

ผลของอุณหภูมิ ความชื้น และฤดูกาลต่อระดับคอร์ติซอลในโคนมสายพันธุ์ โฮลสไตน์ฟริเซียน

วรรณลักษณ์ ถาวร¹ อธิพิล สักล² และวิวัฒน์ พัฒนาวงค์^{1*}

¹คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้

²ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์เพชรบูรณ์ สำนักพัฒนาอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์

*Corresponding author: wpattanawong@gmail.com

(Received: June 1, 2023; Revised: December 25, 2023; Accepted: December 26, 2023)

บทคัดย่อ

อุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์เป็นปัจจัยสำคัญซึ่งเกี่ยวข้องกับการจัดการความเครียดในโคนม และส่งผลต่อการผลิตน้ำนม วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนคอร์ติซอลของโคนมแม่พันธุ์โฮลสไตน์ฟริเซียนที่ได้รับอิทธิพลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิสิ่งแวดล้อมและความชื้นในอากาศในช่วงฤดูกาลต่าง ๆ ในจังหวัดลำพูน และช่วงฤดูกาลต่าง ๆ ด้วยเทคนิค Sandwich ELISA โดยใช้ความเข้มข้นของปริมาณคอร์ติซอลเป็นค่ามาตรฐาน 0, 0.039, 0.078, 0.156, 0.315, 0.625, 1.25, 5 และ 10 ng/mL เพื่อใช้ในการคำนวณปริมาณฮอร์โมนคอร์ติซอลในตัวอย่างสารสกัดจากมูลโค จากผลการศึกษา พบว่าค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิเท่ากับ 28.16°C ความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับ 34.36% ค่า THI เท่ากับ 72.40% และปริมาณของฮอร์โมนคอร์ติซอลเท่ากับ 12.84 ng/mL ซึ่งปริมาณของฮอร์โมนคอร์ติซอลในฤดูฝนมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 16.96 ± 7.83 ng/mL ซึ่งมีค่าสูงกว่าในฤดูหนาว (7.94 ± 3.01 ng/mL) เนื่องจากมีความสัมพันธ์กับความชื้นสัมพัทธ์ที่วัดได้ภายในโรงเรือน พบว่ามีค่าความสูงช่วงฤดูฝนของเดือนสิงหาคม และตุลาคม โดยค่าความความชื้นที่วัดได้เท่ากับ 52.29 และ 54.19% ตามลำดับ และอุณหภูมิในช่วงฤดูหนาวมีความแปรปรวนของสภาพอากาศก่อนที่จะเข้าสู่ฤดูร้อนจึงส่งผลต่อปริมาณฮอร์โมนคอร์ติซอลในฤดูหนาวสูงกว่าในฤดูร้อน รวมถึงความชื้นที่สูงช่วงฤดูหนาวของเดือนมกราคมซึ่งมีความชื้นสูงถึง 52.71% นอกจากนี้ ปริมาณของฮอร์โมนคอร์ติซอลต่ำสุดในช่วงฤดูร้อนเท่ากับ 7.03±2.93 ng/mL ผลการศึกษาพบว่า ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ ความชื้น และฤดูกาลต่อระดับคอร์ติซอลในโคนมสายพันธุ์โฮลสไตน์ฟริเซียน ค่าเฉลี่ยปริมาณคอร์ติซอลต่ออุณหภูมิอากาศมีค่าสหสัมพันธ์เท่ากับ 0.17 ($P < .05$) และค่าเฉลี่ยปริมาณคอร์ติซอลต่อ ความชื้นสัมพัทธ์ ฤดูกาล และ ค่า THI มีค่าสหสัมพันธ์เท่ากับ 0.435, 0.543 และ 0.347 ตามลำดับ ($P < .01$) ดังนั้น จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ และฤดูกาล มีผลต่อปริมาณคอร์ติซอลซึ่งแสดงถึงความเครียดในโคนมสายพันธุ์โฮลสไตน์ฟริเซียน

คำสำคัญ: โคนม; คอร์ติซอล; อุณหภูมิ; ความชื้น

Effects of Temperature, Humidity and Season on the Cortisol Levels in Holstein Friesian

Wannaluk Thaworn¹, Ittipol Saklo² and Wiwat Pattanawong^{1*}

¹Faculty of Animal Science and Technology, Maejo University

²Phetchabun Animal Nutrition Research and Development Center, Bureau of Nutrition Development, Department of Livestock Development

*Corresponding author: wpattanawong@gmail.com

(Received: June 1, 2023; Revised: December 25, 2023; Accepted: December 26, 2023)

Abstract

Temperature and humidity are an important factor in dairy cow management, stress, and milk production. The objective of this study was to investigate the changes in cortisol concentration of Holstein Friesian dairy cows influenced by environmental temperature changes and humidity in the air during different seasons in Lamphun Province. The cortisol hormone was determined using the Sandwich ELISA method, with standard values of 0, 0.039, 0.078, 0.156, 0.315, 0.625, 1.25, 5, and 10 ng/ml. Cortisol concentrations have been determined in cow fecal extract samples. The results showed average temperature was 28.16°C, relative humidity was 34.36%, THI was 72.40 %, and cortisol was 12.84 ng/ml. The average cortisol concentration was 16.96 ± 7.83 ng/ml during a rainy season, which was higher than the winter (7.94 ± 3.01 ng/ml). Since measured inside the dairy farm. The height was found during the rainy seasons of August and October, when the measured humidity was 52.29 and 54.19%, respectively, and the temperature in winter has more instability in the weather before entering the summer, influencing the concentration of cortisol hormone in the winter to be higher. all through winter, as well as high humidity in January, when the humidity is approximately 52.71%. Also, cortisol concentrations were lowest in the summer, at 7.03 ± 2.93 ng/ml. The results showed a relationship between temperature, humidity, and season on cortisol concentration in Holstein Friesian. The average cortisol concentration to air temperature correlated by 0.17 ($P < .05$). And the average amount of cortisol to Relative humidity, season, and THI correlated were 0.435, 0.543, and 0.347 respectively ($P < .01$).



Therefore, this study found temperature, relative humidity, and season-influenced cortisol concentration indicated stress in Holstein Friesian.

