

## RIASSUNTO: PROTOCOLLO PER IL CAMPIONAMENTO E IL MONITORAGGIO DEI CONTAMINANTI NEI RAPACI

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. \*Indirizzo attuale: 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)

### INTRODUZIONE E OBIETTIVI

Il Progetto internazionale “EURAPMON” è un programma di ricerca e di monitoraggio sui rapaci in Europa, finanziato dalla European Science Foundation (ESF) (<http://www.eurapmon.net>). Uno degli obiettivi di EURAPMON è di favorire la diffusione di buone pratiche e di rafforzare le competenze tecniche per armonizzare in Europa il monitoraggio dei contaminanti ambientali effettuato attraverso i rapaci. Dal 31 maggio al 2 giugno 2013, i rappresentanti di sei paesi si sono incontrati a Murcia, Spagna, per partecipare al workshop “*Setting best practices on raptor contaminant monitoring activities in Europe*”, finanziato da EURAPMON. Durante il workshop è stata redatta una prima bozza di un protocollo per la raccolta dei campioni, successivamente completata con il coinvolgimento degli esperti di monitoraggio dei contaminanti nei rapaci. Lo scopo di questo protocollo è di indicare le migliori pratiche per facilitare l’armonizzazione delle procedure seguite dagli schemi di ricerca già esistenti e da quelli che stanno nascendo, al fine di massimizzare l’affidabilità, il confronto e l’interoperabilità dei dati. Questo protocollo riguarda le modalità di campionamento di sangue e penne negli uccelli vivi, di uova deteriorate o abbandonate, organi interni e tessuti da individui morti e altri materiali come feci, secrezioni uropigiali e borre. Il presente documento è un riassunto della versione completa del protocollo, scaricabile gratuitamente dal sito di EURAPMON (<http://www.eurapmon.net>) in lingua inglese.

### 1. LINEE GUIDA GENERALI

- 1.1. Permessi.** Prima di dare avvio alla ricerca, occorre ottenere tutte le necessarie autorizzazioni da parte degli organismi nazionali competenti. I campioni devono essere raccolti da personale adeguatamente formato e autorizzato.
- 1.2. Identificazione.** Ogni contenitore contenente i campioni deve essere etichettato prima o immediatamente dopo la raccolta, con un codice identificativo univoco.
- 1.3. Rischi di contaminazione.** Per la raccolta e la conservazione dei campioni deve essere usato materiale adeguato. L’attrezzatura deve essere pulita prima dell’utilizzo (chiedere specifiche al laboratorio che effettuerà le analisi chimiche). Assicurarsi che il personale incaricato non

fumi, beva o mangi durante il campionamento. Annotare se il personale incaricato del campionamento abbia usato dello spray repellente per insetti.

**1.4. Salute e sicurezza del personale.** Devono essere usati adeguati dispositivi di protezione individuale e devono essere adottate misure di sicurezza per l'arrampicata o la scalata ai nidi.

**1.5. Diritti animali.** Durante la raccolta dei campioni, evitare ogni forma di stress non necessario per gli uccelli (aver cura di coprire loro la testa, evitare rumori forti, non maneggiarli o visitare i nidi quando le condizioni potrebbero aumentare lo stress, maneggiare gli individui per il minor tempo possibile). Informarsi con il laboratorio sull'entità minima del campione in base alle analisi da effettuare, ma assicurarsi che l'entità del prelievo sia compatibile con la salute degli uccelli e con le autorizzazioni ottenute.

**2. DATI DI BASE.** Nella scheda di campionamento che deve sempre accompagnare i campioni mandati ad analizzare, devono essere chiaramente indicate le seguenti informazioni: nominativo e recapiti dell'osservatore o del campionatore, data e ora di campionamento, area di studio, tipologia e numero dei campioni prelevati, dati biologici (specie, numero di anello, età e sesso, misure morfometriche, indice delle condizioni corporee, informazioni sul nido) e altre osservazioni generali.

