

## SUMMARY: SAMPLING AND CONTAMINANT MONITORING PROTOCOL FOR RAPTORS

Espín S<sup>1\*</sup>, García-Fernández AJ<sup>1</sup>, Herzke D<sup>2</sup>, Shore RF<sup>3</sup>, van Hattum B<sup>4</sup>, Martínez-López E<sup>1</sup>, Coeurdassier M<sup>5</sup>, Eulaers I<sup>6</sup>, Fritsch C<sup>5</sup>, Gómez-Ramírez P<sup>1</sup>, Jaspers V.L.B.<sup>6,7</sup>, Krone O<sup>8</sup>, Duke G<sup>9</sup>, Helander B<sup>10</sup>, Mateo R<sup>11</sup>, Movalli P<sup>12</sup>, Sonne C<sup>13</sup>, van den Brink NW<sup>14</sup>.

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

## EINLEITUNG UND ZIEL

Research and Monitoring for and with Raptors in Europe (EURAPMON) ist ein vernetztes Forschungsprogramm der Europäischen Wissenschaftsstiftung (ESF). Ein Ziel von Eurapmon ist die Verbreitung einer „Best Practice“ und der Aufbau von Kapazitäten in Europa für ein abgestimmtes Monitoring von Greifvögeln. Vom 31. Mai bis zum 2. Juni 2013 nahmen Vertreter aus sechs verschiedenen Ländern an einem von EURAPMON gesponserten Workshop für „Entwicklung von bewährten Vorgehensweisen für Monitoring Aktivitäten von Greifvogel-Schadstoffen in Europa“ in Murcia, Spanien, teil. Im Workshop wurde ein Entwurfs-Protokoll entwickelt, das anschließend unter Mitwirkung von Experten im Monitoring von Schadstoffen in Greifvögeln vollendet wurde. Das Ziel dieses Probenahmeprotokolls ist es Anleitungen verschiedener Typen von „Best practice“ bereitzustellen. Dies soll die Anpassung von Prozeduren zwischen bestehenden und neu entstehenden Programmen vereinfachen und somit die Zuverlässigkeit, Vergleichbarkeit und Kompatibilität der Daten zu steigern. Dieses Protokoll behandelt die Entnahme von Blut und Federn von lebenden Vögeln, verdorbenen und verlassenen Eiern, inneren Organen und Gewebe von toten Exemplaren und andere Proben wie Fäzes, Bürzeldrüsen-Sekret und Gewölle.

Das vorliegende Dokument ist eine Zusammenfassung des vollständigen Protokolls das auf der EURAPMON Homepage (<http://www.eurapmon.net>) frei verfügbar ist.

### 1. Genereller Leitfaden

- 1.1 Genehmigung:** Alle nötigen Lizenzen und Genehmigungen müssen von der zuständigen nationalen Behörde vorliegen bevor die Arbeit durchgeführt wird. Die Proben sollten von entsprechend geschultem und befugtem Personal entnommen werden.
- 1.2 Identifizierung:** Die individuellen Probengefäße sollten, bevor oder direkt nachdem die Proben entnommen wurden, mit einem einzigartigen Code beschriftet werden.
- 1.3 Vermeidung von Kontamination:** Für das Sammeln und Lagern der Proben sollte geeignetes Material verwendet werden. Die Arbeitsgeräte müssen vor der Probenahme gereinigt werden (halten Sie Rücksprache mit dem Labor, das die chemischen Analysen durchführt). Versichern Sie sich, dass das Personal das die Proben nimmt während der Probeentnahme nicht raucht, trinkt oder isst. Notieren Sie sich, ob Insektenschutzmittel vom Personal benutzt wurde.
- 1.4 Gesundheit und Sicherheit des Personal:** Es sollte eine angemessene Schutzausrüstung für das Personal benutzt werden und Sicherheitsmaßnahmen zum Klettern und Wandern sollten durchgeführt werden.
- 1.5 Tierschutz:** Unnötiger Stress für die Vögel während der Probenahme sollte vermieden werden (Kopf abdecken, unnötigen Lärm vermeiden, Umgang mit den Vögeln oder Kontrolle der Nester vermeiden, wenn sie unter Umständen den Stress für die Tiere erhöhen, Bearbeitungszeit so kurz wie möglich halten). Klären Sie mit dem Labor die Mindestgröße einer Probe für die geplanten Analysen,

aber gehen Sie sicher dass die Probengröße das Wohl des Vogels nicht gefährdet und konform mit den Lizenzbestimmungen ist.

