

TIIVISTELMÄ: TOIMINTAOHJE PETOLINUISSA ESIINTYVIEN VIERASAINEDIEN NÄYTTEENOTTOA JA SEURANTAA VARTEN.

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, 20014 Turku, Finland. E-mail: silvia.espin@um.es, sieslu@utu.fi

JOHDANTO JA TAVOITE

EURAPMON (*Research and Monitoring for and with Raptors in Europe*) on Euroopan tiedesäätiön (*European Science Foundation, ESF*) tutkimusverkosto-ohjelma (*Research Networking Programme RNP*; <http://www.eurapmon.net>), jonka tavoitteena on Euroopan petolintukantojen seuranta petolintujen puolesta (*for*) ja rinnalla (*with*). Yksi EURAPMON-ohjelman tavoitteista on luoda valmiudet Euroopan petolintukantojen yhdenmukaistettuun seurantaan parhaiksi koetuin menetelmin. Kuuden maan edustajat osallistuivat 31.5.–2.6.2015 Espanjan Murciassa pidettyyn EURAPMONin rahoittamaan työpajakokoukseen, jonka työnimenä oli ”*Parhaiden menetelmien luominen Euroopan petolintukannoissa esiintyvien vierasaineiden seurantaan*”. Työpajakokous luonnosteli toimintaohjeen, joka lähetettiin täydennettäväksi eräille muille petolinuissa esiintyvien vierasaineiden seurannan asiantuntijoille. Toimintaohjeen tavoitteena on ohjata näytteenottajia käyttämään parhaita menetelmiä, joiden avulla voidaan yhdenmukaistaa jo toiminnassa olevien ja uusien projektien käyttämät menettelytavat ja maksimoida aineiston luotettavuus, vertailukelpoisuus ja yhteentoimivuus. Toimintaohje sisältää näytteenoton elävien lintujen verestä, höyhenistä ja rasvarauhasesta, pilaantuneista ja hyläytyistä munista, kuolleiden yksilöiden elimistä ja kudoksista sekä ulosteista ja oksennuspalloista. Tämä kirjoitus on yhteenveto laajemmasta toimintaohjeesta, joka on vapaasti saatavilla EURAPMONin kotisivuilla (<http://www.eurapmon.net>).

YLEISET OHJEET

- 1.1. Lupa.** Ennen työn aloittamista on hankittava tarvittavat luvat asianmukaisista kansallisista virastoista.
- 1.2. Identifiointi.** Näytteet on merkittävä yksilöllisin tunnuksin joko ennen näytteenottoa tai välittömästi sen jälkeen.
- 1.3. Epäpuhtauksien välttäminen.** Näytteen otossa ja varastoinnissa on käytettävä asianmukaisia materiaaleja. Näytteenottovälineiden tulee olla esipuhdistettuja kemiallisia analyysejä tekevien laboratoriorien ohjeiden mukaisesti. On varmistettava, että näytteitä ottavat henkilöt eivät tupakoi, syö tai juo näytteenoton aikana. Näytteenottajien mahdollinen hyönteiskarkotteiden käyttö on myös kirjattava.
- 1.4. Henkilökohtainen terveys ja turvallisuus.** Näytteenotossa tulee käyttää asianmukaisia henkilökohtaisia turvavarusteita ja noudattaa turvaohjeita kiipeilyjen ja maastovaellusten aikana.
- 1.5. Eläinten hyvinvointi.** Näytteenoton aikana on vältettävä tarpeettoman stressin aiheuttamista linnuille (peitä pää, vältä tarpeetonta melua, älä käsittele lintuja tai vieraile pesillä stressiä aiheuttavissa olosuhteissa, pidä käsittelyaika mahdollisimman lyhyenä). On tiedusteltava tutkimuslaboratoriosta, mikä on kyseisessä analyysissä vaadittava minimimäärä näytettä, mutta myös varmistettava, että otettava näytteen määrä ei aiheuta riskiä linnulle ja vastaa lupaehtoja.