### 3. PROTOCOLLO PER CIASCUNA TIPOLOGIA DI CAMPIONAMENTO

#### 3.1. SANGUE

**Criteri generali.** Se possibile, prima e dopo il prelievo l'animale dovrebbe essere sottoposto ad un esame clinico da parte di un veterinario per accertarne lo stato di salute. Ciascun prelievo non dovrebbe eccedere l'1% del peso corporeo dell'animale. Qualora si rendessero necessari campioni diversi prelevati da uno stesso individuo, al massimo può essere raccolto il 2% del peso corporeo nell'arco di 14 giorni.

I campioni ematici devono essere prelevati usando una siringa e un ago ipodermico. Cambiare aghi e siringhe ad ogni individuo. Il prelievo in uccelli di piccola dimensione deve essere effettuato incidendo la vena brachiale con una punta affilata e sterile (per esempio un bisturi o un ago ipodermico) e raccogliendo il sangue in un tubo capillare. Le provette sottovuoto dovrebbero essere evitate. Le dimensioni degli aghi da utilizzare devono essere le più piccole possibili: ago ipodermico di diametro interno da 30 a 25 mm e siringa da 1 a 2 ml per uccelli < 500 g di peso corporeo; ago ipodermico con diametro da 23 mm e siringa da 5 o 10 ml per uccelli > 500 g di peso corporeo. Per il sangue intero o per il plasma sono necessari anticoagulanti. Seguire le indicazioni del laboratorio che effettuerà le analisi chimiche (di solito è consigliata l'eparina).

- **Metodo di prelievo.** (1) stimolare la circolazione sanguigna della zona, (2) usare un antisettico nel punto di flebotomia, (3) raccogliere il sangue dopo aver punto la vena (la vena brachiale è la più adatta per prelevare il sangue), (4) prima di estrarre l'ago dalla vena tenere pressata la parte con un tessuto sterile e tenerla premuta per alcuni minuti dopo aver estratto l'ago, onde evitare perdite di sangue ed ematomi.
- **Procedure dopo l'estrazione.** L'ago deve essere tolto dalla siringa prima di inserire il campione nelle provette debitamente etichettate. I campioni devono essere trasportati a 4-10 °C. Le provette contenenti anticoagulanti devono essere riempite adeguatamente per ottenere un corretto rapporto sangue/anticoagulante. Per la raccolta del siero sono necessarie provette con separatore di siero e i campioni devono essere centrifugati il prima possibile, meglio se entro le

sei ore successive al prelievo (al massimo entro 12/24 ore). Maggiore è il tempo che intercorre dalla raccolta alla centrifugazione, più alto è il rischio di coagulazione e rottura dei globuli rossi. Il sangue va centrifugato per separare il plasma/siero dagli eritrociti (10 minuti, 1600-3000 g). La separazione del plasma/siero/globuli rossi è possibile solo con il sangue fresco. Tutte le frazioni separate devono essere conservate in diverse provette, debitamente etichettate. Per evitare contaminazioni incrociate, durante la separazione plasma/siero devono essere usati puntali per pipette diversi per ciascun campione.

- **Conservazione.** I campioni devono essere conservati al buio e congelati in N<sub>2</sub> liquido a -20°/-80°C/ (in funzione della sostanza e del biomarker da studiare) fino al momento delle analisi.

