini svolte da Janus e Grochowina hanno evidenziato come la privazione da cibo e acqua nei vitelli, possa rallentare l'eliminazione di farmaci (es. paracetamolo) che sono sottoposti al metabolismo tramite UDP-glucuroniltransferasi e sulfotransferasi nel bestiame (Janus, Grochowina et al., 2003).

Nella letteratura sono stati indagati altri ruminanti come cammelli, pecore e capre delle regioni medio-orientali.

In tutte e tre le specie, l'equilibrio dell'azoto era negativo quando l'acqua era somministrata ad libitum. In tutti gli animali la privazione di liquidi ha depresso l'ingestione di sostanza secca, accresciuto l'apparente digeribilità di quest'ultima e dell'azoto. Gli effetti comunque si sono dimostrati generalmente intermedi. Questi risultati suggeriscono che il metabolismo dei composti azotati nel bestiame domestico adulto allevato dai pastori nomadi del Sudan non ha subito effetti dannosi, e che tale bestiame può, a conti fatti, essere sottoposto a brevi periodi di privazione d'acqua (Mousa e Ali, Hume, 1983; Choshniak e Shkolnik, 1978; Choshniak et al., 1984; Silanikove et al., 1980).

3. MATERIALI E METODI

3.1 SETTING

La sperimentazione si è svolta presso l’Azienda Sperimentale “L. Toniolo” appartenente all’università di Padova nei mesi di Ottobre, Novembre e Dicembre 2005.

La stalla delle bovine in lattazione è predisposta con un sistema a stabulazione libera su cuccette in doppia fila, con annesso paddok esterno.

La pavimentazione delle corsie di alimentazione e dei disimpegni è piena e si utilizza un sistema di pulizia con farfalle raschianti, mentre le cuccette sono dotate di lettiera di paglia.

La zona di alimentazione è adiacente a quella di riposo e da quest’ultima si può accedere al paddock esterno.

La stalla è dotata di una sala mungitura a spina di pesce 6+6 ma viene utilizzata solo una corsia, quindi le vacche vengono munte a gruppi di 6. L’impianto di mungitura è collegato ad un processore De Laval® che registra, per ciascun animale, i dati relativi alla mungitura: durata, tempo, flusso medio e picco di flusso.

Questo a sua volta è collegato ad un computer aziendale che provvederà, attraverso un programma apposito (Alpro) alla codifica dei dati produttivi. E’ possibile inoltre risalire ai dati attivometrici attraverso una centralina collocata nella stalla.

Le vacche venivano munte due volte al giorno alla 6:45 h e alle 18:45 h.

A ridosso della sala mungitura si trova anche il locale macchine e una sala con il refrigeratore per conservare il latte.

L’alimentazione delle bovine viene somministrata sotto forma di “unifeed” preparato con un carro trincia-miscelatore e distribuita alle 7:30. La base alimentare è rappresentata dall’insilato di mais (59 %) che viene miscelato con: acqua (10 %), fieno di prato stabile (7%), soia (6%), polpe di bietola (5%), medica disidratata (5%), mangime concentrato (5%), farina di mais (2%) e grasso (1%).

La quota rimanente di alimento concentrato è dosata singolarmente attraverso auto-alimentatori e presenta un contenuto proteico ed energetico tale da poter sostenere una produzione media di 15-20 kg di latte giornalieri.

3.2 DISEGNO SPERIMENTALE

La sperimentazione è stata realizzata su 12 bovine, clinicamente sane, di razza Frisona Italiana. Lo studio ha valutato la risposta comportamentale ad una sospensione di 3,5 ore della somministrazione dell'acqua di abbeverata, dalle 6.05 h alle 9.35 h.

Le bovine sono state tabulate in due box da 6, dotati di cuccette e paddock esterni e ciascuna di esse è stata contrassegnata con colore diverso, in modo da risultare facilmente riconoscibili nel corso della rilevazione.

La sperimentazione è iniziata in data 27/09/2005 e si è conclusa il 10/12/2005. I rilievi sono iniziati il 4/10/2005. La settimana precedente l'inizio dei prelievi sono state fatte delle osservazioni preliminari, con il fine principale di far abituare gli animali alla presenza degli osservatori.

Lo schema del disegno sperimentale è riprodotto nella tabella 3.1 nella quale è possibile osservare che la sospensione di approvvigionamento idrico veniva applicata nelle bovine, con due modalità:

- Sospensione singola, attuata esclusivamente in una giornata (martedì);
- Sospensione ripetuta, applicata per tre giorni di seguito (martedì, mercoledì e giovedì).

settimana	BOX 1	BOX2
	Marcatura animali ed osservazioni sperimentali	
	Riposo	
1	<i>Controllo</i>	<i>Sospensione singola</i>
	Pausa (1 settimana)	
2	<i>Controllo</i>	<i>Sospensione ripetuta</i>
	Pausa (1 settimana)	
3	<i>Basale</i>	<i>Basale</i>
4	<i>Sospensione ripetuta</i>	<i>Controllo</i>
	Pausa (1 settimana)	
5	<i>Sospensione singola</i>	<i>Controllo</i>
	Pausa (1 settimana)	

Tabella 3.1 Disegno sperimentale

Le “osservazioni preliminari”, che hanno lo scopo di far abituare gli animali alla presenza degli osservatori, non sono state considerate nell'analisi dei dati.

Le “settimane basali” rappresentano i periodi di non applicazione dello stress (in nessuno dei due box). I dati rilevati in questo periodo saranno considerati come fisiologici.

Le “settimane di controllo” rappresentano il periodo in cui uno specifico box non è soggetto a stress. Tali fasi differiscono dalle settimane basali in quanto hanno anche la funzione di controllo, entro settimana, tra il box sottoposto a stress e il box non sottoposto a stress.

Nelle “settimane di sospensione singola”, il blocco dell'acqua viene applicato solo una volta (martedì).

Nelle “*settimane di sospensione ripetuta*”, la sospensione dell’acqua si attua per tre giorni di seguito (martedì, mercoledì, giovedì).

Le “*pause*” consistono in periodi di riposo di una settimana in cui non si effettuano i rilievi sperimentali.

L’attività sperimentale si svolgeva tre volte alla settimana (martedì, giovedì e sabato).

In tali giorni si eseguivano i seguenti rilievi:

- Osservazioni comportamentali;
- Prelievi di sangue (escluso il sabato);
- Registrazione dei dati relativi alla mungitura;
- Registrazione dei dati attivometrici.

3.3 RILIEVI SPERIMENTALI

3.3.1 Osservazioni comportamentali

Le osservazioni comportamentali sono state eseguite il martedì, giovedì e il sabato di tutti i periodi sperimentali.

Per poter osservare correttamente gli animali è stata utilizzata una postazione altra circa 3 metri e posta di fronte ai box a pochi metri dal fronte mangiatoia.

I metodi di registrazione utilizzati sono stati:

- *Instantaneous scan sampling* (campionamento istantaneo a scansione) ogni due minuti;
- *Behavioural sampling* (campionamento comportamentale) incentrato su eventi particolari; (Martin e Bateson, 1986).

BOX 1						BOX 2					
Verde 22	Fuxia 215	Blu 207	Viola 11	Gialla 45	Nera 39	Verde 30	Fuxia 14	Blu 743	Viola 42	Gialla 50	Nera 701

Tabella 3.2 Distribuzione delle bovine per box.

Le osservazioni sono state suddivise in intervalli di mezz’ora, ognuno dei quali era diviso quindi in 15 rilievi. Gli orari di inizio delle rilevazioni comportamentali erano:

- 1^a osservazione dalle 7:05 h alle 7:35 h;
- 2^a osservazione dalle 7:35 h alle 8:05 h;
- 3^a osservazione dalle 9:05 h alle 9:35 h;
- 4^a osservazione dalle 9:35 h alle 10:05 h;
- 5^a osservazione dalle 10:05 h alle 10:35 h;
- 6^a osservazione dalle 11:15 h alle 11:45 h;
- 7^a osservazione dalle 11:45 h alle 12:15 h;
- 8^a osservazione dalle 13:00 h alle 13:30 h;
- 9^a osservazione dalle 13:30 h alle 14:00 h.



3.3.1.a Etogramma

I comportamenti rilevati sono stati raccolti nel seguente etogramma:

COMPORAMENTO	SIGLA	OGGETTO	SIGLA OGGETTO	STAZIONE (s) O DECUBITO (s/d)
Inattività	I			S/d
Movimento	Mov			S/d
Locomozione	Loc			S
Transizione S-D	S-D			
Alimentazione+Alim. integrata	Fe			S
Bere	B			S
Attività orali verso mangiatoia (leccare, mordere, mordicchiare)	AoM			S/d
Attività orali verso strutture	AoB			S/d
Annusare	A	Mangiatoia Strutture Soggetto Aria	M S B A	S/d
Gioco con la lingua fuori (tongue playing o tongue rolling)	TP			S/d
Urinazione	U			S
Defecazione	D			S
Pulirsi (leccarsi, grattarsi, strofinarsi)	PI			S/d
Dare testate	Dar Test			S/d
Monta altro soggetto	M			S
Sposta altro soggetto per alimentarsi	SA			S/d
Vocalizzazione	Voc			S/d
Ruminazione	R			S/d
Tosse	T			S/d
Osserva	Oss	Altri sogg. Operatore	Sogg. Oper.	S/d
Fuori campo	FC			

Tabella 3.3 Etogramma e legenda della codifica dei componenti da rilevare.

Per l'analisi statistica si sono raggruppati i comportamenti molto simili tra loro che potevano avere lo stesso significato etologico. I raggruppamenti sono mostrati nella tabella sottostante:

Raggruppamento	Comportamenti compresi
<i>Is</i>	Inattività in stazione
<i>Id</i>	Inattività in decubito
<i>Movim</i>	Movimento (decubito e stazione), locomozione, transizione (s/d)
<i>Fe</i>	Alimentazione (unifeed e alimentazione integrata)
<i>B</i>	Bere
<i>Att_strutt</i>	Attività verso strutture / mangiatoia, annusare mangiatoia / strutture (s/d)
<i>Att_sogg</i>	Attività orali / atteggiamento non agonistico verso altri animali, montare Altro soggetto (decubito e stazione)
<i>Expl_pass</i>	Esplorazione passiva: annusare l'aria, osservare altri bovini / operatori (d/s)
<i>TP</i>	Tongue playing (d/s)
<i>Elimin</i>	Escrezione: urinazione / defecazione
<i>Pul</i>	Pulizia (d/s)
<i>Agon</i>	Agonismo: dare testate, spostare altri animali per alimentarsi (stazione)
<i>R_s</i>	Ruminazione in stazione
<i>R_d</i>	Ruminazione in decubito
<i>T</i>	Tossire (stazione o decubito)
<i>Vocal</i>	Vocalizzazione (stazione o decubito)
<i>Tot_s</i>	Totale attività in stazione
<i>Tot_d</i>	Totale attività in decubito
<i>FC</i>	Fuori campo

Tabella 3.4 Raggruppamenti delle osservazioni comportamentali ai fini statistici.

3.3.2 Prelievi di sangue

I campioni di sangue sono stati prelevati su tutte le bovine nelle sole giornate di martedì e giovedì, sia nelle settimane di stress, che nelle settimane basali/controllo. Il prelievo veniva eseguito alla giugulare alle 11:00 h, ossia 1 h e 30 min. dopo la fine dello stress.

I campioni ottenuti venivano portati prontamente al laboratorio del Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie, dove subivano una centrifugazione a 3500 rpm per 15 minuti. Il plasma

ottenuto da ogni campione veniva aliquotato in due provette e posto in un freezer ad una temperatura di -20°C .

Sulle aliquote stoccate sono state svolte in seguito le analisi per il dosaggio del cortisolo.

3.3.3 Produzione latte e attivometria

I dati riguardanti i diversi parametri di mungitura sono stati rilevati automaticamente per ogni animale dagli impianti inclusi alla sala mungitura, grazie ad un trasponder presente al collo delle vacche, che ha lo scopo di identificare gli animali alla loro entrata in sala mungitura o nell'auto-alimentatore. I dati raccolti sono rappresentati da: produzione giornaliera, flusso medio, picco di flusso e durata della mungitura. Tale rilevazioni strumentali sono state trasmesse ad un processore De Laval che li ha raccolti rendendoli però solo parzialmente visibili.

Per visualizzare i dati definitivi si è utilizzato un software specifico (ALPRO) che ha consentito di ottenere i dati sia in forma numerica che grafica.

Per quanto riguarda i dati attivometrici è stato usato un procedimento analogo al precedente. Ogni bovina era dotata di un contapassi (transponder) che trasmetteva 24 ore su 24 le informazioni relative all'attività di ogni bovina.

In questo caso come nel precedente, le registrazioni sono state convertite in formato elettronico grazie al software Microsoft[®] Office Excel.

3.4 METODO DI ANALISI

3.4.1 Rilievi comportamentali

I dati comportamentali sono stati annotati attraverso campionamento istantaneo a scansione.

L'istantaneous scan sampling (campionamento istantaneo a scansione) è un procedimento per cui un intero gruppo di soggetti viene esaminato ad intervalli regolari (nel nostro studio gli intervalli sono stati di due minuti) scanditi da un beeper o un orologio. Ogni periodo d'osservazione è ripartito in un certo numero di brevi fasi successive, chiamate "intervalli campione". La conclusione di ciascuno di essi, definito "punto campione" viene evidenziato al rilevatore mediante un segnale acustico (Martin e Bateson, 1986). Il comportamento di ciascun individuo è stato registrato in quel preciso istante.

In questo modo si possono ottenere informazioni in forma condensata e quindi registrare simultaneamente un certo numero di categorie di comportamento diverse.

I dati sono stati riportati manualmente su apposite tabelle e successivamente i rilievi sono stati trasferiti in formato elettronico utilizzando il programma Microsoft® Office Excel.

3.4.2 Dosaggio del cortisolo

Il dosaggio del cortisolo è stato effettuato su plasma bovino mediante la tecnica Radio Immuno Assay (R.I.A.).

Il metodo R.I.A. viene utilizzato per la determinazione dei livelli plasmatici di diverse sostanze come ormoni, farmaci e altro materiale biologico.

Questa tecnica è basata sulla competizione, per il legame con l'anticorpo (Ab), tra una quantità nota di sostanza marcata da un radioisotopo (Ag°) e una quantità sconosciuta dello stesso tipo di sostanza, presente nel campione da analizzare (Ag). Si vengono a formare composti Ag-Ab che si possono separare agevolmente con l'ausilio di centrifugazione o immunoprecipitazione, e dei quali si valuta la radioattività residua.

La concentrazione incognita dell'ormone si ottiene sulla base del grado di diminuzione della radioattività del precipitato rispetto ad un campione di controllo (Poli e Coccilovo, 2002).

3.4.2.1 Estrazione degli steroidi

Le provette per l'estrazione degli steroidi hanno una capienza pari a 10 mL.

Il primo passaggio è quello di lavare tutte le provette con 1 mL di acetone e successivamente asciugarle. Si sono quindi prelevati 100 μ L di plasma ai quali sono stati aggiunti 8 mL di etere etilico. I contenitori sono stati quindi posti su un vortex e fatti agitare per 10 minuti, a temperatura ambiente. Successivamente le provette sono state centrifugate a 1500 rpm per 5 minuti a + 5°C, e fatte congelare a -20°C per un'ora. Si è proseguito poi prelevando il surnatante che è stato fatto decantare in provette coniche di vetro e portato a secco sotto corrente di azoto. Il residuo secco è stato risospeso con un 1 mL di tampone R.I.A. Infine sono stati caricati 100 μ L di ciascun estratto, su ogni pozzetto della piastra.

3.4.2.2 Tampone R.I.A. (R.I.A. Buffer)

61 mM (Na₂HPO₄)*12H₂O

25 mM (Na₂HPO₄)*H₂O

154 mM (NaCl)

I sali vengono sciolti in acqua bidistillata e la soluzione viene portata a pH 7.2 con NaOH. Il giorno dell'utilizzo viene aggiunto 0.1 % di albumina bovina sierica (BSA).

3.4.2.3 Anticorpo specifico e tracciante per il dosaggio sierico

Per il dosaggio del cortisolo è stato impiegato un antisiero anti-cortisolo 3 CMO-BSA ricavato dal coniglio presso il Centro Medico Diagnostico Emilia alla diluizione di 1:8 000.

L'antisiero presentava le seguenti reattività crociate: cortisolo 100%, prednisolone 44,3%, 11-desossicortisolo 13,9%, cortisone 4,9%, corticosterone 3,5%, progesterone inferiore a 0,01%.

Il tracciante utilizzato era 1,2,6,7-H³ cortisolo (Perkin Helmer), utilizzato in ragione di 30 pg/pozzetto.

3.4.2.4 Allestimento dell'analisi

Per interpretare i dati dell'analisi è stata creata una curva di taratura, utilizzando concentrazioni note di Ag diluite in R.I.A. Buffer. Tale curva garantisce una corrispondenza biunivoca tra la radioattività misurata e la concentrazione di ormone. La curva di taratura per la determinazione del cortisolo era compresa tra 3 e 200 pg/pozzetto/200 µL.

L'analisi è stata quindi allestita aggiungendo ai pozzetti, già predisposti con l'Ab, le opportune quantità di soluzione standard, tracciante e campione come rappresentato in tabella 3.1.

POZZETTI	ESTRATTO DI PLASMA BOVINO	R.I.A. BUFFER	TRACCIANTE
Attività totale	-	-	10
Legame non specifico	-	200	10
Curva standard	100	100	10
Controllo di qualità	100	100	10
Campioni	100	100	10

Tabella 3.1: Allestimento dei campioni.

3.4.2. 5 Separazione libero/legato

La piastra, in tal modo preparata, è stata agitata lentamente tramite vortex per 3 minuti quindi lasciata incubare per una notte a 4°C. Il giorno successivo è stata rimossa la fase liquida e sono stati eseguiti 4 lavaggi consecutivi della piastra con tampone R.I.A. 200 µL/pozzetto.

In conclusione sono stati addizionati 200 µL di scintillante per pozzetto (Perkin Helmer, MICROSCINT 20). La piastra è stata poi sigillata con l'apposita pellicola termosaldabile (Perkin Helmer, TOPSEAL-S) per essere letta con il contatore a β-emittenti.

3.4.3 Analisi statistica

Tutti i risultati ottenuti sono stati analizzati con metodiche differenti a seconda della variabile indipendente considerata.

3.4.3.1 Analisi statistica dei dati comportamentali

Dopo alcune analisi esplorative (test non parametrici di Wilcoxon per paragonare medie dei giorni di sospensione vs giorni senza sospensione e di Friedman per confrontare i valori medi della settimana senza sospensione vs settimana di sospensione singola vs settimana di sospensione ripetuta), si è deciso di analizzare i dati comportamentali usando la procedura G.M.L. (SAS, 1999), che permette di apprezzare la complessità del disegno sperimentale.

Allo scopo di indagare tutte le possibili fonti di variazione, il modello lineare usato è stato il seguente:

$$y_{ijklmn} = \mu + B_i + C(B)_{ij} + W_k + D_l + H_m + BW_{ik} + BD_{il} + WD_{kl} + BWD_{ilk} + BH_{im} + WH_{km} + BWH_{ikm} + DH_{lm} + WDH_{klm} + BDH_{ilm} + BWDH_{iklm} + e_{ijklmn}$$

Dove:

y_{ijklmn} = singola osservazione comportamentale della j^{esima} vacca tra il i^{esimo} box durante la k^{esima} settimana sperimentale, l^{esimo} giorno della settimana e la m^{esima} ora di osservazione nel giorno;

μ = media generale;

B_i = effetto del box ($i = 1, 2$);

$C(B)_{ij}$ = effetto della vacca all'interno del box ($j=1, \dots, 12$);

W_k = effetto della settimana di osservazione ($k=1, \dots, 5$);

D_l = effetto del giorno della settimana ($l=1, \dots, 3$);

H_m = effetto dell'ora di osservazione durante il giorno ($m=1, \dots, 9$);

BW_{ik} = interazione B*W;

BD_{il} = interazione B*D;

WD_{kl} = interazione W*D;

BWD_{ilk} = interazione B*W*D;

BH_{im} = interazione B*H;

WH_{km} = interazione W*H;

BWH_{ikm} = interazione B*W*H;

DH_{lm} = interazione D*H;

WDH_{klm} = interazione W*D*H;

BDH_{ilm} = interazione B*D*H;

$BWDH_{iklm}$ = interazione B*W*D*H;

e_{ijklmn} = errore casuale residuo $\sim N(0, \sigma_e^2)$.

Un appropriato valore d'errore è stato definito testando l'effetto del box (per esempio il valore di errore della vacca all'interno del box), mentre i restanti effetti sono stati tutti testati sul valore residuo casuale. Il PDIFF (*Piecewise DIFFerentiable*), accoppiato con la correzione di Bonferroni,

sono stati usati per ottenere una diretta comparazione di tutti i quadrati minimi delle medie (*LSMEANS*) per l'effetto BWD_{ilk} (es., interazione del Box*Settimana*Giorno).
 In queste analisi, l'effetto determinato dall'ambiente (per es., sospensione della somministrazione di acqua) è rappresentato dall'interazione BWD.

