

SUMMARY: SAMPLING AND CONTAMINANT MONITORING PROTOCOL FOR RAPTORS

Espín S^{1*}, García-Fernández AJ¹, Herzke D², Shore RF³, van Hattum B⁴, Martínez-López E¹, Coeurdassier M⁵, Eulaers I⁶, Fritsch C⁵, Gómez-Ramírez P¹, Jaspers V.L.B.^{6,7}, Krone O⁸, Duke G⁹, Helander B¹⁰, Mateo R¹¹, Movalli P¹², Sonne C¹³, van den Brink NW¹⁴.

¹Department of Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Murcia, Spain; ²Norwegian Institute for Air Research, FRAM—High North Research Centre for Climate and the Environment, 9296 Tromsø, Norway; ³NERC Centre for Ecology and Hydrology, Lancaster Environment Centre, Library Avenue, Bailrigg, Lancaster LA1 4AP, UK; ⁴Institute for Environmental Studies, VU University, De Boelelaan 1087, 1081 HV Amsterdam, The Netherlands; ⁵Chrono-Environnement, UMR 6249 University of Franche-Comté / CNRS Usc INRA, Place Leclerc, F-25030 Besançon Cedex, France; ⁶Ethology research group, University of Antwerp, Universiteitsplein 1, 2610 Wilrijk, Belgium; ⁷NTNU, Realfagbygget, DU2-169, Høgskoleringen 5, 7491 Trondheim, Norway; ⁸Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research, Alfred-Kowalke-Strasse 17, 10315 Berlin, Germany; ⁹Oxford University Centre for the Environment, South Parks Road, Oxford, OX1 3QY, UK; ¹⁰Environmental Research & Monitoring, Swedish Museum of Natural History, Box 50007 SE-104 05 Stockholm, Sweden; ¹¹Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos-IREC (CSIC-UCLM-JCCM), Ciudad Real, Spain; ¹²Naturalis Biodiversity Center, Department of Collections, Darwinweg 2, 2333 CR Leiden, The Netherlands; ¹³Århus University, Department of Bioscience, Artich Research Centre (ARC), Frederiksborgvej 399, Box 358, DK-4000 Roskilde, Denmark; ¹⁴Alterra, Wageningen UR. PO Box 47, 6700NL, Wageningen, The Netherlands. *Present address: Section of Ecology, University of Turku,

INDLEDNING OG AIM

Forskning og overvågning for og med rovfugle i Europa (EURAPMON) er en European Science Foundation (ESF) Research Networking Programmer (<http://www.eurapmon.net>). Et af formålene med EURAPMON er at sprede bedste praksis og opbygge en kapacitet i Europa der harmoniserer overvågning med rovfugle. Fra 31. maj–2. juni 2013 samledes repræsentanter fra seks lande i Murcia, Spanien, for at deltage i workshoppen om "Den bedste praksis i forbindelse med overvågningsaktiviteter af miljøgifte i rovfugle i Europa" finansieret af EURAPMON. Workshoppen resulterede i et protokol udkast som efterfølgende blev gennemgået og kommenteret af eksperter indenfor forskningsfeltet. Formålet med denne prøvetagningsprotokol er at give vejledning i den bedste praksis når der forskes i miljøgifte i rovfugle som vil lette harmoniseringen af procedurerne mellem eksisterende og nye ordninger. Dette vil maksimere pålidelighed, sammenlignelighed og sammenlægning af data. Protokollen dækker prøvetagning af blod og fjer fra levende fugle, fjer og æg, indre organer og væv fra døde fugle og andre prøver såsom fæces og indholdet fra gumppekirtlen. Nærværende dokument er et sammendrag af protokollen som frit kan downloades fra EURAPMON's hjemmeside (<http://www.eurapmon.net>).

