

RESUMO: PROTOCOLO PARA AMOSTRAGEM E MONITORIZAÇÃO DE CONTAMINANTES EM AVES DE RAPINA

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, Arctic 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

INTRODUÇÃO E OBJECTIVO

Investigação e monitorização de e com aves de rapina na Europa (Research and Monitoring for and with Raptors in Europe; EURAPMON) é um Programa de Investigação em Rede (<http://www.eurapmon.net>) da Fundação Europeia da Ciência (European Science Foundation; ESF). Um dos objectivos do programa EURAPMON é divulgar boas práticas e criar competências na Europa para uma monitorização coordenada com aves de rapina. De 31 de Maio a 2 de Junho de 2013, representantes de seis países reuniram-se em Murcia, Espanha, para participar num Workshop para “Estabelecimento de boas práticas para actividades de monitorização de contaminantes em aves de rapina na Europa” financiado pelo EURAPMON. Neste workshop desenvolveu-se o rascunho do protocolo que foi subsequentemente completado com o envolvimento de especialistas na monitorização de contaminantes em aves de rapina. O objectivo deste protocolo de amostragem é criar linhas de orientação sobre boas práticas que facilitarão a coordenação de procedimentos entre programas de monitorização existentes ou em início, maximizando assim a fiabilidade, comparação e inter-operacionalidade da informação. Este protocolo abrange a amostragem de sangue e penas em aves vivas, ovos não eclodidos e abandonados, órgãos internos e tecidos de exemplares mortos e outras amostras como dejectos, óleo da glândula uropigiana e regurgitações. Este documento é um resumo do protocolo alargado, que está disponível no sítio web do programa EURAPMON (<http://www.eurapmon.net>).

1. ORIENTAÇÕES GERAIS

- 1.1. Autorização.** Antes de iniciar os trabalhos, todas as licenças e autorizações devem ser obtidas junto das autoridades nacionais. As amostras devem ser recolhidas por pessoas devidamente preparadas e autorizadas para este tipo de acções.
- 1.2. Identificação.** Os recipientes com amostras individuais devem ser etiquetados antes ou imediatamente após a recolha da amostra, utilizando um código identificativo único.
- 1.3. Evitar contaminação.** Deve utilizar-se material de amostragem e armazenamento apropriado. O equipamento deve estar limpo antes da amostragem (procure aconselhamento junto do laboratório que realizará as análises químicas). Deve assegurar-se que quem realiza a amostragem não fume, beba ou coma durante a recolha de amostras. Deve-se registar se as pessoas utilizaram repelente de insectos durante a amostragem.
- 1.4. Saúde e segurança pessoal.** Sempre que necessário, deve ser utilizado equipamento de protecção pessoal, devendo sempre ser seguidos os princípios de segurança para escalada e caminhada em zonas declivosas.

- 1.5. **Bem-estar animal.** Deverá evitar-se o stress desnecessário das aves durante a amostragem (cobrindo a cabeça, evitando ruído desnecessário, evitando manipular aves ou visitar ninhos quando as condições poderão aumentar o stress, reduzir o tempo de manipulação o mais possível). Verifique junto do laboratório qual o tamanho mínimo de cada amostra necessário para análise, garantindo que o tamanho da amostra recolhida é segura para a ave e está de acordo com as condições da licença.
2. **INFORMAÇÃO BÁSICA.** A seguinte informação deve ser claramente descrita no relatório de amostragem, que deverá acompanhar sempre as amostras enviadas para análise: contactos detalhados do observador ou pessoa que recolheu as amostras, data e hora de amostragem, área de estudo, tipo de amostras e número de amostras recolhidas, dados biológicos (espécie, data de anilhagem, idade e sexo, medidas morfométricas, índice de condição corporal, informação do ninho), e outras observações gerais.