### 3.2. PIUME

- **Campionamento.** Il numero e il tipo di piume da campionare e l'età degli uccelli da cui prelevarle dipende dal contaminante in esame, dalla tecnica analitica e dagli obiettivi dello studio. Le piume di contorno del corpo, strappate (o tagliate alla base) da pulcini/adulti sono le più indicate. Possono essere raccolte anche piume della muta presenti nel nido o trovate sul campo. Per il monitoraggio dei contaminanti il piumino non è raccomandato. Normalmente sono richiesti 200-500 mg per i composti organici e 10-200 mg per le analisi dei metalli. Per l'analisi degli inquinanti organici, le piume devono essere trasportate, a temperatura ambiente, in un foglio di alluminio dentro sacchetti di plastica sigillati, mentre per le analisi dei metalli solo in sacchetti di plastica.
- **Conservazione.** Se secche e in assenza di tessuti molli o residui di sangue, le piume possono essere conservate al buio, in un luogo asciutto (all'occorrenza usare granuli di silice), a temperatura ambiente, avvolte in fogli di alluminio e/o sacchetti di plastica chiusi o in buste. In alternativa, si possono congelare in sacchetti di plastica chiusi. Non applicare l'etichetta direttamente sulla penna, ma contrassegnare il sacchetto con un codice.
- **Caratterizzazione dei campioni.** Identificare il tipo o i tipi di penne raccolte, indicando, quando possibile, da quale lato dell'uccello sono state prese e utilizzando la numerazione convenzionale per le penne primarie (dall'interno verso la punta dell'ala). Nel caso delle piume di contorno, indicare il punto del corpo da cui sono state prelevate. Registrare la data del campionamento e stimare il tempo intercorso dall'ultima muta. Misurare la lunghezza di ciascuna penna con un calibro (in mm), partendo dalla base delle barbe fino alla punta. Prima di prendere le misure della lunghezza, rimuovere il calamo (cioè la parte del rachide priva di barbe, più vicina al corpo dell'uccello) con un paio di forbici sterilizzate in acciaio inossidabile, appena sopra il punto dove le prime barbule del vessillo si attaccano al rachide. Il calamo può essere conservato per studi genetici (utilizzando il sangue residuo). Ciascuna penna deve essere pesata (in mg). In funzione dei diversi composti da studiare, prima delle analisi procedere a differenti sistemi di lavaggio (si veda il protocollo completo).

### 3.3. UOVA NON SCHIUSE

- **Campionamento.** Dal nido dovrebbero essere raccolte solo uova deteriorate ed abbandonate. Usare una matita per scrivere le informazioni richieste sia sul guscio, sia sul contenitore. Usare contenitori adatti per evitarne la rottura durante il trasporto. Eventuali parti di guscio trovate nel nido (resti della schiusa o uova rotte) possono essere raccolte e conservate in una busta di plastica chiusa. Il contenuto del nido, incluse le uova sane, quelle deteriorate e i pulcini, deve essere registrato così come l'età stimata dell'uovo (il tempo trascorso dalla deposizione) e la data di raccolta.

- **Pre-trattamento dei campioni e conservazione.** Le uova non devono essere congelate per evitare il rischio di rottura. Conservarle al fresco e analizzarle in tempi molto brevi. Registrarne lunghezza, diametro e peso. Aprire l'uovo all'equatore e svuotarne il contenuto in una ampolla. Pesare il contenuto, omogeneizzarlo e conservarlo ad una temperatura di  $-20^{\circ}\text{C}$  fino alle analisi. Se devono essere analizzati inquinanti industriali, utilizzare un contenitore di vetro con un tappo in teflon. Contenitori in plastica possono essere usati per i contaminati inorganici e per la determinazione dei PFAS. Le uova possono essere esaminate per verificare fenomeni di putrefazione, lo sviluppo e le deformità degli embrioni. Se è presente un embrione, separarlo dal resto del contenuto (prima dell'omogeneizzazione) e conservarlo in congelatore.

Lavare attentamente i gusci con acqua corrente e lasciarli asciugare a temperatura ambiente fino alla stabilizzazione del peso (di cui si dovrà prendere nota). Dopo averlo lasciato asciugare a temperatura ambiente, misurare lo spessore del guscio all'equatore con un calibro. Calcolare gli indici del guscio e del disseccamento utilizzando le equazioni presenti nella versione estesa del protocollo. Correggere i dati dei contaminanti tenendo conto del disseccamento e/o della perdita di umidità.