## 2. Basisdaten

Die folgenden Informationen sollte im Probenahmebericht, der den zu analysierenden Proben immer beiliegen muss, klar beschrieben werden: Kontaktdetails des Beobachters oder Erfassers, Datum und Uhrzeit der Probenahme, Untersuchungsgebiet, Art der Proben und Anzahl der gesammelten Proben, biologische Daten (Art, Beringungsdaten, Alter und Geschlecht, morphologische Maße, Index für die körperliche Verfassung, Nest Informationen) und andere generelle Beobachtungen.

## 3. Protokoll für jede Probenart

### 3.1 Blut:

**Generelle Anforderungen:** Nach Möglichkeit sollte vor und nach der Blutentnahme eine medizinische Untersuchung durch einen Tierarzt durchgeführt werden, um den Gesundheitsstatus des Vogels zu bewerten/überwachen. Das Gewicht der Probenahme darf zu keinem Zeitpunkt 1% des Körpergewichtes des Tieres übersteigen. Wenn das kombinierte Gewicht von Proben, die über mehrere Tage vom selben Individuum entnommen wurden, berücksichtigt wird, darf ein Maximum von 2% der Körpergewichts in einem Zeitraum von 14 Tagen entnommen/gesammelt werden. Blutproben können mit einer subkutanen Nadel oder einer Injektionsspritze entnommen werden. Nadeln oder Spitzen müssen zwischen den Vögeln gewechselt werden. Venen von sehr kleinen Vögeln können mit einer scharfen, sterilen Spitze (zum Beispiel einem Skalpell oder einer subkutanen Nadel) eingeschnitten und das Blut mit einem Kapillarröhren entnommen werden. Vakuumsysteme wie Vacutainers sollten vermieden werden. Die kleinstmöglichen Nadeln sollen genutzt werden: subkutane Nadeln der Größe 30 bis 25 und eine 1 oder 2 ml Injektionsspritze für Vögel mit einem Körpergewicht unter 500 Gramm, und subkutane Nadel der Größe 23 und eine 5 oder 10 ml Injektionsspritze für Vögel über 500 Gramm Körpergewicht. Für Blut/Plasma werden Antigerinnungsmittel benötigt. Halten Sie Rücksprache mit dem Labor, das die chemischen Untersuchungen durchführt (in den meisten Fällen wird Heparin empfohlen).

**Methode der Probenahme:** (1) Stimulieren Sie die lokale Blutzirkulation, (2) Benutzen Sie ein Antiseptikum an der Blutentnahmestelle, (3) Entnehmen Sie die Blutproben durch das Punktieren einer Vene (die Brachialvene ist die einfachste zur Blutgewinnung), (4) Pressen sie ein sterilen Tupfer auf die Punktierstelle bevor Sie die Nadel aus der Vene entfernen und halten Sie den Druck für einige Minuten bis die Wunde nicht mehr blutet. So verhindern Sie Blutungen und Hämatome.