2. PERUSTIEDOT. Seuraavat tiedot pitää selkeästi ilmetä näytteenottoraportista, joka tulee aina liittää analysoitavaksi lähetettävien näytteiden mukaan: näytteenottajan tai havainnoitsijan yhteystiedot, näytteenoton päivämäärä ja

kellonaika, tutkimusalue, kerättyjen näytteiden tyyppi ja lukumäärä, biologiset tiedot (laji, ikä ja sukupuoli, rengastustiedot, mitat, kehonkuntoindeksi, tiedot pesästä) ja muut yleiset havainnot.

3. NÄYTETYYPPIEN MUKAISET TOIMINTAOHJEET

3.1. VERINÄYTTEET

Yleiset vaatimukset. Jos mahdollista, eläinlääkärin pitäisi tehdä ennen ja jälkeen verinäytteen ottoa kliininen tutkimus, jonka perusteella linnun terveydentila arvioidaan. Kerralla otettavan verinäytteen paino saa olla enintään yhden prosentin verran eläimen ruumiinpainosta. Samasta yksilöstä 14 vuorokauden pituisen jakson aikana otettavien toistuvien näytteiden yhteispaino saa olla enintään kaksi prosenttia eläimen ruumiinpainosta. Verinäytteen otossa käytetään steriiliä injektioneulaa ja -ruiskua, jotka on vaihdettava, kun tutkittava lintuyksilö vaihtuu. Hyvin pienten lintujen laskimo voidaan nirhaista rikki steriilillä leikkausveitsen tai injektioneulan terävällä kärjellä ja kerätä veri talteen kapillaariputkeen. Tyhjiöneulojen (*vacutainers*) käyttöä tulee välttää. Neulojen tulee olla mahdollisimman ohuita: alle 500 gramman painoisille linnuille soveltuvat 30–25 G:n neulat ja 1–2 ml injektioruiskut ja yli 500 gramman painoisille linnuille 23 G:n neulat ja 5–10 ml injektioruiskut. Veren hyytymisen estoaineita eli antikoagulantteja tulee käyttää kokoveri- ja plasmanäytteitä otettaessa. Hepariinia suositellaan, mutta kemialliset analyysit tekevän laboratorion mielipide on parasta tarkistaa.

Näytteenottomenetelmä. (1) Stimuloi paikallista verenkiertoa, (2) puhdistaa antiseptisellä aineella ihon alue, josta verinäyte otetaan, (3) ota verinäyte puhkaisemalla laskimon seinämä (näytteenotto onnistuu helpoiten olkavarsilaskimosta, *vena brachialis*), (4) verenvuodon ja -purkautumien välttämiseksi paina steriilillä sidekankaalla pistokohtaa ennen kuin vedät neulan pois suonesta ja jatka painamista muutaman minuutin ajan, kunnes verenvuoto lakkaa.

Toimenpiteet verinäytteen oton jälkeen. Neula on irrotettava ruiskusta ennen kuin näyte siirretään merkittyihin näyteputkiin. Näytteet kuljetetaan 4–10 °C lämpötilassa. Antikoagulanttia sisältävät putket on täytettävä siten, että verinäytteen ja antikoagulantin määrän suhde on oikea. Näytteet tulee sentrifugoida eri osioiksi (fraktioiksi) mahdollisimman nopeasti, mieluiten kuuden tunnin kuluessa (maksimiaika 12–24 h) näytteenotosta; mitä enemmän aikaa kuluu, sitä suuremmalla todennäköisyydellä tapahtuu veren hyytyminen ja punasolujen rikkoutuminen. Sentrifugoimalla plasma/seerumi erotetaan punasoluista (10 minuuttia 1 600–3 000 g). Plasman/seerumin/punasolujen erottelu on mahdollista vain tuoreesta verestä. Kaikki erotetut fraktiot tulee säilyttää erillisissä merkityissä näyteputkissa. Eri näytteiden plasman/seerumin erottelussa tulee käyttää eri pipetinkärkiä, jotta mahdollisten epäpuhtauksien siirtyminen näytteestä toiseen (*cross contamination*) vältetään.

