

## RESUMEN: PROTOCOLO DE MUESTREO Y MONITORIZACIÓN DE CONTAMINANTES EN RAPACES.

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).

## INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO

Con el nombre de “Investigación y Monitorización *de y con* Rapaces en Europa” (EURAPMON) se denomina una de las redes de la Fundación Europea para la Ciencia (European Science Foundation, ESF) dentro del Programa de Redes de Investigación (Research Networking Programme) (<http://www.eurapmon.net>). Uno de los objetivos de EURAPMON es difundir las mejores prácticas y el desarrollo de capacidades en Europa hacia una monitorización armonizada con rapaces. Desde el 31 de Mayo al 2 de Junio de 2013, representantes de seis países se reunieron en Murcia, España, para asistir al Workshop sobre “Establecimiento de las mejores prácticas en actividades de monitorización de contaminantes en Europa” (Setting best practices on raptor contaminant monitoring activities in Europe), financiado por la red EURAPMON. El workshop concluyó con la elaboración de un borrador de protocolo que fue posteriormente completado con la participación de más expertos en monitorización de contaminantes en rapaces. El objetivo de este protocolo de muestreo es proveer una guía sobre las mejores prácticas que facilitarán la armonización de los procedimientos entre todos los programas de monitorización, existentes y emergentes; y así maximizar la fiabilidad, comparabilidad e interoperabilidad de los datos. Este protocolo aborda el muestreo de sangre y plumas de aves vivas, huevos no viables y abandonados, órganos y tejidos internos de especímenes muertos, así como otras muestras tales como heces, aceite de acicalamiento del plumaje (procedente de la glándula uropígea) y egagrópilas. El presente documento es un resumen de este protocolo *in extenso* disponible on-line en inglés en la página web de EURAPMON (<http://www.eurapmon.net>).

### 1. NORMAS GENERALES

- 1.1. **Permisos.** Todos los permisos y licencias necesarios deben obtenerse según lo dispuesto en las agencias nacionales y regionales antes de que el trabajo vaya a llevarse a cabo. Las muestras deben ser recolectadas por personal debidamente entrenado y autorizado.
- 1.2. **Identificación.** Los recipientes contenedores de las muestras individuales deben estar etiquetados correctamente, antes o inmediatamente después de que la muestra sea obtenida, mediante un código inequívoco.
- 1.3. **Evitar la contaminación.** Para el muestreo y almacenamiento de las muestras ha de usarse material apropiado. Todo el material ha de ser lavado antes del muestreo (es conveniente seguir los consejos del laboratorio que realizará los análisis químicos). Asegurarse de que el personal que va a llevar a cabo el muestreo no fuma, bebe o come durante el mismo. Es preciso anotar la utilización de algún repelente de insectos por parte del personal de muestreo.

- 1.4. Salud y seguridad del personal.** El personal que participe en el muestreo y manejo de las muestras deberá usar equipo de protección personal adecuado, así como aplicar los requerimientos en seguridad personal durante la escalada y el trabajo en campo.
- 1.5. Bienestar animal.** Habrá de evitarse el estrés innecesario a las aves durante el muestreo (por ejemplo, cubrir la cabeza del ave, evitar ruidos innecesarios, evitar manipulaciones del ave innecesarias, o visitar los nidos en situaciones de posible incremento del estrés, y siempre acortar el tiempo de manejo del ave tanto como sea posible). Obtener del laboratorio información sobre la cantidad o tamaño mínimo de muestra para los análisis previstos, pero asegurarse al mismo tiempo de que el tamaño de muestra a tomar es seguro para el ave y está en consonancia con las condiciones de autorización o licencia.
- 2. DATOS BÁSICOS.** La siguiente información debe estar claramente descrita en el informe de muestreo, el cual debe acompañar siempre a las muestras enviadas para el análisis: Detalles de contacto del observador o el muestreador, día y hora del muestreo, área de estudio, naturaleza de las muestras y número de muestras recogidas, datos biológicos del individuo muestreado (especie, datos de anillamiento, edad, sexo, medidas morfométricas, índice de condición corporal, información del nido), y cualquier otra observación general de interés.