**Prozedur nach der Blutentnahme:** die Nadeln müssen von der Spritze entfernt werden bevor die Proben in die gekennzeichneten Röhrchen gegeben werden. Die Proben müssen bei 4-10°C transportiert werden. Röhrchen die Gerinnungshemmer enthalten sollten in hinreichender Menge befüllt werden, um ein angemessenes Blut-zu-Gerinnungshemmer Verhältnis zu erreichen. Serum Trennröhrchen werden für Serum benötigt und Proben sollen so schnell wie möglich, idealerweise innerhalb von 6 Stunden (maximal 12-24h) nach der Probenahme, zentrifugiert werden; je länger die Gesamtbearbeitungszeit desto höher ist das Risiko, dass die Roten Blutkörperchen gerinnen und auseinanderbrechen. Um das Plasma/Serum von den Erythrozyten zu trennen muss das Blut zentrifugiert werden (10 Minuten, 1600-3000 g). Das Trennen von Blutplasma, Serum und roten Blutkörperchen ist nur bei frischem Blut möglich. Alle getrennten Bestandteile sollten in unterschiedlich gekennzeichneten Röhrchen gelagert werden. Während der Plasma/Serum Trennung soll für jede Probe eine frische Pipettenspitze benutzt werden um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.

**Lagerung:** die Proben sollten bis zur Analyse gefroren bei -20°/ -80° flüssigem Stickstoff (abhängig von der zu analysierenden Substanz oder dem Biomarker) dunkel gelagert werden.

### 3.2. Federn

**Sammeln:** die Anzahl und Art der Federn die entnommen werden müssen sowie das Alter der Vögel von denen sie entnommen werden, ist abhängig vom untersuchten Schadstoff, der Analysetechnik und der Zielsetzung der Studie. Bevorzugt werden gerupfte (oder an der Haut abgeschnittene) Konturfedern von Nestlingen oder erwachsenen Tieren. Mauserfedern die im Nest oder im Gelände gefunden werden können auch eingesammelt werden. Daunenfedern werden zum Schadstoffmonitoring nicht empfohlen. Normalerweise werden 200-500mg für organische Komponenten und 10-200mg für Metallanalysen benötigt. Federn können für die Analyse der organischen Komponenten bei Raumtemperatur in

Aluminiumfolie oder Gefrierbeutel transportiert werden, für die Metallanalyse dürfen nur Gefrierbeutel benutzt werden.

**Lagerung:** Federn können bei Raumtemperatur gelagert werden sofern Gewebereste oder Blut entfernt wurden und sie trocken sind. Federn können in Aluminiumfolie und/oder Gefrierbeuteln oder Briefumschlägen gelagert werden, im Dunkeln und an einem trockenen Platz (oder durch Nutzung von Silica). Alternativ können die Federn auch in Gefrierbeuteln eingefroren werden. Die Beschriftung sollte nicht direkt auf der Feder sein, sondern als Code auf den Beuteln.

**Probenbeschreibung:** die Federarten die entnommen wurden müssen identifiziert werden, nach Möglichkeit unter Angabe der genauen Stelle wo sie dem Vogel entnommen wurden und unter Verwendung des gebräuchlichen Nummerierungssystems der Handschwingen (von innen nach außen). Falls Konturfedern entnommen werden, soll die genaue Lokalisierung am Körper angegeben werden. Das Datum der Probenahme muss notiert und der Zeitpunkt der letzten Mauser geschätzt werden. Die Länge jeder Feder (in mm) sollte von der Basis der Fahne bis zur Spitze mittels Schiebelehre gemessen werden. Vor der Messung der Federlänge sollte der Kalamus oder Federkiel (der Teil der am nächsten an der Federfahne liegt) mit einer sterilisierten Edelstahlschere an der Stelle an der die Fahnen vom Schaft beginnen, abgeschnitten werden. Der Kalamus kann für genetische Untersuchungen (mit dem im Schaft enthaltenen Blut) gelagert werden. Jede Feder muss gewogen werden (in mg). Abhängig von den Wirkstoffen die analysiert werden sollen, müssen vor der Analyse verschiedene Waschtechniken angewandt werden.