Varastointi. Ennen analyysiä näytteet tulee säilyttää pimeässä ja pakastettuina -20°C/-80°C/nestemäisessä työssä (riippuen tehtävästä tutkimuksesta).

3.2. HÖYHENNÄYTTEET

Näytteenotto. Tarvittavien näytehöyhenten (tai sulkien) lukumäärä ja tyyppi sekä näytteenoton kohteena olevan linnun ikä määräytyvät tutkimuksen kohteena olevan vierasaineen, analyysitekniikan ja tutkimuksen tavoitteiden mukaan. Suositeltavimmat höyhennäytteet ovat pesäpoikasista tai täysikasvuista yksilöistä nypityt (tai läheltä ihoa katkaistut) ruumiinhöyhenet. Myös pesästä tai maastosta löydetty sulkasadossa irronneet sulat ja höyhenet kelpaavat analysoitaviksi. Untuvien käyttöä vierasaineiden seuranta-aineistona ei suositella. Orgaanisten yhdisteiden analysointiin tarvitaan normaalisti 200–500 mg ja metallien analysointiin 10–200 mg höyhenmateriaalia. Höyhennäytteet voidaan kuljettaa huoneenlämmössä orgaanisia yhdisteitä analysoitaessa alumiinifolioon käärittynä suljetuissa muovipusseissa, mutta metalleja analysoitaessa pelkästään suljetuissa muovipusseissa.

Varastointi. Höyhennäytteet voidaan säilyttää huoneenlämmössä, mikäli ne ovat kuivia ja niistä on poistettu mahdolliset pehmytkudosten ja veren jäänteet. Höyhennäytteet voidaan säilyttää alumiinifoliossa ja/tai suljetuissa muovipusseissa tai kirjekuorissa, mikäli ne säilytetään huoneenlämmössä pimeässä ja kuivassa paikassa (tai käyttäen silikaa kosteuden ehkäisyyn). Vaihtoehtoisesti höyhennäytteet voidaan säilyttää pakastimessa suljetuissa muovipusseissa. Koodattu etiketti tulee kiinnittää muovipussiin eikä suoraan näytteeseen.

Näytteiden luonnehdinta. Höyhenen tai sulan tyyppi tulee määrittää. On myös rekisteröitävä, kummalta puolelta lintua höyhennäyte on peräisin. Siipi- ja pyrstösulat tulee numeroida vakioitua menetelmää käyttäen (eli käsisulat ja

pyrstösulat sisimmästä uloimpaan ja kyynärsulat uloimmasta sisimpään). Myös ruumiinhöyhenten irrotuskohta tulee rekisteröidä. Näytteenottopäivä tulee ilmoittaa ja edellisen sulkasadon ajankohta tulee arvioida. Jokaisen höyhenen (tai sulan) pituus (mm) mitataan työntötulkilla höydyn (*vane*) tyvestä kärkeen. Ennen höyhenen pituuden mittausta pitää leikata kynä (*calamus* eli höydyn alapuolella oleva ruodon (*rachis*) tyviosa) pois steriileillä ruostumattomasta teräksestä valmistetuilla saksilla. Leikkauskohta sijaitsee heti alimpien höytyliistakkeiden (*rami*, *barbs*) alapuolella. Kynä säästetään mahdollisia geneettisiä analyysejä varten. Jokainen höyhen (tai sulka) tulee punnita (mg). Ennen analyysiä höyhenmateriaali on pestävä menetelmällä, joka määräytyy tutkittavan kemiallisen yhdisteen mukaan (ks. täydellinen toimintaohje <http://www.eurapmon.net>).

3.3. KUORIUTUMATTOMAT MUNAT

Näytteenotto. Vain hylättyjen tai pilaantuneiden munien poistaminen pesästä ja tallentaminen näytteeksi on sallittua. Tunnistetiedot tulee kirjoittaa lyijykynällä sekä munan kuoreen että säilytyskoteloon. Säilytyskoteloiden tulee olla sellaisia, että munat eivät rikkoudu kuljettaessa. Pesästä löydetty rikkoutuneen tai kuoriutuneen munan kuoren palaset ja sirut voidaan tallentaa suljettuihin muovipusseihin. Pesässä havaittujen elävien ja kuolleiden munien sekä poikasten määrät tulee merkitä muistiin; olisi myös arvioitava, jos mahdollista, kerätyn munan ikä eli munintapäivästä keräyspäivään kulunut aika.