3. PROTOCOLO PARA CADA TIPO DE AMOSTRA

3.1. SANGUE

- **Requisitos gerais:** Se possível, antes e depois de realizar uma recolha de sangue deverá ser realizada uma verificação clínica por um veterinário para avaliar o estado de saúde da ave. O peso da colheita de sangue nunca deve exceder 1% do peso corporal do animal. Quando consideradas recolhas de sangue do mesmo indivíduo em várias datas, o peso combinado das amostras deverá atingir no máximo 2% do peso corporal num período de 14 dias. As amostras de sangue podem ser recolhidas com uma agulha hipodérmica e uma seringa. As agulhas e seringas deverão ser mudadas para cada ave. As veias de aves pequenas poderão ser picadas com uma ponta afiada e esterilizada (e.g. bisturi ou agulha hipodérmica), recolhendo o sangue com um tubo capilar. Os sistemas de colheita a vácuo como “Vacutainer” devem ser evitados. Deverá sempre usar-se a agulha mais pequena possível: agulha hipodérmica 30 a 25 gauge e uma seringa de 1 ou 2 ml para aves com peso corporal < 500 g, e agulha hipodérmica 23 gauge e seringa de 5 a 10 ml para aves com peso corporal > 500 g. São necessários anticoagulantes para sangue total/plasma. Deverá aconselhar-se com o laboratório que fará a análise química (no geral, a heparina é o recomendado).
- **Método de amostragem:** (1) estimular a circulação sanguínea local, (2) usar um anti-séptico no local de flebotomia, (3) tirar a amostra de sangue perfurando uma veia (a veia braquial é a mais fácil para recolha de sangue), (4) pressionar o local de perfuração com um algodão esterilizado antes de retirar a agulha da veia e manter a pressão durante alguns minutos até que o sangue não flua da ferida para evitar sangramento e hematomas.
- **Procedimento após a extração do sangue:** a agulha tem de ser removida da seringa antes de passar a amostra de sangue para os tubos etiquetados. As amostras devem ser transportadas entre 4 e 10 °C. Os tubos contendo os anticoagulantes deverão ser devidamente enchidos por forma a assegurar uma razão sangue-anticoagulante adequada. É necessário tubos separadores de soro e as amostras deverão ser centrifugadas assim que possível, idealmente até 6 horas depois da colheita (máximo 12-24 h); quanto mais tempo passar, maior o risco de coagulação e ruptura dos glóbulos vermelhos. O sangue tem de ser centrifugado para separar o plasma/soro dos eritrócitos (10 minutos, 1600-3000 g). A separação do plasma/soro/glóbulos vermelhos só é possível com sangue recentemente recolhido. Todas as fracções separadas devem ser conservadas em tubos separados e etiquetados. Deve usar-se pontas de pipeta diferentes para cada amostra durante a separação do plasma/soro por forma a evitar contaminação cruzada.
- **Armazenamento:** as amostras devem ser armazenadas no frio a -20°/-80°C/liquid N₂ (dependendo do analito ou biomarcador estudado) e no escuro até análise.