3.4.3.2 Analisi statistica dei dati attivometrici

I dati relativi all'attivometria, registrati nelle giornate di martedì e giovedì, sono stati analizzati mediante analisi della varianza per misure ripetute (variabili entro soggetto: ora; SPSS), considerando le seguenti variabili indipendenti:

VARIABILI	VALORI
VACCA (C)	12
BOX (B)	Box 1 vs box 2
PERIODO (W)	Controllo vs stress breve vs stress lungo
GIORNO SETTIMANA (D)	Martedì vs giovedì

Tabella 3.2: Variabili attivometriche e loro valori.

e le combinazioni:

- W*D;
- W*B;
- D*B;
- W*D*B.

3.4.3.3 Analisi statistica dei parametri di mungitura

Come per i dati attivometrici, anche quelli relativi ai parametri di mungitura (produzione, flusso medio, picco di flusso, durata) sono stati interpretati mediante analisi della varianza (SPSS) tenendo in considerazione le variabili indipendenti contenute in tabella 3.2, con l'unica differenza di considerare l'ora di mungitura (H) solo su due livelli (mungitura della mattina e mungitura del pomeriggio) e analizzando solo le seguenti combinazioni:

- B*D;
- B*W;

- W*D;
- B*W*D.

3.4.3.4 Analisi statistica dei valori del cortisolo

I dati relativi ai valori degli steroidi sono stati anch'essi indagati attraverso l'analisi della varianza (SPSS), considerando le variabili indipendenti riportate nella tabella 3.2, ma tenendo conto delle seguenti modifiche: (D) solo su due livelli (martedì e giovedì); (H) un solo prelievo per giorno (l'ora quindi non è stata analizzata).

Sono state studiate solo le seguenti interazioni:

- B*D;
- W*D;
- B*W*D.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 RISULTATI E DISCUSSIONE DEI DATI COMPORTAMENTALI

In condizioni di allevamento estensivo, il bovino tende a trascorrere la maggior parte della giornata a compiere attività ingestive, come pascolare e ruminare (Arnold, 1984).

Anche in condizioni di allevamento intensivo, come quello dell'Azienda sede della nostra sperimentazione, si è osservato che le vacche hanno trascorso gran parte del tempo alimentandosi e ruminando (figura 4.1), ma sono stati rilevati anche frequenti atteggiamenti di inattività.

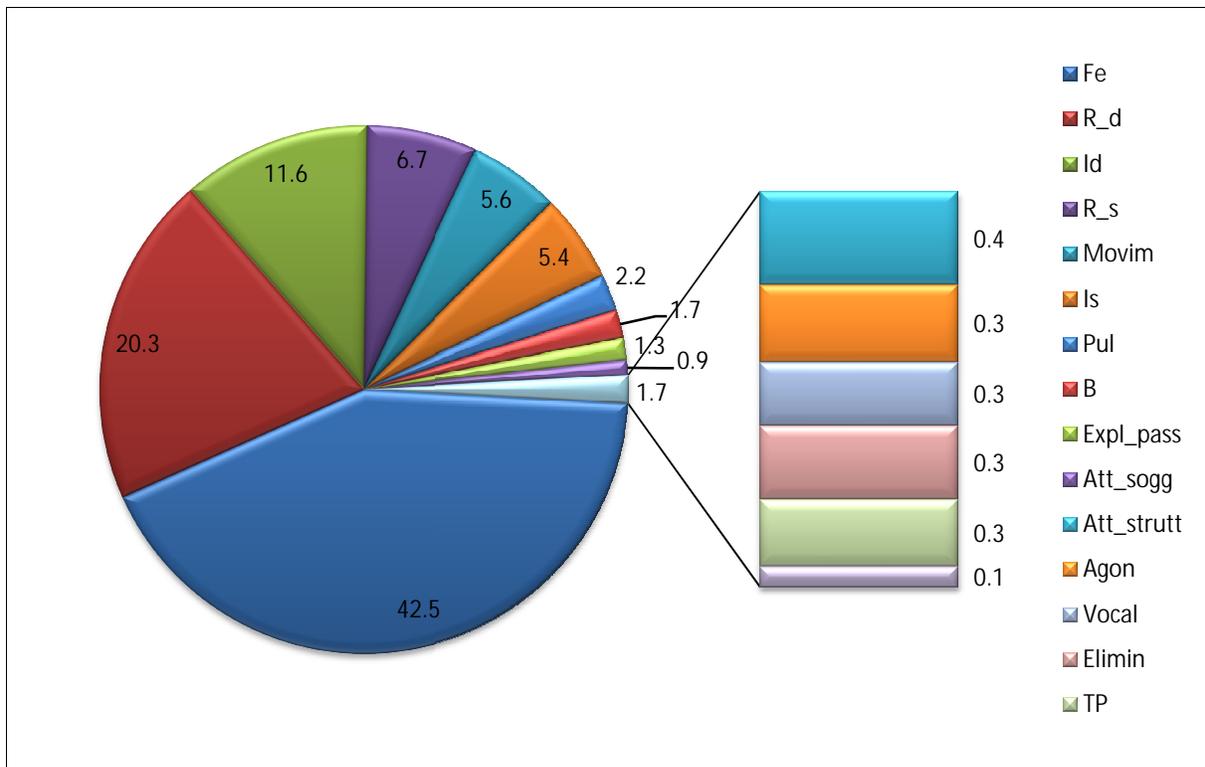


Figura e tabella. 4.1. Percentuali di sample points in cui le bovine sono state viste compiere i vari comportamenti.

Fe	R_d	Id	R_s	Movim	Is	Pul	B
42,45	20,32	11,57	6,73	5,60	5,40	2,24	1,71
Expl_pass	Att_sogg	Att_strutt	Agon	Vocal	Elimin	TP	T
1,34	0,93	0,40	0,33	0,27	0,32	0,29	0,09

Tabella 4.1

Tutte le variabili incluse nell'analisi G.L.M. hanno avuto effetti sul comportamento delle vacche. Tuttavia, gli effetti osservati non hanno mostrato una relazione significativa con la sospensione della disponibilità d'acqua.

I principali risultati saranno descritti qui, mentre i risultati completi sono mostrati nell'appendice a partire da pagina 74.

Tutte le categorie comportamentali, ad eccezione di movimento, agonismo, eliminazione e tosse, hanno palesato significative differenze individuali, con un intervallo di F da 31.53 per la vocalizzazione (Vocal: $p < 0.0001$) a $F = 2.8$ per l'esplorazione passiva (Expl_pass: $p = 0.002$). L'assenza di significative differenze individuali per l'eliminazione e la tosse, probabilmente è legata al fatto che sono attività che sono state raramente osservate. Il mancato riscontro di significative variazioni individuali nel comportamento agonistico è piuttosto sorprendente dato che Schrader (2002) ha dimostrato che il comportamento agonistico mostra maggiore variabilità tra le vacche nel medesimo recinto rispetto ad altri comportamenti, come la locomozione/stazione o il decubito. Tuttavia anche questo comportamento è stato rilevato raramente, dato che non sorprende, in quanto i gruppi di bovine considerate erano relativamente stabili.

Prendendo in considerazione la variabile box (B), le vacche del box 2 sono state viste esprimere il comportamento di bere (B: $F = 31.61$, $p = 0.023$), quello di tossire (T: $F = 12.07$, $p = 0.047$) e il comportamento agonistico (Agon: $F = 12.02$, $p = 0.012$) significativamente più spesso di quelle del box 1 (rispettivamente figure 4.3, 4.4, 4.2). Possiamo supporre che questi risultati siano legati più a differenze individuali che all'applicazione della sospensione d'acqua.

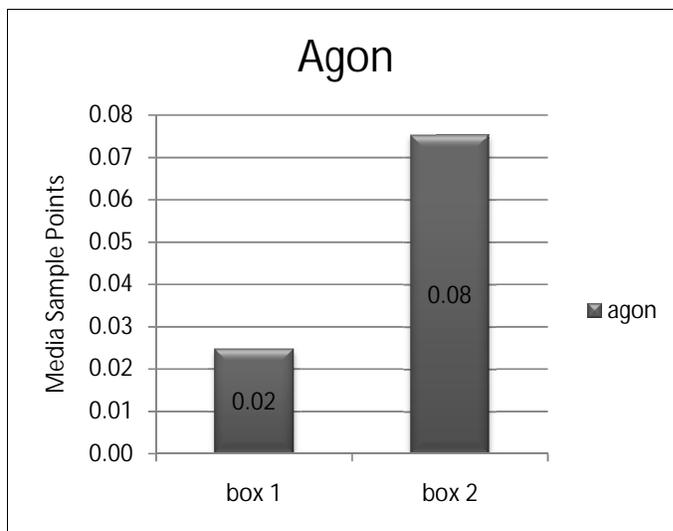


Figura 4.2. Medie dei sample points in cui gli animali sono stati visti compiere il comportamento agonistico in relazione alla variabile box (B).

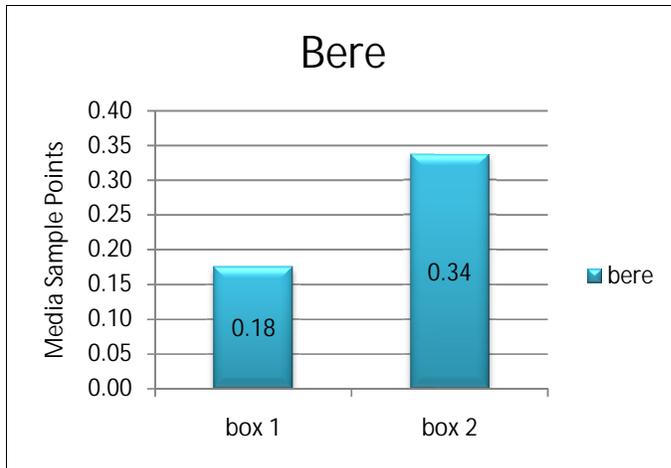


Figura 4.3. Medie dei sample points in cui gli animali sono stati visti manifestare il comportamento del “Bere” in relazione alla variabile Box (B).

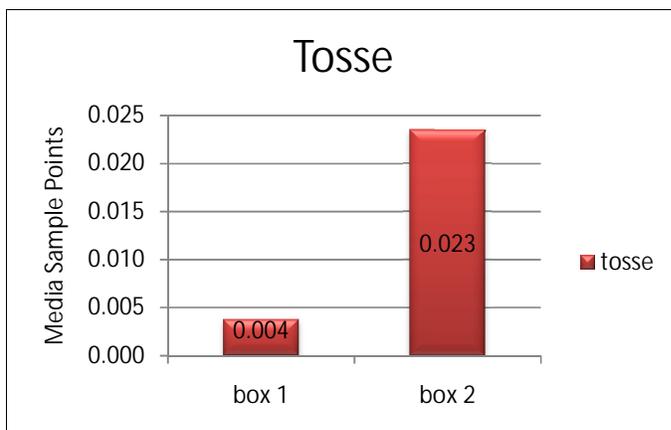


Figura 4.4: Medie dei sample points in cui gli animali sono stati visti “Tossire” in relazione alla variabile Box (B).

La settimana sperimentale (W) non ha influenzato in maniera chiara i comportamenti. In particolare, le attività di mantenimento come la ruminazione e l’inattività sono variate con un range di F da 17.85 ($p=0.001$) per Is a $F=4.15$ ($p=0.0024$) per R_d; le altre attività mostrano una differenza tra settimane il cui F varia tra $F=6.18$ ($p<0.0001$) per la locomozione a valori di $F=3.55$ ($p=0.006$) per l’agonismo. Approfondendo l’indagine, si osserva che l’attività verso altri soggetti (Att_ sogg: $F=3.56$, $p=0.006$) dimostra di aumentare in maniera graduale con il trascorre delle settimane sperimentali, ad eccezione della 5^a settimana in cui il comportamento si è manifestato in maniera inferiore rispetto alla settimana precedente. La locomozione (Movim: $F=6.18$, $p=0,0001$) e l’agonismo (Agon: $F=3.55$, $p=0.006$) dimostrano un andamento altamente variabile che risulta di difficile interpretazione.

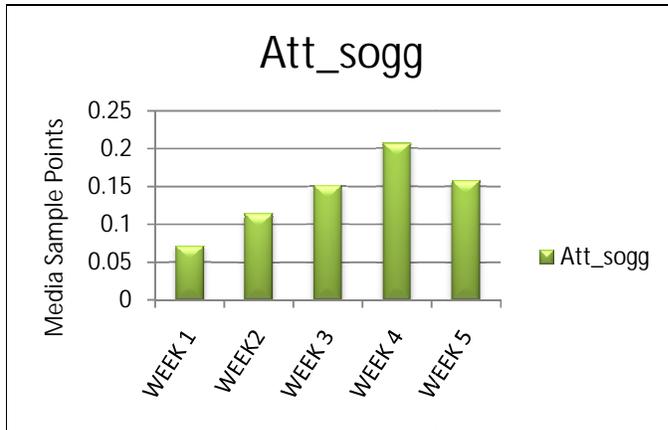


Figura 4.5 Medie dei sample points in cui gli animali sono stati visti manifestare l’ “Attività verso altri soggetti” in relazione alla settimana di sperimentazione (W).



Figura 4.6 Medie dei sample points in cui gli animali sono stati visti manifestare il “Movimento” in relazione alla settimana di sperimentazione (W).

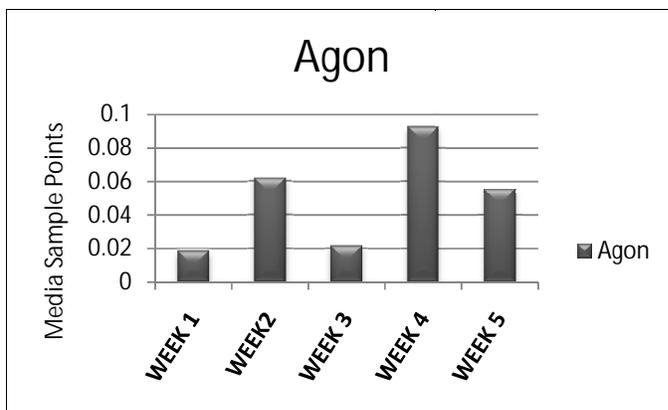


Figura 4.7 Medie dei sample points in cui gli animali sono stati visti manifestare l’ “Agonismo” in relazione alla settimana di sperimentazione (W).

Gli effetti del giorno della settimana (D) hanno interessato attività come la ruminazione in stazione (R_s : $F=5.49$, $p=0.0042$), l'inattività in decubito (Id : $F=3.92$, $p=0.02$) e l'abbeverata (B : $F=6.1$, $p=0.0023$). Nel dettaglio, le vacche hanno ruminato in stazione e si sono abbeverate meno nella giornata di sabato, mentre l'inattività in stazione si è manifestata maggiormente in questo giorno. Le prime due differenze potrebbero essere dovute al fatto che sabato è un giorno di riposo per il personale dell'Azienda agricola. Questo significa che i turni per gli addetti al bestiame erano diversi e che c'erano meno persone attorno agli animali e si svolgevano minori attività di disturbo. Le vacche quindi erano probabilmente più "rilassate" il sabato per cui stavano di più inattive in decubito e ruminavano meno in stazione, comportamento che è stato dimostrato essere associato ad ansia in questa specie (Bristow e Holmes, 2007).

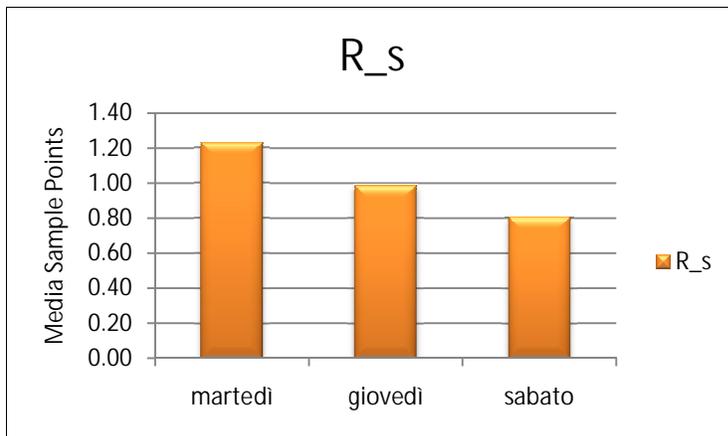


Figura 4.8 Medie dei sample points in cui gli animali sono stati visti manifestare la “Ruminazione in stazione” in relazione al giorno della settimana (D).

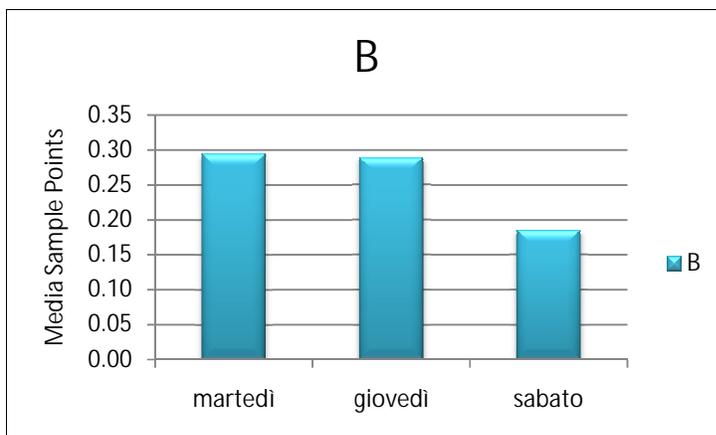


Figura 4.9 Medie dei sample points in cui gli animali sono stati visti manifestare il “Bere” in relazione al giorno della settimana (D).

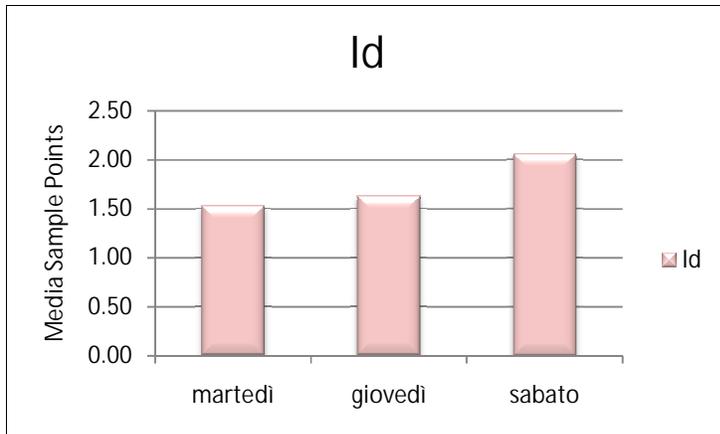


Figura 4.10 Medie dei sample points in cui gli animali sono stati visti manifestare l' "Inattività in decubito" in relazione al giorno della settimana (D).

La minor attività di ingestione di acqua, rilevata il sabato, potrebbe rappresentare o un effetto della procedura sperimentale o essere anch'essa collegata al discorso fatto precedentemente. Infatti, il sabato è l'unico giorno della settimana a non essere mai stato interessato dalla sospensione, e quindi la maggior assunzione di acqua dei due altri giorni potrebbe rappresentare o un effetto *rebound* dovuto alla interruzione della fornitura idrica nei giorni di sospensione, o essere il frutto di un abbassamento della soglia del comportamento di assunzione di acqua, dovuto al maggiore stato di disagio delle bovine il martedì e il giovedì. È infatti noto come una situazione stressante possa indurre l'abbassamento della soglia di espressione di comportamenti come l'assunzione di cibo (polifagia) e di liquidi (polidipsia) (Broom e Johnson, 1993).

Tra le altre variabili che hanno influenzato il comportamento, quella che ha dimostrato il più chiaro effetto è stata l'ora del giorno. In dettaglio, l'ora (H) ha inciso su quasi tutte le categorie comportamentali con range di F da 153.63 ($p < 0.0001$) per l'alimentazione a 2.42 per gli altri ($p < 0.05$), mentre non ha influito in maniera significativa sull'agonismo (Agon: $F = 1.85$, $p = 0.06$), la vocalizzazione (Vocal: $F = 1.9$, $p > 0.05$) e il tossire (T: $F = 1.92$, $p > 0.05$). In particolare, l'abbeverata (Bere: $F = 14.68$, $p < 0.0001$) è stata registrata sorprendentemente in misura maggiore alle 11.15 h che non alle 9.35 h, cioè alla ripresa della normale somministrazione d'acqua.