Näytteiden esikäsittely ja varastointi. Munia ei ole syytä pakastaa, koska ne voivat rikkoutua. Munat tulisi pitää viileässä ja käsitellä mahdollisimman pian. Munien pituus, leveys ja paino tulee määrittää. Munaan porataan reikä munan ekvaattorille ja sisältö tyhjenetään lasiseen laboratorioastiaan. Munan sisältö punnitaan ja homogenisoidaan ja säilytetään -20°C lämpötilassa ennen analysointia. Analysoitaessa teollisuuden tuottamia vierasaineita, voidaan näytteen säilytykseen käyttää teflonkannella varustettuja lasiastioita. Muovisia säilytysastioita voidaan käyttää tutkittaessa epäorgaanisia yhdisteitä (metallit) tai PFAS-aineita (perfluorattuja alkylyyhdisteitä). Munien mätänemisaste, alkion kehitysvaihe ja mahdolliset epämuodostumat tulee tutkia ja rekisteröidä. Alkio voidaan ennen homogenisointia eristää munan muusta sisällöstä ja pakastaa erikseen. Vaihtoehtoisesti munan sisältö voidaan homogenisoida yhtenä kokonaisuutena.

Munan kuori huuhdotaan varovaisesti vesijohtovedellä ja annetaan kuivua huoneenlämmössä niin kauan, että kuori saavuttaa vakiopainon, joka rekisteröidään. Puhdistetun ja kuivan munan kuoren paksuus mitataan munan ekvaattorin alueelta työntömitalla tai vastaavalla erikoistyökalulla. Kuoren paksuusindeksi ja munan kuivumisindeksi (*dessication index*) lasketaan laajassa toimintaohjeessa esitettyjä laskukaavoja käyttäen (<http://www.eurapmon.net>). Mitatut vierasaineiden pitoisuudet tulee korjata ottaen huomioon munan sisällön mahdollinen kuivuminen.

3.4. SISÄELIMET JA KUDOKSET

Yleiset näkökohdat. Kuivumisen välttämiseksi raadot tulee säilyttää suljetuissa muovipusseissa, joiden sisällä on lyijykynällä tai vedenkestävällä musteella kirjoitettu etiketti, jonka sisältämät tiedot on kirjoitettu vedenkestävällä musteella myös pussin päälle. Kaikki raatoon liittyvät tiedot tulee kirjata: löytöpäivä, löytöpaikka, löydön olosuhteet, löytäjän yhteystiedot, löydetyn linnun laji, ikä, sukupuoli, paino, muut ruumiinmitat ja mätänemisaste.

Ruumiinavaus. Jos suinkin mahdollista, ruumiinavaus tulee tehdä tuoreelle raadolle tai raato on säilytettävä pakastimessa (-20°C) ruumiinavaukseen asti. Jos raato on jäässä, sen tulee antaa sulaa yli yön. Ennen ruumiinavausta on tutkittava, onko ruumin pinnalla havaittavissa merkkejä vammoista tai kliinisistä oireista ennen kuolemaa. Ruumiin kunto on arvioitava (katso laaja toimintaohje). Ruumiinavauksen aikana rekisteröidään elimen paino, mahdolliset vauriot ja muutokset sekä sukuelinten tila (kehitysaste). Vakioitua ruumiinavauksen toimintaohjetta tulee noudattaa (katso laaja toimintaohje).

