

Állatorvostudományi Egyetem
Szülészeti Tanszék és Haszonállat-Gyógyászati Klinika

Sörényes hangyász ivari ciklusának meghatározása
noninvazív módszerekkel

Készítette: Molnár Péter András

Témavezetők:

Dr. Somoskői Bence

Állatorvostudományi Egyetem,
Szülészeti Tanszék és Haszonállat-
gyógyászati Klinika

Tudományos munkatárs

Dr. Bakonyi László

Jászberényi Állat- és Növénykert
Szakállatorvos

Budapest, 2019

TARTALOM

| | |
|--|----|
| Szülészeti Tanszék és Haszonállat-Gyógyászati Klinika | 1 |
| 1 Rövidítések jegyzéke..... | 3 |
| 2 Bevezetés | 4 |
| 3 Szakirodalmi áttekintés | 6 |
| 3.1 A sörényes hangyász (<i>Myrmecophaga tridactyla</i>) általános jellemzői..... | 6 |
| 3.2 Állatkerti tartásuk..... | 7 |
| 3.3 Természetvédelmi státusz | 8 |
| 3.4 A sörényes hangyász (<i>Myrmecophaga tridactyla</i>) szaporodásbiológiája..... | 9 |
| 3.5 Rokonfaj..... | 11 |
| 3.6 Az állatkertek génmegőrző szerepe..... | 11 |
| 3.7 A nyál állatorvosi és humánorvosi felhasználása ciklusdiagnosztikára | 12 |
| 3.8 A nyál felhasználása állatkerti kutatásokban..... | 13 |
| 4 Célkitűzés | 15 |
| 5 Anyag és Módszer..... | 16 |
| 5.1 Az alanyok..... | 16 |
| 5.1.1 Tartás és takarmányozás..... | 17 |
| 5.2 A mintagyűjtés módjai | 19 |
| 5.3 A mintagyűjtés ütemterve..... | 21 |
| 5.4 A laboratóriumi munka..... | 22 |
| 5.4.1 A laborban felhasznált anyagok és eszközök..... | 22 |
| 5.5 A laboratóriumi munka menete | 24 |
| 6 Eredmények | 30 |
| 6.1 Jászberényi minták | 30 |
| 7 Megbeszélés, következtetések | 34 |
| 8 Összefoglalás | 35 |
| 9 Summary | 36 |
| Irodalom..... | 37 |
| Köszönetnyilvánítás | 40 |

1 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

CITES: Convention on International Trade in Endangered Species, Egyezmény a veszélyeztetett vadon élő állat- és növényfajok nemzetközi kereskedelméről

EAZA: European Association of Zoos and Aquaria, Állatkertek és Akváriumok Európai Szövetsége

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay, Enzimhez kapcsolt immuno szorbens vizsgálat

HPLC: High Pressure Liquid Chromatography, Magas nyomású folyadék kromatográfia

IUCN: International Union for Conservation of Nature, Természetvédelmi Világszövetség

NSB: Non-Specific Binding, Nem specifikus kötődés

RIA: Radioimmunoassay

WAZA: World Association of Zoos and Aquarium, Állatkertek és Akváriumok Világszövetsége

2 BEVEZETÉS

Az állatok hormonális működésének feltérképezése kulcsfontosságú ahhoz, hogy megértsük alapvető élettani működésüket és szaporodásbiológiájukat, mégis napjainkig rendkívül keveset tudunk a bolygónkon élő emlősök endokrinológiájáról. Mindössze az emlősök 2%-ának hormonális működéséről van bármilyen részletességű feljegyzésünk, de madarakban, hüllőkben, kétélűekben és gerinctelen állatokban még alacsonyabb az arány (Monfort, 2003; Wildt, 2003).

Az állatkertben tartott sörényes hangyászok veszélyes állatok, amelyek hajlamosak az agresszív viselkedésre. Nehezen tréningezhetőek, ezért a fájdalmas vérvételre nem lehet felkészíteni őket. Pusztán ciklusdiagnosztika céljából rendszeresen invazív módon vért venni tőlük nem volna etikus állatjóléti szempontból, illetve nem lenne praktikus anyagi szempontból sem. Alternatív megoldásként szóba jön a bélsár és a nyál, mint lehetséges minta a hormon meghatározásokhoz. A sikeres mérési eredményekhez elengedhetetlen, hogy pontosan tudjuk nyomon követni melyik bélsár minta melyik egyedtől származik, azonban hely és eszközhiány miatt sokszor még az állatok befogása és elkülönítése is körülményes. Még több kifutó, illetve speciális kaloda kellene hozzá, ami még jobban növeli a stresszhatást (1. ábra). Nagy szaktudással bíró személyzetre, állatorvosra lenne szükség minden alkalommal a minta levételére. Állatkerti körülmények között tavasz végétől ősz elejéig a sörényes hangyászok szabadtéri, medencés kifutón vannak tartva. Ilyenkor a fajra jellemző, hogy a medence vizébe ürítik székletüket, emiatt a bélsárból történő mintavétel ebben az időszakban csak a medence tartós leengedésével valósulhatna meg, ami a meleg nyári napokon kellemetlen lenne az állatoknak.

1. ábra: Vérvétel okozta stressz miatt bepánikolt hangyász által meghajlított kaloda



Ezzel szemben a nyálból történő mintavétel egyáltalán semmilyen stresszt vagy fájdalmat nem okoz. Nincs szükség költséges és veszélyes kalodára, amiben az állat még meg is sérülhet. Kevesebb férőhellyel rendelkező állatkertben is megoldható, mert nem igényli az állatok elkülönítését egymástól. Nem fontos a mintavételhez az állatorvosi jelenlét, hisz a gondozók is el tudják végezni. A forró nyári napokon is könnyedén végre lehetne hajtani anélkül, hogy leengednénk a medencéből az állatok vizét ezzel még több felesleges stresszt okozva nekik.

Ha kutatásunk sikeresen zárul és megállapíthatjuk, hogy a noninvazív módon nyálból mért progeszteron is alkalmas ciklusdiagnosztikára sörényes hangyászokban, az hosszútávon nagyban segítheti a faj megőrzésére irányuló törekvéseket, a tenyésztési programok sikerességét. Lenne egy gyorsan, egyszerűen alkalmazható módszer, ami segítene felderíteni sörényes hangyászokban, hogy az utódnemzés elmaradásának oka endokrinológiai háttérű-e. Magának az ivari ciklus monitorozásnak azért is lenne értelme, mert ezek az állatok ivarzáskor sem mutatnak igazán jellegzetes külsőleg megfigyelhető viselkedésformát, azonban ha ismernénk a hormonális ciklusukat, pontosan meghatározhatnánk ovulációjuk várható időpontját és ezáltal a termékenyítés legoptimálisabb időszakát is. Ezen tapasztalatok később más, sebezhető és veszélyeztetett besorolású, állatkertben tartott állatfajoknál is hasznosak lehetnek.

3 SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 A sörényes hangyász (*Myrmecophaga tridactyla*) általános jellemzői

A sörényes hangyász (*Myrmecophaga tridactyla*) (2. ábra) az emlősök (Mammalia) osztályába, azon belül a vendégízületesek (Xenarthra) öregrendjébe és azon belül a szőrös vendégízületesek (Pilosa) rendjébe tartozó faj, akárcsak közeli rokonai a lajhárfélék (Folivora). Ma élő közeli rokonai még a páncélos vendégízületesek (Cingulata) rendjébe tartozó tatufélék (Dasypodidae) (Gardner, 2008). Nevüket az utolsó hátszigolyán és az ágyékszigolyákon található járulékos nyúlványról kapták. Elterjedési területe Közép- és Dél-Amerika. Belize és Guatemalától Argentína északi részéig trópusi esőerdőkben és füves pusztákon is megtalálható (Redford és Eisenberg, 1992).

2. ábra: A sörényes hangyász (Forrás: nationalgeographic.com.au)



Rovarevő állat, fő tápláléka hangyák és természetek (3. ábra). A sternumról eredő jól fejlett, 60 cm-re kiölthető nyelvvel percnként 150-160 nyelvcsapást képes végezni (Smith, 2007; Reiss 1997, 2000). Ennek és éles karmainak segítségével naponta kb. 200 hangya- és természetvár mintegy 30 000 rovarát fogyasztja el (Naples, 1999; Naugher, 2004). A sörényes hangyász képtelen magának gyomorsavat előállítani, ezért az áldozataiból kinyert hangyasavat használja fel az emésztésre (Naples, 2001). Speciális táplálkozási módja miatt alsó és felső állkapcsa 45 cm-re megnyúlt, csőszerűen összeforrtak (Shaw, 1987).

3. ábra: A sörényes hangyász táplálkozása (Forrás: www.bbc.co.uk)



Különösen lassú az anyagcseréje, ami miatt testhőmérséklete az egyik legalacsonyabb az emlősök között, mindössze 32-33 Celsius-fok (Rodrigues, 2008). Farkát alváskor testére borítja, hogy éjszaka ne csökkenjen még tovább testhőmérséklete. Naponta akár 15 órát is tölthetnek alvással. Élettartamuk vadon 14-16 év (Redford és Eisenberg, 2000). Méretéből adódóan ő maga kevés ragadozónak a prédája, de alkalmanként áldozatul esik a jaguároknak és pumáknak (Nowak, 1999). Nappal- vagy éjjel-aktív életmódot is folytathat, ami főleg a megvilágított órák számától és a hőmérséklettől függ (Camilo-Alves, 2006). Magányosan élő állat, amely fajtársával csak párzáskor találkozik. Szárazföldi élőlények, azonban jól úsznak. Hosszú, erős karmait úgy védi, hogy járás közben a talpa alá hajlítja őket és csuklójára támaszkodik. Nem látnak jól (Redford és Eisenberg, 2000), azonban fejlett bulbus olfactoriusuknak köszönhetően kifinomult szaglással rendelkeznek, amely mintegy 40-szer jobb, mint az emberé (Rodrigues, 2008).

3.2 Állatkerti tartásuk

Élettartamuk fogságban akár 24-26 év is lehet (Jones, 1982). Állatkerti körülmények között almából, banánból, körtéből, paradicsomból, túróból, főtt tojásból, gammarusból, kutyatápból, zabpehelyből, tőzeggől és marhaszívből álló turmixszal etetik őket, kiegészítve lisztkukacokkal (4. ábra). Fogságban tartott sörényes hangyászoknál néha szükséges a takarmányt mesterségesen hangyasavval kiegészíteni, mert ennek hiányában emésztőszervi problémák

léphetnek fel. Az állatkertekben tartott sörényes hangyászok vadon élő fajtársaiknál korábban, mintegy 1,5-2,5 évesen válnak ivaréretté (Dortmund Zoo, Nyíregyházi Állatpark; Knott, 2013), és egészen 24-25 éves korukig termékenyek is maradnak (Belhumeur, 2013). Magyarországon jelenleg 5 állatkertben tartanak sörényes hangyászt: a Fővárosi Állat- és Növénykertben, a Nyíregyházi Állatparkban, a Jászberényi Állat- és Növénykertben, a Szegedi Vadasparkban, és a győri Xantus János Állatkertben.