### 3.4. ORGANI INTERNI E TESSUTI

- **Considerazioni generali.** Per evitarne il disseccamento, le carcasse devono essere conservate in buste di plastica chiuse; le etichette vanno poste sia dentro le buste (scritte con una matita o con pennarello indelebile), sia all'esterno (scritte con pennarello indelebile). Registrare tutte le informazioni riguardanti la carcassa, incluse la data, il sito e le circostanze del ritrovamento, i recapiti di chi le ha ritrovate, la specie, l'età, il sesso, il peso corporeo, le misure biometriche e il grado di decomposizione.
- **Necropsia.** Quando possibile, le necropsie devono essere effettuate sulle carcasse fresche; in alternativa conservare i corpi in congelatore ( $-20^{\circ}$ ) fino al momento dell'esame necroscopico. Se la carcassa è congelata, toglierla dal congelatore la notte prima della necropsia. Al fine di evidenziare eventuali segni di traumi o sintomi clinici precedenti la morte, procedere ad un esame autoptico esterno della carcassa, valutandone le condizioni (si veda la versione estesa del protocollo). Durante la necropsia, annotare il peso degli organi, le lesioni o le alterazioni, il sesso e lo stato delle gonadi (stadio di sviluppo), seguendo un protocollo standard (si veda la versione estesa del protocollo).
- **Campionamento.** Per la selezione dei tessuti da analizzare, si consiglia di contattare il laboratorio che effettuerà le analisi chimiche. Utilizzare una strumentazione da dissezione appropriata e pulire gli strumenti ad ogni prelievo di organo e tra ogni individuo. Quando possibile, i prelievi di fegato, rene ed altri organi interni, dovrebbero riguardare l'intero organo. Se i prelievi riguardano i muscoli, prediligere il muscolo pettorale; se riguardano il grasso, preferire il grasso addominale a quello sottocutaneo. Se i tessuti da esaminare sono diffusi nel corpo, come nel caso del grasso addominale e delle ossa, si consiglia che i prelievi effettuati, in individui differenti, vengano effettuati da tessuti localizzati nelle stesse aree del corpo (oppure, nel caso di ossa, nella stessa parte dello scheletro).
- **Conservazione.** Gli organi devono essere conservati in contenitori o buste di plastica separate e debitamente etichettate. Evitare l'utilizzo di contenitori la cui composizione possa interferire con le analisi da effettuare. Se si è incerti circa l'adeguatezza di contenitori in plastica per l'analisi dei composti perfluorurati, avvolgere i campioni in fogli di alluminio (lavati con acqua e metanolo). I fogli di alluminio non devono essere usati nel caso di analisi di metalli in traccia.

Conservare gli organi ad una temperatura di -20 °C oppure -80 °C. Se si hanno dubbi sulle procedure di conservazione, contattare il laboratorio che effettuerà le analisi.

**3.5. Altre considerazioni.** Lo smaltimento dei rifiuti e delle carcasse deve avvenire secondo le norme nazionali in materia di rifiuti biologici. Quando possibile, gli organi chiave, le penne e le ossa dovrebbero essere conservati in appositi luoghi atti alla conservazione a lungo termine.

### 3.6. ALTRI ESEMPI

- Gli escrementi freschi possono essere raccolti inducendo gli individui a emetterli durante la manipolazione. Le feci vecchie cadute dai nidi sono potenzialmente a rischio di contaminazione e non sono adatte per le analisi dei contaminanti. Quando si deve campionare il secreto uropigiale da individui morti, si raccomanda di togliere l'intera ghiandola. In uccelli vivi, la secrezione può essere raccolta premendo delicatamente la ghiandola con un tessuto e raccogliendone il secreto in una provetta sterile. Le borre fresche possono essere raccolte dai nidi, dai dormitori e sotto i posatoi. I campioni devono essere conservati in provette sterili etichettate (feci/secrezione uropigiale) oppure in sacchetti di plastica (feci/ghiandola uropigeale/borre), con le stesse raccomandazioni fatte per le carcasse (si veda il paragrafo 3.4). Contattare il laboratorio che effettuerà le analisi per determinare le quantità necessarie e avere indicazioni sulle adeguate condizioni per il trasporto e la conservazione. Di solito, il trasporto deve essere effettuato a bassa temperatura e la conservazione deve avvenire a -20° fino al momento dell'analisi chimica. In alcuni casi potrebbe essere più indicata la conservazione ad una temperatura diversa (da temperatura ambiente a -80°C, in funzione dell'analisi richiesta).

Ringraziamenti. Gli autori ringraziano il supporto finanziario della *European Science Foundation* (ESF) attraverso il contributo erogato da *EURAPMON Research Networking Programme*. Si ringrazia Lee Walker per i preziosi commenti sulla versione estesa del protocollo, Mark Wilson, Amy Challis e Chris Wernham per i loro suggerimenti sulla versione riassunta.

*Per informazioni più dettagliate, figure e bibliografia si rimanda alla versione estesa del protocollo, disponibile in lingua inglese sul sito web di EURAPMON, (<http://www.eurapmon.net/>).*

Dicembre 2015