Keywords: Dairy cow; Cortisol; Temperature; Humidity

บทนำ

การเลี้ยงโคนมในประเทศไทยหากสามารถทำให้โคอยู่อย่างสุขสบายจะส่งผลตอบแทนทางเศรษฐกิจที่ดีขึ้นตามมาด้วย อาทิเช่น ผสมติดง่าย กินอาหารได้มากขึ้น มีสุขภาพแข็งแรงมากขึ้น ผลผลิตน้ำนมต่อตัวมากขึ้น การสูญเสียหรือปัญหาต่าง ๆ จะลดลง ดังนั้นการเลี้ยงโคนมจึงต้องคำนึงถึงการจัดการกับตัวสัตว์ด้วย โดยการทำให้สัตว์เกิดความเครียดน้อยที่สุด เพราะความเครียดที่เกิดขึ้นกับตัวสัตว์นั้นล้วนส่งผลต่อพฤติกรรม หรืออาจเกิดการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนในร่างกาย ซึ่งจะส่งผลต่อระบบสืบพันธุ์ การผลิตน้ำนม (West et al., 2003) ระบบภูมิคุ้มกันโรค (Collier et al., 1982) และการทำงานของกระเพาะรูเมน (Johnson et al., 1963) เป็นต้น โดยสาเหตุที่ทำให้เกิดความเครียดนั้นมีหลายสาเหตุ เช่น อดอยาก ขาดแคลน ทั้งน้ำและอาหาร การขนส่ง ความเจ็บปวดต่าง ๆ การแออัดจำนวนโคต่อพื้นที่มากเกินไปมีการเปลี่ยนแปลงของอากาศกะทันหันทำให้โคปรับตัวไม่ทันอุณหภูมิของอากาศสูงขึ้นหรือต่ำไปโดยเฉพาะในเรื่องของสภาพอากาศโดยเราจะเห็นได้อย่างชัดเจนในแต่ละฤดูกาลนั้น ปริมาณการกินอาหาร และปริมาณของผลผลิตจะแตกต่างกันออกไป (ชัยณรงค์, 2555) โดยในปัจจุบันการตรวจหาระดับของคลอติซอลในมูลโคด้วยวิธีการทดสอบที่ใช้หลักการทางภูมิคุ้มกันวิทยาโดยอาศัยปฏิกิริยาการจับกันแบบจำเพาะระหว่างแอนติเจน (Antigen) และแอนติบอดี (Antibody) (Tallo-Parra et al., 2015) ซึ่งฮอร์โมนในกลุ่ม Glucocorticoids ประกอบไปด้วยฮอร์โมนคอร์ติซอล (Cortisol) และคอร์ติโคสเตอโรน (Corticosterone) การหลั่งฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์ (โดยเฉพาะคอร์ติซอลในโค) จากสมองส่วนไฮโปทาลามัส-ต่อมใต้สมอง-ต่อมหมวกไต (HPA) มีบทบาทสำคัญในการควบคุมพลังงาน ดังนั้น ความเข้มข้นของกลูโคคอร์ติคอยด์ (GCs) หรือสารเมตาบอไลต์ จึงถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้ความเครียดและมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในการวิจัยด้านสวัสดิภาพสัตว์ (Palme, 2019) นอกจากนี้วิธีการวัดความเข้มข้นของ GC ในเลือดซึ่งเป็นวิธีเดิม (โดยใช้ซีรัมหรือพลาสมา) รวมถึงน้ำลายนม หรือปัสสาวะ (Mormède et al., 2007) ซึ่งวิธีการเก็บตัวอย่างที่ไม่ส่งผลให้เกิดความเครียดต่อสัตว์เพื่อประเมินระดับความเครียดในระยะเวลานานคือการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ของคอร์ติซอลในอุจจาระ (FCMs) โดยเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์ (EIA) (Palme and Möstl, 1997) ในทางตรงกันข้ามกับคอร์ติซอลในเลือดหรือน้ำลาย FCMs แสดงให้เห็นถึงการหลั่งคอร์ติซอลในระยะเวลานานขึ้น โดยในโคอยู่ที่ 9-15 ชั่วโมง ดังนั้น การวิเคราะห์คอร์ติซอลในอุจจาระจึงมีแนวโน้มที่จะเปลี่ยนแปลงระยะสั้นน้อยกว่าในระหว่างวันของการเก็บตัวอย่าง (Ebinghaus et al., 2020) โดยปกติการหลั่งฮอร์โมนกลุ่มนี้จะมีฤทธิ์กว้างซึ่งส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับการรักษาสมดุลของร่างกายภายหลังที่เกิดความเครียด (ชัยณรงค์, 2555) ความเครียดจากความร้อนเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้โคนมผสมเทียมมีภาวะเจริญพันธุ์ต่ำปลายเดือนฤดูร้อน (Ingraham et al., 1974) และมีอัตราการผสมติดลดลงในช่วงฤดูร้อนระหว่าง 20-30% เมื่อเปรียบเทียบกับฤดูหนาว (Rensis et al., 2002) ฤดูกาลยังส่งผลต่อโคนมที่ผสมเทียมในช่วงฤดูร้อนของปีจะมีอัตราการเจริญพันธุ์ลดลง ที่สำคัญเป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิและความชื้นที่ส่งผลให้การแสดงออกของการเป็นสัตว์ลดลงและความอยากอาหารและการกินได้ของโคลดลงด้วย โดยขึ้นอยู่กับความเครียดจากความร้อนแบบเฉียบพลันหรือเรื้อรังและขึ้นอยู่กับสภาวะเมตาบอลิซึมของสัตว์ (Rensis and Scaramuzzi, 2003) ดังนั้น จึงทำการศึกษา



การเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนคอร์ติซอลของโคนมแม่พันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซียนที่ได้รับอิทธิพลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิสิ่งแวดล้อม และความชื้นในอากาศในช่วงฤดูกาลต่าง ๆ ในจังหวัดลำพูน

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างสัตว์และการเก็บตัวอย่างมูลสัตว์ (Animals and Fecal Sample Collection)

สัตว์ที่ใช้ในการศึกษานี้ เป็นแม่พันธุ์โคนม สายพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซียน จำนวน 40 ตัว สถานที่ทำการเก็บตัวอย่างเชียงใหม่เฟรมิลค์ฟาร์ม 379/1 หมู่ 7 ตำบลเหล่ายาว อำเภอบ้านโฮ่ง จังหวัดลำพูน ทำการเก็บตัวอย่างมูลของโคนมแม่พันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซียนอาทิตย์ละ 1 ครั้ง ตั้งแต่เดือนมกราคม - ธันวาคม 2562 ซึ่งหลังจากที่เก็บตัวอย่างนำไปแช่เพื่อเก็บรักษาสภาพ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาเข้ากระบวนการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนคอร์ติซอล ในการศึกษาครั้งนี้ได้รับอนุมัติภายใต้การพิจารณาจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยแม่โจ้ (Approval No. MACUC 043A/2561)

ข้อมูลสภาพอากาศ

บันทึกอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ด้วยเครื่อง Thermo-Hygrometer (Delta Trak) วันละ 3 ครั้ง (04.30, 12.00 และ 20.30 น.) และนำข้อมูลมาคำนวณให้อยู่ในรูปของค่าดัชนีอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ (temperature humidity index; THI) ตามวิธีการของ National Research Council (1971) ดังสมการ $THI = (1.8 \times \text{temperature} + 32) - (0.55 - 0.0055 \times \text{relative humidity}) \times (1.8 \times \text{temperature} - 26)$ ซึ่งค่า THI ในแต่ละวันนำมาใช้ศึกษาความสัมพันธ์กับระดับคอร์ติซอลในโคนมโฮลสไตน์

การสกัดสเตียรอยด์ฮอร์โมนจากมูลสัตว์ (Fecal Steroid Extraction)

นำตัวอย่างมูลสัตว์ที่แช่แข็งไว้มาทำให้แห้งด้วยการนำเข้าสู่อบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนแห้งทุกให้แตกเป็นผงเก็บเข้าตู้แช่แข็งอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทำการสกัด ทำการสกัดโดยใช้น้ำหนักมูลสัตว์ที่แห้งเป็นผง 0.1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง (test tube) เต็มเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 90% ปริมาณ 3 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,500 g เป็นเวลานาน 15 นาที เก็บเฉพาะส่วนใสด้านบน จากนั้นนำไปเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อบริการนำไปทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนคอร์ติซอล



การวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน

ทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Sandwich ELISA จากการทดลองเตรียมและใช้สารละลาย ในการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนคอร์ติซอลโดยเทียบเคียงกับวิธีการตรวจวัดปริมาณคอร์ติซอลของ (Brown et al., 2004) การเตรียมตัวอย่างมูลโคเพื่อทำการเจือจาง โดยสารสกัดฮอร์โมนจากตัวอย่างมูลที่ได้ทำการเจือจาง 1:4 ใน Phosphate Buffered Saline (PBS 1X) ใช้สำหรับการดำเนินการในขั้นตอนวิเคราะห์ ปริมาณคอร์ติซอลเคลือบเพลทด้วย Anti-Cortisol ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4°C นานข้ามคืน ล้างเพลทด้วยสารละลายสำหรับการล้าง (Washing buffer) จากนั้น เติมสารละลายเจลาตินที่มีความเข้มข้น 2% ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 25°C นาน 2 ชั่วโมง ทำการล้างเพลท หลังจากนั้นเติมสารละลายมาตรฐาน (Standards Cortisol) ความเข้มข้น 0, 0.039, 0.078, 0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 ng/mL ตามลำดับ

เติมสารละลายฮอร์โมนตัวอย่างมูล ความเข้มข้น 1:4 บ่มที่อุณหภูมิ 25°C นาน 60 นาที ทำการล้างเพลทแล้วเติมเอนไซม์ Cortisol-HRP ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุมบ่มที่อุณหภูมิ 25°C นาน 60 นาที หลังจากนั้นทำการล้างเพลท เติมสารละลายที่ทำให้เกิดสี (Substrate + OPD) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 25°C นาน 5-10 นาที และทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย H₂SO₄ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ผลด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และหาค่าความสัมพันธ์ (Correlation) ระหว่างของอุณหภูมิ ความชื้น ฤดูกาล และระดับคอร์ติซอล

ผลการทดลองและอภิปรายผล

จากการวิเคราะห์หาปริมาณคอร์ติซอลตั้งแต่เดือน มกราคม-ธันวาคม 2562 ด้วยเทคนิค Sandwich ELISA มีปริมาณของฮอร์โมนคอร์ติซอลมีค่าเฉลี่ย 12.84 ng/mL มีค่าสูงสุดที่ 34.50 ng/mL และต่ำสุดที่ 1.18 ng/mL ซึ่งมีผลที่ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Szenci et al. (2011) พบว่าการเพิ่มระดับคอร์ติซอลในพลาสมาในโคสาวที่ตั้งท้องที่ได้รับความเครียด 1 ชั่วโมงของการสัมผัสกับความเครียดในวันที่ 2 (ชั่วโมงที่ 48) และวันที่ 3 (ชั่วโมงที่ 72) ของการทดลองมีความเข้มข้นของคอร์ติซอลในพลาสมาต่ำกว่าวันที่ 2 (29.4 ± 5.1 ng/mL เทียบกับ 41.0 ± 4.7 ng/mL ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิที่บันทึกภายในฟาร์มมีอุณหภูมิสูงสุดที่ 34.87°C และต่ำสุดที่ 18.13°C ค่าความสัมพันธ์สัมพัทธ์สูงสุด 65% และต่ำสุด 11% และค่า THI สูงสุดที่ 79.77% ต่ำสุดที่ 61.95% (Table 1) ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานของ ธนวัต และคณะ (2560) พบว่าโคนมลูกผสมสายไทย-โฮลสไตน์ ที่เลี้ยงใต้สภาพอากาศร้อนชื้นของประเทศไทยมีค่าเฉลี่ย THI

สูงกว่า 77.00 ซึ่งสามารถใช้เป็นเกณฑ์ในการผสมพันธุ์ให้อยู่ในเป้าหมายของโคนมได้ การเพิ่มประสิทธิภาพการสืบพันธุ์โดยคำนึงถึงดัชนีอุณหภูมิความชื้นสัมพัทธ์ เพื่อหลีกเลี่ยงผลกระทบจากภาวะความเครียดเนื่องจากความร้อนเป็นแนวทางในการช่วยเพิ่มโอกาสการผสมติดและลดจำนวนวันท้องว่างในฟาร์มได้

Table 1. Data structure for the analysis

	N	Mean ± SD	Min	Max
Animal with record	40			
Number of records	214			
Temperature (°C)		28.16 ± 2.99	18.13	34.87
Relative humidity (%)		34.36 ± 12.06	11.00	65.00
Temperature humidity index (THI)		72.40 ± 4.90	61.95	79.77
Cortisol concentration (ng/ml)		12.84 ± 7.82	1.18	34.50

จากการเก็บข้อมูลอุณหภูมิอากาศและความชื้นสัมพัทธ์ตลอดทั้งปี 2562 พบว่ามีค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิอากาศเท่ากับ 28.16 ± 2.99 °C และมีค่าเฉลี่ยความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับ 34.36 % ความชื้นสัมพัทธ์ที่วัดได้ภายในโรงเรือน พบว่า มีค่าความสูงช่วงฤดูฝนของเดือนสิงหาคมและตุลาคม โดยค่าความชื้นที่วัดเท่ากับ 52.29 และ 54.19% ตามลำดับ และอุณหภูมิในช่วงฤดูหนาวมีความแปรปรวนของสภาพอากาศก่อนที่จะเข้าสู่ฤดูร้อนจึงส่งผลต่อปริมาณฮอร์โมนคอร์ติซอลในฤดูหนาวสูงกว่าในฤดูร้อน รวมถึงความชื้นที่สูงช่วงฤดูหนาวของเดือนมกราคมซึ่งมีความชื้นสูงถึง 52.71% (Figure 1) เมื่อนำมาคำนวณค่า THI มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 72.40% (Figure 2) ความสัมพันธ์ระหว่าง THI และฤดูกาลอาจแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสภาพอากาศของภูมิภาคนั้น ๆ โดยทั่วไปแล้ว THI มีแนวโน้มที่จะสูงขึ้นในช่วงเดือนที่อากาศอบอุ่นและลดลงในช่วงเดือนที่อากาศหนาวเย็น อย่างไรก็ตามค่าและช่วงเฉพาะของ THI อาจแตกต่างกันไปตามรูปแบบสภาพอากาศในท้องถิ่นในช่วงฤดูร้อนในหลายภูมิภาคเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นและระดับความชื้นมักจะสูงขึ้น THI มีแนวโน้มที่จะสูงขึ้นซึ่งหมายความว่าสิ่งมีชีวิตจะรู้สึกร้อนและอึดอัดมากขึ้น ในทางตรงกันข้ามในช่วงฤดูหนาวเมื่ออุณหภูมิต่ำลง และระดับความชื้นโดยทั่วไปก็จะต่ำลงเช่นกัน ค่า THI มักจะต่ำลง ซึ่งบ่งบอกถึงความรู้สึกสบายตัวมากขึ้น สิ่งสำคัญคือต้องสังเกตว่าความสัมพันธ์ระหว่าง THI และฤดูกาลสามารถได้รับอิทธิพลจากปัจจัยต่าง ๆ เช่น ที่ตั้งทางภูมิศาสตร์ ความใกล้ชิดกับแหล่งน้ำ และรูปแบบสภาพอากาศในท้องถิ่น ภูมิภาคต่าง ๆ ทั่วโลกมีลักษณะภูมิอากาศและการเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาลที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจส่งผลต่อค่า THI (Vitali et al., 2016)