4. ábra: A sörényes hangyász állatkerti tápláléka (Forrás: SAJÁT, 2019)



3.3 Természetvédelmi státusz

A Közép- és Dél-Amerikában őshonos vadon élő sörényes hangyászok száma az utóbbi évtizedekben rohamosan csökkent. A Természetvédelmi Világszövetség Vörös Listáján sebezhető besorolást kapott, köszönhetően természetes élőhelye rohamos pusztulásának, illetve annak, hogy illegálisan vadásszák húzáért, szőréért és karmáért. A sebezhető besorolást azért kapta, mert 2000 és 2010 között 30%-al, a következő 10 évben pedig várhatóan még 20%-al fog csökkenni a vadon élő populáció létszáma (The IUCN Red List of Threatened Species, 2014; Aguiar, 2008; Belhumeur, 2010). A Washingtoni Egyezmény (CITES – Convention on International Trade in Endangered Species) II. függelékében is helyet kapott, amiben olyan fajok szerepelnek, amelyeket veszélyeztet a nagymértékű kereskedelem, állományuk azonban ma még nincs kritikus helyzetben (CITES species database: *Myrmecophaga tridactyla*).

3.4 A sörényes hangyász (*Myrmecophaga tridactyla*) szaporodásbiológiája

A sörényes hangyászok testalkat és színezet vonatkozásában nem mutatnak jellegzetes ivari dimorfizmust (Shaw, 1987). A vadonban 3-4 éves korukra válnak ivaréretté (Nowak, 1999). Innentől kezdve egész évben pározhatnak (5. ábra). Március és május között különösen aktívak (Rodrigues, 2008), ugyanakkor vadon élő és állatkertben tartott állatoknál is egész évben várható fialás (Belhumeur, 2013). Napi ritmusukat tekintve optimális hőmérsékleti és éghajlati viszonyok között 18:00-19:00 között a legaktívabbak.

A nőstény állat ősztusz fázisának idején kevés megfigyelhető karakterisztikus viselkedésmódot mutat. A hímen azonban látható, hogy ilyenkor ideges, nyugtalan, mindenhova követi a nőstényt miközben az urogenitális tájékát szaglássza. A jellemzően egyedül élő állatok ilyenkor párban táplálkoznak ugyanazokból a természetvárból (Shaw, 1987). Ez nagyjából 3 napig tart, mely idő alatt többször is párzanak, ilyenkor a nőstény az oldalára fekszik, hogy a hím hozzáférjen. Feltételezhető tehát, hogy az anális mirigyek váladéka jelzőértékkel bír a szignált hagyó egyed szaporodási kondíciójáról (Rodrigues, 2008). Egy kutatás szerint a nőstény hangyász semmilyen specifikus viselkedést nem tanúsít az ősztusz alatt (Patzl, 1998). Ezzel szemben egy másik kutatás hüvelyi váladékozást figyelt meg az ivarzó nőstényeken, valamint hogy felemelik farkukat az udvarlás során (Shaw, 1987). Egy frissebb kutatás rendszeres ősztusz alatti vérzést is megfigyelt a termékeny nőstények esetében (Schauerte, 2005). A korábban a rokonrend tatuféléknél megfigyelt késleltetett embrióbeágyazódás beigazolódott, hogy a sörényes hangyászokra is jellemző (Knott, 2013).

5. ábra: A sörényes hangyász szaporodása (Forrás: animalfactsencyclopedia.com)



A sikeres megtermékenyülést egy 171-183 napos gesztáció követi, aminek a végén egy átlagosan 1,3-1,4 kg-os utódot hoz a világra (Naugher, 2004; Knott, 2013). Ultrahanggal már a 12. héten biztosan detektálható a vemhesség (Schauerte, 2005). Érdekes tény, hogy a hangyászok placentája az emberhez hasonlóan haemochorialis mintázatot mutat, vagyis nincs anyai szövetekből származó határoló hártya a chorionbolyhok és az anya vére között (Mess, 2012). Az újszülött hangyászt az anyja a hátára veszi, és ott hordja egészen 9-10 hónapos koráig, amikor is elkezdnek önállóvá válni (6. ábra). Teljesen önállóvá csak akkor válnak, amikor az anya újra vemhesül, de ha erre nem kerül sor, akkor nagyjából 2 éves korukra. Hozzávetőleg 3 hónapos korukra szoknak át az anyatejéről a szilárd táplálékra (Nowak, 1999; Smith, 2007). Nagyjából 3 évesen érik el a kifejlett felnőtt kori testméretüket (Shaw, 1987).

6. ábra: Újszülött sörényes hangyász (Forrás: yorkshirewildlifepark.com)



Ösztrogén és progesztagén metabolitokat illetve glükokortikoidokat mértek már bélsárból 6 hónapon keresztül heti kétszer enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálatokkal (ELISA). Ezek alapján a nőstény sörényes hangyászok poliösztroszosak, a nem szezonális ösztrosz ciklus körülbelüli átlagos hossza $51,3 \pm 16,1$ nap, az ösztrosz nagyjából $16,0 \pm 4,8$ napig, a metösztrosz és a diösztrosz $24,7 \pm 2,9$ napig és a proösztrosz $10,8 \pm 4,0$ napig tart. Kijelenthető tehát, hogy a bélsárból mért ösztrogén és progeszteron metabolitok megbízhatóan alkalmazhatók ivari ciklus monitorozásra sörényes hangyászokban (Patzl, 1998). Kutyafélékhez hasonlóan a proösztroszt diapedézis jellemzi a méhfal epithéliumában, mely az ösztroszig folytatódik a nőstény hangyászok egyharmadánál. Ez alkalmanként véres hüvelyi váladékozás formájában figyelhető meg. Amikor az ellés után nem volt laktáció, az ellést követő 20-34. napon kezdődött

a következő ösztusz. Amikor volt laktáció, akkor az ellést követő 58-152. napon került újra ösztusz állapotba az állat (Schauerte, 2005).

3.5 Rokonfaj

Egy másik hangyászfajban, a dolmányos hangyászban (*Tamandua tetradactyla*) (7. ábra.) végeztek ivari ciklus meghatározást vizeletből mért hormonokkal és hüvelycitológiával, amiből megállapították, hogy ebben a fajban 42 nap az ösztusz ciklus hossza (Hay, 1994). Szintén dolmányos hangyászban bebizonyították, hogy van összefüggés a hormonális változások és a hüvelyből történő vérzés között. Az első vérzést követően 3 héttel lép az ösztusz fázisba az állat. A nőstény dolmányos hangyász az utód megszületése után 6 hónapig laktál, az ösztusz ciklus azonban a szülés után 3 héttel újra kezdődik, tehát ez nem függ a laktációtól (Kusuda, 2011).

7. ábra: Dolmányos hangyász (Forrás: animalspot.net)



3.6 Az állatkertek génmegőrző szerepe

Napjainkban, amikor egyre több állatfaj válik sebezhetővé, veszélyeztetetté, egyre nagyobb figyelmet kapnak az állatkertek génmegőrzést, fajmentést segítő programjai. Manapság az állatkertek elsődleges szerepe a genetikai diverzitás fenntartása, kutatás és a látogatók oktatása (Tudge, 1991). Segítenek felhívni az emberek figyelmét olyan problémákra, mint a kihalt félben lévő állatfajok és így támogatókat szerezni a fajok mentésére irányuló programokhoz. Az Állatkertek és Akváriumok Világszövetsége (WAZA) 1993-ban kiadta első programját a fajmegőrzésre, majd 2004-ben ezt kibővítették és a világ állatkertjei mai napig ennek elveit követve törekednek a globális probléma megoldására. Természetesen az állatkertek részéről nem elegendő a természetes élőhely minél pontosabb lemodellezése, az állatok igényeit

kielégítő takarmányozás vagy az állatorvosi ellátás és ezek segítségével a magas színvonalú életminőség biztosítása az állat számára. Gondolniuk kell a következő generációkra is, ezért tenyésztési programokat hoztak létre a veszélyeztetett fajok koordinálására. Az állatkertek egy számukra könnyen hozzáférhető globális adatbank segítségével informálódhatnak arról, hogy melyik állatkertben található az adott fajnak egy olyan egyede, amely génállománya megfelelő lenne az általuk tartott állattal való pároztatásra, utódnemzésre (European Association of Zoos and Aquaria). Hosszú távú célja ezeknek a programoknak, hogy egyszer majd visszatelepíthetők legyenek az állatok a vadonba, természetes élőhelyükre. Ezt számos állatfaj esetében már sikeresen kiviteleztek, azonban sörényes hangyászok esetében erre egyelőre nem volt példa a kevés születés és a magas fiatalkori elhalálozás miatt.

3.7 A nyál állatorvosi és humánorvosi felhasználása ciklusdiagnosztikára

Különböző haszonállatokban napjainkban már széles körben elterjedt a nyálban található ösztrogén és progeszteron, enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálatokkal (ELISA) és radioimmunoassay (RIA) módszerekkel való mérése ivari ciklus meghatározására, illetve korai vemhesség diagnosztizálására, de a legoptimálisabb vemhesítési időpont előrejelzésére is alkalmasak ezek az eljárások. Egy kutatás keretében, üszökben és többször ellett tehenekben, vemhesség alatt és a postpartum időszakban, vérplazmában és nyálban mértek progeszteron koncentrációt RIA módszerrel. A kísérlet eredménye az volt, hogy a nyálban és a vérplazmában mért hormonkoncentrációk szignifikánsan korrelálnak egymással szarvasmarhában, tehát a nyál jól alkalmazható ciklusdiagnosztikára (Kanchev, 1988). Juhokban is hasonló eredményeket kaptak a reprodukzív funkciók nyállal történő monitorozását illetően (Needham, 2007). Egy frissebb tanulmány zebu x holstein-fríz keresztezett tejelő tehenekben hasonlította össze, ELISA módszerrel, a szérum ösztradiol és progeszteron szintjét a tej, a nyál, illetve a vizelet hormonszintjeivel. A kutatás eredménye az volt, hogy legmegbízhatóbban a tejben mért progeszteron mennyisége korrelál a szérumban mért értékekkel (Mekonnin, 2017).

Humánorvosok bebizonyították, hogy nőkben is korrelál a vérplazmában mért progeszteron mennyisége a nyálban mérttel (Bourge, 1986). A vérben található progeszteron több mint 80%-a fehérjéhez kötött (Tallon, 1984). A nyálban leírt szabad progeszteron mennyiség nagyjából 2-10%-a a vérplazmában mért értéknek (Riad-Fahmy, 1981). Egy későbbi, humán esetekkel foglalkozó tanulmány leírta, hogy a női vizelet ösztrogén és progeszteron tartalma mérhető ELISA és RIA módszerekkel is, illetve ezek egybeesnek a vérplazmában mért értékekkel.