1. GENERELLE RETNINGSLINJER

1.1. Tilladelse. Alle nødvendige licenser og tilladelser skal indhentes fra de respektive nationale styrelser inden arbejdet påbegyndes. Prøver skal indsamles af behørigt uddannet og autoriseret personale (FELASA).

1.2. Identifikation. Individuelle prøvebeholdere skal mærkes med en unik kode før eller umiddelbart efter indsamling.

1.3. Undgå forurening. Passende materiale til prøvetagning og opbevaring bør anvendes. Udstyr skal være rengjort før prøvetagning og er du i tvivl så rådfør dig med laboranter eller andet relevant personale som er vandt til at udføre miljøgift analyser. Dem der udtager og håndterer prøverne må ikke ryge, drikke eller spise under arbejdet og det skal noteres om et insekticid mod f.eks. myg blev benyttet under feltarbejdet.

1.4. Personlig sundhed og sikkerhed. Der skal anvendes hjelm mv i forbindelse med klatring ligesom sikkerhed i den forbindelse skal overholdes. Det samme gælder ved længere vandreture i feltet.

1.5. Dyrevelfærd. Unødig stress af fuglene i forbindelse med håndtering og prøveudtagning skal undgås. Hovedet bør derfor dækkes med eget stykke mørkt stof ligesom unødig støj, håndtering, besøgt af reder og lignende skal undgås eller tage så kort tid som muligt. Check med laboratoriet hvad den minimale prøvestørrelse er og sørg for at prøven er taget så sikkert som muligt i forhold til dyrets sikkerhed og i overensstemmelse med de licenser og tilladelser der er givet.

2. STANDARD DATA. Følgende oplysninger skal noteres i forbindelse med prøveudtagning. Kontaktoplysninger på observatør og den der har taget prøverne, dato og tidspunkt for prøvetagning, GPS-info, prøvetype og antal, biologiske data (art, ringnr., alder, køn, morfometri, hud indeks og rede information og andre relevante oplysninger).

3. PROTOKOL FOR HVER PRØVETYPE

3.1. BLOD

- **Generelt krav:** Fuglen bør så vidt muligt inspiceres klinisk af en dyrlæge eller anden relevant sundhedspersonale. Blodvolumenet bør ikke overstige 1% af legemsvægten af én gang. Mængden af blod taget over to uger må ikke overstige 2% af kropsvægten. Blodprøver tages ved hjælp af en kanyle og en sprøjte. Skift nål og sprøjte mellem hver fugl. Er venerne i meget små da disse punkteres med steril skalpel eller kanyle og blodet kan suges op i kapillærrør. Vacutainers bør undgås og så små kanyler so muligt skal anvendes (25-30 G) for fugle < 500 gram og 23 G for fugle > 500 gram. Antikoagulantia til fuldblod / plasma er nødvendige. Normalt anbefales heparin men rådfør dig med din laborant.

- **Sampling metode:** (1) stimuler den lokale blodcirkulation, (2) rens stedet hvor blodprøven skal tages, (3) Anvendt brachial/radial venen, (4) tryk på punktstedet med sterilt klud når kanylen trækkes ud og hold trykket i nogle minutter for at blødning og hæmatom dannelse.

- **Procedure efter blod ekstraktion:** nål skal fjernes fra sprøjten før prøven sprøjtes i mærkede cryorør. Prøverne skal transporteres ved 4-10 °C og røren bør være tilstrækkeligt fyldt med henblik på at tilvejebringe en passende blod-til-antikoagulantia forhold. Der anvendes evt. serumrør ved centrifugering som gennemføres så hurtigt som muligt og helst inden for 6 timer (maksimalt 12-24 timer) efter indsamling. Jo længere tid der går jo større er risikoen for koagulation og sprængning af røde blodlegemer. Blood skal centrifugeres for at separere plasma / serum fra erythrocytter (10 minutter, 1600-3000 g). Plasma / serum / røde blodlegemer adskillelse er kun mulig på frisk blod. Alle udsorterede fraktioner skal bevares i forskelligt mærkede rør. Forskellige pipettespidser bør anvendes for hver prøve under plasma / serum adskillelse for at undgå krydskontaminering.