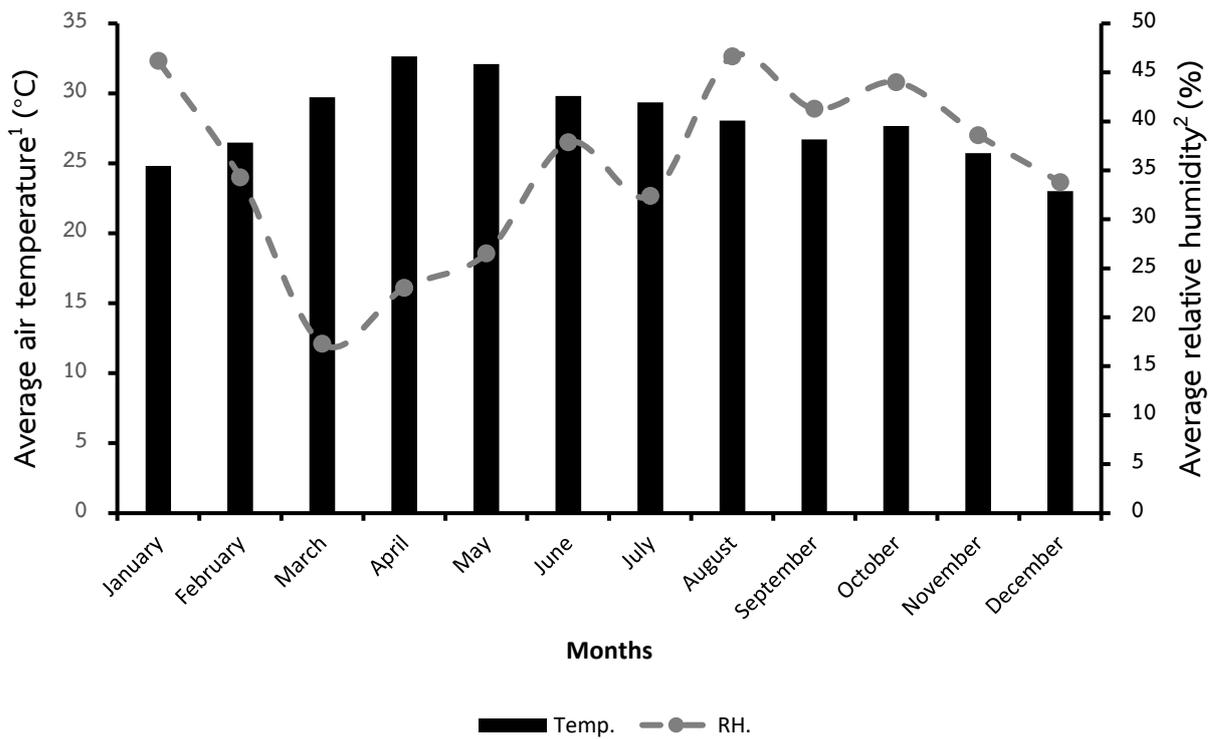


Figure 1. Monthly Average air temperature and relative humidity inside the dairy cow house
¹temperature: Temp.; ²relative humidity: RH.