Bizonyított tehát, hogy a noninvazív módszerek nőkben alkalmasak a menstruációs ciklus leírására, az ovuláció előrejelzésére, valamint a terhesség korai detektálására (Munro, 1991).

3.8 A nyál felhasználása állatkerti kutatásokban

Ugyan ivari ciklus megfigyelésére még nem elterjedt a nyál használata állatkerti állatoknál, de más jellegű kutatásokra, illetve diagnosztikai célra már többször használták. Komodói varánuszok (*Varanus komodoensis*) nyálát vizsgálták, hogy bővebb ismereteket kapjunk sajátos orális flórájáról, különös tekintettel az anaerob baktériumokra, amelyek nagy segítségükre vannak a zsákmányállat elejtésében (Goldstein, 2013). Madagaszkárban vadon élő, illetve állatkertekben fogságban élő gyűrűsfarkú makik (*Lemur catta*) spontán foghullását próbálták összefüggésbe hozni nyáluk savas pH-jával, náluk ezért volt szükség rendszeres mintavételre (Cuozzo, 2008). Ruandában hegyi gorillákon (*Gorilla beringei beringei*) és keleti gorillákon (*Gorilla beringei graueri*) kísérleteztek különböző fájdalommentes noninvazív nyálminta vételi technikákkal, amelyek közül a legpraktikusabbat azóta is rendszeresen használják kutatásokra (Smiley, 2010). Nyugati síkvidéki gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*) vizeletét és nyálát használták arra, hogy összefüggést találjanak az állatok viselkedése és a kiválasztott oxitocin mennyisége között (Leeds, 2018). Egy német tanulmány keretében szélesszájú orrszarvú (*Ceratotherium simum*), keskenyszájú orrszarvú (*Diceros bicornis*), és indiai orrszarvú (*Rhinoceros unicornis*) nyálában mérték a tannin-kötő fehérjék mennyiségét (Clauss, 2005). Három olyan állatkerti kutatás volt, amikor nyálból ELISA segítségével vizsgálták kortizol szintet, hogy mérhető értékeket kapjanak bizonyos stressz-faktorok hatásáról az állatok jóllétére: ázsiai elefántban (*Elephas maximus*); afrikai elefántban (*Loxodonta africana*); és dromedár tevében (*Camelus dromedarius*) (Menargues, 2012; Majchrzak, 2015; Casares, 2016).

Egzotikus állatok nyálából eddig két alkalommal mérték androgéneket: radioimmunoassay (RIA) segítségével a sebezhető besorolású dél-amerikai manátusból (*Trichechus inunguis*), illetve palackorrú delfinből (*Tursiops truncatus*) nagy nyomású folyadékkromatográfiával (HPLC). Ezek a vizsgálatok bebizonyították, hogy a manátuszokban a nyál, a vizelet, és a bélsár minták tesztoszteron koncentrációja korrelálnak egymással, és megbízhatóan egybecsengenek az állat élettani viselkedésével, ezáltal jó noninvazív módszerek a hím állatok reprodukciós ciklusának monitorozására (Hogg, 2005; Amaral Rde, 2009). Eddig egyetlen állatkerti tanulmány volt, amelyben nőstény állatok ivari ciklusának feltérképezésére nyálból mért progeszteron metabolitokat használtak: afrikai elefántokban (*Loxodonta africana*) ELISA módszerrel. Céljuk ezzel nekik is a tenyésztési program hatékonyságának növelése volt ebben

a sebezhető besorolású fajban. A kutatás eredménye az volt, hogy a nyál és a vizelet mintákban mért progeszteron mennyisége korrelálnak egymással, tehát megbízhatóan alkalmazhatóak az ivari ciklus monitorozására ebben a fajban (Illera, 2014).

4 CÉLKITŰZÉS

Elsődleges célunk megállapítani, hogy a sörényes hangyász (*Myrmecophaga tridactyla*) sajátos anatómiája és élettani működése mellett van-e lehetőség rendszeres nyál mintavételre, és ha igen akkor mérhető mennyiségben kinyerhető-e belőle progeszteron, ösztrogén és tesztoszteron laboratóriumi körülmények között radioimmunoassay (RIA) módszerrel. Alkalmazható-e ez az eljárás a nőstény sörényes hangyász reprodukciós ciklusának monitorozására? Alkalmazható-e ez az eljárás a hím sörényes hangyász tesztoszteron ciklusának monitorozására? Korrelálnak-e a bélsár mintákból mért eredmények a nyálmintákból mért eredményekkel? További céljaink bővebb ismereteket szerezni a sörényes hangyász faj szaporodásbiológiájáról, illetve elsőként sikeresen alkalmazni nőstény egzotikus állat nyálán a radioimmunoassay (RIA) módszert ciklusdiagnosztikai céllal, és elsőként használni sörényes hangyász nyálát kutatási célra.

5 ANYAG ÉS MÓDSZER

A kutatásunknak négy fő része volt. Első a körültekintő szakirodalmi áttekintés, kapcsolatfelvétel a kutatást segítő állatkertekkel, az elérhető egyedszám felmérése, és a kísérlet gyakorlati részének alapos megtervezése. Második lépés volt konzultálni az állatkertek személyzetével a mintavételi módokról, és a mintagyűjtés megkezdése a helyszínen, fotódokumentáció. A harmadik fázis a minták összegyűjtése, 4°C-ra hűtött tárolóban a laboratóriumba szállítása, és a laboratóriumi endokrinológiai vizsgálatok végrehajtása volt. Végezetül pedig a kapott eredmények összegzése, megbeszélése az állatkertek személyzetével, és statisztikai számítások következtek.

5.1 Az alanyok

Jászberényben a nőtény sörényes hangyász (Zuzi) (8. ábra) 2012.08.04-én született Poznanban, Lengyelországban. Apja Magdeburgban, Németországban született 2005.02.09-én, anyja Zürichben, Svájcban 2006.01.27-én. Zuzi 2014.04.16-án került át a jászberényi állatkertbe egy nemzetközi tenyésztési program terv részeként. Tömege a kísérlet megkezdésekor 66,1 kg volt. A jászberényi hím állat (Jorgi) (8. ábra) 2013.05.26-án született Dortmundban, Németországban majd 2014.03.19-én költöztették Magyarországra. Apja 2007.08.13-án született Dortmundban, anyja pedig 2007.09.29-én szintén a Dortmundi Állatkertben. Jorgi tömege az első mintavételkor 55,6 kg volt (1. táblázat).

8. ábra: Zuzi és Jorgi (Forrás: SAJÁT, 2019)



Jászberénybe kerülésük óta az állatkert személyzete többször megfigyelt ivarzási jeleket Zuzin és ilyenkor Jorgi is nyugtalanul, idegesen viselkedett, de a nőtény egyszer sem vemhesült. A korábbi években volt, hogy az állatkert személyzete megpróbált Zuzitól vért venni vagy diagnosztikai célú ultrahang vizsgálatot végrehajtani, azonban ez nem sikerült. Az állat annyira zaklatott lett, hogy meghajlította a speciálisan neki készített fém kalodát, a hordozható ultrahang készüléket pedig szétörte. Sajnos a sörényes hangyászok nem rendelkeznek olyan fejlett kognitív, szellemi képességekkel, hogy lehessen őket tanítani, tréningezni az állatorvosi vizsgálatok eltűrésére.

A nyíregyházi nőtény állat (Manka) 2012.06.30-án Koppenhágában, Dániában született, míg a hím párja (Marvin) 2013.12.13-án Nykobingban, szintén Dániában. 2014 októberében egyszerre vitték őket a Nyíregyházi Állatparkba. Amióta Magyarországon vannak rendszeresen párzanak. Márciustól májusig a legaktívabbak és már kétszer is történt sikeres vemhesülés. Elsőként 2015 októberében született két kölyökhangyász. Az egyik elpusztult, míg a másik, aki egy hím állat volt pedig Liberecbe, Csehországba került a tenyésztési program részeként. Két évvel később 2017.04.26-án egy nőtény született, de sajnos 2017.05.11-én trauma miatt ő is elpusztult. 2017 decemberében megszületett még egy utód, de mivel túlságosan alulfejlett volt, ezért ez az egyed azonnal elpusztult. Érdekes módon a nyíregyházi nőtény hangyász engedte, hogy ultrahang készülékkel vizsgálják a vemhesség alatt. 2019.01.27-én van feljegyzés újabb párzásról, de ebből utód nem született (1. táblázat).

1. táblázat: Alanyok (Forrás: SAJÁT, 2019)

| Név | Állatkert | Ivar | Születési idő | Vemhesülés | Utód |
|--------|-------------|--------|---------------|------------|----------------|
| Zuzi | Jászberény | Nőtény | 2012.08.04. | 0 | 0 |
| Manka | Nyíregyháza | Nőtény | 2012.06.30. | 3 | 4 (1 nőtt fel) |
| Jorgi | Jászberény | Hím | 2013.05.26. | - | - |
| Marvin | Nyíregyháza | Hím | 2013.12.13. | - | - |

5.1.1 Tartás és takarmányozás

Jászberényben Jorgi és Zuzi egész évben egy nagy kültéri kifutón vannak tartva közösen. Ezen a kifutón található egy nagy medence is, ami azonban csak tavasz végétől, ősz elejéig van felengedve vízzel, tehát a melegebb hónapokra (9. ábra). Ezt a medencét nem csak fürdésre használják, de nyáron a vízbe ürítik székletüket is, ami ellehetleníti a bélsár mintagyűjtést ebben az időszakban, ezért is volna hasznos, ha lehetne az állatok nyálát használni

ciklusdiagnosztikára. Környezetgazdagítás céljából találhatóak még kérges fák és különböző hasonló alkalmazhatóságok, amiket kaparhatnak, a karmaikat élezzhetik rajta.

9. ábra: A jászberényi sörényes hangyászok kifutója (Forrás: SAJÁT, 2019)



Estéenként a gondozók betereleik őket fedett, zárt alvóhelyükre, ahol viszont már elkülönítve vannak (10. ábra). Reggel itt kapják meg almából, banánból, körtéből, paradicsomból, túróból, főtt tojásból, gammarusból, kutyatápból, zabpehelyből, tőzgeből, marhaszívből, és lisztkekacokból álló tápjukat (4. ábra), amit a dortmundi központban írtak elő, mint a sörényes hangyászok legoptimálisabb, minden igényt kielégítő takarmányát. Ezután újra kiengedik őket a kifutóra.