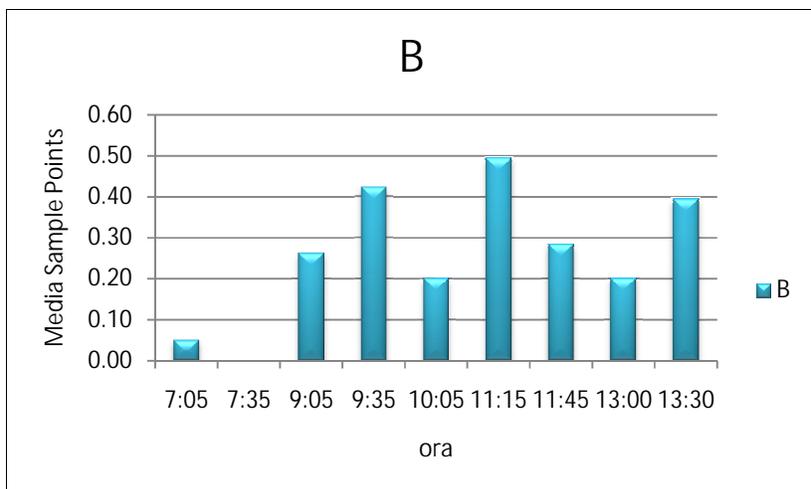


Figura 4.11 Medie dei sample points in cui gli animali sono stati visti manifestare il “Bere” in relazione all’ora del giorno (H).

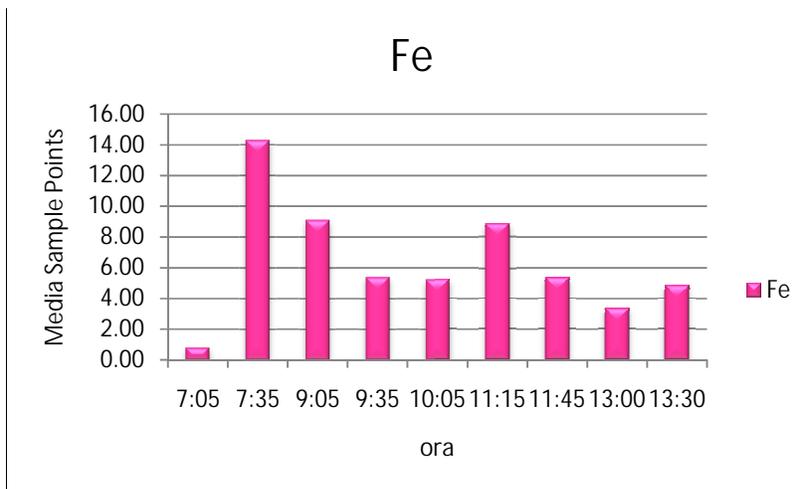


Figura 4. 12 Medie dei sample points in cui gli animali sono stati visti manifestare l’”Alimentazione” in relazione all’ora del giorno (H).

Ovviamente, subito dopo la distribuzione dell’unifeed si è avuto un notevole aumento del comportamento di assunzione dell’alimento (Fe: $F=153.63$, $p<0.0001$). Questo potrebbe aver influenzato la frequenza di rilevazione degli altri comportamenti (ruminazione in stazione, R_s : $F=117.2$, $p<0.0001$; inattività in stazione, I_s : $F=22.04$, $p<0.0001$; esplorazione passiva, $Expl_pass$: $F=145.49$, $p<0.0001$; attività verso le strutture, Att_strutt : $F=9.84$, $p<0.0001$; e l’attività verso le altre bovine, Att_sogg : $F=5.68$, $p<0.0001$) perché l’espressione del comportamento alimentare escludeva la possibilità di espressione degli altri comportamenti. È anche probabile la presenza di un ritmo circadiano nell’espressione dei vari *patterns* comportamentali, per cui la somministrazione

del cibo potrebbe agire come segnapassi, come riscontrato in altre specie (Stephan, 1986; Moreira e Krieger, 1982). In letteratura non ci sono studi sugli effetti della sospensione dell'acqua sui ritmi ciclici degli animali, ma Stephan (2002) ha osservato che la regolazione della somministrazione del cibo, gioca un ruolo importante nella regolazione del *pattern* circadiano, determinando ad esempio un incremento delle attività correlate all'alimentazione dopo distribuzione del cibo (figura 4.12). Anche il fatto che la sospensione fosse applicata in una ristretta fascia oraria (ancorché non tutti i giorni) potrebbe aver contribuito indirettamente al fenomeno precedentemente citato.

Inoltre, mezz'ora prima della somministrazione dell'alimento, è stata riscontrata una maggiore espressione di comportamenti come la ruminazione in stazione, inattività in stazione, attività verso strutture, esplorazione passiva e attività verso altri soggetti. Questo fenomeno può essere legato ad una maggiore inquietudine determinata dall'attesa di potersi alimentare che però non sembra essere collegata alla sospensione dell'erogazione dell'acqua, fatta eccezione per l'attività verso le strutture che risulta elevata mezz'ora prima del rilascio dell'acqua. Questo comportamento potrebbe rappresentare il vano tentativo dell'animale di cercare d'abbeverarsi.

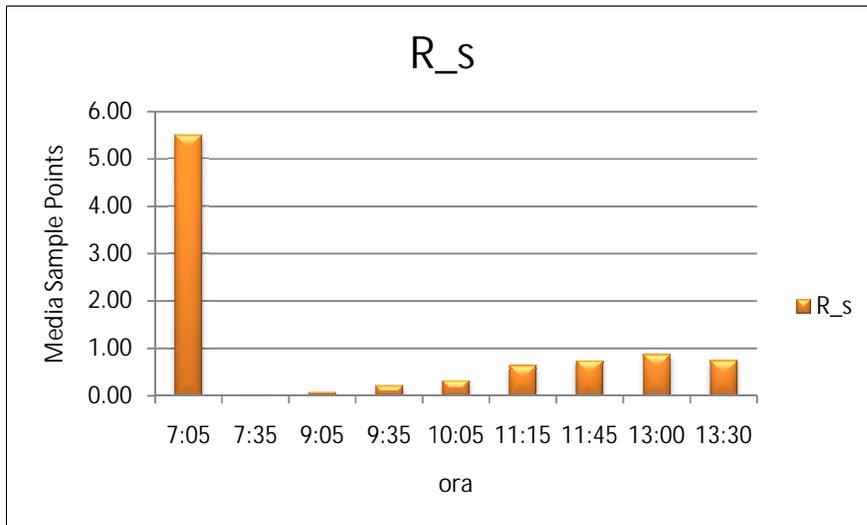


Figura 4.13 Medie dei sample points in cui gli animali sono stati visti manifestare la “Ruminazione in stazione ” in relazione all’ora del giorno (H).

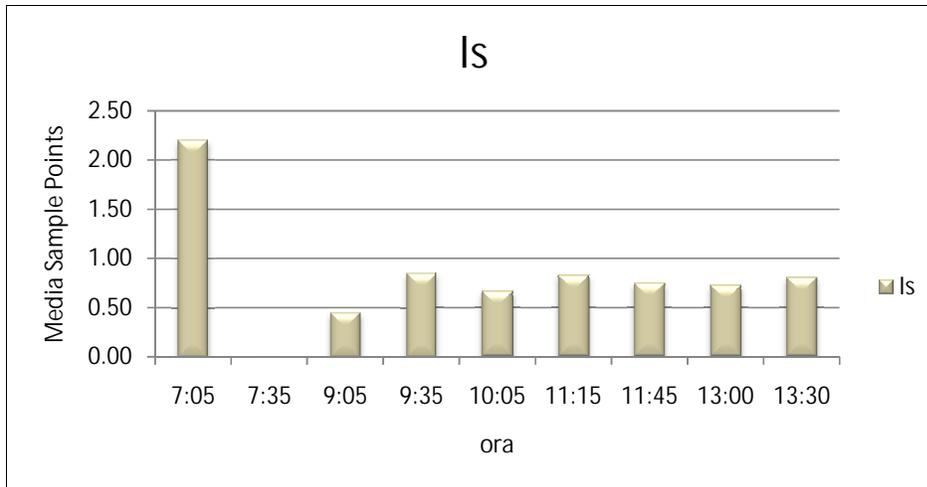


Figura 4.14 Medie dei sample points in cui gli animali sono stati visti manifestare la “Inattività in stazione ” in relazione all’ora del giorno (H).

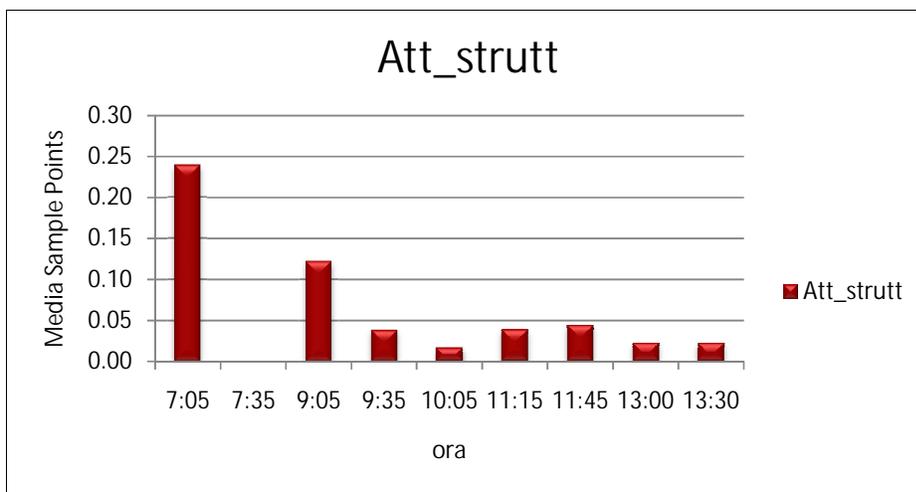


Figura 4.15 Medie dei sample points in cui gli animali sono stati visti manifestare la “Attività verso strutture ” in relazione all’ora del giorno (H).

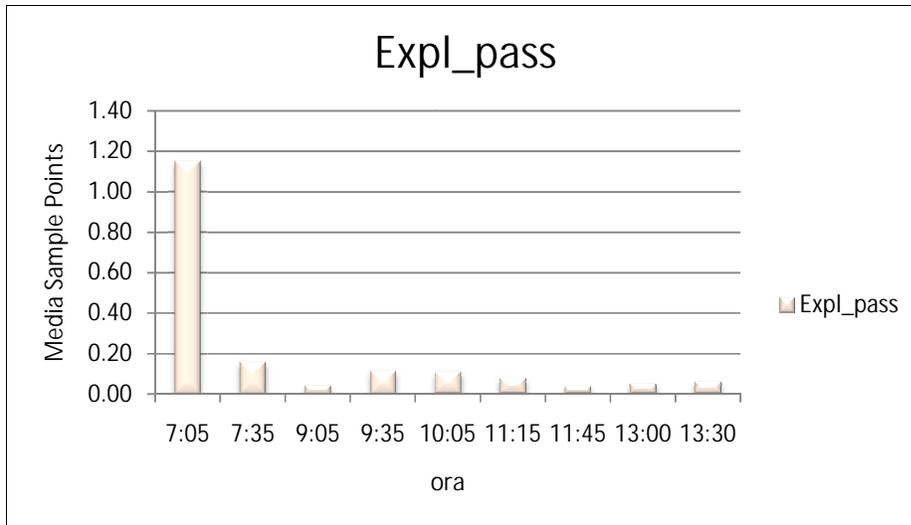


Figura 4.16 Medie dei sample points in cui gli animali sono stati visti manifestare l’ “Esplorazione passiva ” in relazione all’ora del giorno (H).

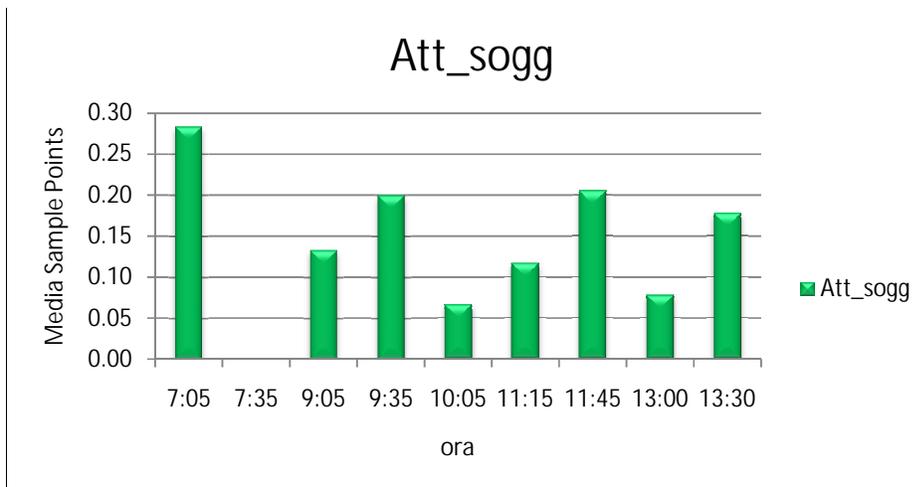


Figura 4.17 Medie dei sample points in cui gli animali sono stati visti manifestare l’ ”Attività verso altri soggetti” in relazione all’ora del giorno (H).

Considerando gli effetti dell’interazione tra le variabili box, settimana e giorno (B*W*D), che dovrebbero rispecchiare gli effetti della procedura di sospensione, sono state osservate differenze significative per la ruminazione in stazione (R_s : $F=2.24$, $p=0.02$), l’inattività in stazione (I_s : $F=3.27$, $p=0.001$), la locomozione ($Movim$: $F=2.24$, $p=0.022$), l’attività verso strutture (Att_strutt : $F=3.02$, $p=0.002$) e le attività di *self grooming* (Pul : $F=2.83$, $p=0.004$).

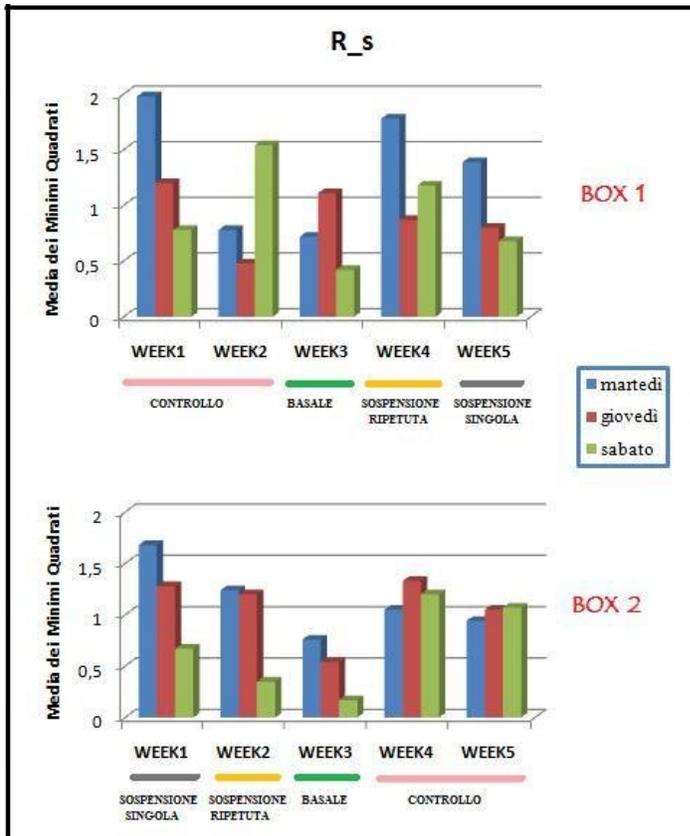


Figura 4.18 Medie dei minimi quadrati relative alla variabile “Ruminazione in stazione” nei due box,

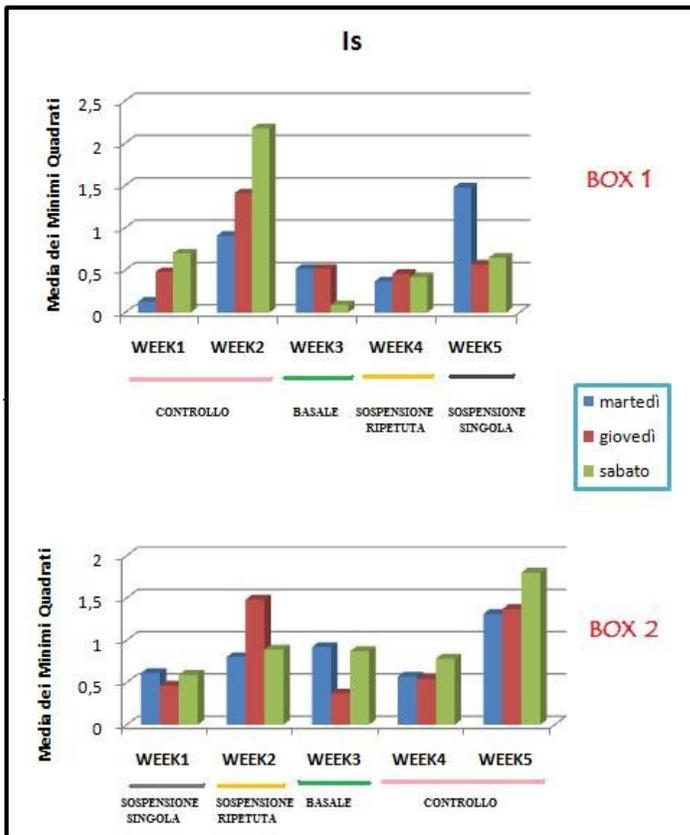


Figura 4.19 Medie dei minimi quadrati relative alla variabile “Inattività in stazione” nei due box,

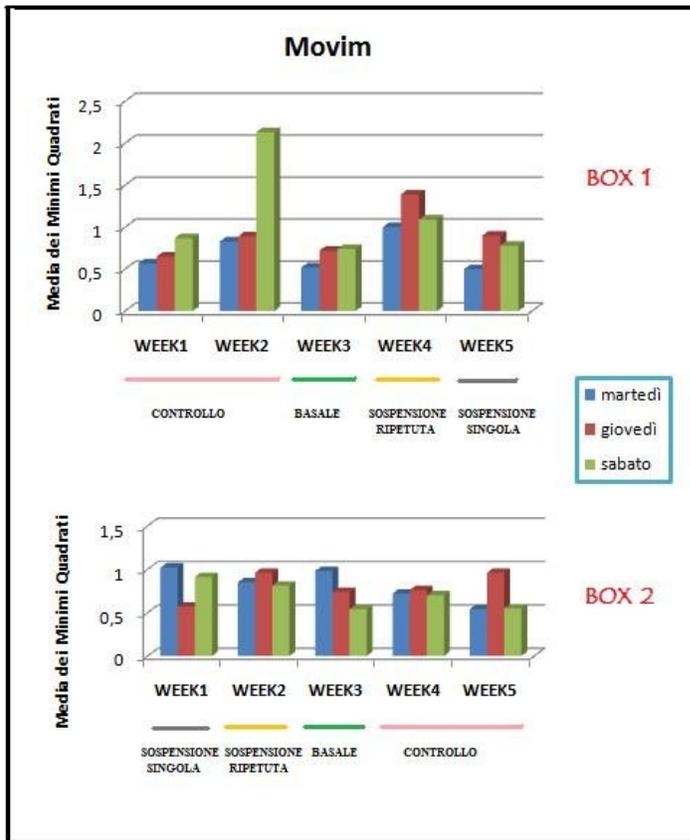


Figura 4.20 Medie dei minimi quadrati relative alla variabile “Movimento” nei due box, nelle 5

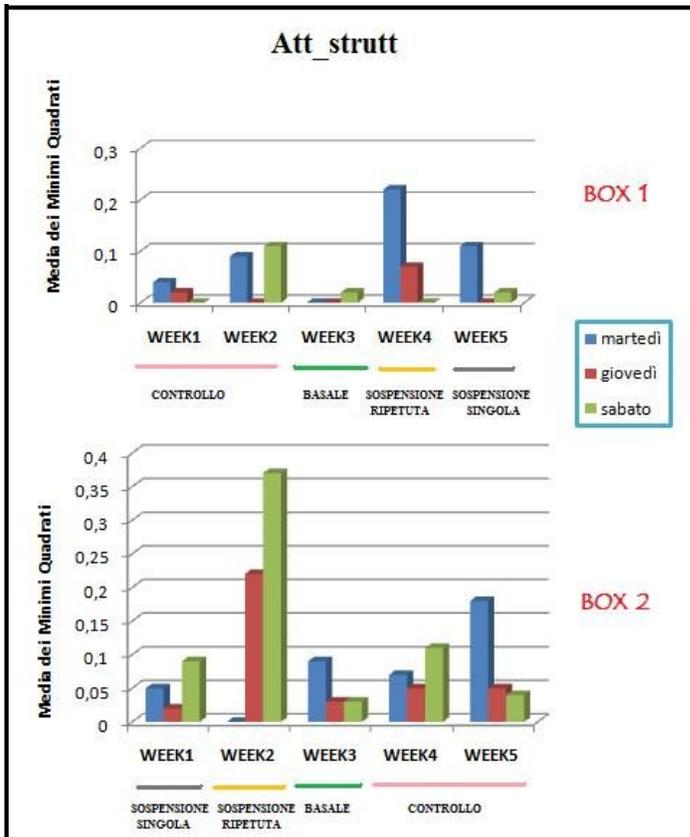


Figura 4.21 Medie dei minimi quadrati relative alla variabile “Attività verso strutture” nei due box, nelle 5

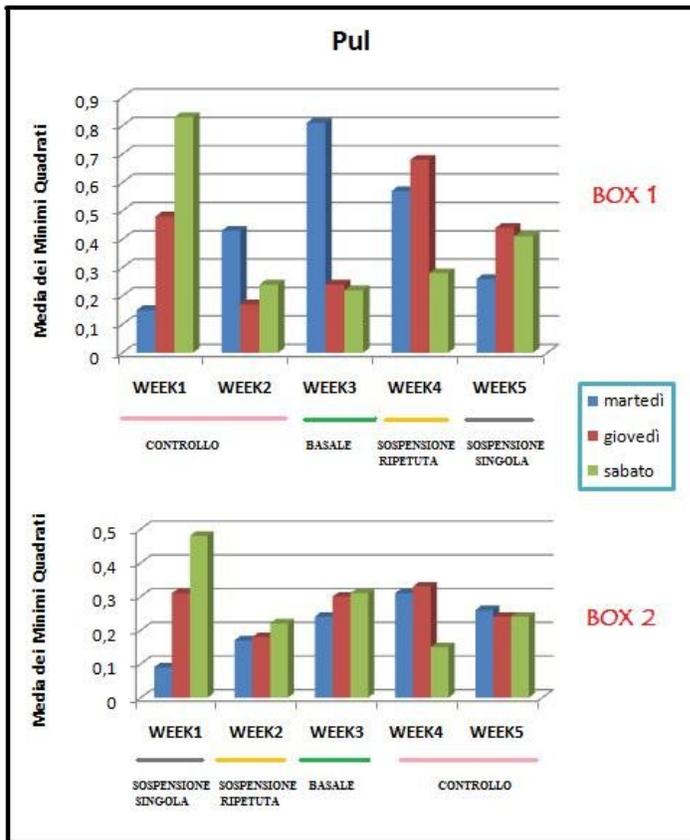


Figura 4.22 Medie dei minimi quadrati relative alla variabile “Pulizia” nei due box, nelle 5 settimane di

Tra le categorie comportamentali influenzate significativamente dell’interazione tra box, settimana e giorno, comunque, solo l’attività verso le strutture e la ruminazione in stazione hanno mostrato delle differenze giornaliere suggestive di un qualche effetto della procedura sperimentale.