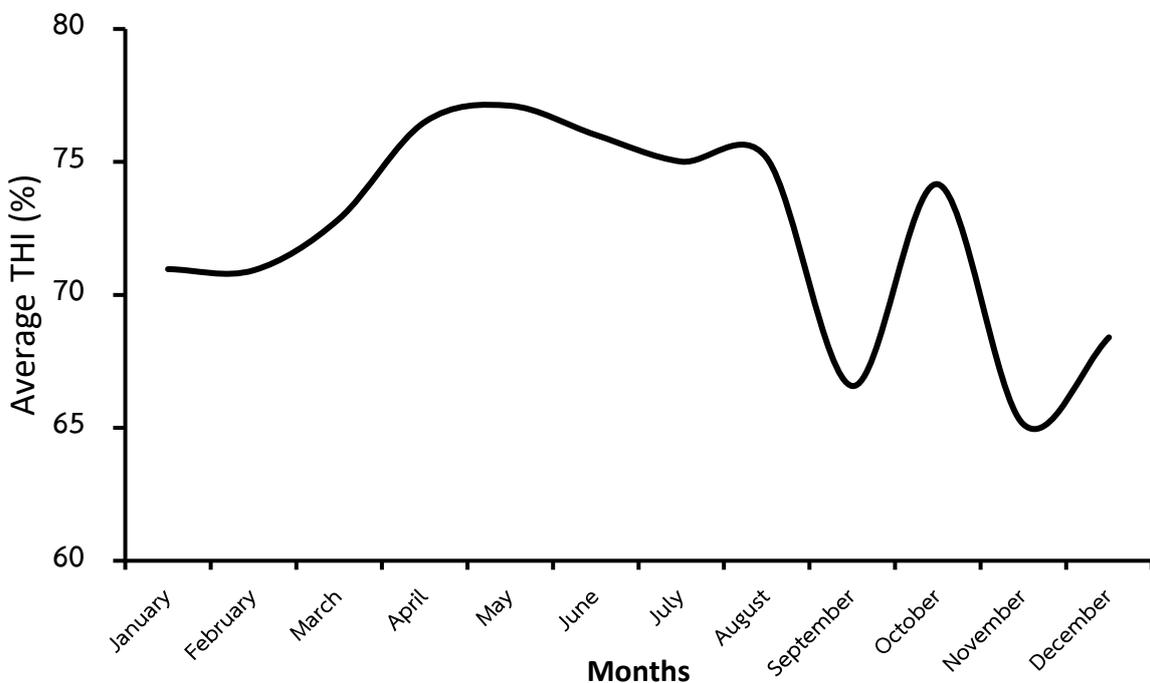


Figure 2. Monthly average of temperature humidity index in Lamphun



ปริมาณของคอร์ติซอลตลอดทั้งปีเมื่อนำผลแต่ละฤดูมาวิเคราะห์ค่าสูงสุดของฤดูหนาว (พ.ย. -ก.พ.) มีค่าเท่ากับ 10.22 ± 4.72 ng/mL ค่าต่ำสุดเท่ากับ 4.75 ± 3.25 ng/mL ฤดูร้อน (มี.ค.-มิ.ย.) มีปริมาณค่าสูงสุดเท่ากับ 10.36 ± 2.41 ng/mL ค่าต่ำสุดเท่ากับ 3.14 ± 1.47 ng/mL และฤดูฝน (ก.ค.-ต.ค.) มีปริมาณค่าสูงสุดมีค่าที่ 10.36 ± 2.41 ng/mL ค่าต่ำสุดที่ (Figure 3) การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วงวันอย่างรวดเร็วกว่าปกติ อาจทำให้เกิดความเครียดเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับกับรายงานของกรมปศุสัตว์ (2560) ที่ได้กล่าวว่า การเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศ ทำให้อุณหภูมิในรอบวันเปลี่ยนแปลงอย่างฉับพลัน ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์ โดยอาจเกิดอาการเครียดและกินอาหารน้อยลง ความแข็งแรงและความทนทานต่อโรคลดลงทำให้สัตว์อ่อนแอและติดโรคได้ง่าย ซึ่งงานวิจัยของ Averos et al. (2008) ทำการศึกษาในฤดูร้อนของประเทศสเปน หาปริมาณคอร์ติซอลในเลือดของพ่อพันธุ์ ระหว่างอยู่ที่ฟาร์ม ขนส่ง และถึงที่หมาย พบว่า ค่าปริมาณคอร์ติซอลก่อนทำการขนส่งเท่ากับ 6.5 ng/mL เมื่อเริ่มขนส่งปริมาณคอร์ติซอลเพิ่มขึ้นมาอยู่ที่ 12.6 ng/mL และเมื่อถึงที่หมายมีปริมาณคอร์ติซอลอยู่ที่ 12.0 ng/mL เนื่องจากวิธีการขนส่งจะผลต่อสรีรวิทยาของความเครียดในสัตว์ทั้งในช่วงก่อนการเดินทางโดยความเครียดก่อนการขนส่งเกิดจากการไล่ต้อนความเครียดระหว่างการขนส่งเกิดจากความร้อนจาก การบรรทุก พื้นถนน เมื่อถึงโรงงานฆ่าและเป็นผลจากความเครียดสะสม และจากการไล่ต้อนลงจากรถ (พงษ์ชาญ, 2556) และปัจจัยที่ทำให้ค่าปริมาณคอร์ติซอลต่างกันอาจมาจากสภาพภูมิประเทศที่แตกต่างกันสภาพอากาศในฤดูร้อนของประเทศสเปนจะมีอุณหภูมิอยู่ในช่วงตั้งแต่ 15 - 28°C (Averos et al., 2008) แตกต่างจากในประเทศไทยที่มีค่าเฉลี่ยอุณหภูมิฤดูร้อนสูงสุดอยู่ที่ 32.2 °C (กรมอุตุนิยมวิทยา, 2562) หากอุณหภูมิของสภาพแวดล้อมสูงกว่าอุณหภูมิที่โคนมสามารถดำรงชีวิตได้อย่างสบาย (comfort zone) ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 4 - 24°C (Hahn, 1981) โคนมจะตอบสนองโดยแสดงพฤติกรรมเพื่อควบคุมอุณหภูมิของร่างกายให้คงที่ เช่น ลดการเดิน เข้าพักในร่มเงา ลดการกินอาหาร ลดการเคี้ยวเอื้อง เป็นต้น (Mitlohner et al., 2002; West et al., 2003)

ซึ่งหากกระบวนการดังกล่าวยังไม่สามารถระบายความร้อนส่วนเกินออกจากร่างกายได้ อาจส่งผลทำให้โคนมเกิดความเครียดเนื่องจากความร้อน (heat stress) และเสี่ยงต่อการลดลงของปริมาณน้ำนมอีกด้วย (West et al., 2003; Collier et al., 2006) ร้อนส่วนเกินออกจากร่างกายได้ อาจส่งผลทำให้โคนมเกิดความเครียดเนื่องจากความร้อน (heat stress) และเสี่ยงต่อการลดลงของปริมาณน้ำนมอีกด้วย (West et al., 2003; Collier et al., 2006)

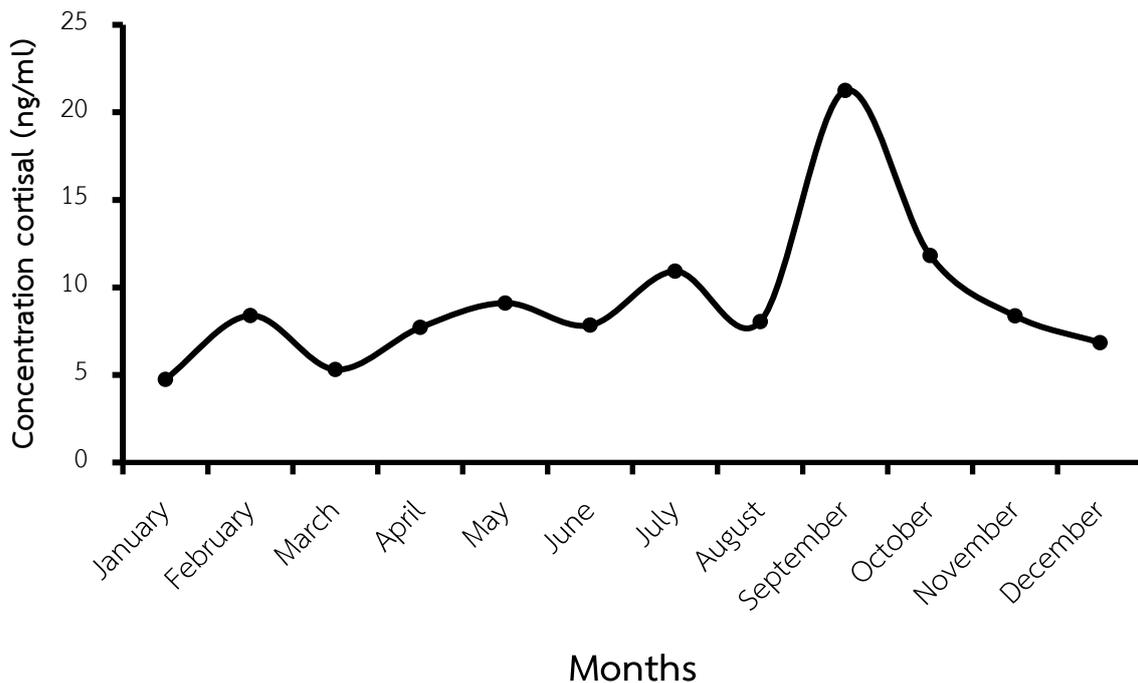


Figure 3. Monthly average of concentration cortisol in cows

จากการวิเคราะห์หาปริมาณคอร์ติซอลแสดงให้เห็นว่าฤดูหนาวมีค่าคอร์ติซอลเฉลี่ยที่ 7.94 ± 3.01 ng/mL ซึ่งสูงกว่าฤดูร้อนที่มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 7.03 ± 2.93 ng/mL จากผลการศึกษาพบว่าปริมาณของฮอร์โมนคอร์ติซอลในฤดูฝนมีค่าเฉลี่ยที่ 16.96 ± 7.83 ng/mL ซึ่งมีค่าสูงกว่าในฤดูหนาว (7.94 ± 3.01 ng/mL) เนื่องจากมีความสัมพันธ์กับความชื้นที่วัดได้ภายในโรงเรือนพบว่ามีความสูงช่วงฤดูฝนของเดือนสิงหาคมและตุลาคม โดยค่าความชื้นสัมพัทธ์ที่วัดได้เท่ากับ 52.29 และ 54.19% ตามลำดับ และอุณหภูมิในช่วงฤดูหนาวมีความแปรปรวนของสภาพอากาศก่อนที่จะเข้าสู่ฤดูร้อนจึงส่งผลต่อปริมาณฮอร์โมนคอร์ติซอลในฤดูหนาวสูงกว่าในฤดูร้อน รวมถึงความชื้นที่สูงช่วงฤดูหนาวของเดือนมกราคมซึ่งมีความชื้นสูงถึง 52.71% นอกจากนี้ปริมาณของฮอร์โมนคอร์ติซอลต่ำสุดในช่วงฤดูร้อน 7.03 ± 2.93 ng/mL (Figure 4) จากข้อมูลของกรมอุตุนิยมวิทยาประจำปี 2562 รายงานว่าอุณหภูมิเฉลี่ยทั้งปีของประเทศไทยนั้นมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 29°C ซึ่งในฤดูหนาวนั้นมีค่าอุณหภูมิต่ำสุดเฉลี่ยอยู่ที่ 20°C ซึ่งแตกต่างจากค่าเฉลี่ยทั้งปีในฤดูร้อนที่มีค่าเฉลี่ยอุณหภูมิสูงสุดอยู่ที่ 32.2°C (กรมอุตุนิยมวิทยา, 2562) ดังนั้น ในฤดูหนาวจะเกิดความแปรปรวนของอากาศในแต่ละวันมากกว่าในฤดูร้อนด้วยสาเหตุนี้จึงทำให้เกิดความเครียดในฤดูหนาวมากกว่าในฤดูร้อนความผันแปรของฤดูกาลอาจส่งผลต่อระดับคอร์ติซอลในโคนม

เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ความชื้น ระยะเวลากลางวัน และความพร้อมของอาหารสัตว์ในสภาพอากาศที่อบอุ่น ฤดูร้อนมักจะเป็นความท้าทายที่ยิ่งใหญ่ที่สุดสำหรับการผลิตน้ำนมเนื่องจากอุณหภูมิและความชื้นที่สูงขึ้นสภาวะเหล่านี้สามารถนำไปสู่ความเครียดจากความร้อนและเพิ่มความเข้มข้น

ของคอร์ติซอล ในทางตรงกันข้ามในช่วงฤดูที่อากาศเย็นลงโคอาจมีระดับความเครียดและคอร์ติซอลในระดับที่ต่ำลงเนื่องจากพวกมันต้องเผชิญกับสภาวะแวดล้อมที่เอื้ออำนวยมากกว่า อย่างไรก็ตาม สิ่งสำคัญคือต้องสังเกตว่าการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่รุนแรง เช่น ฤดูหนาวที่หนาวเย็น อาจสร้างความท้าทายต่อสุขภาพและสวัสดิภาพของวัวได้เช่นกัน (Szenci et al., 2011) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Luca et al., (2015) ทำการวิจัยในประเทศอิตาลี ศึกษาหาปริมาณคอร์ติซอลในปัสสาวะและถุงน้ำดีของโคนม โคฟอพันธุ์และโครุ่นเพศผู้พบว่าในปัสสาวะของโคนมมีปริมาณของคอร์ติซอลที่ 22.0 ± 17.5 ng/mL และในถุงน้ำดีพบอยู่ที่ 5.94 ± 14.7 ng/mL จากงานวิจัยจะเห็นได้ว่าปัจจัยการจัดการเรื่องการถูกรีดนมก็มีผลต่อปริมาณความเครียดของสัตว์ด้วย สอดคล้องกับงานวิจัยของ Pompa et al. (2011) ทำการวิจัยในประเทศอิตาลี ศึกษาหาปริมาณคอร์ติซอลและคอร์ติโซนในโคนมที่มีอาการเต้านมอักเสบและหลังจากได้รับการรักษาด้วยยา Pednisolone ซึ่งเป็นตัวยาที่มีฤทธิ์แก้อักเสบ ในช่วงเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าปริมาณคอร์ติซอลก่อนเกิดอาการเต้านมอักเสบอยู่ที่ 1.98 และ 6.92 ng/mL ตามลำดับและในช่วงเวลาที่เกิดอาการเต้านมอักเสบและหลังได้รับการสอดยา 2-7 ชั่วโมง ค่าคอร์ติซอลเพิ่มขึ้นมาเป็น 238 และ 248 ng/mL ตามลำดับ หลังจากได้รับยา 24-48 ชั่วโมง ลดระดับลงเป็น 25.3 และ 0.65 ng/mL ตามลำดับ ทั้งนี้ปริมาณค่าคอร์ติโซนนั้น จะเพิ่มขึ้นและลดลงตามอาการของการเกิดเต้านมอักเสบด้วยเช่นกัน นอกจากนี้โคนมสามารถระบายความร้อนที่เกิดจากกระบวนการทำงานของร่างกายออกมาสู่ภายนอกด้วยวิธีต่าง ๆ เช่น การนำ การพา และการแผ่รังสีเพื่อรักษาอุณหภูมิของร่างกายให้คงที่โดยส่วนใหญ่จะระบายความร้อนออกจากร่างกายด้วยวิธี Evaporation ซึ่งหากความชื้นในอากาศสูง ความร้อนที่ระบายออกมากับไอน้ำและอากาศที่หายใจออกมาจะเกิดขึ้นได้น้อย เกิดความร้อนสะสมในร่างกายสุดท้ายโคนมก็จะมีมีความเครียดเกิดขึ้นได้สูง (เพ็ญประภา และคณะ, 2562) ความชื้นสูงอาจทำให้โคนมได้รับผลกระทบจากอุณหภูมิสูงมากขึ้น เมื่ออากาศชื้นโคจะลดความสามารถในการกระจายความร้อนผ่านการทำความเย็นแบบระเหย ซึ่งทำให้ความสามารถในการควบคุมอุณหภูมิของร่างกายลดลงอย่างมีประสิทธิภาพ สิ่งนี้สามารถนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของระดับคอร์ติซอลเนื่องจากการตอบสนองต่อผลกระทบของอุณหภูมิและความชื้นสูง (Oyewole et al., 1981)