### 3.3. Ungeschlüpfte Eier

**Sammeln:** Es sollten nur verlassene oder verfaulte Eier aus den Nestern genommen werden. Mit einem Bleistift sollen Informationen auf die Eischale und den Behälter geschrieben werden. Um ein Zerschlagen der Eier zu vermeiden werden geeignete Behälter für den Transport benötigt. Eischalen (die nach dem Schlüpfen zurück bleiben oder von zerstörten Eiern) die im Nest gefunden werden, können eingesammelt und in Plastikbeuteln aufbewahrt werden. Die Inhalte des Nests, das heißt lebensfähige oder abgestorbene Eier sowie Nestlinge, sollten notiert werden ebenso wie das geschätzte Alter der Eier (seit sie gelegt wurden) als sie gesammelt wurden.

**Vorbereitung der Proben und Lagerung:** Eier sollten nicht eingefroren werden, da sie hierbei aufbrechen können. Sie sollten kühl gehalten werden und so schnell wie möglich bearbeitet werden. Die Länge und Breite des Eies muss gemessen werden und auch das Gewicht sollte erfasst werden. Das Ei sollte an seinem Äquator geöffnet und der Inhalt in einen Glaskolben gefüllt werden. Der Inhalt muss gewogen und homogenisiert werden und bis zur Analyse bei -20°C eingefroren werden. Wenn industrielle Schadstoffe untersucht werden sollen, soll ein Glasbehältnis mit abdichtender Teflonkappe verwendet werden. Plastikbehälter können bei anorganischen Schadstoffen und PFAS Bestimmung verwendet werden. Eier sollen auf Fäulnis, Embryoentwicklung und –missbildung geprüft werden. Falls ein Embryo vorhanden ist, muss er (vor der Homogenisierung) von den restlichen Eihalten getrennt und eingefroren werden.

Die Eischalen müssen vorsichtig mit Leitungswasser abgewaschen und bei Raumtemperatur bis zu einem konstanten Gewicht getrocknet werden (das konstante Eigewicht soll notiert werden). Die Dicke der Eischale soll nach dem Trocknen bei Raumtemperatur an ihrem Äquator mittels Schiebelehre ermittelt werden. Eierschalenindex und Trockenindex müssen anhand von Gleichungen berechnet werden die im ausführlichen Protokoll enthalten sind. Die Schadstoffdaten müssen aufgrund des Trocknens/Feuchtigkeitsverlusts korrigiert werden.

### 3.4. Innere Organe und Gewebe

**Allgemeine Anweisungen:** Kadaver müssen in Gefrierbeuteln gelagert werden um eine Austrocknung zu vermeiden, dabei Etiketten sowohl im Beutel (beschriftet mit einem Bleistift oder wasserfesten Marker) und auf dem Beutel (beschriftet mit einem wasserfesten Marker) sein. Alle Informationen über den Kadaver sollten erfasst werden, einschließlich Datum, Ort, unter welchen Umständen er gefunden wurde, Kontaktinformationen des Finders, Art, Alter, Geschlecht, Körpergewicht, Körpermaße, Zersetzungsstadium.

**Obduktion:** Obduktionen sollten nach Möglichkeit an frischen Kadavern durchgeführt werden andernfalls sollten die Kadaver bis zur Obduktion bei -20°C eingefroren werden. Falls der Kadaver gefroren ist, sollte er über Nacht aufgetaut werden. Äußere Untersuchungen des Kadavers sind notwendig um mögliche Zeichen die auf ein Trauma hinweisen oder Hinweise auf klinische Symptome vor dem Tod

zu finden. Die körperliche Verfassung sollte geschätzt werden (siehe im ausführlichen Bericht). Während der Obduktion müssen Organgewicht, Verletzungen/Veränderungen, Geschlecht und Status der Keimdrüsen (Entwicklungsstadium) notiert werden. Es sollte nach einem standardisierten Obduktionsplan vorgegangen werden (siehe im ausführlichen Bericht).