In dettaglio, considerando l’attività verso le strutture, essa è risultata significativamente più frequente nel box 1 il primo giorno di applicazione della sospensione ripetuta rispetto agli altri giorni di sospensione e ai giorni basali e di controllo. Il *pattern* è risultato meno comprensibile nel box 2, come si vede nella figura 4.21.

Un aumento di attività verso le strutture è stato evidenziato anche in uno studio analogo al presente, in cui si applicava alle bovine un ritardo nella somministrazione dell’unifeed (Frasson, 2004).

L’incremento dell’attività verso le strutture è stato osservato anche in studi effettuate da Johannesson e Ladewig (2000), sulla privazione di cibo sui vitelli. In quello studio, i cambiamenti mostrati dai soggetti erano spiegati come comportamento anticipatorio, dovuto al fatto che gli animali avevano imparato a predire la somministrazione del cibo e che la loro aspettativa non era stata soddisfatta. L’incremento del movimento e dell’attività verso le strutture, durante i giorni di sospensione dell’acqua, potrebbe avere lo stesso significato, come se le vacche avessero imparato ad aspettarsi un evento che invece non si manifesta quanto dovrebbe. Un’insoddisfatta anticipazione

potrebbe portare a diversi livelli di frustrazione nei bovini (Johannesson e Ladewig, 2000), sebbene sia difficile affermare che tale frustrazione sia stata causa di stress significativo nelle vacche della nostra sperimentazione. Molti fattori potrebbero contribuire a far percepire la sospensione come fonte di disagio e possibilmente anche di stress. Le vacche potrebbero essere state agitate dal fatto che pur essendo assetate, hanno dovuto aspettare per soddisfare il loro bisogno, oppure potrebbero essere state turbate dal cambio di routine.

Altre ipotesi, formulate nello studio analogo riguardante la privazioni da cibo nelle vacche da latte (Frasson, 2004), suggeriscono che questi comportamenti potrebbero essere legati al fatto che la possibilità di abbeverarsi non fosse simultanea per i due box, così che mentre in un box le vacche potevano bere, nell'altro questa possibilità era negata. Quindi le bovine che non potevano bere, tentavano di raggiungere l'acqua a disposizione nel box adiacente. Anche la facilitazione sociale potrebbe aver giocato un ruolo importante, infatti le vacche potrebbero essere state spinte ad andare agli abbeveratoi vedendo gli altri animali fare la stessa cosa. Di conseguenza vedere le altre vacche bere e non poter fare altrettanto, avrebbe potuto essere stato frustrante e probabilmente stressante per le bovine.

La ruminazione in stazione è stata registrata più frequentemente il primo giorno di sospensione (martedì della prima settimana) rispetto a tutti gli altri giorni di osservazione, nel box 2.

Contemporaneamente a questo box, anche nel box 1 si è osservato lo stesso picco di ruminazione; la prima settimana però rappresenta, per questo box, un periodo di controllo. Nel complesso, si nota che nel box 1, la ruminazione in stazione è stata registrata maggiormente nelle settimane di sospensione (quarta e quinta settimana) che nella terza settimana basale, in cui non è stata applicata alcuna sospensione. È da notare che nelle settimane in cui l'interruzione nella somministrazione d'acqua era applicata al box 1 (quarta e s settimana), i soggetti del box 2 hanno manifestato questo comportamento più spesso che nei giorni della settimana basale (vedi figura 4.18). Riassumendo, il primo giorno della prima settimana è stato il giorno in cui, in ambedue i box, la ruminazione in stazione è stata espressa in misura maggiore. Questo dato è interessante, in quanto il martedì della prima settimana era il primo giorno in assoluto in cui le vacche venivano messe di fronte a questa situazione potenzialmente avversa. Il disagio e l'agitazione delle bovine del box 2, davanti ad un evento negativo mai sperimentato, potrebbe aver influenzato il comportamento anche delle vacche del box adiacente. È importante ricordare che questo comportamento è stato dimostrato essere associato ad ansia in questa specie (Bristow e Holmes, 2007).

È molto sorprendente il fatto che nessun effetto significativo dell'interazione sia stato evidenziato sul comportamento alimentare. Ciò non trova riscontro nelle ricerche presenti nella bibliografia,

nelle quali bovine e ruminanti selvatici di regioni caldo aride, sono stati sottoposti a privazioni prolungate d'acqua.

In particolare, Little e Sansom (1976), privando dell'acqua 4 vacche frisone per 72 ore, hanno osservato una riduzione della produzione di latte e dell'ingestione della sostanza secca del 10%. Pur rilevando aumenti progressivi della disidratazione a livello sierico, le vacche non hanno però dimostrato segni comportamentali e sierici di stress (Little, Sansom et al., 1984).

È da notare, per altro, che nel presente studio la sospensione era di durata decisamente minore e le temperature ambientali inferiori.

Altri studi in Israele, effettuati da Silanikove e Tadmor, hanno messo in evidenza le conseguenze della disidratazione nelle vacche da latte sul volume ruminale, sul flusso di saliva e sull'omeostasi dei fluidi corporei. I risultati hanno confermato, come nei precedenti studi, che una riduzione dell'ingestione d'acqua porta ad una riduzione nell'assunzione volontaria di cibo (Silanikove e Tadmor, 1989).

Oltre che sulle vacche da latte, sono stati effettuati studi sulla parziale privazione di acqua nei vitelli. Questi studi, effettuati da Igbokwe e successivamente da Kamphues, hanno evidenziato una riduzione nell'ingestione alimentare, problemi comportamentali (assunzione di altri liquidi che possono essere critici dal punto di vista igienico), ridotta capacità di termoregolazione, diminuita escrezione renale dei cataboliti e un'augmentata concentrazione di urina e feci (Igbokwe, 1997; Kamphues, 2000).

La depressione dell'ingestione di sostanza secca è stata osservata anche in studi condotti su ruminanti selvatici come cammelli, pecore e capre delle regioni medio-orientali. In tutti gli animali, la privazione di liquidi ha depresso l'assunzione di alimento e accresciuto l'apparente digeribilità di quest'ultimo e dell'azoto. Questi risultati suggeriscono che il metabolismo dei composti azotati nel bestiame domestico adulto allevato dai pastori nomadi del Sudan non ha subito effetti dannosi e può a conti fatti essere sottoposto a brevi periodi di privazione d'acqua (Mousa e Ali, Hume, 1983; Choshniak e Shkolnik, 1978; Choshniak et al., 1984; Silanikove, 1992).

E' singolare che la sospensione dell'abbeverata non abbia provocato un aumento dei comportamenti agonistici, in quanto di solito in condizioni sub ottimali, come in caso di stress, si verifica un aumento dell'aggressività (Broom and Johnson, 1993).

E' interessante notare come sia per l'assunzione dell'alimento che per l'agonismo, l'analisi esplorativa effettuata tramite test di Wilcoxon (giorni senza sospensione vs giorni di sospensione) avesse riscontrato una differenza significativa (Fe: $p=0,0166$ e Agon: $p=0,040$), così come, per altro, per la ruminazione in stazione (R_s : $p=0,0096$), la locomozione (Movim: $p=0,0413$), l'abbeverarsi (B: $p=0,0164$), l'attività verso le strutture (Att_strutt: $p=0,0448$), e il tossire (T:

$p=0,002$). Una differenza significativa sul comportamento di assunzione dell'alimento veniva confermato anche dal test di Friedmann (settimana senza sospensione vs settimana di sospensione singola vs settimana di sospensione ripetuta; Fe: $p=0,00117$), come anche per l'inattività in decubito (Id: $p=0,0388$).

L'analisi più approfondita, che ha tenuto conto della complessità del disegno sperimentale, ha consentito di evidenziare che molte di queste differenze non erano significative e che la realtà dell'allevamento è assai più complessa.

4.2 RISULTATI E DISCUSSIONE DEI DATI ATTIVOMETRICI

Dall'analisi dei dati attivometrici si nota come il box 1 abbia dimostrato un'attività significativamente maggiore rispetto al box 2 ($p=0.002$) in tutti i periodi considerati. Il parametro "ora" si è dimostrato rilevante, infatti i maggiori picchi attivometrici si sono riscontrati principalmente tra le 9.00 h e le 11.00 h; tra le 12.00 h e le 13.00 h e infine tra le 19.00 h e le h 21.00 h (figure da 4.23 a 4.27).

Figure da 4.23 a 4.27 Variazioni attivometriche medie registrate giornalmente durante le 5 settimane di sperimentazione.

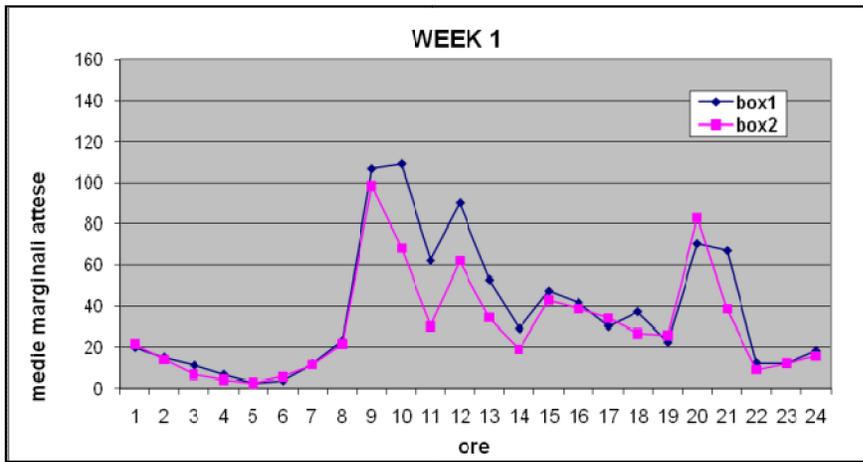


Figura 4.23

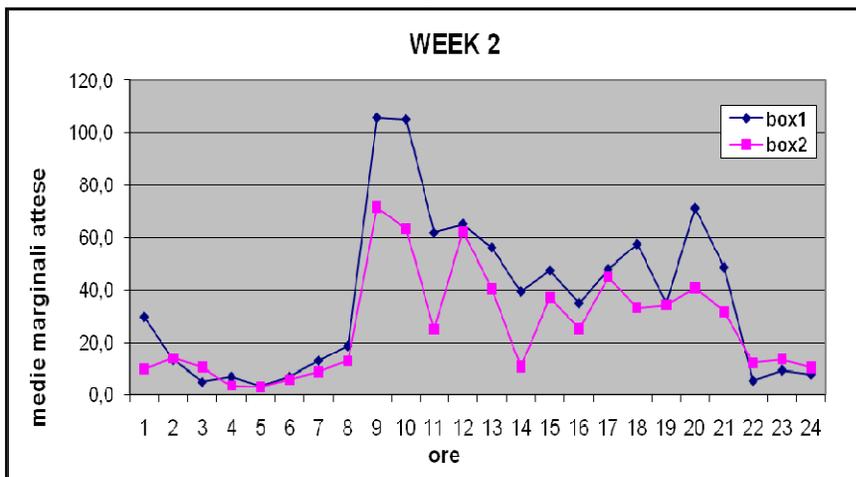


Figura 4.24

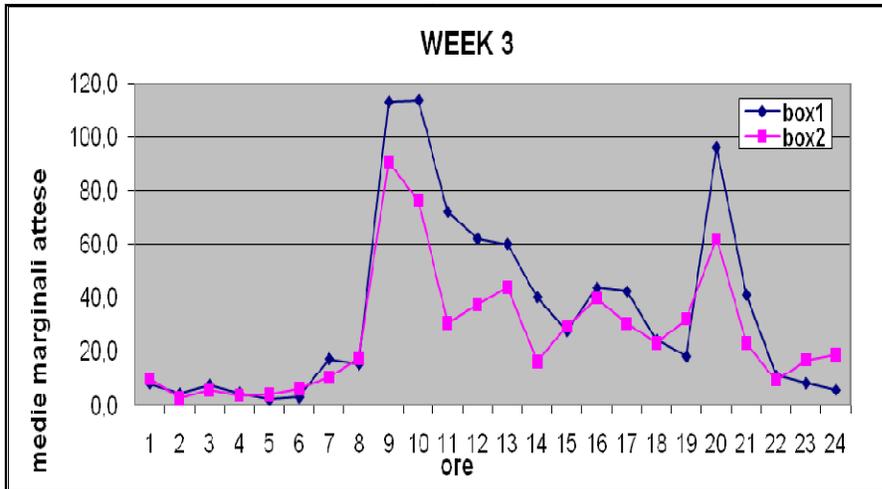


Figura 4.25

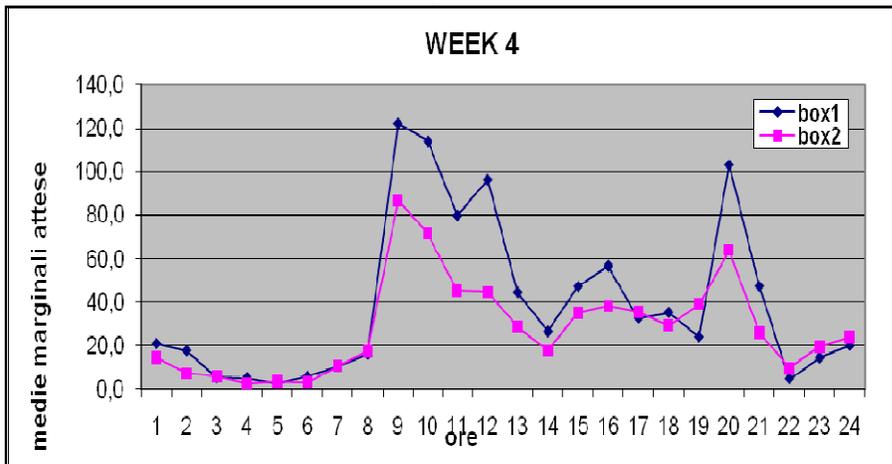


Figura 4.26

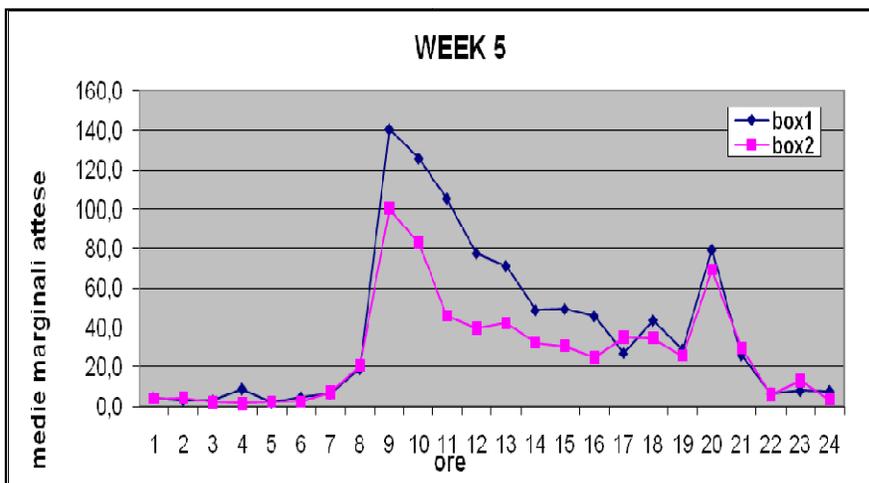


Figura 4.27

Se mettiamo in relazione questi dati, con uno studio precedentemente svolto, sullo stress indotto dal ritardo di mungitura (Fancello, 2005), si nota un’analogia per quanto riguarda la maggiore attività del box 1 rispetto al box 2. Tale comportamento potrebbe far supporre che i due box abbiano caratteristiche peculiari legate per esempio all’ordine di mungitura o alla composizione di ciascun box. Per quanto riguarda l’ordine di entrata in sala mungitura, il box 2 è sempre il primo, seguito dal box 1. Questo dato è interessante perché può far ipotizzare che l’attesa di esser munte accresca l’agitazione delle vacche e che questo stato d’inquietudine perduri durante tutta la giornata. Tuttavia non è da escludere la possibilità che tale discrepanza nella risposta attivometrica possa essere imputabile a fattori interni ai box, come fattori gerarchici o la presenza di animali di indole più irrequieta.

4.3 RISULTATI E DISCUSSIONE DEI DATI PRODUTTIVI

I dati relativi al tempo di mungitura, alla durata e alla flussimetria, in riferimento ai due box, sono stati analizzati mediante ANOVA (SPSS). I risultati sono visibili nella tabella 4.2.

	TEMPO MUNGITURA	DURATA MUNGITURA	PICCO FLUSSO	FLUSSO MEDIO
BOX (B)	n.s.	n.s.	p<0,0001	p<0,0001
SETTIMANA (W)	n.s.	p<0,0001	n.s.	p<0,0001
B*W	n.s.	0,02	n.s.	n.s.
B*D	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
W*D	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
B*W*D	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tabella 4.2 Livello di significatività statistica attribuita alle variabili indipendenti utilizzate nell’analisi di varianza dei parametri di mungitura (n.s.= non significativo).

Solo la durata di mungitura, il picco di flusso e il flusso medio sono state influenzate significativamente dalle variabili prese in esame. Tuttavia, come per i dati comportamentali e per i dati attivometrici, i risultati osservati non hanno mostrato una relazione significativa con la sospensione della disponibilità d’acqua.

Prendendo in considerazione la durata di mungitura (figura 4.29), si è osservato un effetto significativo del periodo ($F= 16,060$; $p<0,0001$) e del rapporto tra il box e la settimana ($B*W$:

F=3,015; p=0,02). Nel box 1, questo parametro è risultato statisticamente inferiore nella quinta settimana (sospensione singola), mentre nel box 2 non si sono riscontrate differenze significative nei 5 periodi. Considerando la curva di lattazione, tale risultato potrebbe derivare dal fatto che con il passare del tempo, la produzione di latte decresce e di conseguenza diminuisce anche la durata di mungitura. Va sottolineato che i soggetti del box 1 vengono munti sempre per ultimi. Le vacche sono animali abitudinari, per cui se per qualsiasi motivo si inverte l'ordine di mungitura dei box o si cambia l'operatore, gli animali ne risentono con la conseguente modificazione delle variabili di mungitura (Molinari, Petrera, 2007). Il cambiamento di gruppo o l'attesa stessa di essere munte rappresentano per l'animale eventi che aumentano la probabilità di interazioni aggressive e quindi l'insorgere di uno stato di stress (Molinari, Petrera, 2007).

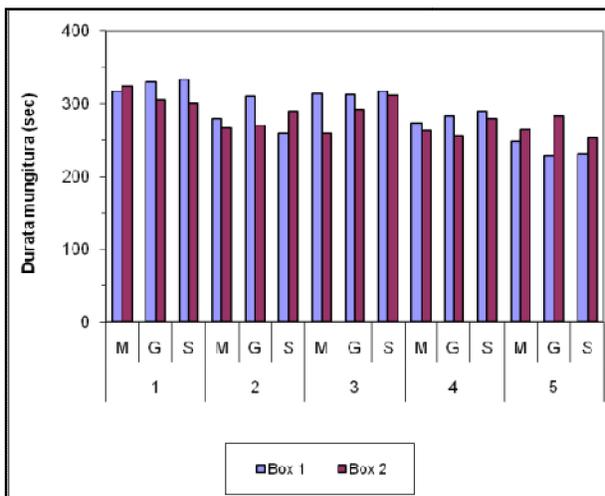


Figura 4.29 Dati relativi alla durata di mungitura.