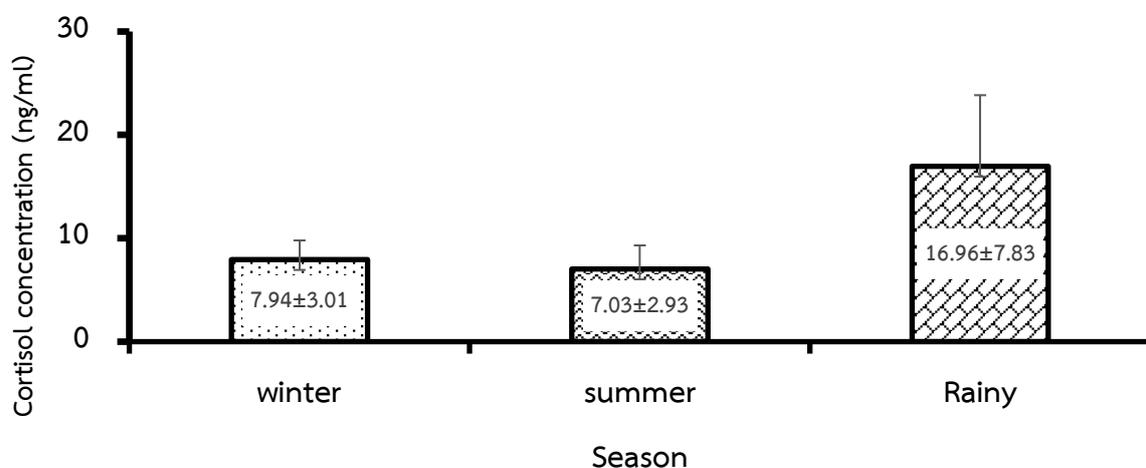


Figure 4. Cortisol concentration during the winter, summer, and rainy seasons

ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ ความชื้น และฤดูกาลต่อระดับคอร์ติซอลในโคนมสายพันธุ์โฮลส์เตนฟรีเซียนใน Table 2 ค่าเฉลี่ยปริมาณคอร์ติซอลต่ออุณหภูมิอากาศมีค่าสหสัมพันธ์เท่ากับ -0.17 ($P < .05$) ที่ความสัมพันธ์ทางลบนั้น แสดงไม่มีความสัมพันธ์โดยตรงระหว่างคอร์ติซอล และอุณหภูมิ อย่างไรก็ตาม อุณหภูมิที่สูงเกินไปอาจทำให้เกิดความเครียด ซึ่งอาจส่งผลทางอ้อมต่อระดับคอร์ติซอลได้เช่นกัน สิ่งสำคัญคือ ต้องสังเกตว่าระดับคอร์ติซอลได้รับอิทธิพลจากปัจจัยต่าง ๆ นอกเหนือจากอุณหภูมิ (Jalil et al., 2019) ในขณะที่ค่าเฉลี่ยปริมาณคอร์ติซอลต่อ ความชื้นสัมพัทธ์ ฤดูกาล และ THI เท่ากับ 0.435 , 0.543 และ 0.347 ($P < .01$) รายงานของแสงจันทร์ และคณะ (2552) กล่าวว่า การหามาตรการในการรับมือกับสภาพภูมิอากาศที่เปลี่ยนแปลงไปมิเป็นความสำคัญอันดับต้น ๆ สำหรับการพัฒนาและปรับปรุงระบบการผลิตปศุสัตว์ให้มีประสิทธิภาพได้แก่ การเปลี่ยนแปลงพื้นที่และรูปแบบในการเลี้ยงปศุสัตว์รวมถึงการปรับปรุงและคัดเลือกสายพันธุ์สัตว์ที่เหมาะสมกับสภาพอากาศที่เปลี่ยนแปลงในพื้นที่ที่สอดคล้องกับการศึกษาของวุฒิไกร และคณะ (2553) กล่าวว่า โคนมที่เลี้ยงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีค่าเฉลี่ยของการสูญเสียน้ำนมต่อตัวมากกว่าภาคอื่นของประเทศไทยนั้นทำให้เห็นว่าการเลี้ยงโคนในแต่ละภูมิภาคของประเทศไทยต้องได้รับการจัดการที่แตกต่างกันจึงจะทำให้โคนมแสดงศักยภาพของการให้ผลผลิตน้ำนมได้เต็มที่

Table 2. Correlation coefficients (r) of Cortisol, Temperature, humidity, Season and THI.

	Cortisol (ng/mL)	Temperature (°C)	Humidity (%)	Season	THI (%)
Cortisol (ng/ml)		-0.170^*	0.435^{**}	0.543^{**}	0.347^{**}
Temperature (°C)	-0.170^*		-0.569^{**}	0.399^{**}	0.789^{**}
Humidity (%)	0.435^{**}	-0.569^{**}		0.101	0.005
Season	0.543^{**}	0.399^{**}	0.101		0.570^{**}
THI (%)	0.347^{**}	0.789^{**}	0.005	0.570^{**}	

** $P < .01$, * $P < .05$, THI; Temperature humidity index

สรุปผล

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าค่าปริมาณคอร์ติซอลมีความสัมพันธ์ระหว่าง อุณหภูมิอากาศ ความชื้นสัมพัทธ์ และฤดูกาล รวมถึงค่า THI ซึ่งเป็นค่าดัชนีอุณหภูมิความชื้นสัมพัทธ์ ดังนั้น ถ้าเรามีการจัดการแม่โคให้อยู่ในช่วงของอุณหภูมิและความชื้นที่ต่ำจะส่งผลต่อปริมาณคอร์ติซอลที่แม่โคสร้างขึ้นมีระดับที่อยู่ในเกณฑ์ต่ำในช่วงฤดูร้อนและฤดูหนาวอย่างไรก็ตามระดับคอร์ติซอลอาจได้รับอิทธิพลจากปัจจัยต่าง ๆ รวมถึงปัจจัยจากความเครียดต่าง ๆ การจัดการโคนม และความแตกต่างระหว่างอุณหภูมิ ความชื้น และฤดูกาล จะส่งผลต่อความเป็นอยู่โดยรวมและความสบายของโคเป็นที่น่าสังเกตว่าความเครียดจากความร้อนซึ่งเกิดขึ้นในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงและความชื้นสูงสามารถส่งผลต่อการตอบสนองทางสรีรวิทยาของสัตว์เนื่องจาก



เป็นปัจจัยที่สำคัญในแสดงถึงการเกิดความเครียดในแม่โคนมในแต่ละช่วงฤดูการตลอดทั้งปีโดยเฉพาะในช่วงฤดูฝนจะมีความชื้นสัมพัทธ์ภายในฟาร์มสูงที่สุดและในส่วนของอุณหภูมิสูงที่สุดจะอยู่ในช่วงฤดูร้อน ซึ่งจะส่งผลต่อปริมาณคอร์ติซอลที่เพิ่มมากขึ้น โดยค่าปริมาณของคอร์ติซอลจะแสดงถึงความเครียดต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นจากหลายปัจจัยที่กระทบต่อตัวแม่โคนมภายในฟาร์มโดยส่งผลต่อระบบสืบพันธุ์ การผสมติด รวมถึงการผลิตน้ำนม

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณฟาร์มโคนมเชียงใหม่เฟรมิลค์ฟาร์ม 379/1 หมู่ 7 ตำบลเหล่ายาว อำเภอบ้านโฮ่ง จังหวัดลำพูน ที่สนับสนุนข้อมูลเพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณนักศึกษาระดับปริญญาตรี และปริญญาโท ทุกท่านที่ช่วยในการเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาวิเคราะห์ข้อมูล

เอกสารอ้างอิง

- กรมปศุสัตว์. (2560). การเฝ้าระวังและควบคุมโรคระบาดสัตว์ที่พบบ่อยในฤดูหนาว. กรมปศุสัตว์.
<https://pvlo-ctr.dld.go.th/webnew/index.php/th/organization-menu>.
- กรมอุตุนิยมวิทยา. (2562). สภาพอากาศ พ.ศ. 2562 ท่าอากาศยานนานาชาติเชียงใหม่. กรมอุตุนิยมวิทยา.
<https://th.weatherspark.com/h/s/149062/2019/>
- ชัยณรงค์ ปั่นคง. (2555). การพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอรอนเพื่อนำมาใช้ในการประเมินภาวะความเครียดในกลุ่มสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมขนาดเล็ก. งานวิจัยฝ่ายอนุรักษ์วิจัยผลสุขภาพสัตว์ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว.
- ธนวัต โชคเจริญ, สายัณห์ บัวบาน, วุฒิไกร บุญคุ้ม และวิบัณฑิตา จันทร์กิตติสกุล. (2560). ความสัมพันธ์ของดัชนีอุณหภูมิความชื้นสัมพัทธ์ต่อลักษณะจำนวนวันที่ท้องว่างในโคนมลูกผสมไทย-โฮลสไตน์ภายใต้สภาพอากาศร้อนชื้นของประเทศไทย. *แก่นเกษตร*, 45(3), 425-432.
- พงษ์ชาญ ณ ลำปาง. (2556). ผลของวิธีการขนส่งสุกรขุนในประเทศไทยที่มีต่อสวัสดิภาพและคุณภาพซาก. สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- เพ็ญประภา คงสุข, วิริยา ลุ่งใหญ่, พงศ์ธร คงมั่น, ณัฐกร แก้วประทุม และสมเกียรติ ประสานพานิช. (2562). การตอบสนองทางสรีรวิทยาของแม่โครีดนมเมื่อได้รับระบบน้ำพ่นร่วมกับพัดลมระบายอากาศในสภาพอากาศร้อนชื้น. *การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*, 57, 191-198.
DOI 10.14457/KU.res.2019.99
- วุฒิไกร บุญคุ้ม, มนต์ชัย ดวงจินดา, วิโรจน์ ภัทรจินดา, ศรเทพ ธรรมวาสร, จุรีรัตน์ แสนโกชน์ และสายัณห์ บัวบาน. (2553). จุดวิกฤติของดัชนีอุณหภูมิความชื้นสัมพัทธ์และระดับเลือดโคโคนมโฮลสไตน์ที่มีผลต่อผลผลิตน้ำนมและค่าพารามิเตอร์ทางพันธุกรรมภายใต้สภาวะเครียดเนื่องจากความร้อน. *แก่นเกษตร*, 38(3), 275-284.