### 3. PROTOCOLO SEGÚN LA NATURALEZA DE LA MUESTRA

#### 3.1. SANGRE

- **Requerimientos generales:** Si es posible, antes y tras el muestreo de la sangre, el ave debe ser sometida a exploración clínica por un veterinario con el fin de evaluar su estado de salud. El volumen máximo de muestra de sangre a recoger no debe exceder el 1% del peso corporal del animal en cada toma de muestras. En caso de tomas repetidas de un mismo animal en diferentes fechas, el peso máximo de muestra tomada en dichas fechas no debe exceder el 2% del peso corporal por cada período de 14 días. Las muestras de sangre pueden ser tomadas usando aguja y jeringa hipodérmica. Es necesario cambiar de aguja y jeringuilla entre aves. Las venas de aves muy pequeñas pueden ser pinchadas con una punta afilada y estéril (p.e. escalpelo o aguja hipodérmica) recogiendo la sangre con un tubo capilar. Los sistemas de vacío, tales como “vacutainers”, deberían evitarse. Se deben usar agujas lo más pequeñas posibles: a) Para aves de menos de 500 g de peso corporal se utilizarán agujas hipodérmicas de 30 a 25-gauge y jeringas de 1 ó 2 ml; b) para aves de más de 500 g de peso corporal, se utilizarán agujas hipodérmicas de 23-gauge y jeringas de 5 ó 10 ml. Para la toma de sangre entera y plasma es necesario el uso de anticoagulantes, siendo recomendable tener en cuenta los consejos del laboratorio que llevará a cabo los análisis químicos (en general, se recomienda la heparina).
- **Método de muestreo:** (1) Estimular la circulación sanguínea local, (2) usar algún antiséptico en el lugar de la flebotomía, (3) tomar las muestras de sangre mediante punción en vena (la vena braquial es la más fácil para la obtención de la sangre), (4) presionar el lugar de punción con un apósito estéril antes de retirar la aguja de la vena, y mantener la presión durante algunos minutos hasta que no fluya sangre desde el lugar de punción, con el fin de evitar hemorragias y hematomas.
- **Procedimiento tras la extracción de la sangre:** La aguja tiene que ser retirada de la jeringa antes de trasvasar la muestra a los tubos etiquetados. Las muestras deberían ser transportadas a temperaturas entre 4 y 10 °C. Los tubos que contienen anticoagulantes deberían ser llenados con sangre con el fin de mantener un adecuado ratio final sangre/anticoagulante en el tubo. Los tubos separadores de suero son necesarios para la obtención de éste, y las muestras deberían ser centrifugadas tan pronto como fuera posible tras el muestreo; idealmente dentro de las 6 horas (máximo 12-24 horas) tras la recogida. Cuanto mayor tiempo pase entre toma y obtención del suero, mayor riesgo de coagulación y rotura de glóbulos rojos habrá. La sangre tiene que centrifugarse para separar plasma y suero de los eritrocitos (10 minutos, 1600-3000 g). La separación de plasma/suero/glóbulos rojos es posible solo sobre sangre fresca. Todas las fracciones separadas deberían conservarse en diferentes tubos etiquetados al efecto. Igualmente, con el fin de evitar contaminaciones cruzadas, deben usarse diferentes puntas de pipeta para cada muestra durante el proceso de separación del plasma y el suero.

- **Almacenamiento:** Las muestras deberían ser almacenadas en congelación a  $-20^{\circ}/-80^{\circ}\text{C}/\text{N}_2$  líquido (dependiendo del analito o del biomarcador estudiado) y en oscuridad hasta su análisis.