Per quanto riguarda il flusso medio (figura 4.30) si osserva una significatività del box (F= 110,282; p<0,0001) e del periodo (F= 5,779; p<0,0001); considerando il picco di flusso (figura 4.31) si è notato un effetto significativo del box (F= 98,324; p<0,0001).

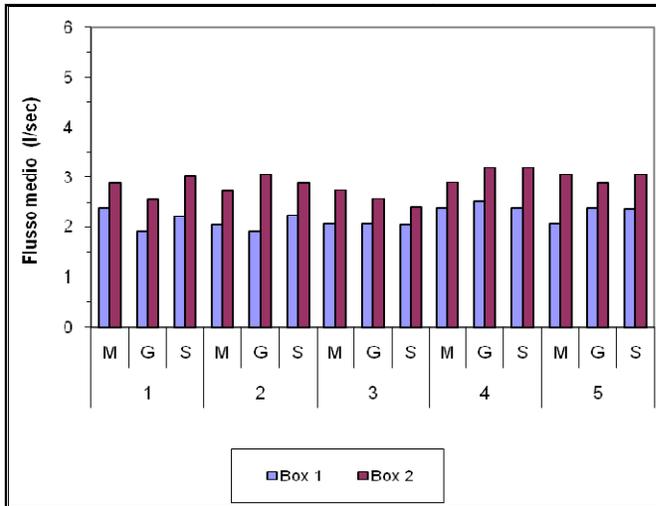


Figura 4.30 Dati relativi al flusso medio

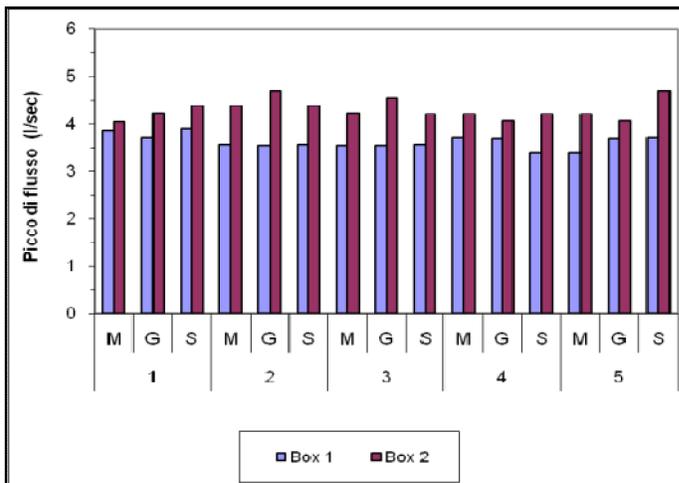


Figura 4.31 Dati relativi al picco di flusso.

Dalla figura 4.29 alla 4.31, si rileva un importante effetto periodo ed un effetto box*periodo.

Le vacche del box 1, movimentate per ultime, vanno in mungitura dopo essere state esposte più a lungo alla situazione, possibilmente stressante, creata dallo spostamento delle altre vacche che sfilano davanti al loro box per essere munte.

Questi stressor possono provocare il rilascio di adrenalina e quindi provocare la costrizione dei vasi sanguigni, riducendo la circolazione sanguigna. In una situazione del genere, se l'animale dovesse secernere ossitocina, la quantità di ormone che potrebbe raggiungere la mammella non sarebbe sufficiente a garantire la mungitura completa. È importante ricordare che l'ossitocina liberata in seguito a stimolazione nervosa, perdura in circolo per un periodo di tempo limitato, dopo il quale la sua azione cessa. Per tale ragione, qualsiasi tipo di stimolo stressante potrebbe influenzare la funzionalità del riflesso di eiezione del latte e quindi la produttività degli animali. Per questo motivo

è necessario che le operazioni di mungitura siano effettuate con una certa rapidità (minimizzando i tempi di attesa), per evitare che una certa quota di latte venga trattenuta (Bittante, Andrighetto e Ramanzin, 1999).

4.4 RISULTATI E DISCUSSIONE DEI VALORI PLASMATICI DEL CORTISOLO

Analizzando i dati cortisolemici nel complesso, osserviamo come anche questi non siano stati influenzati direttamente dalla sospensione dell'acqua. Infatti al momento del prelievo di sangue (1 h e 30 dopo la fine della sospensione), i valori medi ematici del cortisolo sono sempre rimasti entro il range fisiologico (2-4 ng/ml). Si può ipotizzare che 3.5 ore di interruzione nella somministrazione di acqua, non sia stato percepito come un agente stressante e quindi non abbia determinato un significativo aumento nella produzione di cortisolo. Questa ipotesi è supportata dal fatto che la ruminazione e la vocalizzazione, le quali sono collegate ad ansietà e incremento del cortisolo (Bristow and Holmes, 2007), non sono state interessate, in maniera chiara ed univoca, dalla sospensione.

Comunque, nonostante non ci sia stata un'influenza diretta della sospensione sui livelli di cortisolo, abbiamo osservato un significativo effetto del box ($F= 27,711$; $p<0,001$), con concentrazioni di cortisolo più elevate nel box 2 rispetto al box 1; un effetto della settimana ($F= 6,184$; $p<0,001$) e l'effetto box*settimana ($F= 5,704$; $p>0,055$).

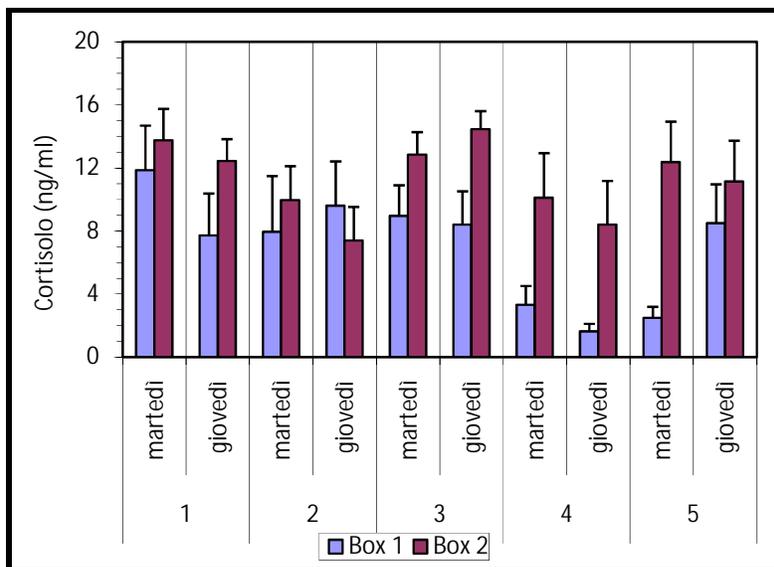


Figura 4.32 Concentrazioni ematiche del cortisolo misurate 1h e 30 dopo la fine della sospensione dell'acqua.

E' possibile che i maggiori livelli di cortisolo, riscontrati nei soggetti del box 2, siano da imputare al fatto che questi rimanevano più tempo in fase di cattura; questo potrebbe aver fatto agitare maggiormente gli animali, in quanto percepivano lo stato di paura e agitazione delle bovine dell'altro box, durante i prelievi. La contenzione, infatti, è considerata uno dei più importanti fattori che possono generare stress negli animali. Questa situazione avrebbe portato all'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi surrenalico e quindi ad un maggior incremento del cortisolo plasmatico (Grandin, 1997).

E' probabile, inoltre, che gli elevati livelli di cortisolo rilevati nelle vacche del box 2, durante il periodo di controllo, siano legati alla maggiore reattività di questi ultimi alle operazioni di contenzione e di manipolazione per l'esecuzione del prelievo stesso. Negli animali sottoposti a stress, l'asse ipotalamo-ipofisi- surrene probabilmente è stato attivato precedentemente, durante la sospensione dell'acqua e per questo motivo non ha subito l'influenza delle operazioni legate al prelievo. La sensibilità del box 2 durante il periodo di controllo risulterebbe visibile soltanto il martedì in quanto in tale giornata le operazioni di prelievo di sangue risultano di fatto una novità (l'ultimo prelievo risale ad almeno 4 giorni prima, in alcuni casi a 12 giorni prima).

5. CONCLUSIONI

Negli allevamenti delle bovine da latte si possono verificare eventi stressanti di diversa entità. Con questa ricerca si sono volute studiare le risposte comportamentali, fisiologiche e produttive indotte da una sospensione della somministrazione dell'acqua di abbeverata.

Dal punto di vista comportamentale, non si sono rilevate influenze imputabili con sicurezza alla procedura di sospensione della somministrazione dell'acqua di abbeverata, tali da poter far ritenere tale procedura uno stressor di rilevante entità. Tuttavia, tra le categorie comportamentali prese in esame, l'attività verso le strutture e la ruminazione in stazione hanno dimostrato delle differenze giornaliere suggestive di un qualche effetto della procedura sperimentale. In particolare, considerando l'attività verso le strutture, essa è risultata significativamente più frequente nel box 1, il primo giorno di applicazione della sospensione ripetuta rispetto a tutti gli altri giorni di sospensione e ai giorni basali e di controllo. Considerando la ruminazione in stazione, questo comportamento è stato espresso maggiormente il primo giorno della settimana in entrambi i box, giorno in cui veniva applicata per la prima volta la sospensione della somministrazione di acqua. Questo risultato è suggestivo perché il martedì era il primo giorno in assoluto in cui le vacche venivano messe a contatto con una situazione che alterava la loro normale routine. Va ricordato che questo comportamento è stato dimostrato essere associato ad ansia nella vacca da latte (Bristow e Holmes, 2007).

È comunque possibile affermare che gli animali hanno subito influenze rilevanti date dal box, dal giorno, dall'ora e dalla settimana della nostra indagine. In particolare, abbiamo riscontrato notevole variabilità nella risposta alla sospensione tra i due box. È interessante notare come sussistessero significative differenze di comportamento tra il sabato e gli altri giorni della settimana, che potrebbero essere imputabili a differenze del management di stalla durante il fine settimana.

I dati attivometrici e produttivi non sono stati condizionati in maniera specifica dall'applicazione del blocco nella somministrazione di acqua. Però anche per questi valori, come per i dati comportamentali, sono state osservate significative differenze legate ai due box. In dettaglio, gli animali del box 1 hanno subito un significativo effetto dell'ora con picchi attivometrici tra le 9.00 h e le 11.00 h, tra le 12.00 h e le 13.00 h e tra le 19.00 h e le 21.00 h. In aggiunta, le vacche del box 1 hanno dimostrato maggiore difficoltà nella gestione della mungitura ed un rilascio del latte meno efficiente. È probabile che questi aspetti siano collegati a fattori individuali, ma anche a fattori manageriali di gestione della mungitura e alle operazioni di contenzione messe in atto durante i prelievi di cortisolo.

Per concludere, anche i dati relativi al cortisolo non hanno dimostrato variazioni significative legate alla privazione d'acqua. Questo risultato può essere legato al fatto che, 3,5 ore di sospensione dell'abbeverata, non sono state percepite come un agente sufficientemente stressante per innalzare i livelli sierici di cortisolo. Cionostante, abbiamo osservato, come per i dati attivometrici e produttivi, un effetto significativo del box, con concentrazioni più elevate nel box 2. Questo può essere collegato ai diversi tempi di contenzione tra i due box e a fattori individuali.

Nella stessa Azienda agricola, in studi precedenti, sono state analizzate le risposte comportamentali, produttive e le variazioni della cortisolemia derivati da altre due tipologie di *stressor* di modesta entità, come una variazione imprevedibile nella somministrazione dell'alimento (Frasson, 2004) e le risposte indotte da un ritardo nella mungitura nelle bovine da latte (Fancello, 2005).

Si è rilevato che le due tipologie di *stressor* hanno determinato diverse reazioni negli animali: nel primo studio, si sono osservate alterazioni comportamentali soprattutto nelle settimane di ritardo ripetuto (aumento dei comportamenti agonistici, delle interazioni con altri soggetti, degli atteggiamenti verso la mangiatoia e altre strutture) che indicano una situazione di disagio psicogeno. Nella seconda sperimentazione, le risposte si sono dimostrate più legate ad aspetti più fisiologici, in relazione alla dolorabilità della mammella.

Grazie alla presente tesi, possiamo affermare che un'interruzione nella somministrazione dell'acqua di 3,5 ore, rappresenta un *very mild stress* che si colloca ai limiti del disagio per le vacche da latte. Per ottenere effetti significativi legati sospensione dell'acqua, probabilmente avremmo dovuto prolungare la durata giornaliera del blocco. Per finire, non possiamo trascurare la stagione autunnale in cui si è svolto lo studio: plausibilmente, se avessimo effettuato le nostre osservazioni durante i mesi estivi, avremmo riscontrato risposte diverse.

6. BIBLIOGRAFIA

Ader R., 1967. The influence of psychological factors on disease susceptibility in animals. Husbandry of Laboratory Animals. Conalty M. L., Ed. Acad Press, New York.

A.I.A Associazione Italiana Allevatori, 2003. Statistiche ufficiali.

A.I.A Associazione Italiana Allevatori, 2005. Statistiche ufficiali.

Andreatta M., 2006. Risposta riproduttiva e comportamentale ad una breve sospensione della disponibilità d'acqua di abbeverata nelle bovine in lattazione. Tesi di laurea, Facoltà di Agraria-Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Padova.

Aguggini G., Beghelli V., Giulio L. F., 1992. Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia. Ed. Utet, seconda edizione. Torino.

Appleby M. C. e Hughes B. O., 1997. Discussion. In: M.C. Appleby and B.O. Hughes (Eds.). Animal Welfare 265-268. London: CAB International.

Atkinson D. e Sibly R. M., 1996. On the solution to a major life-history puzzle. *Oikos* 77: 359–364.

Atkinson D. e Thorndyke M., 2001. Environment and animal development: Genes, life histories and plasticity. BIOS Scientific Publishers, Oxford.

Barnett J. L. e Hutson G. D., 1987. Objective assessment of welfare in the pig contributions from physiology and behaviour. In: APSA Committee Ed. Manipulating Pig Production. Australasian Pig Science Association, Werribee, Victoria, Australia.

Bentham J., 1789 in: Appleby M.C. and Hughes B.O. (1997) Animal Welfare. CAB Int., U.K., 4-6; 21; 237; 239.

Bittante G., Andrighetto I. e Ramanzin M., 1999. Tecniche di produzione animale, terza edizione, Liviana Editore, Torino.

Bloomsmith A. M., Lambert S.P., 1995. Effect of predictable versus unpredictable feeding schedule on chimpanzee behaviour. *Appl. Anim Behav. Sci.* 44: 65-74.

Boivin X., Garel J. P., Mante A., et al., 1998. Beef calves react differently to different handlers according to the test situation and their previous interactions with their care-taker. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 55: 245–257.

Bortolomi R., Callegari E. e Beghelli V., 2000. *Anatomia e Fisiologia degli Animali Domestici* Ed. Calderoni ed agricole, seconda edizione.

Boschetti G., 2000. *Edifici per la zootecnia.* Italo Bovolenta editore.

Brambell Report, 1965. Report of the Technical Committee to Enquire into the Welfare of Animals kept under Intensive Livestock Husbandry Systems. “Command Report 2836, Her Majesty’s Stationary Office”, London.

Breazile J. E., 1988. Physiology of stress and its relationship to mechanism of disease and therapeutics. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 4: 441-480.

Bredbacka P., 1998. Relationships between fear, welfare, and productive traits in caged white leghorn hens. In: Unshelm J., Van Putten G., Zeeb K. and Ekesbo I. (Eds.), “Proc. Int. Congr. on Appl. Ethol. in Farm Animals”, Skara, 74-79.

Bristow D. J., e Holmes D. S., 2007. Cortisol levels and anxiety-related behaviours in cattle. *Physiol. Behav.*, 90: 626-628.

Broom D. M., 1985. Stress, welfare and the state equilibrium, in Proc. 2nd Etr. Sym. Poultr Welfare, (Ed R.M. Wegner), World Poultry Science Association, Celle.

Broom D. M., 1986. Gli indicatori di scarso benessere negli animali. *V.T. Vet Journal* tratto da *Selezione Veterinaria*, 142: 524-526.

Broom D. M., 1988. Le concepts de stress et de bien-être. *Rec. Med. Vet*, 164: 175.

Broom D. M. e Fraser A. F., 1990. Farm and animal Behaviour and Welfare, Ed. Bailliere and Tindall, London.

Broom D. M., 1991. Animal welfare: concepts and measurement. *J. Anim. Sci.*, 69: 4167-4175.

Broom D. M. e Johanson K. G., 1993. Stress and animal welfare, Ed Chapman and Hall, London.

Cannon W. B., 1914. The emergency function of adrenal medulla in pain and the major emotions. *American Journal of Physiology*, 33: 356-372.

Chosniak I. e Shkolnik A., 1978. The rumen as a protective osmotic mechanism during rapid re-hydration in the black Bedouin goat. Osmotic and volume regulation, 344-350, Alfred Benzon Symposium Munksgard, Copenhagen.

Chosniak I., Wittenberg I., Rosenfeld C. et al., 1984. Rapid rehydratation and kidney function in the black Bedouin goat. *Physiological Zoology*, 57: 573-579.

Conny M. A., Van Ravenswaaij A., Louis A. A. K., et al., 1993. Heart rate variability. *An. Of Int. Med.*, 118: 436-447.

Costa A., 2005. Stress? Sì, grazie. <http://www.neurologia.net/neur0026.htm>.

Curtis S. E., 1987. Animal well-being and animal care. *Vet. Clin North Am.: Food Anim. Pract.*, 3: 369-382.

Dantzer R. e Kelley K. W., 1989. Stress and immunity: an integrated view of relationships between the brain and the immune system. *Life Sci.* 44: 1995-2008.

Dawkins M. S., 1980. Animal suffering. Chapman and Hall, New York. (In: Duncan J. H. e Petherick J. C. The implication of cognitive processes for animal welfare., *J. Anim. Sci.*, 1991, 69: 5017-5022).

Dawkins M. S., 1988. Behavioural deprivation: a central problem in animal welfare. *Appl. An. Beh. Sci.*, 20: 209-225.

Degni O., 2006. Lo stress, dalla dimensione biologica alla prospettiva psicologica.
http://www.infoalpa.it/contenuti/contributi_Stress.htm.

DeSouza E. B., Grigoriadis D. E. e Webster E. L., 1991. Role of brain, pituitary and spleen corticotropin-releasing factor receptors in the stress response (In: Von Borrel E., 1995) *Neuroendocrin integration of stress and significance of stress for the performance of farm animals. Applied Animal Behaviour Science.*, 44: 219-227.

Dobson H. e Smith R. F., 2000. What is stress and how does it affect reproduction? *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61: 743- 752.

Dobson H. e Smith R. F., 2002. Hormonal interactions within the hypothalamus and pituitari with respect to stress and reproduction in sheep. *Domestic animal Endocrinology*, 23: 75- 85.

Duncan J. H. e Dawkins M. S., 1983. The problem of assessing “well-being” and “suffering” in farm animals. (In: Duncan J. H. e Petherick J. C. *The implication of cognitive processes for animal welfare. J. Anim. Sci.* 1991., 69: 5017-5022).

Duncan J. H. e Petherick J. C., 1991. The implication of cognitive processes for animal welfare., *J. Anim. Sci.*

Duncan J. H., 1993. Welfare is to do with what animals feel. In: Appleby M. C. and Hughes B. O., 1997, *Anim. Welfare. CAB Int.*, U.K.

Fancello M. I., 2005. Risposta comportamentale ed endocrina ad uno stress di modesta intensità indotto dal ritardo di mungitura in bovine in lattazione. Tesi di laurea, Facoltà di Agraria-Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Padova.

Farnè M., 1999. Lo stress. Ed. Il Mulino, Bologna.

Frasson G., 2004. Risposta di adattamento allo stress indotto da variazioni imprevedibili delle modalità di somministrazione degli alimenti nella bovina in lattazione. Tesi di laurea, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Padova.

Friedman S. B, Ader R., Grota L. J. et al., 1967. Plasma corticosterone response to parameters of electric shock in the rat, *Psychosom Med* 24: 323.

Friend H., 1991. Symposium: response of animals to stress. *J. Dairy Sci.* 74: 292-303.

Grandin T., 1997. Assessment of stress during handling and transport. *J. Anim. Sci.*, 75: 249-257.

Grignard L., Boivin X., Boissy A., et al., 2001. Do beef cattle react consistently to different handling situations? *Appl. Anim. Behav. Sci.* 71: 263–276.

Gross, J.J., 1998. The emerging field of emotion regulation: an integrative review. *Review of General Psychology*, vol. 2, No. 3: 271-299.

Gunnar M., 1987. Psychobiological studies of stress and coping: an introduction. *Child development*, 58: 1403-1407.

Guyton A. C., 1991. Blood pressure control-special role of the kidney and body fluids. *Science* 252: 1813-1816.

Guyton A. C. e Hall J. E., 1999. *Fisiologia Medica*. Ed. Edises, Napoli.