3.2. PENAS

- **Amostragem:** o número e tipo de penas que é necessário recolher e a idade das aves de onde são retiradas, depende dos contaminantes investigados, da técnica analítica e dos objectivos do estudo. As penas corporais arrancadas (ou cortadas junto da pele) de juvenis/adultos são as preferenciais. As penas mudadas, encontradas no ninho ou no campo, também podem ser recolhidas. As plumas dos juvenis não são recomendadas para monitorização de contaminantes. Normalmente, é necessário uma amostra de 200-500 mg para compostos orgânicos e 10-200 mg para análise de metais. As penas podem ser transportadas à temperatura ambiente em folha de alumínio e sacos plásticos selados no caso de análise de compostos orgânicos e apenas em sacos plásticos no caso de metais.
- **Armazenamento:** as penas devem ser mantidas à temperatura ambiente se todos os tecidos moles e resíduos de sangue forem removidos e se estiverem secas. As penas podem ser guardadas em folha de alumínio e/ou sacos plásticos selados ou envelopes, no escuro e num local seco (ou usando sílica) se armazenadas à temperatura ambiente. Alternativamente, as penas podem ser congeladas em sacos plásticos selados. A etiqueta não deve ser colocada directamente na pena mas sim no saco plástico, utilizando um código.
- **Caracterização das amostras:** os tipos de penas recolhidos devem ser identificados, indicando, quando aplicável, de que lado da ave foram tirados, e usando o sistema de numeração convencionado para as penas de voo primárias (do interior para a ponta da asa). No caso de penas corporais, a sua localização no corpo deve ser indicada. Deverá registar-se a data de amostragem, estimando também o período da última muda. O comprimento de cada pena (em mm) deve ser medido desde a base das barbas até à ponta utilizando uma craveira. Antes de medir o comprimento da pena, o cálam (isto é, a parte mais proximal da ráquis e que não tem barbas) deve ser removida com uma tesoura em aço inoxidável esterilizada, logo abaixo da primeira inserção das barbas na ráquis, na base da pena. O cálam pode ser armazenado para estudos genéticos (usando o sangue retido na base). Cada pena deverá ser pesada (em mg). Dependendo dos compostos que serão analisados, deverão utilizar-se diferentes técnicas de lavagem antes da análise (ver protocolo alargado).

3.3. OVOS NÃO ECLODIDOS

- **Amostragem:** apenas ovos abandonados ou inférteis deverão ser recolhidos nos ninhos. Deverá usar-se um lápis de grafite para escrever informação na casca dos ovos e nos recipientes. São necessários recipientes adequados para evitar que os ovos se partam. Pedacos da casca de ovos (restos após eclosão ou ovos partidos) encontrados no ninho podem ser recolhidos e guardados em sacos plásticos selados. O conteúdo dos ninhos, incluindo ovos viáveis e inférteis, bem como juvenis, deve ser registado; devendo ainda ser estimada a idade do ovo à data da recolha (tempo passado após postura).
- **Pré-tratamento das amostras e armazenamento:** os ovos não devem ser congelados pois podem rachar. Eles devem ser conservados num local fresco e processados assim que possível. O comprimento e largura dos ovos devem ser medidos, registando também o seu peso. O ovo deve ser aberto no equador e o seu conteúdo esvaziado para frascos. O conteúdo deve ser pesado e homogeneizado e em seguida guardado congelado a -20°C até análise. Um recipiente em vidro com tampa selada a Teflon pode ser utilizado quando se pretende fazer a determinação de poluentes industriais. Os recipientes plásticos podem ser utilizados para contaminantes inorgânicos e determinação de PFAS. Os ovos devem ser examinados para verificar putrefacção, desenvolvimento embrionário e deformidades. Se o embrião estiver presente, deverá ser separado do resto do conteúdo do ovo (antes da homogeneização) e guardado congelado.

As cascas de ovo devem ser lavadas cuidadosamente com água da torneira e secadas a temperatura ambiente até atingir um peso constante (o peso constante da casca de ovo deve ser registado). A espessura da casca de ovo deve ser medida no equador após secagem a temperatura ambiente, usando uma craveira. O índice da casca de ovo e o índice de dissecação devem ser calculados de acordo com as equações fornecidas no protocolo alargado. Os dados de contaminação devem ser corrigidos tendo em consideração a dissecação/perda de humidade.