- **Opbevaring:** prøver skal opbevares nedfrosset ved -20 / -80°C / flydende N2 (afhængigt af analyse og hvad der skal måles) i mørke indtil analyse.

3.2. FJER

- **Prøveudtagning:** antallet og typen af fjer der udtages samt fuglens alder afhænger af de miljøgifte der skal analyseres for, analyse-teknikken, og målet med undersøgelsen. Fjerene skal så vidt muligt klippes

fremfor plukkes. Fældede fjer i eller under reden kan også indsamles. Dun anbefales ikke. Normalt er 200-500 mg tilstrækkeligt til at analysere for POPer (organiske miljøgifte) mens 10-200 mg er tilstrækkeligt til metal analyser. Fjer kan transporteres ved rumtemperatur i aluminiumsfolie og plast forseglede poser til analyse af organiske miljøgifte mens plastposer kan benyttes til metaller.

- **Opbevaring:** fjer kan opbevares ved stuetemperatur, hvis blod og blødvæv fjernes og hvis de er tørre. Fjer kan gemmes i aluminiumsfolie og / eller plast forseglede poser eller konvolutter, i mørke, og på et tørt sted (brug evt. silica), hvis det opbevares ved stuetemperatur. Alternativt kan fjer fryses i forseglede plastposer. Mærkning af fjerene sker på de pågældende poser.

- **Karakterisering af prøver:** den type (r) af fjer taget bør identificeres, med angivelse i givet fald, hvilken side af fuglen, de blev taget fra, og bruge det konventionelle nummereringssystem for primære svingfjer (indefra og ud til spidsen). I tilfælde af kontur fjer, angives placeringen på kroppen. Dato for prøveudtagning skal registreres, og tidspunktet for den sidste fældning skal estimeres. Skydelære skal anvendes til at måle længde af fjeren (i mm) fra fjerskaft til spids. Calamus skal fjernes med steril saks og gemmes til genetiske analyser. Hver fjer skal vejes (i mg). Afhængig af hvad der skal analyseres kan forskellige vasketeknikker anvendes inden analyse (se protokollen på <http://www.eurapmon.net>).

3.3. Uklækkede ÆG

- **Prøvetagning:** kun ødelagte eller golde æg skal indsamles fra reden. En blyant bør bruges til at skrive oplysninger på både æggeskallen og beholderen. Egnede beholdere til transport er nødvendige for at undgå at æggene ødelægges. Stykker af æggeskaller (tilbage efter klækningen eller knuste æg) fundet i reden kan indsamles og opbevares i forseglede plastposer. Indholdet af reden, herunder levedygtige og golde/ødelagte æg og antallet af unger noteres. Det forsøges at estimere alderen på ødelagte æg ved indsamlingstidspunktet.

- **Forbehandling af prøver og opbevaring:** æg bør ikke fryses, fordi de kan knække. De skal opbevares køligt og forarbejdes så hurtigt som muligt. Længde, bredde og vægt af ægget noteres. Ægget bør åbnes midt på og indholdet skal tømme i kolber. Indholdet skal vejes og homogeniseres og holdes frossen ved -20 °C indtil analyse. En glasbeholder med teflon-foresejlet hætte kan anvendes hvis der skal analyseres for POPer. Plastbeholdere kan anvendes til metaller og PFAS (organiske fluor-kæde forbindelse) bestemmelse. Æg skal undersøges for forrådnelse, udvikling embryo og deformiteter. Hvis et foster er til stede, skal det adskilles fra resten af ægget indhold (før homogenisering) og ligges på frys.