10. ábra: Zuzi a zárt alvóhelyén (Forrás: SAJÁT, 2019)



A nyíregyházi sörényes hangyászokat nyáron a jászberényihez hasonló szabadtéri kifutón tartják, ahol szintén van medence, illetve kaparható fából készült berendezések (11. ábra). Télen azonban egy beltéri helyen tartják őket környezetgazdagítás céljából szintén megtalálhatóak farakások, kötelek. Amikor valószínűsíthető, hogy a nőstény állat vemhes, olyankor elkülönítik őt, és akár nyáron is a téli helyen tartják, hogy megvédjék a hím állat olykor agresszív viselkedésétől, és minél kevesebb stressznek tegyék ki. Nyíregyházán a főleg gyümölcsökből álló pépes tápon kívül külön is kapnak marhahúst és lisztkukacokat (4. ábra).

11. ábra: A nyíregyházi hangyászok nyári kifutója (Forrás: SAJÁT, 2019)



5.2 A mintagyűjtés módjai

A nyál mintavétele (12. ábra) speciális megoldást igényelt. Ez részben a sörényes hangyászok apró szájnylásának volt köszönhető, részben pedig annak, hogy mivel nem rágnak, ezért nagyon kevés nyálat termelnek. A szarvasmarhákban és más gazdasági haszonállatokban használatos Salimetrics és ehhez hasonló nyálgyűjtési eszközök a sörényes hangyász fajban nem alkalmazhatóak. Korábbi kutatásokból azt tapasztaltuk, hogy a nagy méretű, szakítható pamut vatta nem használható jól erre a célra, mert túl nehéz belőle kinyerni a nyálat. Végül úgy döntöttünk, hogy hagyományos fültisztító pálcát alkalmazunk. Mivel ezek a pálcák nem egységes tömegűek, ezért a későbbi laboratóriumi munka szempontjából fontos volt, hogy a mintagyűjtés előtt minden pálcának lemérjük a nyál nélküli tömegét. Maga a mintavétel reggelente etetés előtt történt. Az állat takarmányának, és a hangyászok által kedvelt, humán

fogyasztásra szánt joghurtnak a felmutatásával, megszagoltatásával próbáltunk minél jobban nagyobb mértékű nyálszekréciót indukálni. Amikor ez sikerült, a fültisztító pálcával próbáltunk minél több nyálat kitörölni a hangyász szájából és az ajkairól. Megpróbáltunk egy egyszerűbb módszert is, vagyis etetés után az etetőtálkában maradt nyálat kitörölni, azonban ez a laborban okozott több nehézséget, mert a takarmány maradékkal kontaminált volt a minta. Az összegyűjtött nyálat 4 °C-ra hűtve tároltuk a laboratóriumba szállításig.

12. ábra: Nyál mintavétel (Forrás: SAJÁT, 2019)



A bélsár gyűjtése kevésbé volt körülményes. Jászberényben olyan időszakot választottunk a mintagyűjtésre amikor még nem engedték fel vízzel a medencét, így az állatok a szárazföldre ürítették székletüket. A hím és a nőstény állat ürülékét könnyű volt elkülöníteni egymástól, ugyanis mind a kettejüknek volt egy megszokott helye a kifutón, ahova jártak rendszeresen bélsarat üríteni. A széklet mintákat hermetikusan zárható simítózáras nylon zacskóba helyeztük (13. ábra), és ezeket is hűtőben tároltuk.

13. ábra: Sorbarendezett széklet minták zacskóban (Forrás: SAJÁT, 2019)



5.3 A mintagyűjtés ütemterve

Jászberényben a nőstény sörenyes hangyásztól (Zuzi) nyál és bélsár mintát is gyűjtöttünk. Nyálat heti 3-4-szer 2019.01.31-től, 2019.03.24-ig, míg bélsarat heti 5-6 alkalommal 2019.01.30-tól, 2019.04.13-ig. A hím sörenyes hangyásztól (Jorgi) csak bélsarat gyűjtöttünk, heti 2-3 alkalommal 2019.01.31-től, 2019.04.07-ig. Nyíregyházán a hím (Marvin) és a nőstény (Manka) hangyásztól is gyűjtöttünk nyálat heti 2-3 alkalommal 2019.06.07-től, 2019.07.07-ig (2. táblázat). A Nyíregyházi Állatparkban a mintavétel alatt fennált a vemhesség gyanúja ezért az állatok külön voltak tartva ebben az időszakban.

2. táblázat: Mintavétel (Forrás: SAJÁT, 2019)

| Név | Minta típus | Gyakoriság (hetente) | Időtartam (nap) |
|---------------|-------------|-------------------------|--------------------|
| Zuzi | Nyál | 3-4 | 52 |
| | Bélsár | 5-6 | 73 |
| Manka | Nyál | 2-3 | 30 |
| Jorgi | Bélsár | 2-3 | 66 |
| Marvin | Nyál | 2-3 | 30 |

A kis mintamennyiség miatt a Marvintól gyűjtött mintákat nem lehetett értékelni.

A begyűjtött minták időpontja a Jászberényi állatkertben (3. táblázat) (4. táblázat):

Zuzi:

3. táblázat: A Zuzitól gyűjtött bélsár minták időpontjai (Forrás: SAJÁT, 2019)

| | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| sorszám | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
| dátum | 01.30 | 02.01 | 02.03 | 02.04 | 02.06 | 02.07 | 02.08 | 02.09 | 02.11 | 02.13 | 02.15 | 02.16 | 02.17 | 02.18 |
| sorszám | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 |
| dátum | 02.19 | 02.20 | 02.23 | 02.24 | 02.25 | 02.26 | 02.27 | 02.28 | 03.02 | 03.03 | 03.04 | 03.05 | 03.06 | 03.07 |
| sorszám | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 |
| dátum | 03.08 | 03.09 | 03.10 | 03.11 | 03.14 | 03.15 | 03.16 | 03.17 | 03.18 | 03.19 | 03.20 | 03.24 | 03.25 | 03.26 |
| sorszám | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | | |
| dátum | 03.27 | 03.29 | 03.30 | 04.02 | 04.03 | 04.04 | 04.06 | 04.07 | 04.09 | 04.10 | 04.12 | 04.13 | | |

Jorgi:

4. táblázat: A Jorgitól gyűjtött bélsár minták időpontjai (Forrás: SAJÁT, 2019)

| | | | | | | | | | | | |
|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| sorszám | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| dátum | 01.31 | 02.07 | 02.08 | 02.11 | 02.19 | 02.25 | 02.26 | 02.28 | 03.02 | 03.03 | 03.04 |
| sorszám | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 |
| dátum | 03.05 | 03.06 | 03.11 | 03.14 | 03.18 | 03.24 | 03.26 | 03.27 | 03.30 | 04.03 | 04.07 |

A begyűjtött minták időpontja a Nyíregyházi Állatkertben (5. táblázat):

Manka:

5. táblázat: A Mankától gyűjtött nyál minták időpontjai (Forrás: SAJÁT, 2019)

| | | | | | | | | | | | | |
|----------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| sorszám | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| dátum | 06.07 | 06.11 | 06.15 | 06.16 | 06.18 | 06.20 | 06.21 | 06.26 | 06.27 | 06.29 | 07.06 | 07.07 |

5.4 A laboratóriumi munka

5.4.1 A laborban felhasznált anyagok és eszközök

Felhasznált anyagok:

Az assay részei:

- Bélsár minta (18. ábra)
- Nyál minta (14. ábra)

- puffer (14 g Na₂HPO₄·2H₂O; 3 g NaH₂PO₄·2H₂O; 9 g NaCl; 2 g NaN₃; 1000 ml-re desztillált víz; 1 g zselatin)
- 7 kémcsőből álló progeszteron (4-Pregnene-3,20-dione) standard sor:
 - 7. kémcsőben a progeszteron koncentrációja 2000 femtomol/cső, ami = 100 nanomol/liter
 - 6. kémcső: 1000 fmol/cső progeszteron = 50 nmol/l
 - 5. kémcső: 500 fmol/cső progeszteron = 25 nmol/l
 - 4. kémcső: 250 fmol/cső progeszteron = 12,5 nmol/l
 - 3. kémcső: 125 fmol/cső progeszteron = 6,25 nmol/l
 - 2. kémcső: 62,5 fmol/cső progeszteron = 3,125 nmol/l
 - 1. kémcső: 31,25 fmol/cső progeszteron = 1,563 nmol/l
- Tesztoszteron standard
- Ösztrogén standard
- Antiszérum oldat
- Izotóp törzsoldat
- Dextrán-fedett szén (0,0625 g dextrán; 0,625 g szén; 100 ml-re (zselatint nem tartalmazó) foszfát puffer)
- Totál (600 µl puffer; 100 µl izotóp)
- NSB (Non-Specific Binding) (300 µl puffer; 100 µl izotóp; 300 µl dextrán-fedett szén)
- B0 (200 µl puffer; 100 µl antiszérum oldat; 100 µl izotóp; 300 µl dextrán-fedett szén)
- Etil-acetát

Egyéb anyagok:

- Szcintillációs oldat (8 gramm PPO; 0,8 g POPOP; 320 ml 1,4-dioxan; 1600 ml toluol), sötét üvegben tárolandó!
- desztillált víz
- 80%-os metanol
- jég
- csapvíz

Eszközök:

- Vastagfalú kémcsövek (14. ábra) (18. ábra)
- Sartorius Basic analitikai mérleg

- Precisa 220 M analitikai mérleg
- Műanyag kiskanál
- Mélyhűtő
- Jencons Sealpette 10-100 µl-es automata Eppendorf egycsatornás pipetta és pipettahegyek
- Jencons Sealpette 100-1000 µl-es automata Eppendorf egycsatornás pipetta és pipettahegyek (16. ábra)
- Jencons Sealpette 1000-10000 µl-es automata Eppendorf egycsatornás pipetta és pipettahegyek
- Gumidugók a kémcsövekbe (18. ábra)
- VWR multi-tube vortex
- Personal vortex
- IKAMAG RCT fűthető, mágneses keverő
- Beckman J6-HC laboratóriumi centrifuga (15. ábra)
- Centrifugapersely (15. ábra)
- Hőmérő jégfürdőhöz
- Lavór jégfürdőhöz
- Binder szárítószekrény
- Eppendorf csövek
- Küvették
- Sötét üveg
- Tri-Carb 2800 TR béta – sugázmérő műszer (17. ábra)
- Fültisztító pálcikák a mintákkal (12. ábra)
- QuantaSmart (™) szoftver

5.5 A laboratóriumi munka menete

A nyál minták feldolgozásában legnagyobb kihívás a fültisztító pálcák vattájából kellő mennyiségű mérhető hormon kinyerése volt. Az extrahálás Isobe és munkatársai (2005) módosított protokollja alapján történt. A folyamat azzal kezdődött, hogy a mintákat dátum szerint sorba tettük. A mintagyűjtés előtt lemértük a fültisztító pálcák nyál nélküli tömegét, most pedig lemértük a mintavétel utáni tömegüket, hogy a kettő különbségéből megállapíthassuk a gyűjtött nyál mennyiségét az egyes pálcákon. Ezt követően megszámoztuk a kémcsöveket, majd félbe vágtuk a pálcákat és mind a két felét behelyeztük a megfelelő vastagfalú kémcsöbe (14. ábra).