### 3.2. PLUMAS

- **Muestreo:** El número y tipo de plumas que se necesita muestrear, y la edad de las aves de las que se deben tomar dichas muestras, depende de factores tales como los contaminantes sujetos a investigación, la técnica analítica y los objetivos del estudio. Es preferible el arranque (o el corte a ras de piel) de las plumas coberteras corporales de pollos/adultos. Las plumas mudadas encontradas en el nido o campo son también objeto de recolección. El plumón no se recomienda para monitorización de contaminantes. Normalmente, para compuestos orgánicos se requieren 200-500 mg de pluma, mientras que para análisis de metales bastan 10-200 mg de muestra. Las plumas se pueden transportar a temperatura ambiental en papel de aluminio y bolsas de plástico de cierre hermético (p.e., tipo ziplock) para el análisis de contaminantes orgánicos, y solo en bolsas de plástico para el análisis de metales.
- **Almacenamiento:** Las plumas pueden ser guardadas a temperatura ambiente si se elimina cualquier tejido blando o residuo de sangre y si son almacenadas en ambiente seco. Las plumas se pueden almacenar en hojas de aluminio y/o bolsas o embalajes de plástico de cierre hermético, en oscuridad y en ambiente seco (o mediante uso de sílica) si son almacenadas a temperatura ambiente. Alternativamente, las plumas pueden ser congeladas en bolsas de plástico de cierre hermético. La etiqueta no debe ponerse directamente sobre la pluma, pero sí es preciso etiquetar las bolsas con un código inequívoco.
- **Caracterización de muestras:** Los tipos de pluma tomadas deben ser identificados, indicando cuando sea aplicable cuál fue el lado del ave de donde fueron tomadas las muestras de plumas, y usando el sistema de numeración convencional para plumas de vuelo primarias (desde el interior hacia el exterior hasta la punta del ala). En el caso de plumas coberteras, debería indicarse la localización en el cuerpo. Debe registrarse la fecha de muestreo y la estimación de la fecha de la última muda. Debe medirse con un calibre la longitud de cada pluma (en mm), midiendo desde la base de las barbas hasta la punta. Antes de tomar las medidas de longitud de las plumas, el cálamo o cañón (es decir, la parte más proximal del raquis que carece de barbas) debe ser quitado con unas tijeras esterilizadas de acero inoxidable, justo en el punto donde las primeras barbas se unen a la base de la pluma. El cálamo puede ser almacenado para estudios genéticos (usando la sangre presente en el cañón). Cada pluma debería ser pesada (en mg). Dependiendo del/de los compuesto/s que vayan a ser analizados, deberían emplearse previamente al análisis, diferentes técnicas de lavado (ver el protocolo *in extenso*).

### 3.3. HUEVOS NO ECLOSIONADOS

- **Muestreo:** Solo los huevos abandonados o no eclosionados pueden ser recolectados de los nidos. Para escribir la información en la cáscara y el contenedor de la misma puede usarse un lápiz. Son necesarios los contenedores específicos (suelen ser de cartón) para el transporte de huevos con el fin de evitar su rotura. Los trozos de cáscara (tras la eclosión o la rotura de los huevos) que se encuentran en los nidos pueden ser también recolectados y guardados en bolsas de plástico de cierre hermético. Los contenidos del nido, incluyendo huevos viables y no viables, así como pollos, deben ser registrados; siendo importante registrar la edad estimada que tendría el huevo (tiempo transcurrido desde la puesta) cuando es recogido.
- **Pre-tratamiento de las muestras y almacenamiento:** Los huevos no deberían congelarse porque podrían romperse. Deberían ser guardados en refrigeración y procesados lo más rápidamente posible. Deben tomarse medidas de la longitud y anchura del huevo, así como registrar su peso. El huevo debe ser abierto en el ecuador y su contenido debería vaciarse en frascos bocales debidamente etiquetados. El contenido debe pesarse y homogenizarse y guardarse en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. En el caso de tener previsto determinar contaminantes industriales, debería usarse un contenedor de vidrio con tapa hermética de teflón. Los contenedores de plástico pueden usarse cuando se prevé la determinación de contaminantes inorgánicos y PFAS. Los huevos deben ser examinados anotando datos de putrefacción, desarrollo embrionario y deformidades. Si hay embrión, debe ser separado del resto del contenido del huevo (antes de la homogenización) y deber guardarse congelado.

La cáscara de huevo debe ser enjuagada cuidadosamente con agua del grifo y secada a temperatura ambiente hasta que alcance un peso constante, anotándose este peso final. El grosor de la cáscara debe medirse en el ecuador del huevo, usando un calibre, tras haberse secado a temperatura ambiente. El índice de cáscara y el índice de desecación deben calcularse según las ecuaciones provistas en el protocolo *in extenso*. Los datos de contaminantes deben ser corregidos teniendo en cuenta las pérdidas originadas por la desecación y condensación.