- แสงจันทร์ ลิ้มจิรกาล, อัครมน ลิ้มสกุล และทวิวงศ์ ศรีบุรี. (2552). การประเมินสภาวะความรุนแรงสภาพภูมิอากาศของประเทศไทย: การวิเคราะห์ความเสี่ยงและความล่อแหลมของพื้นที่วิกฤติ [ร่างรายงานฉบับสมบูรณ์]. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.
- Averós, X., Martín, S., Riu, M., Serratosa, J., & Gosálvez, L. F. (2008). Stress response of extensively reared young bulls being transported to growing-finishing farms under Spanish summer commercial conditions. *Sci*, 119(1), 174-182
- Brown, J. L., Walker, S., & Steinman, K. (2004). *Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and nondomestic species* (2nd ed.). Smithsonian institution.
- Collier, R. J., Dah, G. E. L., & VanBaale, M. J. (2006). Major advances associated with environmental effects on dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 89(4), 1244-1253.
- Collier, R. J., Beede, D. K., Thatcher, W. W., Israel, L. A., & Wilcox, C. J. (1982). Influences of environment and its modification on dairy animal health and production. *Journal of Dairy Science*, 65(11), 2213-2227.
- Ebinghaus, A., Knierim, U., Simantke, C., Palme, R., & Ivemeyer, S. (2020). Fecal cortisol metabolites in dairy cows: A cross-sectional exploration of associations with animal, stockperson, and farm characteristics. *Animals*, 10(10), 1787.
- Hahn, G. L. (1981). Housing and management to reduce climatic impacts on livestock. *Journal of Animal Science*, 52(1), 175-186.
- Ingraham, R. H., Gillette, D. D., & Wagner, W. D. (1974). Relationship of temperature and humidity to conception rate of Holstein cows in subtropical climate. *Journal Dairy Science*, 57, 476-81
- Jalil, G. N., Lee, B. H., Kim, J. Y., Kim, B. W., Chemere, B., Park, K. H., & Sung, K. (2019). Comparing hair cortisol concentrations from various body sites and serum cortisol in Holstein lactating cows and heifers during thermal comfort zone. *Journal of Veterinary Behavior*, 30, 92-95. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2018.12.007>
- Johnson, H. D., Ragsdale, A. C., Berry, I. L., & Shanklin, M. D. (1963). *Temperature-humidity effects including influence of acclimation in feed and water consumption of Holstein cattle* (Research Bulletin No. 846). University of Missouri, Agricultural Experiment Station.



- Luca, C., Maria, N., Sara, P., Daniele, V., Radmila, P., & Francesco, A. (2015). Suitability of bovine bile compared to urine for detection of free sulfate and glucuronate boldenone, androstadienedione cortisol cortisone prednisolone prednisone and dexamethasone by LC-MS/MS. *Food Chemistry Science*, 188, 473-480.
- Mitlohner, F. M., Galyean, M. L., & McGlone, J. J. (2002). Shade effects on performance, carcass traits, physiology, and behavior of heat-stressed feedlot heifers. *Journal of Animal Science*, 80(8), 2043-2050.
- Mormède, P., Andanson, S., Aupérin, B., Beerda, B., Guémené, D., Malmkvist, J., Manteca, X., Manteuffel, G., Prunet, P., van Reenen, C. G., Richard, S., & Veissier, I. (2007). *Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. Physiology & Behavior*, 92(3), 317-339.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.12.003>
- National Research Council. (1971). Committee on physiological effects of environmental factors on Animals. In *Physiological effects of environmental factors on animals* (Publication No. 374). National Academy of Sciences.
- Oyewole, A., Heath, I. E., Adadevoh, B. K., & Steinbach, J. (1981). Plasma cortisol in *Bos taurus* and *Bos indicus* heifers in seasonal tropical climate. *Journal of Dairy Science*, 64(7), 1586-1592.
- Palme, R. (2019). *Non-invasive measurement of glucocorticoids: advances and problems. Physiology & Behavior*, 199, 229-243. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.11.021>
- Palme, R., & Möstl, E. (1997). Measurement of cortisol metabolites in faeces of sheep as a parameter of cortisol concentration in blood. *International Journal of Mammalian Biology*, 62(Suppl. 2), 192-197.
- Pompa, G., Arioli, F., Casati, A., Fidani, M., Bertocchi, L., & Dusi, G. (2011). Investigation of the origin of prednisolone in cow urine. *Science*, 76(1-2), 104-110.
- Rensis, F. D., & Scaramuzzi R. J. (2003). Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow-A review. *Theriogenology*, 60(6), 1139-1151.
[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00126-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00126-2)
- Rensis, F. D., Marconi, P., Capelli, T., Gatti, F., Facciolongo, F., Franzini, S., & Scaramuzzi, R. J. (2002). Fertility in postpartum dairy cows in winter or summer following estrus synchronization and fixed time AI after the induction of an LH surge with GnRH or



hCG. *Theriogenology*, 58(9), 1675–1687. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01082-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01082-8)

Szenci, O., Karen, A., Bajcsy, Á. Cs., Gáspárdy, A., Sousa, N. M., & Beckers, J. F. (2011). Effect of restraint stress on plasma concentrations of cortisol, progesterone and pregnancy associated-glycoprotein-1 in pregnant heifers during late embryonic development. *Theriogenology*, 76, 1380–1385. <https://doi:10.1016/j.theriogenology.2011.05.030>

Tallo-Parra, O., Manteca, X., Sabés-Alsina, M., Carbajal, A., & Lopez-Béjar, M. (2015). Hair cortisol detection in dairy cattle by using EIA: Protocol validation and correlation with faecal cortisol metabolites. *Animal*, 9(6). <https://doi.org/10.1017/S1751731115000294>

Vitali, A., Bernabucci, U., Nardone, A., & Lacetera, N. (2016). Effect of season, month and temperature humidity index on the occurrence of clinical mastitis in dairy heifers. *Advances in Animal Biosciences*, 7(3), 250–252. <https://doi:10.1017/S2040470016000315>

West, J. W., Mullinix, B. G., & Bernard, J. K. (2003). Effects of hot, humid weather on milk temperature, dry matter intake, and milk yield of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 86(1), 232-242.