Æggeskaller skylles forsigtigt med ionbyttet vand og tørres ved stuetemperatur til en konstant vægt (konstant æggeskal vægt skal registreres). Æggeskal tykkelse skal måles til ækvator efter tørring ved stuetemperatur ved hjælp af en skydelære. Æggeskal indeks og udtørring indeks bør beregnes efter formlerne i protokollen (<http://www.eurapmon.net>). Data skal korrigeres for udtørring / fugttab.

3.4. Indre organer og væv

- **Generelle overvejelser:** Kroppe af obducerede og prøve udtagne fugle bør bevares i forseglede plastposer for at undgå udtørring og etiketter placeret både inde i posen (skrevet med blyant eller vandtæt spritmarker) og udenpå posen (skrevet med vandtæt markør). Alle oplysninger om slagtekroppen skal registreres, herunder dato, sted, under hvilke omstændigheder det blev fundet, kontaktoplysninger finderens, art, alder, køn, kropsvægt, målinger samt tilstand.

- **Obduktion:** obduktioner bør ske på friske kadavere hvor det er muligt, eller alternativt skal fugles frysning ned (-20 °C) til obduktion og prøveudtagning kan foretages. Hvis fuglen er nedfrosset, skal den optøes natten over. Ekstern undersøgelse af fuglen er nødvendigt at finde mulige tegn på traumer eller tegn på kliniske symptomer tidligere til døden. Huld bør estimeres (se udvidet protokol på <http://www.eurapmon.net>). Under obduktion, skal organvægte, læsioner, køn og gonade-status (udviklingsstadiet) noteres. En standardiseret protokol bør følges (se udvidet protokol).
- **Prøvetagning:** Hvilke væv der skal analyseres kan diskuteres med kolleger og laborant. Passende dissektions-udstyr bør anvendes, og udstyret bør rengøres mellem hvert individ. Prøveudtagning af lever, nyre og andre indre organer bør være hele organet hvis muligt. Når der udtages prøver fra muskelvæv bør det være fra brystmusklen. Hvis fedt skal analyseres, anvendes abdominal fedt i stedet for subkutant fedt. Prøven tages konsekvent fra samme område på fuglen.
- **Opbevaring:** organer bør holdes i separate, tydeligt mærkede beholdere / plastikposer. Anvendelsen af beholdere, hvis materialer kan forstyrre eller påvirke analyse af forurenende stoffer skal undgås. Aluminiumsfolie (vaskes med vand og methanol) kan bruges til prøver der skal analyseres for PFAS mens aluminiumsfolie ikke bør anvendes til væv der skal analyseres for metaller. Organer skal opbevares ved -20 °C eller -80 °C. Hvis man er i tvivl om hvordan prøverne skal opbevares konsulteres analyse laboratoriet.
- **Andre overvejelser:** bortskaffelse af affald og kroppe skal ske i henhold til nationale bestemmelser vedrørende biologisk affald. Hvor det er muligt, bør de vigtigste organer, fjer og knogler arkiveres i en biobank til fremtidige analyser.

3.5. Andre prøver

- **Frisk fæces** kan udtages under håndtering. Det anbefales ikke at tage gammelt fæces til analyse for miljøgifte. Fra døde fugle kan hele gumpékirtlen fjernes mens den forsigtigt tømmes på levende fugle. Frisk afføring kan indsamles fra reder og hvilesteder. Prøverne mærkes tydeligt som angivet ovenfor (se afsnit 3.4). Check med analyselaboratoriet for at kende analysemængden der kræves samt transport og opbevaringsforhold som normalt skal foregå ved -20° indtil kemisk analyse.

Tak. Forfatterne takker den finansielle støtte fra European Science Foundation (ESF) gennem EURAPMON Research Networking Programme. Også tak til Lee Walker for hans værdifulde kommentarer til den forlængede protokol, og Mark Wilson, Amy Challis og Chris Wernham for deres kommentarer til dette resumé.

Detaljerede oplysninger, tal og referencer, se udvidet protokol til rådighed på EURAPMON hjemmeside (<http://www.eurapmon.net/>).

April 2015