14. ábra: Nyálmintás pálcák a megszámozott kémcsövekben (Forrás: SAJÁT, 2019)



Ezután egy 80% metanol, 20% desztillált víz összetételű elegyből hozzáértünk 1 ml-t. A következő lépés, hogy 2000-es fordulatszámon kevertük multi-tube vortex-el 30 percen keresztül. Ezt követően 2000-es fordulatszámon Beckman laboratóriumi centrifugával (15. ábra) centrifugáltuk 15 percen keresztül, majd egy éjszakára elhelyeztük a mintákat a -20 °C-os hűtőben.

15. ábra: Beckman laboratóriumi centrifuga (Forrás: SAJÁT, 2019)



Másnap kimértünk mindegyik kémcsőből 400 μl -t és Binder szárítószekrényben elpárologtattuk a metanolt. Ezután készítettünk egy 7 kémcsőből álló, ismert koncentrációjú hígítási sort. A 7. kémcsőbe 2 ml puffert mértünk, a többibe csak egyet-egyet. Ezt követően a 7. kémcsőből kivettünk 20 μl -t, majd hozzáadtunk a kémcső tartalmához 20 μl ismert progeszteron koncentrációjú (1 nmol/l) standardet. A 7. kémcső progeszteron koncentrációja így 2000 fmol/cső lett, ami pontosan egyenlő 100 nmol/l-el. Ezután felező hígítást alkalmazva (16. ábra), kimértünk ebből a kémcsőből 1 ml-t és átpipettáztuk a 6. csőbe, amelynek a progeszteron koncentrációja így 1000 fmol/cső = 50 nmol/l lett.

16. ábra: Standard sor készítése (Forrás: SAJÁT, 2019)



Ezt ismételtük addig amíg el nem jutottunk az 1. kémcsőhöz. Így az 5. kémcső progeszteron koncentrációja 500 fmol/cső = 25 nmol/l lett, a 4. kémcső progeszteron koncentrációja 250 fmol/cső = 12,5 nmol/l, a 3. kémcső progeszteron koncentrációja 125 fmol/cső = 6,25 nmol/l, a 2. kémcső progeszteron koncentrációja 62,5 fmol/cső = 3,125 nmol/l, és végül az 1. kémcső progeszteron koncentrációja 31,25 fmol/cső = 1,563 nmol/l lett.

Az assay elkészítésének a lépései a következők:

1. Pufferek bemérése (600 μl a Totálba, 300 μl az NSB-be, 200 μl a B0-ba, és 200 μl a mintákba).

2. Standardek bemérése (200 μ l).
3. Minták bemérése (20 μ l).
4. 4 °C-os vízfürdőbe helyezem őket 1 órára.
5. Amíg a vízfürdőben vannak rámértem az izotópot (Totálba, NSB-be, B0-ba, Standardekbe, és a mintákba is egyaránt 100-100 μ l-t) és az antiszérumot (B0-ba, Standardekbe, és a mintákba is egyaránt 100-100 μ l-t).
6. Alufóliába csomagolom őket és 1 éjszakára beteszem a hűtőbe 4 °C-ra.
7. El kell készíteni a szén-dextránt másnapra (62,5 mg dextrán, 625 mg szén, majd nem zselatinos 7,4-es pH-jú foszfát pufferrel 100 ml-re felönteni). A szén megköti azokat az antigéneket, amelyek nem tudtak kötődni.
8. Másnap 4 °C-os vízfürdőben, állandó kavarással és hűtés mellett, a Totál kivételével mindre rámérünk 300-300 μ l szén-dextránt.
9. 15 percig állni hagyjuk, majd 3000-es fordulatszámon centrifugáljuk 15 percig (15. ábra).
10. A felülúszót küvettákba öntjük.
11. Hozzáadjuk mindhez a szcintillációs oldatot (8 gramm PPO; 0,8 g POPOP; 320 ml 1,4-dioxan; 1600 ml toluol). Ez fogja a béta-sugarakat, a gép által mérhető fotonokká alakítani.
12. 6 órát állni hagyjuk a sötétben.
13. Végül pedig elhelyezzük őket a béta-sugárzásmérő műszerbe (17. ábra).

17. ábra: Tri-Carb 2800 TR béta - sugárzásmérő műszer (Forrás: SAJÁT, 2019)



Tesztoszteron és ösztrogén mérésnél is hasonlóak a lépések csak más standardeket és antiszérumokat használunk. Ösztrogén mérésnél metanol helyett dietil-éterrel vagy etil-acetáttal extrahálhatunk, de ezutóbbi jobbnak bizonyult.

18. ábra: Bélsár minták előkészítése a RIA próbához (Forrás: SAJÁT, 2019)



A bélsár minták vizsgálata nem sokban különbözött (18. ábra):

1. A minták sorba rendezése (13. ábra).
2. Analitikai mérlegen lemértük az üres kémcsövek tömegét.
3. 500 mg székletet kimérése minden kémcsőbe.
4. Mélyhűtőben állni hagyni egy éjszakára.
5. Másnap reggel 500 µl desztillált adtunk a mintához.
6. Vortex-el felrázás.
7. Ezután 4 ml 80%-os metanolt adtunk a mintákhoz.
8. Gumidugókkal lezártuk a kémcsöveket, majd multi-tube vortex-el rázatás 2500-as fordulatszámmon 30 percig.
9. Beckman laboratóriumi centrifugával (15. ábra) centrifugálás 3000-es fordulatszámmon 20 percig.
10. Lefagyasztás (30-40 perc).
11. Binder szárítószekrényben a metanol elpárologtatása 1-2 óra alatt.
12. Minden kémcsőbe kimérünk 300 µl puffert.
13. Multi-tube vortex 1 percig, majd centrifuga 5 percig.
14. Az assay összeállítása a nyál mintákhoz hasonló módon.

A radioimmunoassay (RIA) módszer lényege, hogy az izotóppal jelzett antigének versengenek a kötőhelyekért a minta antigénjeivel, kapcsolatuk tehát egymással fordítottan arányos.

A mérési pontosság és az ismételhetőség paraméterei az alábbiak voltak (coefficient of variation; CV%):

- Progesteron bélsár: intra-assay CV<5%; inter-assay CV Kontroll1 (6,81 nmol/l) esetén 12,62 %, Kontroll2 (22,52 nmol/l) esetén 7,29%.
- Ösztradiol bélsár: intra-assay CV<5%; inter-assay CV 14,3%

Tesztoszteron bélsár: intra-assay CV<5%; inter-assay CV 15,7%

6 EREDMÉNYEK

6.1 Jászberényi minták

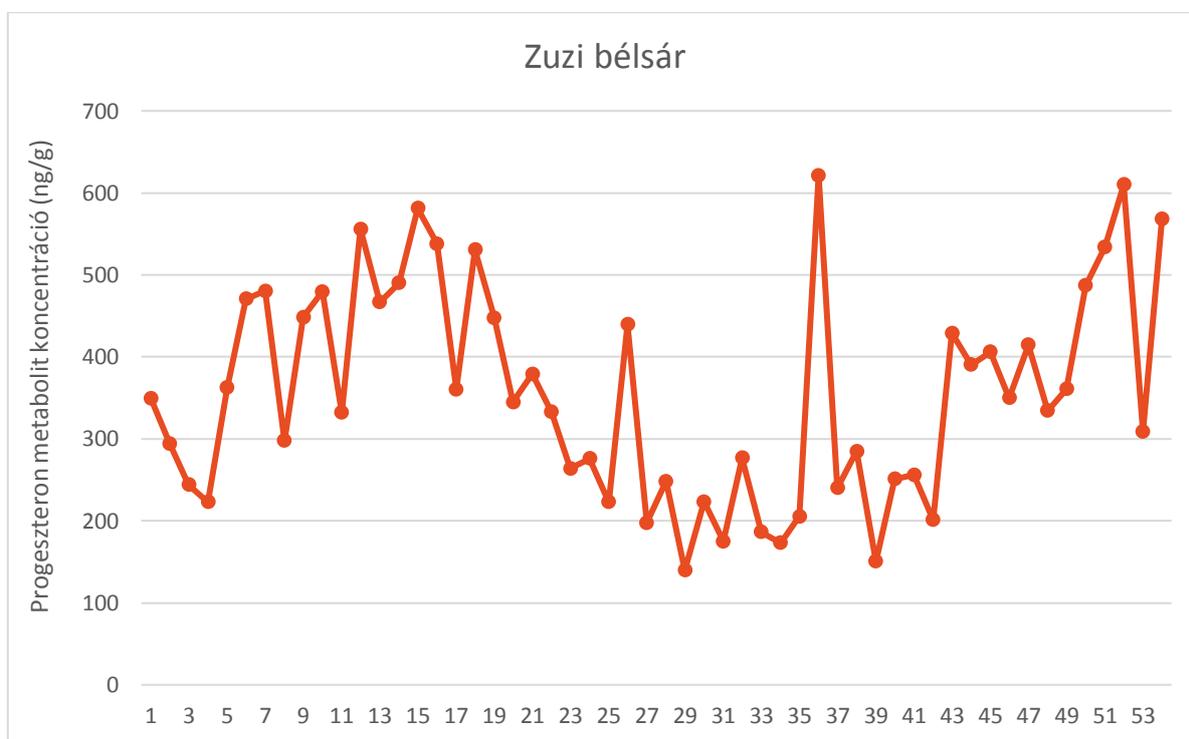
Zuzi

A nőtény egyed bélsár metabolit szintjeit megvizsgálva a következő eredményeket kaptuk:

A progeszteron metabolit koncentrációk átlaga 356,16 ng/g ($\pm 130,24$) volt. A mérési intervallum 130.28 – 621.35 ng/g.

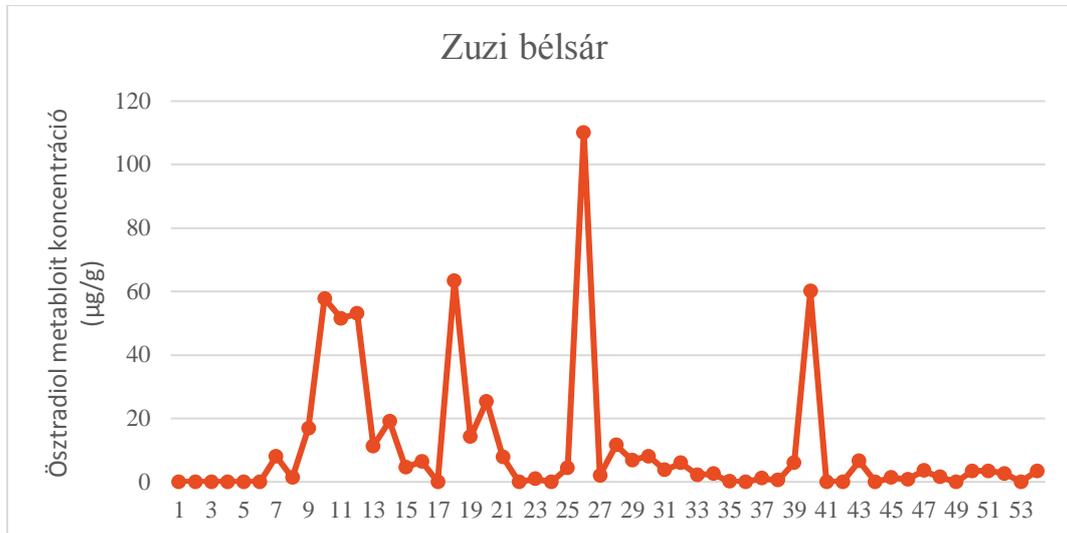
Az eredmények alapján Zuzi ciklusa 55-57 nap (19. ábra).