3.4. ÓRGÃOS E TECIDOS INTERNOS

- **Considerações gerais:** os cadáveres devem ser conservados em sacos plásticos selados para evitar desidratação, e devem ser colocadas etiquetas tanto no interior do saco (escritas com lápis ou marcador resistente à água), como no seu exterior (escritas com marcador resistente à água). Toda a informação sobre o cadáver deve ser registado, incluindo data, localização, circunstâncias em que foi encontrado, contactos de quem fez a recolha, espécie, idade, sexo, peso corporal, medidas, estado de decomposição.
- **Necrópsia:** as necrópsias devem ser feitas em cadáveres recentes sempre que possível, ou os cadáveres devem ser guardados congelados (-20°) até à necrópsia. Se o cadáver estiver congelado, deverá ser descongelado de um dia para o outro. O exame externo do cadáver é necessário para encontrar possíveis sinais de trauma ou evidência de sintomas clínicos prévios à morte. A condição corporal deve ser estimada (ver protocolo alargado). Durante a necrópsia, deve registar-se o peso dos órgãos, lesões/alterações, sexo e estado de desenvolvimento das gónadas. Deve seguir-se um protocolo de necrópsia padrão (ver protocolo alargado).
- **Amostragem:** obtenha aconselhamento do laboratório que fará a análise química relativamente à selecção dos tecidos para análise. Deve utilizar-se material de dissecação adequado, que deverá ser limpo entre amostragem de órgãos e entre indivíduos. A amostragem de fígado, rim e outros órgãos internos deve, se possível, ser do órgão completo. Para amostrar tecido muscular deve preferir-se o músculo peitoral. Quando se pretende analisar gordura, deve preferir-se gordura abdominal relativamente à gordura subcutânea. Se os tecidos a amostrar estão dispersos ao longo do corpo, tal como gordura abdominal ou osso, é recomendado que as amostras destes tecidos sejam recolhidas consistentemente da mesma parte do corpo em indivíduos diferentes (ou se a amostra é de osso deve ser a mesma localização no esqueleto).
- **Armazenamento:** os órgãos devem ser guardados separadamente, em recipientes/sacos plásticos claramente identificados. Deve evitar-se o uso de recipientes cujo material possa interferir com ou afectar a análise de contaminantes. Pode utilizar-se folha de alumínio (lavada com água e metanol) para embrulhar amostras se houver incerteza sobre a adequabilidade de recipientes de plástico para a análise de compostos perfluorinados. Não se deve utilizar folha de alumínio para análise de metais. Os órgãos devem ser armazenados a -20 °C ou -80 °C. Se tiver dúvidas sobre algum aspecto de armazenamento procure aconselhamento do laboratório de análise.
- **Outras considerações:** o lixo e os cadáveres devem ser descartados de acordo com as normas nacionais sobre lixo biológico. Sempre que possível, órgãos importantes, penas e ossos devem ser armazenados num arquivo de longo-prazo.

3.5. OUTRAS AMOSTRAS

- Dejectos recentes podem ser obtidos induzindo os indivíduos a defecar aquando da sua manipulação. Os dejectos antigos junto dos ninhos têm elevada probabilidade de contaminação externa não sendo por isso recomendados para análise de contaminantes. Na amostragem de óleo da glândula uropigiana em cadáveres, toda a glândula uropigiana pode ser removida. Em aves vivas, a glândula uropigiana deve ser pressionada suavemente e o óleo expelido deve ser recolhido para um tubo esterilizado. As regurgitações recentes podem ser recolhidas em ninhos, dormitórios ou debaixo de poisos. As amostras devem ser guardadas em tubos esterilizados e etiquetados (dejectos/óleo) ou sacos plásticos (dejectos/glândula uropigiana/regurgitações), com informação semelhante à recomendada para os cadáveres (ver secção 3.4). Confirme com o laboratório de análise qual a quantidade necessária e as condições aceitáveis para transporte/armazenamento. Normalmente, o transporte deve ser feito a temperatura fresca e o armazenamento a -20° até análise química. Nalguns casos, o armazenamento a outras temperaturas (desde temperatura ambiente até -80°C, dependendo da análise) pode ser mais apropriada.

Agradecimentos. Os autores agradecem o apoio financeiro da European Science Foundation (ESF) através do programa de investigação em rede EURAPMON (Research Networking Programme). Agradecemos também ao Lee Walker pelos valiosos comentários ao protocolo alargado, e ao Mark Wilson, Amy Challis e Chris Wernham pelos comentários a este resumo.

Para informação detalhada, figuras e referências, consulte o protocolo alargado disponível no sítio web do EURAPMON (<http://www.eurapmon.net/>).

Abril 2015