Hanson J. D. et al., 1976. The effect of control over high intensity noise on plasma cortisol levels in rhesus monkeys. *Behav. Biol.*, 16: 333-340.

Hemsworth P. H. e Coleman G. J., 1998. *Human-Livestock Interactions: the stockperson and the Productivity and Welfare of Intensively Farmed Animals*, CAB International Ed., Wallingford, U.K.

Hemsworth P. H., Barnett J. L., Hansen C., 1987. The influence of inconsistent handling by humans on the behaviour, growth and corticosteroids of young pigs. *Appl. An.*

Beh. Sci., 17: 245-252.

Hennessy, M. B., 1997. Hypothalamic-pituitary-adrenal responses to brief social separation. *Neur Biobehav Rev*, 21:11–29.

Henry J.P e Stephens P. M., 1977. Stress, Health and Social Environment. A Sociobiologic Approach to Medicine. Topics in Environmental Physiology and Medicine. Springer, New York.

Igbokwe, I. O., 1997. The effects of water deprivation in livestock ruminants: an overview. *Nutr. Abstr. Rev. B Livest. Feeds Feeding* 67: 905–914.

Johannesson T. e Ladewig J., 2000. The effect of irregular feeding times on the behaviour and growth of dairy calves. *Applied Animal Behaviour Science*, 69: 103-111.

Kamphues J., 2000. Water requirement of food producing and companion animals. *Dtsch. Tieraerztl. Wochenschr.* 107: 297–302.

Kandel E.R., Jessell T.M., 1991. Touch in: Principles of neural science. Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T. M., eds), 3: 367-384. Amsterdam, Elsevier.

Kandel E. R., 2002. Genes, synapses, and long term memory. In R. Martin (Chair), The nature of nurture. Symposium conducted at the Nobel Conference, St. Peter, MN.

Kiecolt-Glaser J. K. et al., 1984. Psychosocial modifiers of immunocompetence in medical students. *Psychosom. Med.* 46:7-14. (In: Von Borell E. 1995. Neuroendocrine integration of stress and significance of stress for the performance of farm animals. *Applied Animal Behaviour Science.*, 44:219-227).

Laborit H., 1985. Resumption of contact with the environment after a loss of consciousness. *Soins Psychiatr.*, 54: 35-38.

La Brocca A., 2006. Biochimica e fisiologia della corticale surrenalica (rassegna). *LigandAssay* 11(1).

Ladewig J. e Von Borell E., 1988. Ethological methods alone are not sufficient to measure the impact of environment on animal health and animal well-being. In: Unshelm J., Van Putten G., Zeeb K., Ekesbo I. (Eds.), "Proc. Int. Congr. on Appl. Ethol. Farm Animals", Skara, 95-102.

Lazarus R. S., 1966. Psychological stress and the coping process. McGraw-Hill, New York.

Le Doux J., 1998. The emotional brain, Phoenix.

Levine M. D., 1987. Developmental variations and learning disorders. Cambridge, MA: Educators Publishing Service.

Levine S., Goldman L. e Coover G. D., 1972. Expectancy and pituitari-adrenal system, in Physiology, Emotion and Phychosomatic Illness. R. Porter and J. Knight, Ed., Elsevier, Amsterdam.

Little W, Sansom B. F., Manston R, et al., 1984. Effects of restricting the water intake of dairy cows upon their milk yield, body weight and blood composition. Anim. Prod., 22: 329-339.

Manser C. E., 1992. The Assessment of Stress in Laboratory Animals. RSPCA, Horsham.

Mason J. W., 1968. A review of psychoendocrine research on pituitary-adrenal cortical system. Psychosom Med, 30:576-607.

Mason J. W., 1975. A historical view of the stress field I. J Hum. Stress 1: 6-12.

Mason J. W. e Mendl M., 1993. Why is there no simple way of measuring animal welfare? Animal Welfare 2: 302-319.

McGlone J. J. 1993. What is animal welfare? "J. Agr. Environm. Ethics", 6 (Suppl. 2), 26-36.

Mendoza S. P. e Mason W.A., 1986. Contrasting responses to intruders and to involuntary separation by monogamous and polygynous New World monkeys. Physiol Behav 38: 795-801.

Mineka S. e Kihlstrom J. K., 1978. Unpredictable and uncontrollable events: a new perspective on experimental neurosis. *J. Abnorm. Psychol.*, 87: 256-271.

Mineka S., Gunnar M. e Champoux M., 1986. Control and early socioemotional development: infant rhesus monkeys reared in controllable versus uncontrollable environments. *Child Dev.*, 57: 1241-1256.

Mishkin M., e Appenzeller T., 1987. The anatomy of memory. *Scientific Am.*, 256:62-71.

Moberg G. P., 1985. Biological response to stress: key to assesment of animal well-being? In *Animal Stress* (ed. G.P. Moberg), American Physiological Society, Bethesda, Maryland, 27: 49.

Molinari C., Petrera F., 2007. L'alimentazione delle bovine da latte. *Agricoltura*, 98: 98, 101.

Moreira A. C. e T. Krieger D. T., 1982. The effects of subdiaphragmatic vagotomy on circadian corticosterone rhythmicity in rats with continuous or restricted food access. *Physiology & Behavior*, 28: 787-790.

Morton D. B., Griffiths P. H. M., 1985. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and hypothesis for assessment. *Vet. Res.*116: 431-436.

Mousa H. M., Ali K. E. e Hume I. D., 1983. Effect of water deprivation on urea metabolism in camels, desert sheep and desert goats fed dry desert grass. *Comparative Biochemistry and Physiology* 74: 715-720.

Muir J. L. e Pfister H.P., 1987. Time course of the corticosterone and prolactin response following predictable and unpredictable novelty stress in *Rattus norvegicus*. *Physiology and Behavior*, 40: 103–107.

Munk A., Guyre P., e Holbrook N., 1984. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr. Rev.* 5:25. (In: Minton J. E. e Blecha F., 1990. Effect of acute stressors on endocrinological and immunological functions in lambs. *J. Anim. Sci.*, 68: 3145-3151).

Poli G. e Coccilovo A., 2002. Microbiologia e immunologia veterinaria. Ed. UTET, Torino., 33: 662.

Rossi P. e Gastaldo A., 2005. Dossier/ L'acqua di bevanda negli allevamenti. Centro Ricerche Produzioni Animali, Reggio Emilia.

Rushen J., 1991. Problems associated with the interpretation of physiological data in the assessment of animal welfare. *Appl. An. Beh. Sci*, 28: 381-386.

Sapolsky R., 1992. Neuroendocrinology of the stress response. *Behavioral endocrinology*, 287-324.

Sapsee A. T., 1997. Cortisol, high cortisol diseases and anti-cortisol therapy. *Psychoneuroendocrinology*, 22: 3-10.

Selye H., 1946. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *Journal of Clinical Endocrinology.*, 6: 117-230.

Scheurink A. J. W., Steffens A. B. et al., 1989. Adrenal and sympathetic catecholamines in exercising rats. *American Journal of Physiology*, 256: 155-161.

Schrader L., 2002. Consistency of individual behavioural characteristics of dairy cows in their home pen, *Applied Animal Behaviour Science*, 77: 255.

Silanikove N., 1992. Effects of water scarcity and hot environment on appetite and digestion in ruminants: a review. *Livestock Production Science* 30: 175-194.

Silanikove N. e Tadmor A., 1989. Rumen volume, saliva flow rate, and systemic fluid homeostasis in dehydrated cattle, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 256: 809-815.

Singer P., 1977. *Animal Liberation*. Avon Books, New York.

Sonnenfeld G., Mandel A. D., Konstantinova I. V. et al., 1992. Spaceflight alters immune cell function and distribution *Journal of Applied Physiology*, 73, issue 2: 191-195.

Stephan F. K., 1986. Coupling between feeding- and light-entrainable circadian pacemakers in the rat, *Physiology & Behavior*, 38: 537-544.

Trunkfield H. R., Broom D. M., Maatje K. et al., 1991. Effects of housing on responses of veal calves to handling and transport. In: Metz J. H. M. and Groenenstein (Eds.): "New Trends in Veal Calves Production". EAAP Publ., The Netherlands, 40-43.

Vale W., Spiess J., Rivier C., Rivier J., 1981. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotrophin and beta-endorphin. *Science* 213: 1394-1397.

Verga M., Carenzi C., 1998. Interazione con l'uomo, reazioni di "timore" e effetti negli animali da reddito. *Large Animals Review*, 4, (4-5), 5-10.

Verga M. e Ferrante V., 2001. Il benessere degli animali. *Bioagricoltura.*, 70: 28-31.

Verga M., Le Neidre P., Moyanagh J., 1999. Valutazione scientifica del "benessere" nelle specie zootecniche: ricerca ed applicazioni nell'allevamento. Atti del convegno: Convegno Nazionale Parliamo di ...benessere e allevamento animale Fossano, 14-15 ottobre 1999.

Von Borrel E., 1995. Neuroendocrine integration of stress and significance of stress for the performance of farm animals. *Applied Animal Behaviour Science.*, 44: 219-227.

Von Borrel E., 2000. Stress and coping in farm animals. *Archives of animal breeding.*, 43: 144-152.

Weiss L., 1972. Psychological factors in stress and disease, *Scientific American*, June, 1972, reprinted in Atkinson and Atkinson (Eds) *Mind and Behaviour*, Freeman, San Francisco, 1980.

7. APPENDICE

Tabella 1 (a, b, c, d, e, f): Medie quadrate, F, p, delle variabili box, soggetto, settimana, giorno e ora e loro rapporti in relazione ai comportamenti osservati nelle bovine, durante la sperimentazione.

	R _s			R _d			I _s		
	MEDIA Q	F	P	MEDIA Q	F	P	MEDIA Q	F	P
BOX (B)	2,45	0,54	0,6661	19,12	0,92	0,7219	10,92	3,9	0,4344
SOGGETTO	12,4	2,76	0,0023	142,64	6,89	0,0001	16,46	5,89	0,001
SETTIMANA (W)	22,3	4,96	0,0006	86,01	4,15	0,0024	49,92	17,85	0,001
GIORNO (D)	24,7	5,49	0,0042	35,92	1,73	0,1769	3,2	1,14	0,3185
ORA (H)	526,86	117,2	0,0001	549,15	26,51	0,0001	61,64	22,04	0,0001
B*W	1,29	0,29	0,8868	17,01	0,82	0,5116	11,97	4,28	0,0019
B*D	7,25	1,61	0,1999	38,6	1,86	0,1555	0,012	0	0,9958
W*D	5,88	1,31	0,2345	42,62	2,06	0,037	5,44	1,95	0,0499
B*W*D	10,05	2,24	0,0227	24,6	1,19	0,3025	9,14	3,27	0,0011
B*H	5,85	1,3	0,2386	59	2,85	0,0038	4,8	1,72	0,0897
W*H	27,04	6,02	0,0001	26,67	1,29	0,1316	10,66	3,81	0,0001
B*W*H	3,81	0,85	0,709	14,07	0,68	0,9127	4,15	1,48	0,0409
D*H	5,29	1,18	0,2791	37,82	1,83	0,0236	4,6	1,64	0,0516
W*D*H	7,021	1,56	0,0036	43,07	2,08	0,0001	5,77	2,07	0,0001
B*D*H	3,79	0,84	0,6363	27,53	1,33	0,1707	4,88	1,75	0,0333
B*W*D*H	4,61	1,03	0,4229	19,96	0,96	0,559	3,68	1,32	0,0503

Tabella 1. a

	I _d			Movim			F		
	MEDIA Q	F	P	MEDIA Q	F	P	MEDIA Q	F	P
BOX (B)	139,86	12,74	0,079	6,93	4,82	0,0905	108,89	6,1	0,4583
SOGGETTO	36,57	3,33	0,0003	1,98	1,37	0,1861	182,95	10,25	0,0001
SETTIMANA (W)	80,78	7,36	0,0001	8,88	6,18	0,0001	97,71	5,48	0,0002
GIORNO (D)	43,09	3,92	0,02	3,51	2,44	0,0873	37,27	2,09	0,1242
ORA (H)	193,67	17,64	0,0001	17,33	12,05	0,0001	2740,84	153,63	0,0001
B*W	21,12	1,92	0,1041	5,99	4,17	0,0023	12,28	0,69	0,5998
B*D	2,94	0,27	0,7653	10,46	7,27	0,0007	15,87	0,89	0,411
W*D	82,2	7,49	0,0001	4,47	3,11	0,0017	55,5	3,11	0,0017
B*W*D	7,63	0,69	0,6965	3,22	2,24	0,0224	17,73	0,99	0,4388
B*H	31,22	2,84	0,0039	0,89	0,62	0,7625	102,47	5,74	0,0001
W*H	17,79	1,62	0,0161	1,95	1,36	0,0882	55,17	3,09	0,0001
B*W*H	8,05	0,73	0,8609	2,5	1,74	0,0068	16,22	0,91	0,6138
D*H	29,01	2,64	0,0004	1,77	1,23	0,2362	84,54	4,74	0,0001
W*D*H	15,97	1,45	0,0124	2,04	1,42	0,018	57,97	3,25	0,0001
B*D*H	14,5	1,32	0,1757	2,79	1,94	0,0139	28,68	1,61	0,0597
B*W*D*H	10,54	0,96	0,567	1,95	1,36	0,0346	17,24	0,97	0,5535

Tabella 1.b

	B			Att_strutt			Att_sogg		
	MEDIA Q	F	P	MEDIA Q	F	P	MEDIA Q	F	P
BOX (G)	10,59	31,61	0,023	0,3	2,88	0,3728	1,25	5,33	0,1892
SOGGETTO	1,47	4,4	0,0001	0,34	3,31	0,0003	0,63	2,68	0,003
SETTIMANA (W)	0,5	1,48	0,2051	0,21	2,03	0,0874	0,83	3,56	0,0067
GIORNO (D)	2,04	6,1	0,0023	0,28	2,76	0,0638	0,33	1,4	0,2472
ORA (H)	4,92	14,68	0,0001	1,02	9,84	0,0001	1,33	5,68	0,0001
B*W	0,25	0,75	0,5595	0,06	0,63	0,6381	0,44	1,87	0,1138
B*D	0,09	0,29	0,7489	0,17	1,65	0,1925	0,38	1,64	0,1942
W*D	0,43	1,27	0,2528	0,17	1,64	0,1088	0,19	0,81	0,5961
B*W*D	0,48	1,44	0,1741	0,31	3,02	0,0023	0,13	0,55	0,8194
B*H	1,64	4,89	0,0001	0,31	3,02	0,0023	0,41	1,73	0,0863
W*H	0,4	1,2	0,2059	0,18	1,71	0,0082	0,23	0,97	0,5218
B*W*H	0,45	1,36	0,0876	0,16	1,57	0,0226	0,3	1,28	0,1381
D*H	0,55	1,66	0,0487	0,19	1,85	0,0209	0,33	1,42	0,1223
W*D*H	0,56	1,68	0,0008	0,2	1,89	0,0001	0,27	1,14	0,2115
B*D*H	0,17	0,52	0,9364	0,17	1,68	0,0438	0,3	1,3	0,1898
B*W*D*H	0,41	1,22	0,1218	0,21	2,05	0,0001	0,28	1,19	0,1488

Tabella 1.c

	Puliz			Agon			Expl_pass		
	MEDIA Q	F	P	MEDIA Q	F	P	MEDIA Q	F	P
BOX (B)	10,11	22,25	0,1394	1,04	12,02	0,0122	0,02	0,14	0,8274
SOGGETTO	3,92	8,63	0,0001	0,11	1,29	0,2318	0,44	2,8	0,002
SETTIMANA (W)	1,4	3,09	0,0152	0,31	3,55	0,0069	0,3	1,9	0,1079
GIORNO (D)	0,01	0,03	0,9666	0,1	1,12	0,3282	0,09	0,59	0,5558
ORA (H)	6,35	13,97	0,0001	0,16	1,85	0,0642	23,08	145,49	0,0001
B*W	0,31	0,69	0,5957	0,38	4,44	0,0014	0,29	1,88	0,1113
B*D	0,53	1,16	0,3143	0,002	0,03	0,9718	0,41	2,6	0,0744
W*D	3,35	7,38	0,0001	0,18	2,15	0,0287	1,53	9,66	0,0001
B*W*D	1,28	2,83	0,0041	0,06	0,65	0,7323	0,15	0,96	0,4665
B*H	0,54	1,2	0,297	0,04	0,45	0,8897	0,88	5,58	0,0001
W*H	0,45	1	0,4635	0,1	1,26	0,1542	0,6	3,83	0,0001
B*W*H	0,43	0,95	0,547	0,09	1,02	0,4411	0,19	1,19	0,2161
D*H	0,33	0,72	0,7757	0,09	1,11	0,3425	0,4	2,5	0,0009
W*D*H	0,8	1,77	0,0002	0,1	1,18	0,1624	0,79	5,01	0,0001
B*D*H	0,37	0,82	0,6664	0,09	1,08	0,367	0,26	1,62	0,0572
B*W*D*H	0,58	1,29	0,0652	0,07	0,86	0,7704	0,25	1,58	0,0029

Tabella 1.d

	Vocal			eliminaz			TP		
	MEDIA Q	F	P	MEDIA Q	F	P	MEDIA Q	F	P
BOX (B)	2,53	34,21	0,3221	0,005	0,12	0,8029	1,67	15,28	0,3579
SOGGETTO	2,33	31,53	0,0001	0,08	1,75	0,0647	1,8	16,45	0,0001
SETTIMANA (W)	0,15	2,08	0,0817	0,01	0,31	0,8734	0,35	3,18	0,013
GIORNO (D)	0,02	0,3	0,7404	0,04	0,93	0,3933	0,97	0,89	0,412
ORA (H)	0,14	1,9	0,0566	0,11	2,42	0,0135	0,42	3,81	0,0002
B*W	0,13	1,83	0,1215	0,08	1,59	0,1755	0,29	2,66	0,0311
B*D	0,03	0,43	0,6478	0,07	1,5	0,2242	0,08	0,72	0,448
W*D	0,06	0,82	0,5825	0,1	2,05	0,0375	0,1	0,89	0,5204
B*W*D	0,06	0,81	0,5936	0,05	1,05	0,3968	0,16	1,43	0,1787
B*H	0,12	1,64	0,1081	0,1	0,6	0,7747	0,23	2,13	0,0301
W*H	0,05	0,74	0,8576	0,04	0,82	0,7541	0,1	0,87	0,6795
B*W*H	0,06	0,76	0,8325	0,09	1,82	0,0035	0,1	0,94	0,5562
D*H	0,05	0,66	0,8371	0,03	0,73	0,7624	0,07	0,62	0,8698
W*D*H	0,09	1,17	0,1754	0,05	1,15	0,1993	0,08	0,76	0,9167
B*D*H	0,06	0,79	0,6968	0,09	1,81	0,0249	0,05	0,5	0,9476
B*W*D*H	0,08	1,13	0,2259	0,05	1,06	0,3525	0,08	0,75	0,9322

Tabella 1 e.

	Tosse			Tot_d			Tot_s		
	MEDIA Q	F	P	MEDIA Q	F	P	MEDIA Q	F	P
BOX (B)	0,16	12,07	0,0047	78,67	2,78	0,6199	84,96	2,99	0,6086
SOGGETTO	0,01	0,92	0,5099	300,36	10,61	0,0001	303,1	10,7	0,0001
SETTIMANA (W)	0,01	1,13	0,34	180,42	6,37	0,0001	183,18	6,45	0,0001
GIORNO (D)	0,02	1,32	0,2675	53,37	1,88	0,1523	48,31	1,7	0,1831
ORA (H)	0,04	1,92	0,0533	1353,13	47,74	0,0001	1384,8	48,73	0,0001
B*W	0,001	2,88	0,0218	56,68	2	0,092	61,84	2,18	0,0695
B*D	0,01	0,75	0,4705	52,28	1,85	0,1583	55,87	1,97	0,1404
W*D	0,01	1,03	0,4145	126,53	4,47	0,0001	125,31	4,41	0,0001
B*W*D	0,03	0,93	0,4895	54,75	1,93	0,0516	54,79	1,93	0,0523
B*H	0,01	2,2	0,0248	112,04	3,96	0,0001	117,02	4,12	0,0001
W*H	0,02	1,18	0,2216	44,62	1,58	0,0221	43,88	1,54	0,0273
B*W*H	0,01	1,23	0,1761	15,95	0,56	0,9769	17,01	0,6	0,9632
D*H	0,01	0,95	0,512	68,12	2,41	0,0014	65,36	2,3	0,0025
W*D*H	0,01	0,92	0,6568	55,12	1,95	0,0001	55,44	1,95	0,0001
B*D*H	0,008	0,6	0,8896	47,8	1,69	0,0429	47,89	1,69	0,0433
B*W*D*H	0,01	1,04	0,3985	18,38	0,65	0,9855	18,79	0,66	0,9818

Tabella 1.f

Tabella 2 (a, b) Valori delle medie dei minimi quadrati elaborati con il test della GLM, suddivisi per box, giorno, settimana di sperimentazione e variabile comportamentale.