19. ábra: Zuzi bélsár mintáinak progeszteron metabolit koncentrációja (Forrás: SAJÁT, 2019)



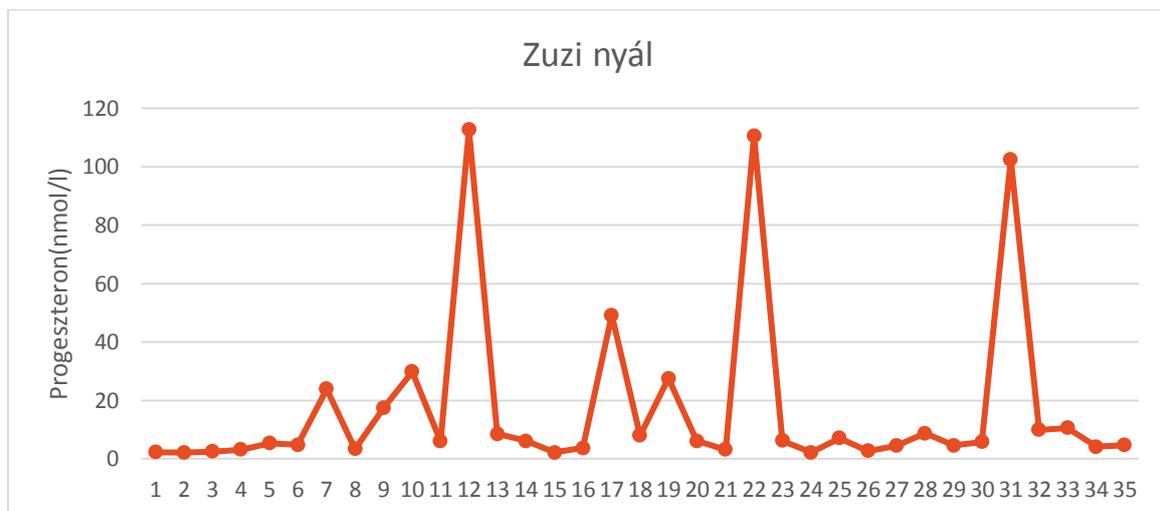
Az ösztrogén metabolitok koncentrációja 0 és 110,13 $\mu\text{g/g}$ közé esett, az átlagos érték 10,99 ($\pm 21,4$) $\mu\text{g/g}$ volt (20. ábra).

20. ábra: Zuzi bélsár mintáinak ösztradiol metabolit koncentrációja (Forrás: SAJÁT, 2019)



A nyál mintákat megvizsgálva az alábbi eredményeket kaptuk (21. ábra):

21. ábra: Zuzi nyál mintáinak progeszteron metabolit koncentrációja (Forrás: SAJÁT, 2019)



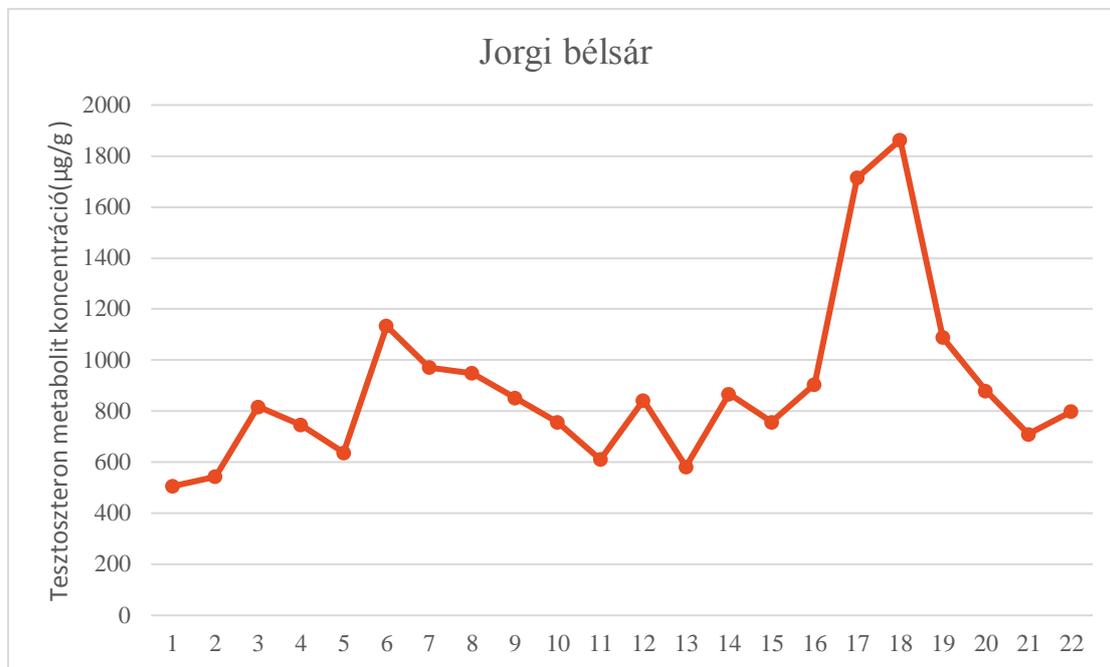
A mérési eredmények intervalluma: 2,1-112,66 nmol/l.

A fültisztító pálcikákkal vett minták elemzésekor nem minden esetben kaptuk vissza a bélsárból nyert adatok alapján várt tendenciát. A három magasabb progeszteron érték ugyan – 2-3 nappal előbb – jelentkezik ebben az esetben is, de az egyéb értékek nem tükrözik a ciklus hosszát. Ez természetesen adódhat mintavételi hibából is, valamint a nem megfelelő feldolgozásból. Ezen a metodikán a jövőben mindenképpen dolgozni kell.

Jorgi

A tesztoszteron metabolitok a hím állat bélsár mintáiban 0,5-1,83 µg/g közötti értékeket vettek fel. Átlag: 0,88 (±0,33) µg/g (22. ábra).

22. ábra: Jorgi bélsár mintáinak tesztoszteron koncentrációja (Forrás: SAJÁT, 2019)



A hím állat viselkedésében a 17-19. mintavételi napon eltérést észleltünk. Ebből arra következtettünk, hogy a nőstény ivarzik. A különös viselkedés a bélsár tesztoszteron metabolit értékeiben is visszaköszönt, hiszen a fent jelzett napokon a koncentráció hirtelen emelkedést mutatott.

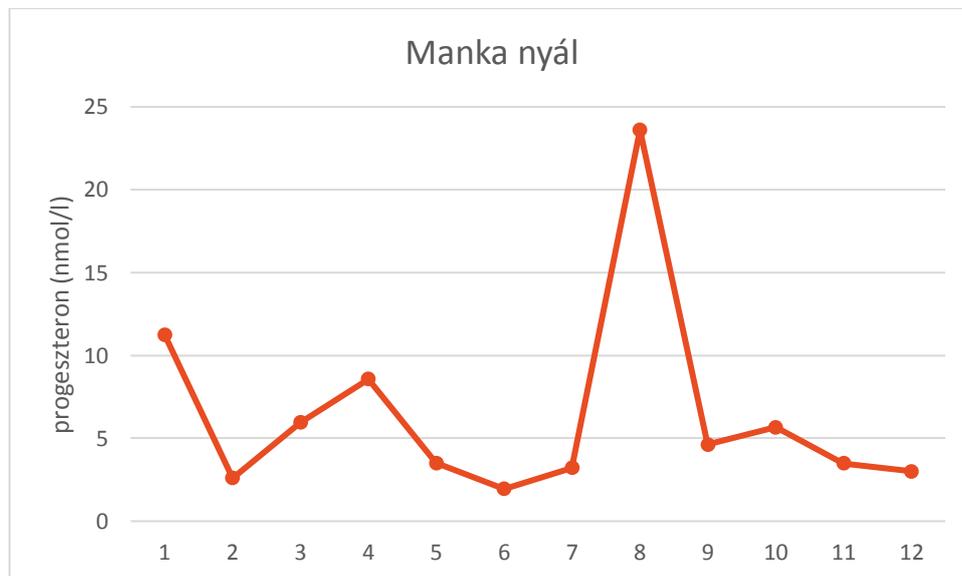
Ez a jelenség – az ivarzás/ovuláció feltételezett időpontja – a progeszteron vizsgálatokban is kikövetkeztethető, valamint a hím viselkedését néhány nappal (40. mintavétel) megelőzi egy markáns ösztrogén-metabolit emelkedés. Ezek az eredmények ugyan biztatóak, de mindenképpen szükséges a jövőben a vizsgálatot ugyan ezen állatokon megismételni.

6.2. Nyíregyházi minták

A Nyíregyházi Állatkertből érkező minták esetén a nőstény egyed mintáit volt lehetőségünk kiértékelni. A minták feldolgozásakor ugyanabba a nehézségbe ütköztünk, mint Zuzi esetében, ezért a kinyert adatokat önmagában csak kellő óvatossággal lehet kiértékelni. A vizsgálat megismétlése feltétlenül indokolt, sűrűbb mintavételezéssel és párhuzamos bélsár mintavétellel.

A nyál minták progeszteron koncentrációja 1,94-23,61 nmol/l között volt (23. ábra).

23. ábra: Manka nyál mintáinak progeszteron metabolit koncentrációja (Forrás: SAJÁT, 2019)



A noninvazív módszerek sokszor az egyetlen alternatívát jelentenek az állatkerti állatok szaporodásbiológiai monitorozása szempontjából.

7 MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK

A szakirodalmi adatoknak megfelelően (Patzl, 1998), az általunk vizsgált jászberényi nőtény egyed is 55-57 napos ciklust mutatott. Schauerte (2005) megfigyeléseihez hasonlóan mi is tapasztaltunk az állatokon jellegzetes viselkedésbeli eltéréseket, illetve hüvelyi vérzést az ösztrusz feltételezhető ideje alatt.

