

## PODSUMOWANIE: PROTOKÓŁ POBIERANIA PRÓB I MONITORING ZANIECZYSZCZEŃ U PTAKÓW DRAPIEŻNYCH

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)

### WPROWADZENIE I CEL

EURAPMON (Research and Monitoring for and with Raptors in Europe) to projekt, który ma na celu badania i monitoring ptaków drapieżnych w Europie i jest częścią programu European Science Foundation (ESF) Research Networking Programme (<http://www.eurapmon.net>). Jednym z celów EURAPMON jest rozpowszechnianie najlepszych praktyk i stwarzanie możliwości zharmonizowanego monitoringu ptaków drapieżnych w Europie. W terminie 31 maj - 2 czerwiec 2013 roku, w Murcii (Hiszpania) spotkali się przedstawiciele sześciu krajów w ramach warsztatów "Ustanawianie najlepszych praktyk w zakresie działań monitorujących zanieczyszczenia u ptaków drapieżnych w Europie", finansowanego przez EURAPMON. W czasie warsztatów opracowany został projekt protokołu, który następnie był sukcesywnie uzupełniany i ukończony z udziałem ekspertów specjalizujących się w monitorowaniu wykrywania zanieczyszczeń u drapieżników. Celem utworzonej procedury pobierania próbek jest dostarczenie wytycznych dotyczących najlepszych praktyk, które umożliwią harmonizację procedur między istniejącymi i powstającymi programami, a więc pozwolą zmaksymalizować wiarygodność, porównywalność i interoperacyjności danych. Protokół obejmuje pobieranie próbek krwi i piór od żywych ptaków oraz ze zbuków i porzuconych jaja, z narządów wewnętrznych i tkanek od okazów martwych, a także prób nieinwazyjnych, takich jak próbki z odchodów, z wydzieliny gruczołów kuprowych oraz z wypluwek. Niniejszy dokument jest streszczeniem Protokołu rozszerzonego, który jest ogólnie dostępny na stronie internetowej EURAPMON (<http://www.eurapmon.net>).

### 1. ZALECENIA OGÓLNE

- 1.1. Pozwolenie.** Wszystkie niezbędne pozwolenia i licencje muszą być uzyskane z odpowiednich instytucji krajowych zanim praca zostanie podjęta. Próbkę powinny być zbierane przez odpowiednio przeszkolony i autoryzowany personel.
- 1.2. Identyfikacja.** Poszczególne zebrane próbki powinny być oznakowane indywidualnym (unikalnym) kodem, przed lub bezpośrednio po zebraniu próbek.
- 1.3. Unikanie kontaminacji** (zanieczyszczeń innymi substancjami). Należy stosować odpowiedni sprzęt do pobierania i przechowywania materiału. Przed pobraniem sprzęt do pobierania musi być odpowiednio przygotowany i oczyszczony (należy zasięgnąć porady laboratorium, w którym zostaną przeprowadzone analizy chemiczne). Należy zadbać żeby personel pobierający próby nie palił ani nie spożywał pokarmów i napojów w czasie zbierania próbek. Należy zwrócić uwagę czy repelenty przeciwko owadom były używane przez personel.
- 1.4. Zdrowie i bezpieczeństwo obsługi.** W czasie pobierania próbek należy stosować odpowiednie środki ochrony osobistej. W sytuacjach tego wymagających należy zachowywać wymogi bezpieczeństwa, w tym w czasie wspinaczki i wędrówki.

**1.5. Dobrostan zwierząt.** Należy unikać niepotrzebnego stresowania ptaków w czasie pobierania prób (przykryć głowę, unikać niepotrzebnego hałasu, unikać przetrzymywania ptaków w ręku lub kontrolowania gniazd w warunkach, które mogą zwiększyć poziom stresu, przetrzymywać w ręku w jak najkrótszym, niezbędnym do pobrania prób czasie). Należy skontaktować się z laboratorium celem ustalenia minimalnej wielkości próby, koniecznej do przeprowadzenia zamierzonych analiz. Należy przestrzegać zasad pobierania prób, tj. pobierać wielkość próby bezpieczną dla ptaka oraz zgodną z wydaną licencją.

**2. DANE PODSTAWOWE.** Poniższe informacje powinny być jasno opisane w sprawozdaniu dotyczącym pobranych próbek i muszą być dołączone do wysyłanych do analizy prób: dane kontaktowe obserwatora lub osoby pobierającej materiał, data i czas zebrania próbek, obszar badań, rodzaj i liczba zebranych prób, dane biologiczne prób (gatunek, dane obrączkowania, wiek i płeć, pomiary morfometryczne, wartość indeksu kondycji, informacja o gnieździe i/lub lęgu) oraz inne ogólne informacje.