Taballe 2.a

		BOX 1			BOX 2		
		martedì	giovedì	sabato	martedì	giovedì	sabato
R_s	WEEK1	1,98	1,2	0,78	1,68	1,28	0,67
	WEEK2	0,78	0,48	1,54	1,24	1,2	0,35
	WEEK3	0,72	1,11	0,42	0,76	0,54	0,17
	WEEK4	1,78	0,87	1,18	1,05	1,33	1,2
	WEEK5	1,39	0,8	0,68	0,94	1,05	1,07
R_d	WEEK1	5,54	3,44	3,22	4,41	2,26	3,09
	WEEK2	3,18	2,39	0,96	2,67	1,48	3,8
	WEEK3	3,13	3,59	3,46	2,67	3,15	3,63
	WEEK4	3,72	2,98	3,59	3,26	2,78	3,31
	WEEK5	2,07	3,18	2,87	2,55	2,81	2,22
Is	WEEK1	0,13	0,48	0,7	0,61	0,46	0,59
	WEEK2	0,91	1,41	2,18	0,8	1,48	0,89
	WEEK3	0,52	0,52	0,09	0,92	0,37	0,87
	WEEK4	0,37	0,46	0,42	0,57	0,54	0,78
	WEEK5	1,48	0,57	0,65	1,31	1,37	1,8
Id	WEEK1	0,17	1,8	1,83	0,46	1,8	2,54
	WEEK2	3,05	1,09	0,65	3,92	1,68	2,52
	WEEK3	1,33	1,59	2,76	1,67	2,24	3,81
	WEEK4	1,3	1,24	1,44	2,31	2,55	2,01
	WEEK5	0,72	0,83	1,81	0,33	1,39	1,18
Movim	WEEK1	0,57	0,65	0,87	1,02	0,57	0,91
	WEEK2	0,83	0,89	2,13	0,85	0,96	0,81
	WEEK3	0,52	0,72	0,74	0,98	0,74	0,54
	WEEK4	1	1,39	1,09	0,72	0,76	0,7
	WEEK5	0,5	0,9	0,78	0,54	0,96	0,55
F	WEEK1	6,07	6,5	6,12	5,87	7,26	5,67
	WEEK2	5	7,98	6,67	4,59	6,57	5,81
	WEEK3	7,41	6,48	6,91	6,67	6,57	4,85
	WEEK4	5,41	6,09	5,41	5,63	5,44	5,63
	WEEK5	7,48	7,7	7,17	7,83	6,09	7,13
B	WEEK1	0,17	0,2	0,13	0,41	0,43	0,33
	WEEK2	0,17	0,13	0,05	0,26	0,39	0,17
	WEEK3	0,15	0,17	0,09	0,5	0,33	0,2
	WEEK4	0,18	0,35	0,2	0,3	0,33	0,37
	WEEK5	0,44	0,11	0,07	0,37	0,44	0,22
Att_strutt	WEEK1	0,04	0,02	0	0,05	0,02	0,09
	WEEK2	0,09	0	0,11	0	0,22	0,37
	WEEK3	0	0	0,02	0,09	0,03	0,03
	WEEK4	0,22	0,07	0	0,07	0,05	0,11
	WEEK5	0,11	0	0,02	0,18	0,05	0,04
Att_sogg	WEEK1	0,04	0,02	0,05	0,17	0,07	0,07
	WEEK2	0,13	0,17	0,15	0,09	0,11	0,04
	WEEK3	0,18	0,3	0,17	0,07	0,11	0,07
	WEEK4	0,18	0,41	0,15	0,15	0,17	0,18
	WEEK5	0,11	0,24	0,22	0,11	0,09	0,17
Pul	WEEK1	0,15	0,48	0,83	0,09	0,31	0,48
	WEEK2	0,43	0,17	0,24	0,17	0,18	0,22
	WEEK3	0,81	0,24	0,22	0,24	0,3	0,31
	WEEK4	0,57	0,68	0,28	0,31	0,33	0,15
	WEEK5	0,26	0,44	0,41	0,26	0,24	0,24

		BOX 1			BOX 2		
		martedì	giovedì	sabato	martedì	giovedì	sabato
Agon	WEEK1	0	0	0,2	0,02	0,04	0,04
	WEEK2	0,05	0,09	0,07	0,02	0,09	0,04
	WEEK3	0	0,02	0	0,02	0,04	0,05
	WEEK4	0	0	0,04	0,2	0,07	0,24
	WEEK5	0	0,07	0	0,04	0,18	0,04
Expl_pass	WEEK1	0,15	0,13	0,41	0,15	0,26	0,33
	WEEK2	0,24	0,18	0,18	0,17	0,2	0,05
	WEEK3	0,18	0,15	0,04	0,2	0,22	0,24
	WEEK4	0,17	0,39	0,11	0,18	0,44	0,07
	WEEK5	0,31	0,04	0,28	0,28	0,11	0,15
Vocal	WEEK1	0	0	0	0,05	0,09	0,07
	WEEK2	0	0	0	0,05	0,02	0,05
	WEEK3	0	0	0	0,11	0,22	0,05
	WEEK4	0	0	0,02	0,15	0,09	0,11
	WEEK5	0	0	0	0	0,05	0,05
Elimin	WEEK1	0	0,05	0,02	0	0,13	0,02
	WEEK2	0,09	0,02	0,04	0,07	0,05	0,02
	WEEK3	0,04	0,09	0,02	0,04	0,04	0,07
	WEEK4	0,04	0,02	0,04	0,05	0,05	0,07
	WEEK5	0,11	0,07	0,04	0,02	0	0,04
TP	WEEK1	0	0	0	0	0,02	0,05
	WEEK2	0,04	0	0,02	0,02	0,28	0,17
	WEEK3	0	0,02	0,05	0,02	0,05	0,05
	WEEK4	0	0	0,02	0,02	0,02	0,04
	WEEK5	0	0,02	0	0,18	0,11	0,09
T	WEEK1	0	0,02	0	0	0	0,04
	WEEK2	0	0	0	0,07	0,05	0,02
	WEEK3	0	0	0	0,04	0,04	0,02
	WEEK4	0	0,04	0	0	0,02	0
	WEEK5	0	0	0	0,04	0,2	0
Tot_d	WEEK1	5,72	5,26	5,18	4,98	4,31	5,91
	WEEK2	6,31	3,54	1,61	6,76	3,24	6,48
	WEEK3	4,54	5,35	6,39	4,44	5,67	7,66
	WEEK4	5,04	4,48	5,11	5,78	5,74	5,39
	WEEK5	2,8	4,09	4,85	2,89	4,3	3,5
Tot_s	WEEK1	9,26	9,59	9,74	10	10,6	9
	WEEK2	8,67	11,42	13,37	8,2	11,72	8,4
	WEEK3	10,42	9,61	8,61	10,39	9,13	7,26
	WEEK4	9,91	10,5	9,8	9,17	9,41	9,52
	WEEK5	12,17	10,67	10,13	12,07	10,67	11,46

Tabella 2.b

Di seguito vengono riportati i grafici delle medie dei minimi quadrati (figura da 1 a 18).

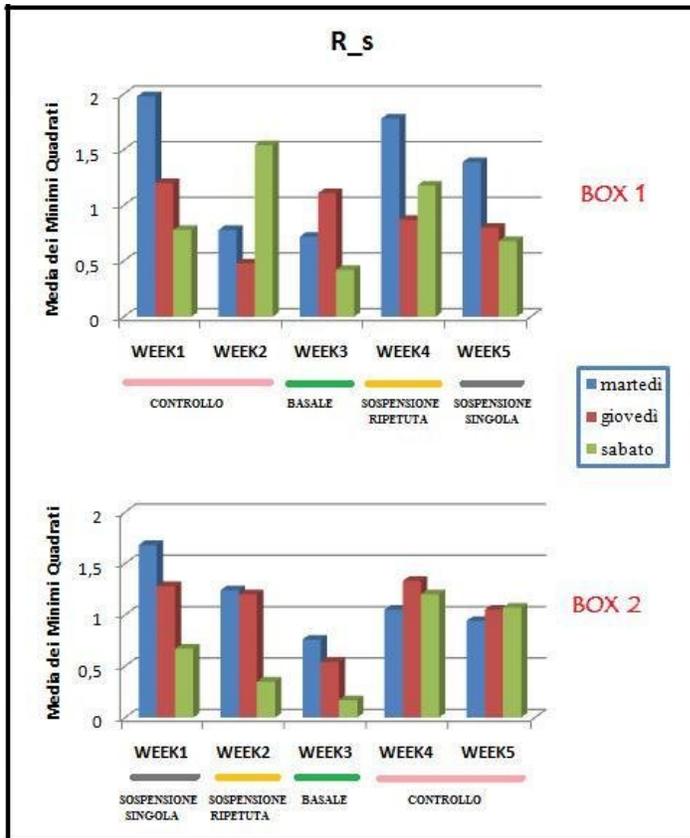


Figura 1. Medie dei minimi quadrati relative alla variabile “Ruminazione in stazione” nei due box, nelle 5 settimane di sperimentazione.

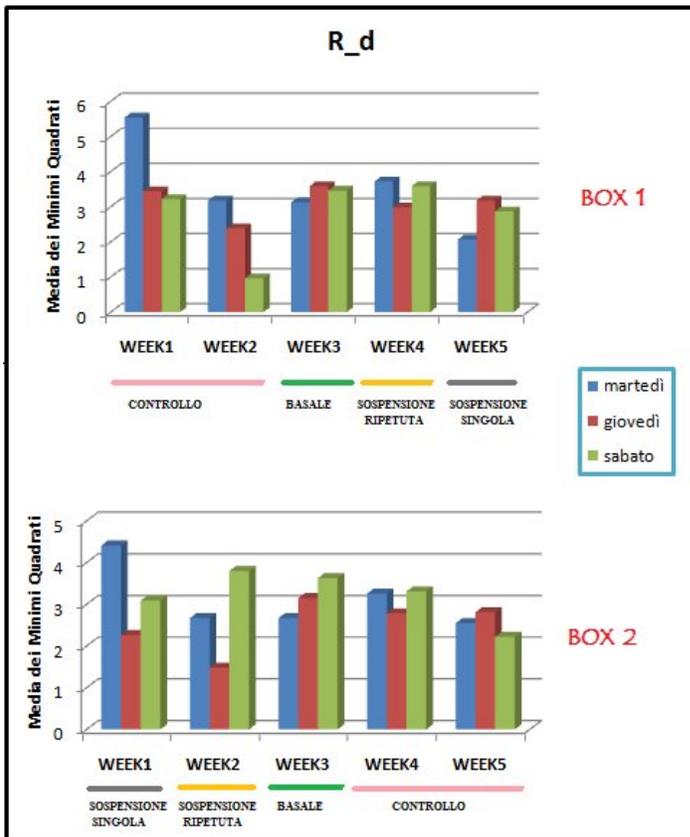


Figura 2. Medie dei minimi quadrati relative alla variabile “Ruminazione in decubito” nei due box, nelle 5 settimane di sperimentazione.

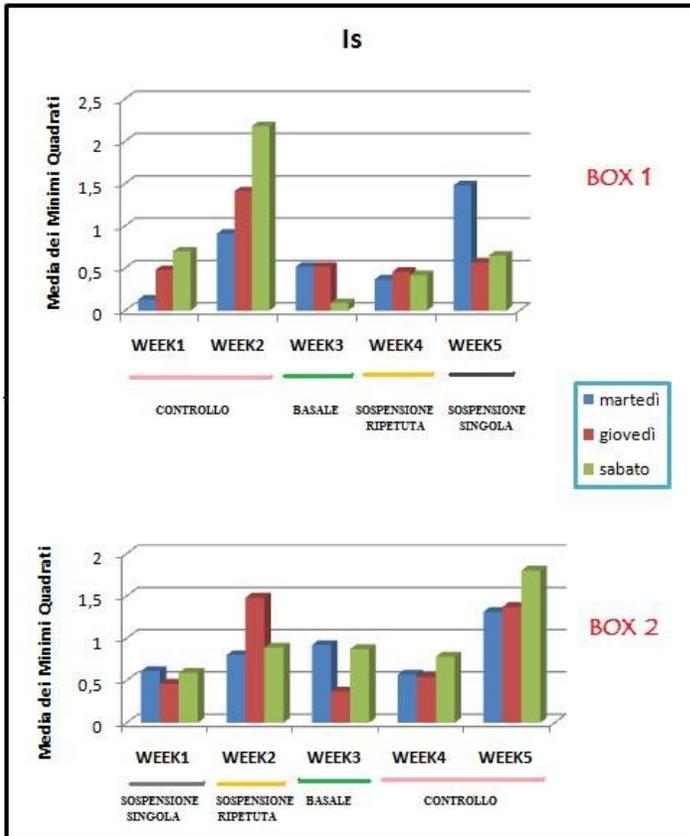


Figura 3. Medie dei minimi quadrati relative alla variabile “Inattività in stazione” nei due box, nelle 5 settimane di sperimentazione.

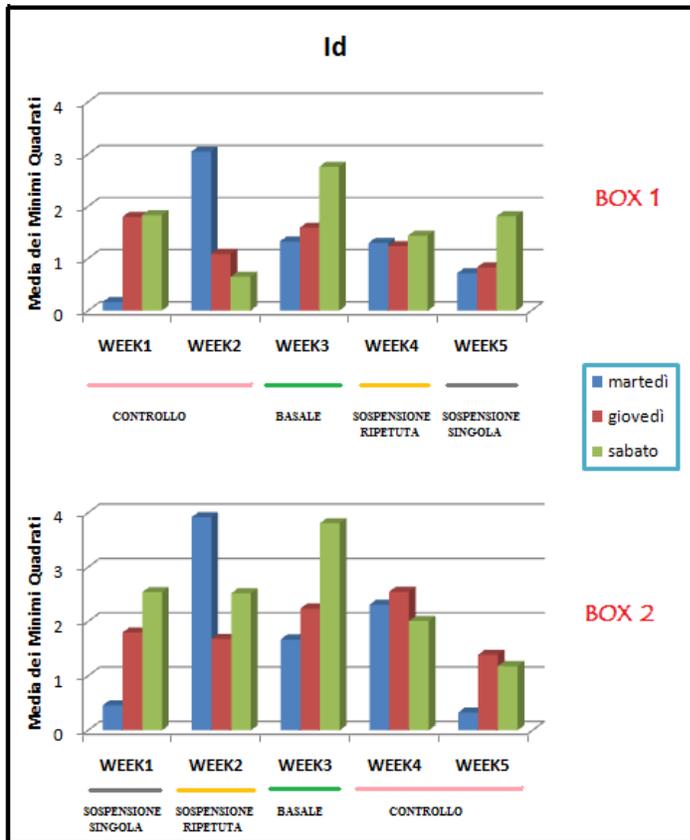


Figura 4. Medie dei minimi quadrati relative alla variabile “Inattività in decubito” nei due box, nelle 5 settimane di sperimentazione.

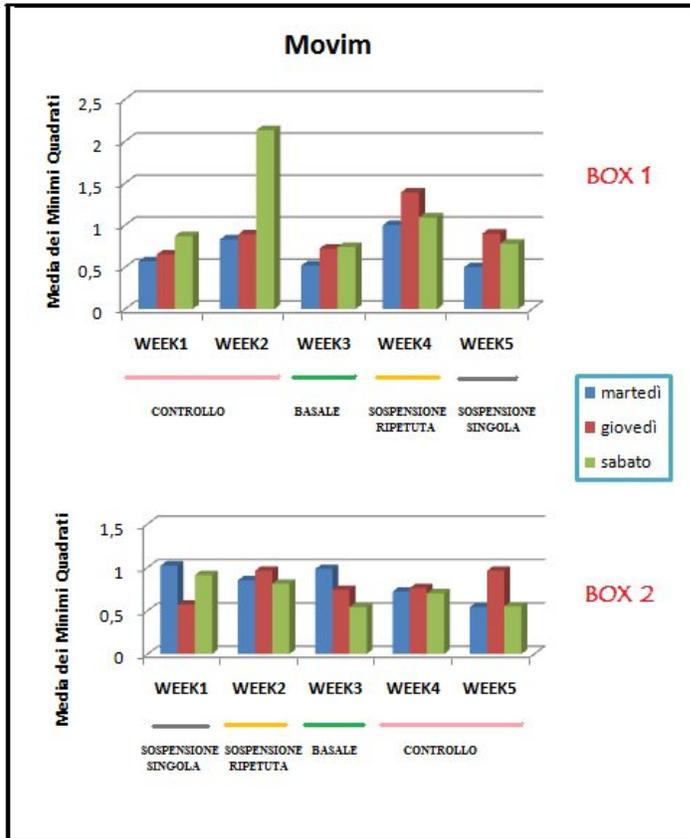


Figura 5. Medie dei minimi quadrati relative alla variabile “Movimento” nei due box, nelle 5 settimane di sperimentazione.

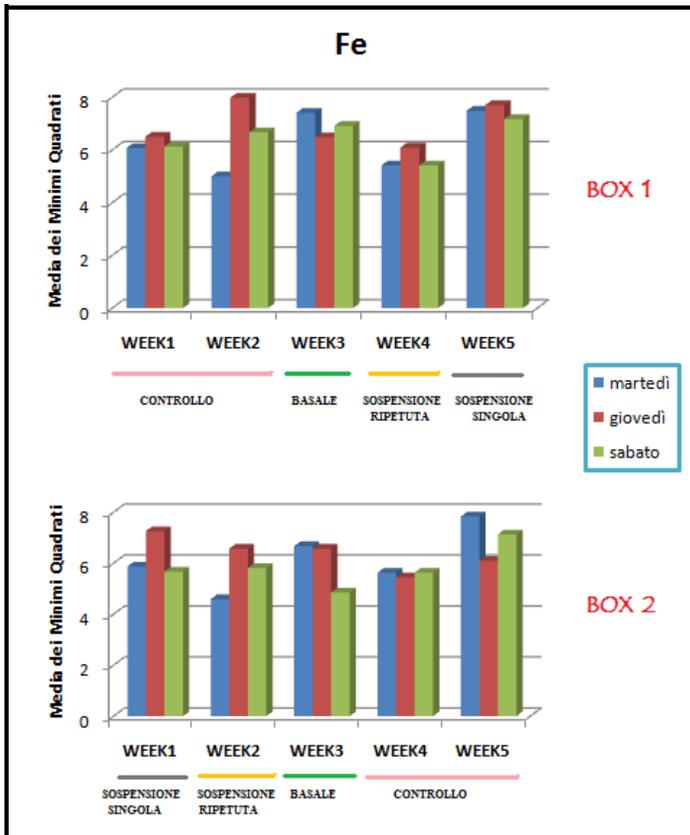


Figura 6. Medie dei minimi quadrati relative alla variabile “Alimentazione” nei due box, nelle 5 settimane di sperimentazione.

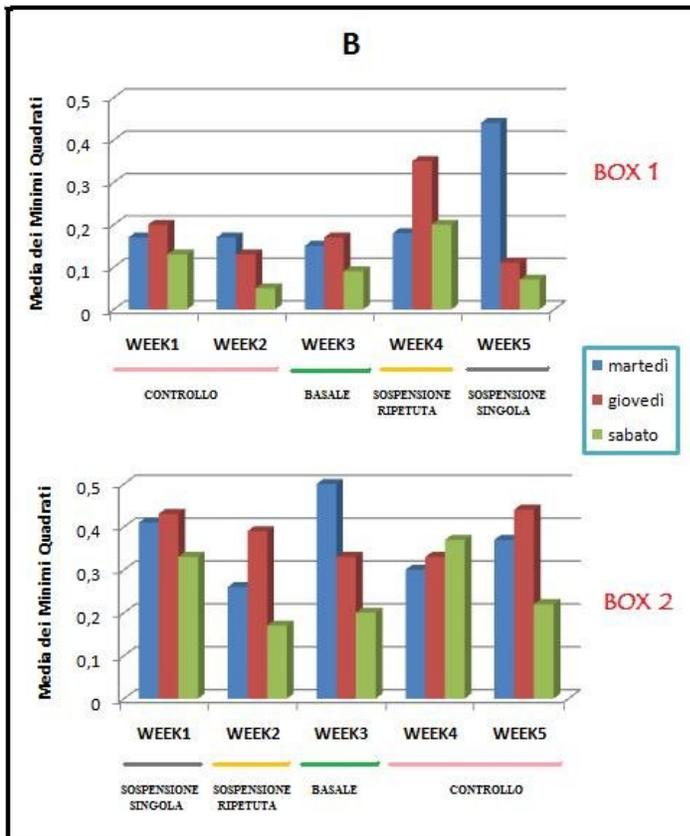


Figura 7. Medie dei minimi quadrati relative alla variabile “Bere” nei due box, nelle 5 settimane di sperimentazione.