A noninvazív módszerek sokszor az egyetlen alternatívát jelentenék az állatkerti állatok szaporodásbiológiai monitorozása szempontjából. Kutatásunk fő célja sikerrel zárult, hiszen sikerült elegendő mennyiségű hormon metabolitot kinyernünk a hangyászok nyálából, azonban a további kutatásokhoz javasoljuk egy haszonállatokban használatos Salimetrics nyál mintagyűjtőhöz hasonló eszköz kifejlesztését és használatát ebben az állatfajban is.

A mi kísérletünkre vonatkozóan: Ígéretes eredmények, de természetesen tisztában vagyunk azzal, hogy 3 egyeden végzett vizsgálat nem rendelkezik bizonyító erővel. Ezért tervezzük a jövőben a vizsgálatok megismétlését, amit célszerű lenne már ősszel elkezdni, hiszen így több mint 6 hónapon keresztül gyűjthetnénk bélsarat a nyári medencés időszak előtt. Vér-, bélsár- illetve nyálminták együttes elemzésével válna lehetővé, hogy hitelt érdemlően igazolhassuk a noninvazív módszerek használhatóságát, valamint az adott körülmények között legjobban alkalmazható alternatíva kiválasztását. A heti 2-3 vérvétel speciális eljárást fog igényelni: hónapokig tartó tréninggel talán fel lehetne készíteni az állatokat egy-egy etetés közben végrehajtott gyors invazív mintavételre vagy akár ultrahang-vizsgálatra is.

A jászberényi állatkertre vonatkozóan: Ha ezen kutatásokat követően sem fog kiderülni a vemhesülés elmaradásának az oka, akkor célszerű lenne a tenyész program keretében Jorgit kicserélni egy másik hímre, például Marvinra. Ezzel a lépéssel kiderülne, hogy vajon Jorgi esetében tapasztaltunk valamilyen szaporodásbiológiai problémát, vagy más okból nem történt eddig termékenyülés.

8 ÖSSZEFOGLALÁS

Emberben és különböző háziállatokban napjainkban gyakran mérnek hormonszinteket nyálból és bélsárból ELISA és RIA módszerek alkalmazásával ivari ciklus követése és vemhesség diagnosztika céljából. Dolgozatom célja az volt, hogy megállapítsuk, hogy sörényes hangyásznál alkalmazhatóak-e erre a célra az invazívnál kisebb stresszel és fájdalommal járó noninvazív módszerek, illetve hogy a nyálból kapott eredmények korrelálnak-e a bélsárból mért hormonszintekkel. További célunk volt bővebb ismereteket szerezni a faj ivari ciklusáról, ezáltal elősegítve az állatkerti tenyésztési programok sikerességét és ezen veszélyeztetett faj megőrzését.

Kutatásunkban 2 állatkert 4 egyedétől (2 hím és 2 nőstény) vettünk mintákat. A Jászberényi Állatkertben heti háromszor történt nyál és ötször bélsár mintavétel a hat éves hím és a hét éves nőstény állattól, három hónapon keresztül. A nyíregyházi állatkertben heti két alkalommal vettünk nyál mintát szintén egy hat éves hím és egy hét éves nőstény egyedtől, egy hónapon keresztül. Ez az időtartam megfelel - a szakirodalomban fellelhető adatok alapján - a sörényes hangyász ösztrusz ciklus hosszának. A nyíregyházi párnak korábban háromszor volt szaporulata, a jászberényinek azonban még egyszer sem. A faj anatómiai és élettani jellegzetességei miatt a nyál mintavétele speciális módon történt. A nőstény állatokból származó mintákból progeszteron és ösztradiol metabolitokat, míg a hímekből vett mintákból tesztoszteront mértünk, radioimmunoassay (RIA) módszerrel.

A kutatás során kiderült, hogy a bélsárban és a nyálban lévő progeszteron alkalmas szaporodásbiológiai monitorozásra a sörényes hangyász esetében is (139.42-624.39 ng/g), az eredmények korrelálnak az állatok külsőleg megfigyelhető viselkedésével. A szakirodalmi adatoknak megfelelően, az általunk vizsgált jászberényi nőstény egyed is 55-57 napos ciklust mutatott. A tesztoszteron szintén mérhető volt (0.506-1.863 µg/g), informatív eredményeket kaptunk belőle a jászberényi hím egyed nemi működéséről. Gyakorlati szempontból az egyszerűbb mintafeldolgozás miatt a bélsár alkalmasabb ciklusdiagnosztikára, mint a nyál. Állatjóléti és gazdaságossági szempontból is a noninvazív módszereket javaslom, mert a mintavétel nem igényel költséges speciális kalodát, amiben az állat meg is sérülhet, nem igényel állatorvosi szaktudást, tehát az állatkerti gondozók is elvégezhetik, illetve nem okoz akkora stresszt és fájdalmat az állatnak, mint egy vérvétel.

9 SUMMARY

Monitoring ovarian cycle in the giant anteater by non-invasive methods

Nowadays ELISA or RIA kits are widely used to measure faecal or salivary estrogen and progestagen metabolites for monitoring ovarian cycle and pregnancy in humans and in different species of domestic and zoo animals. Our aims were to determine if these less stressful and painful non-invasive methods were applicable in the giant anteater and to compare the results of salivary hormones to the faecal ones. Furthermore, we wanted to improve our knowledge about giant anteater's ovarian cycle to help the success of zoo breeding programmes. In this study we collected samples from two males and two females, in two different zoos. At Jászberény Zoo we collected faeces samples five times a week and saliva samples three times a week for three months from a 6-year-old male and a 7-year-old female. At Nyíregyháza Zoo we collected the samples twice a week for two months from a 6-year-old male and a 7-year-old female. According to the literature data, two months is the general length of the polyoestrus giant anteater's ovarian cycle. The animals from Nyíregyháza previously had offsprings three times, however the animals from Jászberény didn't have any before. The anatomical and physiological characteristics of the anteater made us to come up with a special way of collecting saliva samples. The level of progesterone in the female's saliva and the testosterone in the male's saliva was measured using radioimmunoassay. Our results showed that the hormone determinations both in faeces and in saliva are appropriate tools for monitoring the anteater's ovarian cycle and reproductive biology. Faecal and salivary hormone levels reflected to the actual behaviour of the animals. We found 55-57 days long estrous cycle in the investigated females (progesterone level range: 139.42-624.39 ng/g). Valuable results were obtained about the male individuals' reproductive biology by assessing the measured testosterone (range: 0.506-1.863 µg/g). Faeces proved to be a more applicable sample to monitor ovarian cycle than saliva for practical reasons, as sample collection was easier in the field and preparation was easier in the laboratory. We highly recommend non-invasive methods over invasive ones not only for animal welfare but also for financial reasons because this way you do not need expensive, anteater-specialised stocks which are dangerous for the animal, neither veterinary knowledge like blood taking, so it is doable for the zoo staff. The most important advantage is, that it is not much pain and stress for the animal.

IRODALOM

- Aguiar J. M., Fonseca G. A. B., 2008: Conservation status of the Xenarthra. In Vizcaíno, S. F.; Loughry, W. J. (eds.). *The Biology of the Xenarthra*. pp. 219–22.
- Amaral R. S., Rosas F. C., Viau P., d’Affonsêca N. J. A., da Silva V. M., de Oliveira C. A., 2009: Noninvasive monitoring of androgens in male Amazonian manatee (*Trichechus inunguis*): biologic validation. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 40(3):458-65.
- Bagatto B., Crossley D. A., Burggren W. W., 2000: Physiological variability in neonatal armadillo quadruplets: within- and between-litter differences. *Journal of Experimental Biology* 2000 203: 1733-1740.
- Belhumeur S., 2010: AZA North American regional studbook for giant anteater *Myrmecophaga tridactyla*. Association of Zoos and Aquariums; <http://www.aza.org>.
- Belhumeur S., 2013: AZA North American regional studbook for giant anteater *Myrmecophaga tridactyla*. Association of Zoos and Aquariums; <http://www.aza.org>.
- Bourge J. F., Degos L., Bensussan A., 1986: Human T lymphocyte clones with killer or natural killer activity. *Journal of Immunological Methods*, 90(2):215-9.
- Camilo-Alves C. S. P., Mourão M. G., 2006: Responses of a Specialized Insectivorous Mammal (*Myrmecophaga tridactyla*) to Variation in Ambient Temperature. *Biotropica*, 38 (1): 52–56.
- Casares M., Silván G., Carbonell M. D., Gerique C., Martínez-Fernández L., Cáceres S., Illera J., 2016: Circadian rhythm of salivary cortisol secretion in female zoo-kept African elephants (*Loxodonta africana*). *Zoo Biology*, 35(1):65-9.
- CITES species database: *Myrmecophaga tridactyla*. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. Retrieved 3 July 2012.
- Clauss M., Gehrke J., Hatt J-M., Dierenfeld E. S., Flache E. J., Hermes R, Castella J., Streich W. J., Fickel J., 2005: Tannin-binding salivary proteins in three captive rhinoceros species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 140, 67-72.
- Cuozzo F. P., Sauther M. L., Yamashita N., Lawler R. R., Brockman D. K., Godfrey L. R., Gould L, Youssouf I. A. J., Lent C., Ratsirarson J., Richard A. F., Scott J. R., Sussman R. W., Villers L. M., Weber M. A., Willis G., 2008: A comparison of salivary pH in sympatric wild lemurs (*Lemur catta* and *Propithecus verreauxi*) at Beza Mahafaly Special Reserve, Madagascar. *American Journal of Primatology*, 70(4), 363-371.
- Eisenberg J. F., Redford, K. H., 2000: *Mammals of the Neotropics: The Central Neotropics: Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil*. University of Chicago Press. pp. 92–93.
- Gardner A. L., 2008: *Mammals of South America: Marsupials, xenarthrans, shrews, and bats*. University of Chicago Press. pp. 168–75.
- Goldstein E. J. C., Tyrrell K. L., Citron D. M., Cox C. R., Recchio I. M., Okimoto B, Bryja J., Fry B. G., 2013: Anaerobic and aerobic bacteriology of the saliva and gingiva from 16 captive komodo dragons (*varanus komodoensis*): new implications for the "Bacteria as venom" model. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 44(2), 262-272.
- Hay M. A., Bellem A. C., Brown J. L., Goodrowe K. L., 1994: Reproductive patterns in tamandua (*Tamandua tetradactyla*). *J Zoo Wild Med*, 25:248–258.
- Hogg C. J., Vickers E. R., Rogers T. L., 2005: Determination of testosterone in saliva and blow of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 25;814(2):339-46.
- Illera J. C., Silván G., Cáceres S., Carbonell M. D., Gerique C., Martínez-Fernández L., Munro C., Casares M., 2014: Assessment of ovarian cycles in the African elephant (*Loxodonta africana*) by measurement of salivary progesterone metabolites. *Zoo Biology*, 33(3):245-9.
- Isobe N., Nakao T., Yamashiro H., Shinada M., 2005: Enzyme immunoassay of progesterone in the feces from beef cattle to monitor the ovarian cycle. *Animal Reproduction Science* 87. 1-10.