Näytteenotto. On selvítettävä kemialliset analyysit tekevän laboratorion kanssa, mitkä kudokset valitaan tutkimuksiin. Ruumiinavauksessa on käytettävä asianmukaista välineistöä, joka tulee puhdistaa siirryttäessä kudoksesta ja/tai yksilöstä toiseen. Jos mahdollista, maksasta, munuaisesta ja muista sisäelimestä otetun näytteen tulisi sisältää koko elin. Lihasnäyte tulee ensi sijassa ottaa rintalihaksesta. Rasvanäytteet tulee ottaa ensi sijaisesti vatsaontelon rasvasta eikä ihonalaisesta rasvasta. Useista eri yksilöistä otettavat näytteet (esimerkiksi rasva- ja luunäytteet) tulisi ottaa aina samoista kohdista ruumista vakioidun mallin mukaisesti.

Varastointi. Eri elimet tulee säilyttää erillisinä selvästi merkityissä säilytysastioissa tai muovipusseissa. On vältettävä näytteiden säilyttämisessä materiaaleissa, jotka saattavat vaikuttaa tutkittavista vierasaineista saataviin analyysituloksiin. Vedellä ja metanolilla pestyä alumiinifoliota voidaan käyttää näytteiden säilyttämiseen, mikäli on epävarmaa, soveltuuko muovi perfluorattujen yhdisteiden analysointiin tarkoitettujen näytteiden säilytykseen. Alumiinifoliota ei tule käyttää säilytysmateriaalina näytteissä, joista analysoidaan metallien pitoisuuksia. Elinnäytteet tulee säilyttää -20°C tai -80°C lämpötilassa. Säilytykseen liittyvistä yksityiskohdista tulee tiedustella ohjeita analyysit tekevästä laboratorioista.

Muita näkökohtia. Ruumiinavauksessa syntyvien jätteiden ja raatojen hävitys tulee toteuttaa biologisen jätteen hävittämisestä säädettyjen kansallisten säädösten mukaisesti. Jos mahdollista, analyysin kannalta tärkeimmät elimet, höyhenet ja luut tulisi säilyttää pitkäaikaiseen arkistoon.

3.5. MUUT NÄYTTEET

Lintujen käsittelyn yhteydessä erittämät tuoreet ulosteet kelpaavat näytteeksi. Pesästä pudonneista vanhoista ulosteista kerätyjä näytteitä ei sen sijaan suositella käytettäväksi ympäristön vierasaineita analysoidessa potentiaalisen epäpuhtausriskin vuoksi. Raadoista voidaan tallentaa näytteeksi koko rasvarauhanen. Elävien yksilöiden rasvarauhasesta voidaan varovaisesti puristaa öljynäyte suoraan steriiliin näyteputkeen. Oksennuspalloja voidaan kerätä pesiltä, yöpymispaikoilta ja istumapaikkojen alapuolelta. Näytteet tulee kerätä selvästi merkittyihin steriileihin näyteputkiin (ulosteet ja rasvarauhasen öljy) tai muovipusseihin (ulosteet/ rasvarauhanen/oksennuspallot), jotka on varustettu samoilla tiedoilla, jotka mainittiin raatonäytteiden kohdalla (ks. kohta 3.4). Tarvittavat näytemäärät ja vaaditut kuljetus- ja varastointiolosuhteet on sovittava analyysit suorittavan laboratorion kanssa. Normaalisti näytteet on kuljetettava viileässä ja varastoitava ennen analyysiä -20°C lämpötilassa. Joissakin tapauksissa jokin muu lämpötila (huoneenlämmöstä -80°C lämpötilaan) on tehtävien analyysien kannalta parempi.

Kiitokset. Tekijät kiittävät Euroopan tiedesäätiötä EURAPMON tutkimusverkko-ohjelman kautta saamastaan taloudellisesta tuesta. Kiitokset kuuluvat myös Lee Walkerille hänen laajaan toimintaohjeeseen tekemistään arvokkaista kommentteista ja Mark Wilsonille, Amy Challisille ja Chris Wernhamille tähän yhteenvedoon tehdyistä kommentteista.

EURAPMONin kotisivuilla on toimintaohjeiden laaja versio, joka sisältää yksityiskohtaisemman informaation, kuvat ja viitteet (<http://www.eurapmon.net/>).