**Probenahme:** Lassen Sie sich, was die Auswahl der zu analysierenden Gewebeproben angeht, vom Labor das die chemische Untersuchung durchführt beraten. Es sollten geeignete Sektionsutensilien verwendet werden, welche zwischen beprobten Organen und zwischen Individuen gesäubert werden müssen. Probenahmen von Leber, Nieren oder anderen inneren Organen sollten, nach Möglichkeit, vom vollständigen Organ sein. Wenn Muskelgewebe entnommen wird, sollte vorzugsweise der Brustmuskel gewählt werden. Wenn Fett analysiert werden soll, sollten Sie eher abdominales Fett statt subkutanem Fett verwenden. Falls die Gewebeproben über den ganzen Körper verteilt sind, wie beispielsweise abdominales Fett oder Knochen, wird empfohlen, dass die Gewebeproben von mehreren Individuen einheitlich vom selben Teil des Körpers entnommen werden (oder falls Knochen beprobt werden, von derselben Stelle im Skelett).

**Lagerung:** Organe sollten in separaten, eindeutig gekennzeichneten Behältern oder Plastiktüten aufbewahrt werden. Der Gebrauch von Behältern deren Bestandteile die Analyse der Schadstoffe stören oder beeinflussen können, muss vermieden werden. Aluminiumfolie (abgewaschen mit Wasser oder Methanol) kann verwendet werden um die Proben zu umwickeln, sofern es zur Analyse von Perfluorverbindungen Unsicherheit über die Tauglichkeit von Plastikbehältern gibt. Aluminiumfolie sollte nicht verwendet werden, wenn eine Analyse von Spurenmetallen durchgeführt wird. Organe sollten bei  $-20^{\circ}\text{C}$  oder  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Sollte es irgendwelche Unklarheiten zur Probenlagerung geben, suchen sie Rat beim Analyiselabor.

**Sonstige Überlegungen:** Entsorgung von Abfällen und Kadavern soll nach landesrechtlichen Vorschriften zur Entsorgung von biologischem Müll ablaufen. Wo es möglich ist, sollten Schlüsselorgane, Federn und Knochen in einem Langzeit-Archiv aufbewahrt werden.

### 3.5 Andere Proben

Frische Fäzes können gesammelt werden indem Individuen dazu gebracht werden Kot abzusetzen während man mit ihnen arbeitet. Die Möglichkeit einer Kontamination von alten Fäzes die aus dem Nest gefallen sind ist groß und es wird empfohlen diese nicht zur Schadstoffanalyse zu verwenden. Wenn Bürzelöl von Kadavern gesammelt wird, sollte die ganze Bürzeldrüse entfernt werden. Am lebenden Vogel sollte die Bürzeldrüse sanft gedrückt werden und das austretende Öl mit einem sterilen Röhrchen aufgefangen werden. Frisches Gewölle kann von den Nestern, Schlafplätzen oder Ansitzwarten gesammelt werden. Die Proben sollten in eindeutig beschrifteten, sterilen Röhrchen (Kot/Bürzelöl) oder Plastiktüten (Kot/Bürzeldrüse/Gewölle) gesammelt werden, es sollten die gleichen Informationen darauf zu finden sein wie sie für Kadaver empfohlen werden (siehe Kapitel 3.4.). Klären sie mit dem Analyiselabor welche Menge benötigt wird und welche Transport- und Lagerbedingungen zulässig sind. Normalerweise sollte der Transport unter kühlen Bedingungen und die Lagerung bis zur chemischen Untersuchung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  stattfinden. In manchen Fällen ist die Lagerung unter alternativen Bedingungen (von Zimmertemperatur bis  $-80^{\circ}\text{C}$ , abhängig von der Analyse) besser geeignet.

### Danksagung

Die Autoren bedanken sich herzlich für die finanzielle Unterstützung von der Europäischen Wissenschaftsstiftung (ESF) durch das EURAPMON Research Networking Programm. Ein herzlicher Dank gilt auch Lee Walker für seine wertvollen Anmerkungen am ausführlichen Protokoll, und Marc Wilson, Amy Challis and Chris Wernham für ihre Kommentare an dieser Zusammenfassung.

*Ausführlichere Informationen, Abbildungen und Hinweise finden sie im erweiterten Protokoll, welches auf der EURAPMON Internetseite (<http://www.eurapmon.net/>) verfügbar ist.*

April 2015