- Jones M. L., 1982: Longevity of captive mammals. *Zoological Garten N. F. Jena* 52: 113-28.
- Kanchev L. N., Marinova C. H. P., Stankov B. M., 1988: Bovine Salivary Progesterone: Application to the Assessment of Ovarian Function and Early Pregnancy Diagnosis. *Animal Reproduction Science*, 17, 1-8.
- King B. F., Pinheiro P. B., Hunter R. L., 1982: The fine structure of the placental labyrinth in the sloth, *Bradypus tridactylus*. *Anat Rec*, 202:15–22.
- Knott K. K., Roberts B. M., Maly M. A., Vance C. K., DeBeauchamp J., Majors J., Riger P., DeCaluwe H., Kouba A. J., 2013: Fecal estrogen, progestagen and glucocorticoid metabolites during the estrous cycle and pregnancy in the giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*): evidence for delayed implantation. *Reproductive Biology and Endocrinology*; 11:83.
- Kusuda S., Endoh T., Tanaka H., Adachi I., Doi O., Kimura J., 2011: Relationship between gonadal steroid hormones and vulvar bleeding in southern tamandua, *Tamandua tetradactyla*. *Zoo Biol*, 30:212–217.
- Leeds A., Dennis P. M., Lukas K. E., Stoinski T. S., Willis M. A., Schook M. W., 2018: Retracted article: biologically validating the measurement of oxytocin in western lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*) urine and saliva using a commercial enzyme immunoassay. *Primates*, 59(6) 575–575.
- Majchrzaka Y. N., Mastro Monaco G. F., Korver W., Burnessa G., 2015: Use of salivary cortisol to evaluate the influence of rides in dromedary camels. *General and Comparative Endocrinology* 211, 123-130.
- Mekonin A. B., Howie A. F., Riley S. C., Gidey G., Tegegne D. T., Desta G., Ashebir G., Gebrekidan B., Harlow C. R., 2017: Serum, milk, saliva and urine progesterone and estradiol profiles in crossbred (Zebu x Holstein Friesian) dairy cattle. The University of Edinburgh, College of Medicine and Veterinary Medicine, MRC Centre for Reproductive Health, QMRI, 47 Little France Crescent, Edinburgh, EH16 4TJ, UK.
- Menargues A., Urios V., Limiñana R., Mauri M., 2012: Circadian rhythm of salivary cortisol in Asian elephants (*Elephas maximus*): a factor to consider during welfare assessment. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 15(4):383-90.
- Mess A., Favaron P. O., Pfarrer C., Osmann C., Melo A. P. F., Rodrigues R. F., Ambrosio C. E., Bevilacqua E., Miglino M. A., 2012: Placentation in the anteaters *Myrmecophaga tridactyla* and *Tamandua tetradactyla* (Eutheria, Xenarthra). *Reprod Biol Endocrin*, 10:1–7.
- Miranda F., Bertassoni A., Abba A. M., 2014: *Myrmecophaga tridactyla*. The IUCN Red List of Threatened Species. IUCN.
- Munro C. J., Stabenfeldt G. H., Cragun J. R., Addiego L. A., Overstreet J. W., 1991: Relationship of serum estradiol and progesterone concentrations to the excretion profiles of their major urinary metabolites as measured by enzyme immunoassay and radioimmunoassay. *Clin Chem* 37: 838-844.
- Naples V. L., 1999: Morphology, evolution and function of feeding in the giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*). *Journal of Zoology*. 249 (1): 19–41.
- Naples V., 2001: Anteaters. In MacDonald, D (ed.). *The Encyclopedia of Mammals* (2nd ed.). Oxford University Press. pp. 788–91.
- Naugher K. B., 2004: Tamanduas (*Myrmecophagidae*). In Grzimek's *Animal Life Encyclopedia*, Mammals II (M.C. McDade, ed.). Gale Group, Farmington Hills.
- Needham C., 2007: An investigation into the use of salivary progesterone to diagnose pregnancy in sheep. BSc dissertation. The University of Nottingham, UK.
- Nowak R. M., 1999: *Walker's Mammals of the World*, Volume 1. Johns Hopkins University Press. pp. 155–56.
- Patzl M., Schwarzenberger F., Osmann C., Bamberg E., Bartmann W., 1998: Monitoring ovarian cycle and pregnancy in the giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) by faecal progestagen and oestrogen analysis. *Anim Reprod Sci*, 53:209–219.
- Pauli J. N., Peery M. Z., 2012: Unexpected Strong Polygyny in the Brown-Throated Three-Toed Sloth. *PLoS ONE* 7(12): e51389. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051389>.
- Redford K. H., Eisenberg J. F., 1992: *Mammals of the neotropics. The southern cone. Chile, Argentina, Uruguay, Paraguay*. Illinois: University of Chicago Press.

- Reiss K. Z., 1997: Myology of the Feeding Apparatus of Myrmecophagid Anteaters (Xenarthra: Myrmecophagidae). *Journal of Mammalian Evolution*. 4 (2): 87–117.
- Reiss K. Z., 2000: Feeding in Myrmecophagous Mammals. In Schwenk, K. (ed.). *Feeding: Form, Function and Evolution in Tetrapod Vertebrates*. pp. 464–474.
- Rezende L. C., Barbeito C. G., Mess A., Favaron P. O., Miglino M. A., 2012: The fetomaternal interface in the placenta of three species of armadillos (eutheria, xenarthra, dasypodidae). *Reprod Biol Endocrinol*. 1:38.
- Riad-Fahmy D., Read G.F., Walker R. F., Griffiths K., 1981: Steroids in saliva for assessing endocrine function. *Endocr Rev* 3: 367-395.
- Richard T., 2005: Leprosy in wild armadillos (PDF). *Leprosy Review*. 76 (3): 198–208. PMID 16248207.
- Rodrigues F. H. G., Medri Í. M., de Miranda Mourão G. H. B., Camilo-Alves C., Mourão, G., 2008: Anteater behavior and ecology. In Vizcaino, S. F.; Loughry, W. J. (eds.). *The Biology of the Xenarthra*. pp. 257–68.
- Schauerte N., 2005: Untersuchungen zur zyklus- und graviditätsdiagnostik beim großen ameisenbären (myrmecophaga tridactyla). Gießen: Justus-LiebigUniversität, PhD Thesis.
- Shaw C. A., McDonald H. G., 1987: First Record of Giant Anteater (Xenarthra, Myrmecophagidae) in North America. *Science*. AAAS. 236 (4798): 186–188.
- Shaw J. H., Machado-Neto J., Carter T. J., 1987: Behavior of Free-Living Giant Anteaters (Myrmecophaga tridactyla). *Biotropica*. 19 (9): 255–59.
- Smiley T., Spelman L., Lukasik-Braum M., Mukherjee J., Kaufman G., Akiyoshi D. E., Cranfield M., 2010: Noninvasive saliva collection techniques for free-ranging mountain gorillas and captive eastern gorillas. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 41(2), 201-209.
- Smith P., Elsam R., 2007: Giant anteater myrmecopaga tridactyla - mammals of Paraguay. In FAUNA Paraguay handbook of the mammals of Paraguay; <http://www.faanaparaguay.com>.
- Soares C. A., Carneiro R. S., 2002: Social behavior between mothers × young of sloths Bradypus variegatus SCHINZ, 1825 (Xenarthra: Bradypodidae). *Brazilian Journal of Biology*. 62 (2): 249–252.
- Tallon D. F., Gosling J. P., Buckley P. M., Dooley M. M., Cleere W. F., 1984: Direct solid-phase enzyme immunoassay of progesterone in saliva. *Clin Chem* 30: 1507-1511.
- Tudge C. C., 1991: Spermatophore Diversity Within and Among the Hermit Crab Families, Coenobitidae, Diogenidae, and Paguridae (Paguroidea, Anomura, Decapoda). Zoology Department, University of Queensland, Queensland, Australia.
- Turner W., 1987: The placenta in the sloth. *J Anat Physiol*, 14:147–148.
- Yaeger R. G., 1988: The prevalence of Trypanosoma cruzi infection in armadillos collected at a site near New Orleans, Louisiana. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 38 (2): 323–326.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőimnek, Dr. Somoskői Bencének és Dr. Bakonyi Lászlónak a szakmai útmutatást és hogy kérdéseimmel mindig fordulhattam hozzájuk.

Köszönettel tartozom Vonáné Nagy Alice asszisztensnek, a hormonmérésekben nyújtott gyakorlati segítségéért.

Szeretném megköszönni Dr. Biácsi Alexandra szakállatorvosnak, illetve a Nyíregyházi Állatpark és a Jászberényi Állat- és Növénykert személyzetének, akik segítségemre voltak a mintagyűjtésben és szaktudásukat megosztották velem.

HuVetA
ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: MOLNÁR PÉTER ANDRÁS
Elérhetőség (e-mail cím): PETER.MOLNAR1995@GMAIL.COM
A feltöltendő mű címe: SÖRÉNYES HANGYASZ IVARI CIKLUSDÁNAK
MEGHATÁROZÁSA MONINYAZIV MÓDSZEREKKEL
A mű megjelenési adatai: Z. Q. Z. D.
Az átadott fájlok száma: 1

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédett PDF formára konvertálja és szolgáltatssa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyeznek, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg (egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel):

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címekre) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

Kérjük, nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:

Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénysértő módon visszaélne.

Budapest, 2020. év11.....hó12.....nap



alíírás
szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltatassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;
- a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;
- az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;
- a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,
- a nyílt hozzáférés támogatása.

Nyilatkozat a TDK és a diplomamunka azonosságáról

Alulírott MOLNÁR PÉTER ANDRÁS..... nyilatkozom, hogy diplomamunkám,
melynek címe SÖRÉNTES HANGYÁSZ IVARI CIKLUSÁNAK
MEGHATÁROZÁSA NONINVAZÍV MÓDSZEREKKEL
tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik az azonos című, a 2019.
évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2020. 11. 12......

MOLNÁR PÉTER ANDRÁS
Molnár Péter András.....

a hallgató neve és aláírása

Konzulensi ellenjegyzés

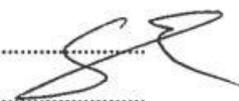
Alulírott **dr Somoskői Bence** igazolom, hogy
..... **Molnár Péter András** (a hallgató neve)

.....
..... **Sörényes hangyász ivari ciklusának meghatározása noninvazív módszerekkel**

című diplomamunkáját ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, **2020.11.13.**.....

..... **Somoskői Bence**



.....
..... a témavezető neve és aláírása

..... **Szülészeti Tanszék és**

..... **Haszonállat-**

..... **gyógyászati Klinika**

tanszék
ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
Szülészeti és Szaporodásbiológiai Tanszék és Klinika
1078 Budapest, István u. 2.
1400 Budapest, Pf. 2.