### 3.4. ÓRGANOS Y TEJIDOS INTERNOS

- **Consideraciones generales:** Las carcasas o cadáveres deben conservarse en bolsas de plástico de cierre hermético para evitar la desecación, siendo identificados con etiquetas ubicadas tanto en el interior de la bolsa (escritas con lápiz o rotulador indeleble), como en el exterior de la bolsa (escrito con un rotulador indeleble). Toda la información sobre el cadáver debe ser registrada, incluyendo fecha, localización, circunstancias en las que fue encontrado, información de contacto de la persona que lo halló, especie del individuo muestreado, edad, sexo, medidas y peso corporal, estado de descomposición del cadáver.
- **Necropsia:** Las necropsias deben llevarse a cabo, siempre que sea posible, sobre cadáveres frescos, o sobre cadáveres previamente congelados (-20°) hasta el momento de su necropsia. Si el cadáver es congelado, debería ser descongelado a lo largo de la noche. Es necesario un examen externo del cadáver para encontrar posibles signos de traumatismos o evidencias de la existencia de síntomas clínicos previos a la muerte. La condición corporal debería ser estimada (ver protocolo *in extenso*). Durante la necropsia, deben registrarse datos sobre el peso de los órganos, lesiones/alteraciones, sexo y estado de las gónadas (estado de desarrollo). Debería seguirse un protocolo de necropsia normalizado (ver protocolo *in extenso*).
- **Muestreo:** A la hora de la selección de tejidos, se deben tener en cuenta los consejos del laboratorio donde se vayan a llevar a cabo los análisis químicos. Debe usarse material adecuado y debe ser limpiado entre el muestreo de cada órgano y entre individuos necropsiados. El muestreo del hígado, riñón y otros órganos internos se debería realizar sobre los órganos completos, siempre que sea posible. En el caso de muestreo de tejido muscular, el músculo pectoral es el preferido. Si está previsto el análisis de grasa o tejido adiposo, la grasa abdominal es preferible a la subcutánea. Si los tejidos a muestrear están dispersos o distribuidos por todo el cuerpo, tales como grasa abdominal o huesos, es recomendable que los tejidos de diversos individuos sean tomados de la misma parte del cuerpo (o, si se trata de muestreo de huesos, de la misma localización esquelética).
- **Almacenamiento:** Los órganos deben guardarse por separado, en contenedores/bolsas de plástico que deben ser claramente etiquetados. Debe evitarse el uso de contenedores cuyos materiales puedan interferir con o afectar a los análisis de los contaminantes. Se puede usar papel de aluminio (lavado con agua y metanol) para envolver muestras, si hay incertidumbre sobre la idoneidad de los contenedores de plástico, o cuando se trata de análisis de compuestos perfluorados. El papel de aluminio no debe usarse en caso de análisis de metales traza. Los órganos deberían almacenarse a -20 °C o -80 °C. Si existen incertidumbres sobre cualquier aspecto comentado, debería seguirse el consejo del laboratorio que fuera a llevar a cabo los análisis.
- **Otras consideraciones:** La eliminación de los desechos y restos cadavéricos debe hacerse de acuerdo a las leyes y normativas nacionales y regionales relativas a los desechos biológicos. Cuando sea posible, los órganos clave, plumas y huesos deberían ser archivados durante un largo período de tiempo.

### 3.5. OTRAS MUESTRAS

- También pueden ser muestreadas heces frescas, induciendo a los individuos a defecar durante su manejo. La potencial contaminación de heces antiguas que caen de los nidos es elevada por lo que no es recomendable su uso para el análisis de contaminantes. Para el muestreo de aceite de acicalamiento de cadáveres debería tomarse la glándula uropígea completa. En aves vivas, la glándula uropígea puede presionarse suavemente y se puede recoger el aceite expelido en un tubo estéril. Las egagrópilas frescas pueden recogerse en los nidos, posaderos o dormideros. Las muestras deben ser recogidas y claramente etiquetadas en tubos estériles (heces/aceite de acicalamiento) o bolsas de plástico (heces/glándula

uropígea/egagrópilas), acompañándose con información equivalente a la recomendada para cadáveres (ver sección 3.4). Contactar con el laboratorio que vaya a realizar los análisis para determinar la cantidad requerida y las condiciones aceptables de transporte y almacenaje. Normalmente, el transporte debe hacerse en condiciones de refrigeración, almacenándose las muestras a -20° C hasta el análisis químico. En algunos casos, podría ser más apropiado el almacenaje a una temperatura alternativa (desde temperatura ambiente hasta -80°C, dependiendo de los análisis).

**Agradecimientos.** Los autores agradecen el soporte financiero provisto por la European Science Foundation (ESF) a través del EURAPMON Research Networking Programme. Agradecen también a Lee Walker sus valiosos comentarios sobre el protocolo *in extenso*; y a Mark Wilson, Amy Challis y Chris Wernham por sus comentarios críticos a este resumen.

*Para mayor detalle de la información, figuras y referencias, ver el protocolo in extenso disponible online en inglés en la página web de EURAPMON (<http://www.eurapmon.net/>).*

Abril 2015