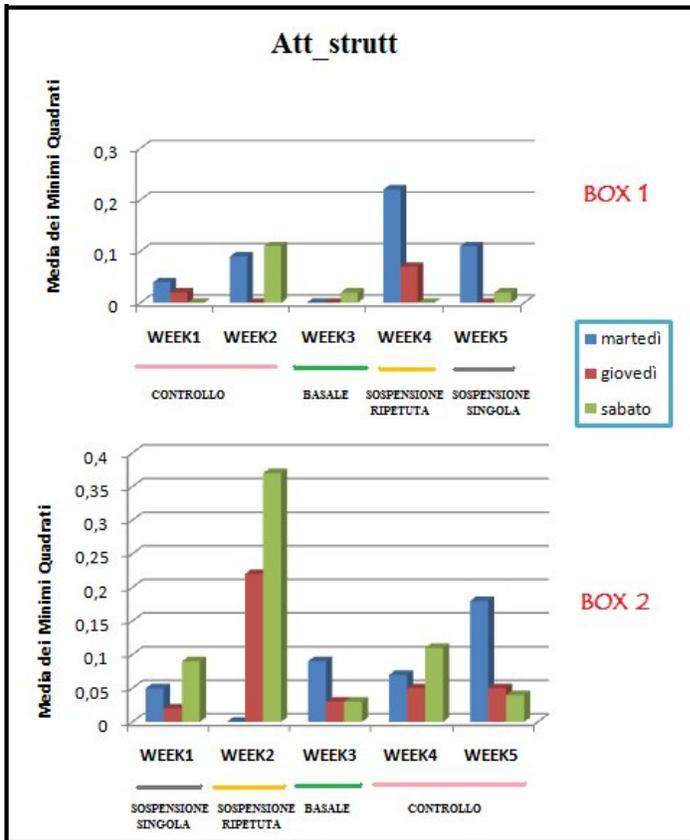


Figura 8. Medie dei minimi quadrati relative alla variabile “Attività verso strutture” nei due box, nelle 5 settimane di sperimentazione.

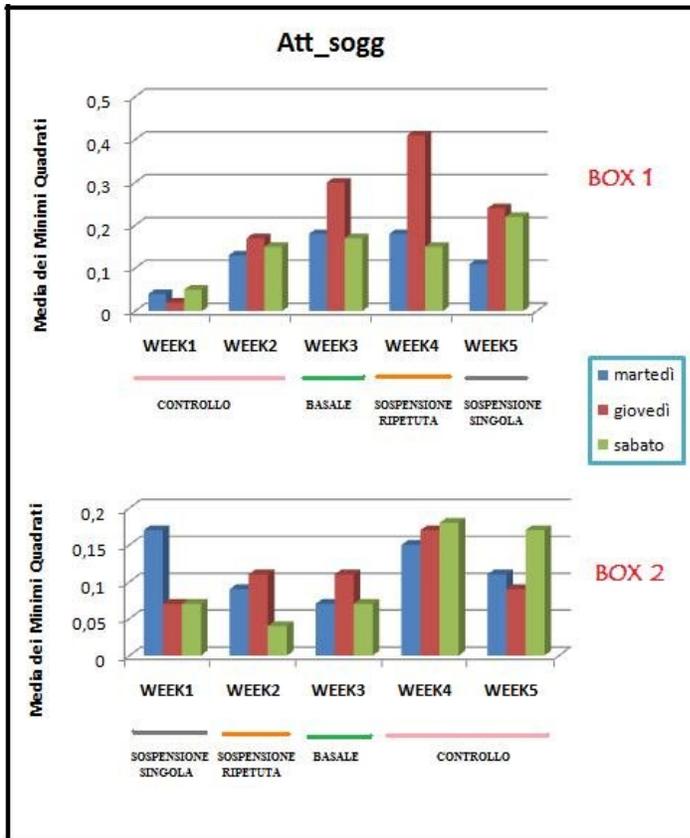


Figura 9. Medie dei minimi quadrati relative alla variabile “Attività verso altri soggetti” nei due box, nelle 5 settimane di sperimentazione.

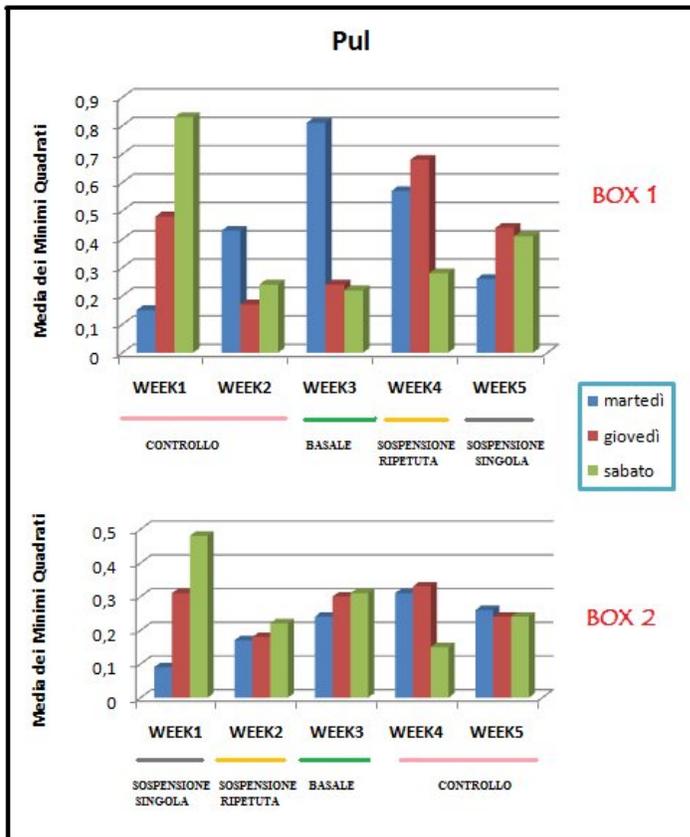


Figura 10. Medie dei minimi quadrati relative alla variabile “Pulizia” nei due box, nelle 5 settimane di sperimentazione.

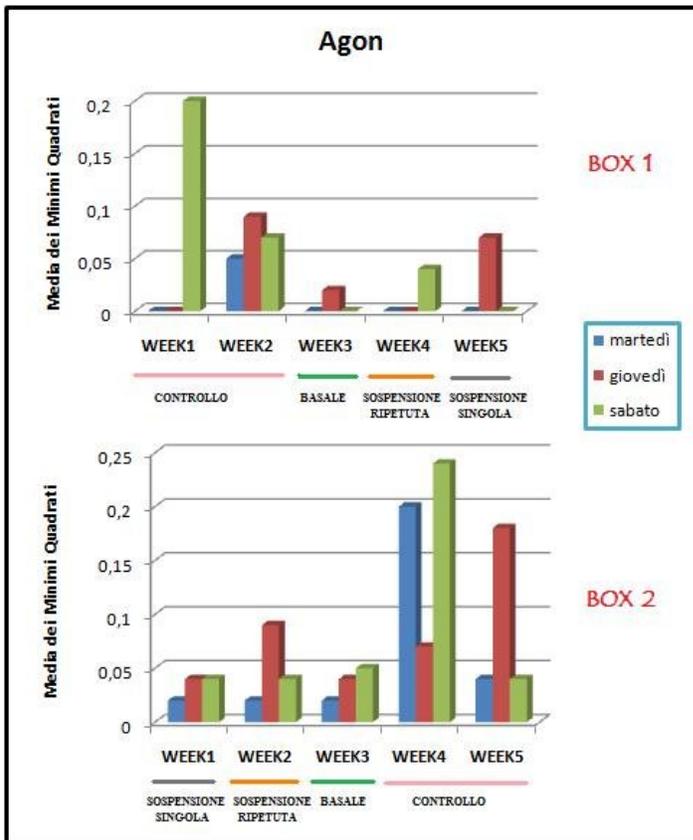


Figura 11. Medie dei minimi quadrati relative alla variabile “Agonismo” nei due box, nelle 5 settimane di sperimentazione.

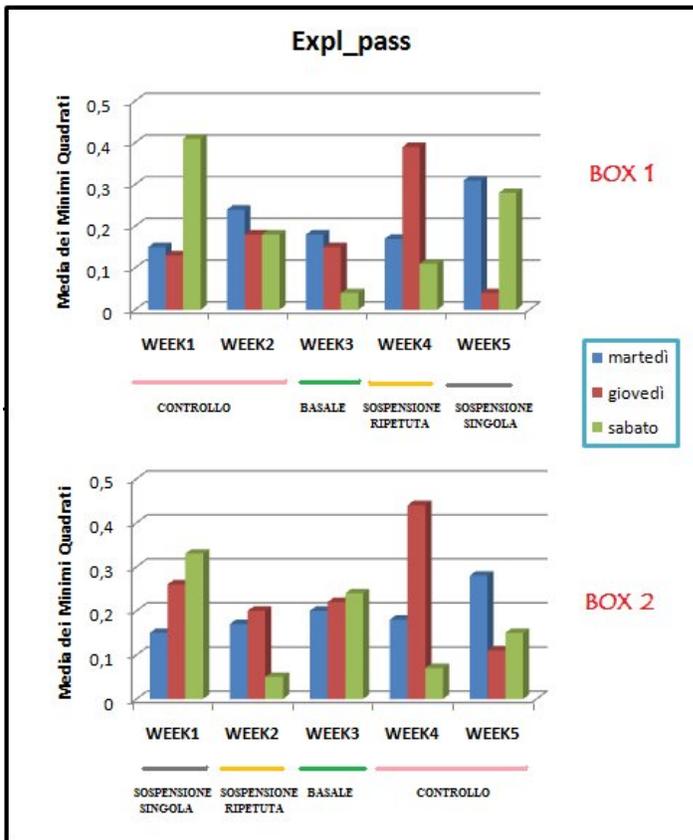


Figura 12. Medie dei minimi quadrati relative alla variabile “Esplorazione passiva” nei due box, nelle 5 settimane di sperimentazione.

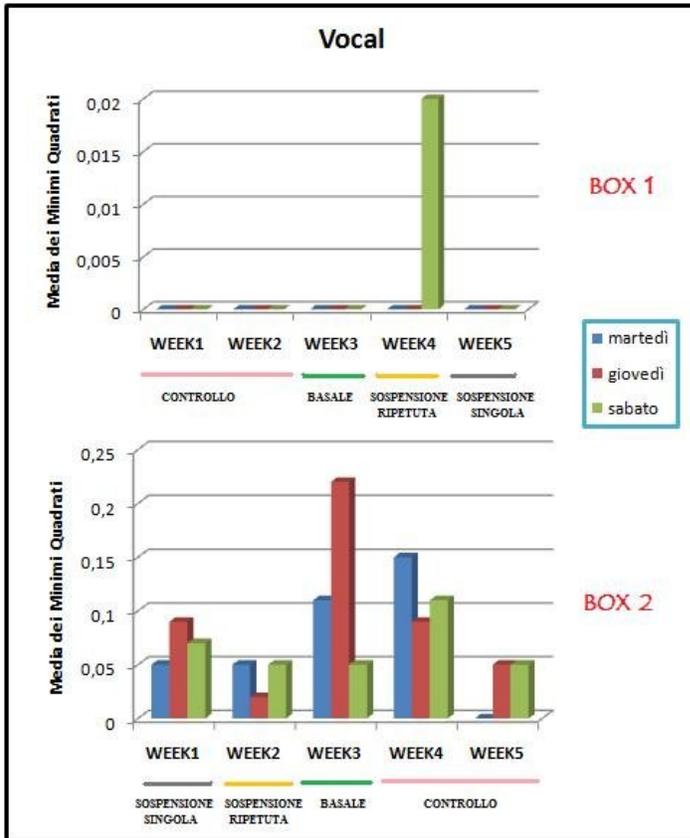


Figura 13. Medie dei minimi quadrati relative alla variabile “Vocalizzare” nei due box, nelle 5 settimane di sperimentazione.

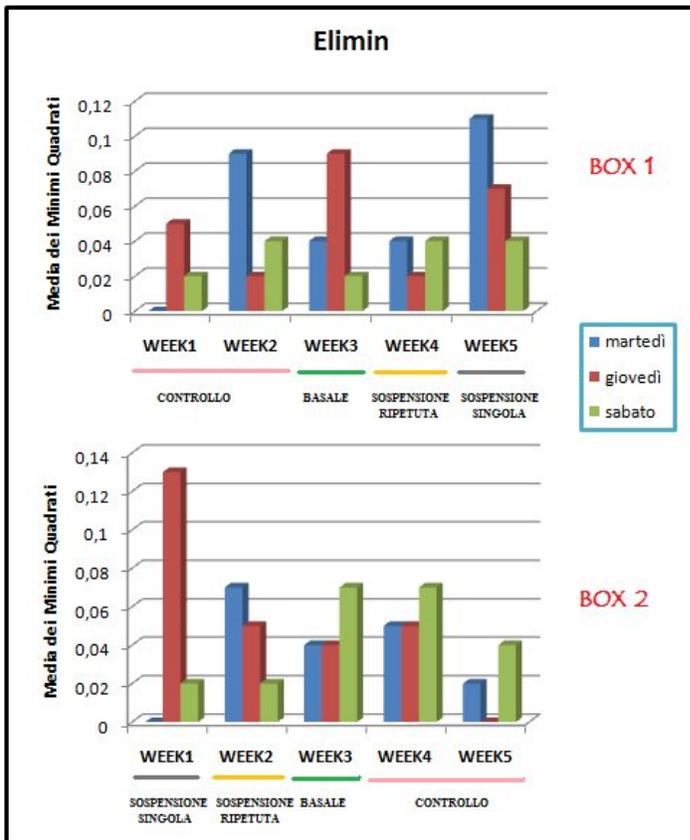


Figura 14. Medie dei minimi quadrati relative alla variabile “Eliminazione” nei due box, nelle 5 settimane di sperimentazione.

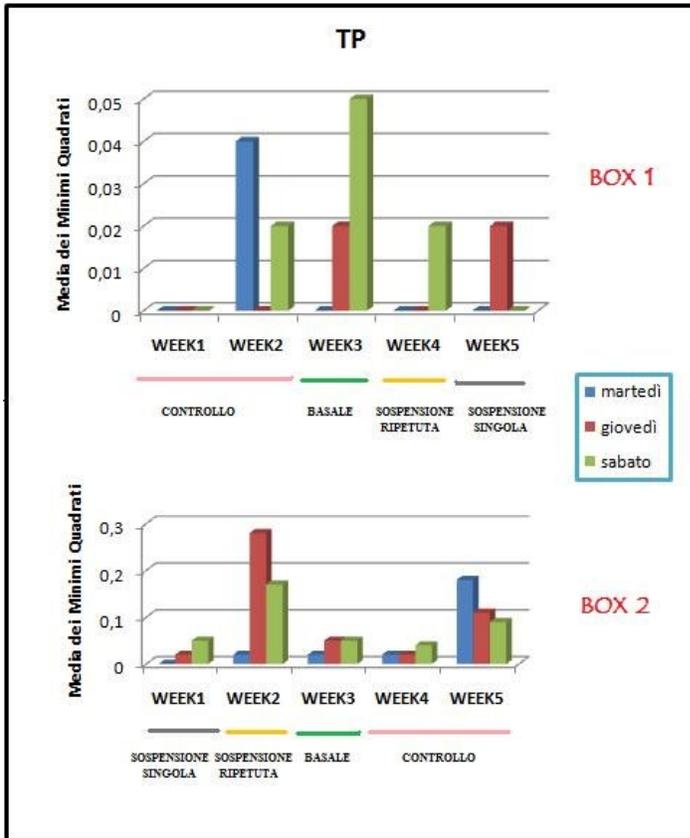


Figura 15. Medie dei minimi quadrati relative alla variabile “Tongue Playing” nei due box, nelle 5 settimane di sperimentazione.

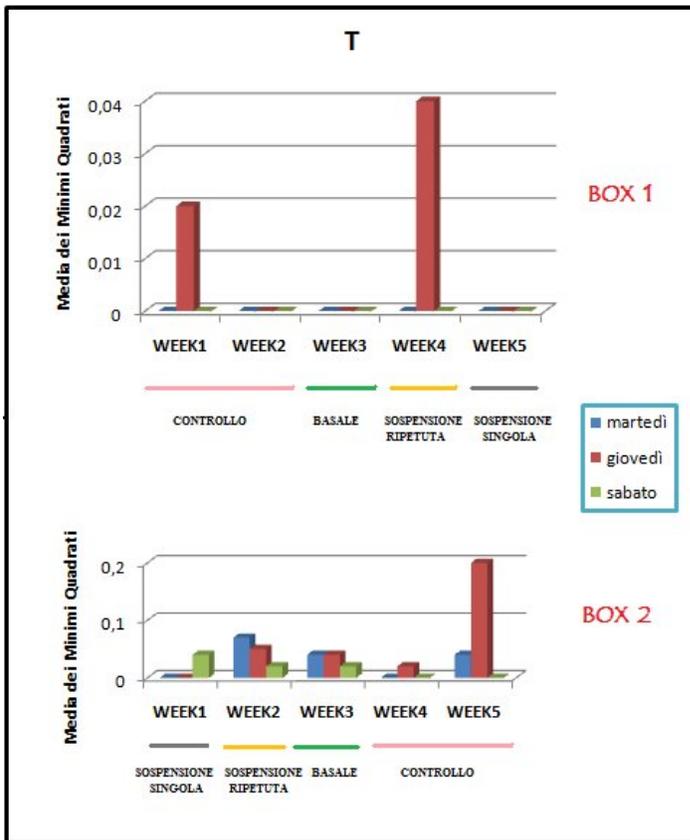


Figura 16. Medie dei minimi quadrati relative alla variabile “Tosse” nei due box, nelle 5 settimane di sperimentazione.

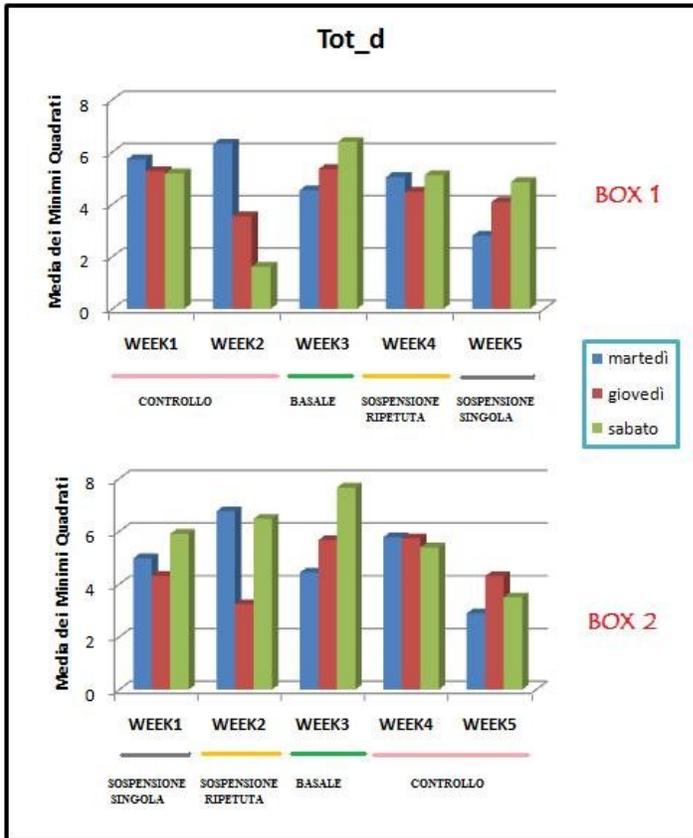


Figura 17. Medie dei minimi quadrati relative alla variabile “Totale decubito” nei due box, nelle 5 settimane di sperimentazione.

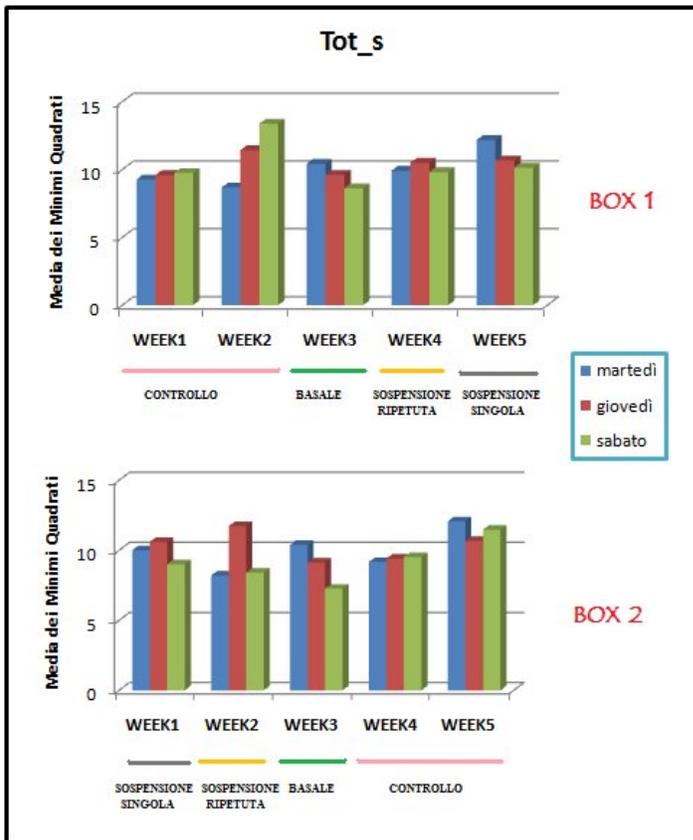


Figura 18. Medie dei minimi quadrati relative alla variabile “Totale stazione” nei due box, nelle 5 settimane di sperimentazione.