### 3. PROTOKÓŁ DLA WSZYSTKICH RODZAJÓW ZBIERANYCH PRÓB

#### 3.1. KREW

**Wymagania ogólne:** Jeśli to możliwe, przed i po pobraniu krwi, wszelkie badania kliniczne powinny być wykonywane przez lekarza weterynarii celem oceny stanu zdrowia zwierzęcia. Jednorazowa masa zebranych prób nie powinna przekroczyć 1% masy ciała zwierzęcia. W przypadku wielokrotnego pobierania prób krwi od tego samego osobnika można pobrać maksymalnie próby o masie łącznej nie przekraczającej 2% masy ciała ptaka, w 14-dniowych odstępach czasu. Pobieranie krwi poprzez iniekcję podskórną wykonuje się z wykorzystaniem sterylnych igieł i strzykawek (igły i strzykawki należy zmieniać, dla każdego osobnika stosować sterylny zestaw). Dopuszczalne jest delikatne nakłuwanie (z użyciem sterylnej igły lub skalpela) żył bardzo małych ptaków, a następnie zebranie kropli krwi do szklanej kapilary. Do pobierania prób krwi należy unikać zamkniętych systemów próżniowych typu Vacutainer. Należy posługiwać się jak najmniejszym rozmiarem igły: dla ptaków o masie < 500 g – rozmiar od 30 G do 25 G ze strzykawką o pojemności 1 lub 2 ml, dla ptaków o masie > 500 g – rozmiar 23 G ze strzykawką 5 lub 10 ml. W przypadku pobierania pełnej krwi należy zastosować antykoagulanty. Konieczne informacje na ten temat można uzyskać z laboratorium, w którym mają zostać przeprowadzone analizy chemiczne (zwykle rekomendowana jest heparyna).

- **Sposób pobierania prób:** Należy (1) pobudzić lokalną cyrkulację krwi, (2) użyć substancji antyseptycznych przed pobraniem próby, (3) nakłuć żyłę celem pobrania próby (żyła ramienna zwykle jest miejscem z którego w najprostszy sposób można uzyskać próbkę krwi), (4) przed usunięciem igły z żyły ucisnąć miejsce nakłucia posługując się sterylnym wacikiem. Uciskanie należy kontynuować przez kilka minut do czasu aż krew nie będzie wypływać z rany ażeby uniknąć wykrwawienia lub powstania krwiaka.
- **Procedura postępowania po pobraniu krwi:** igłę należy usunąć ze strzykawki, a następnie jej zawartość umieścić w oznakowanej probówce. Próbki powinny być transportowane w temperaturze od 4 do 10 °C. W probówkach zawierających antykoagulant należy umieścić zalecaną objętość krwi ażeby zapewnić właściwy stosunek próby do antykoagulantu. Specjalne probówki do analizy surowicy (SST, serum separator tube) są konieczne do analiz surowicy i należy je odwirować najszybciej jak to możliwe. Zaleca się czas nie dłuższy niż 6 h po pobraniu (maksymalnie 12-24 h). Dłuższy czas pozostawienia prób bez zwirowania skutkuje powstawaniem skrzepów oraz pękaniem czerwonych krwinek. Odwirowanie krwi ma na celu rozdzielenie osocza/surowicy od erytrocytów (wirowanie 10 minut, 1 600 – 3 000 x g). Rozdział poszczególnych składników krwi, tj. osocza, surowicy, czerwonych krwinek jest możliwy jedynie w przypadku krwi świeżej. Wszystkie frakcje krwi należy umieścić w oddzielnych, opisanych probówkach. Ażeby uniknąć kontaminacji pomiędzy poszczególnymi próbami konieczna jest każdorazowa wymiana, sterylnych końcówek do pipet.
- **Przechowywanie:** próby należy przechowywać w stanie zamrożonym, w temperaturze -20°/-80°C/ciekły N<sub>2</sub> (w zależności od składnika próbki, który podlegać będzie oznaczeniu lub w zależności od analizowanego biomarkera).

### 3.2. PIÓRA

- **Pobieranie materiału:** Liczba i typ piór, oraz wiek ptaka od którego należy pobrać pióra uzależnione są od analizowanego czynnika zanieczyszczającego/ skażającego, stosowanej techniki analitycznej przy oznaczeniu kontaminanta oraz celu prowadzonych badań. Preferowane są wyskubane (lub wycięte ze skóry) pióra konturowe (okrywowe). Pióra, które wypadły w gnieździe lub w terenie, w wyniku naturalnego procesu pierzenia również mogą być zebrane. Pióra puchowe nie są rekomendowane do analiz zawartości czynników zanieczyszczających. Zwykle konieczne jest 200-500 mg materiału do oceny zanieczyszczeń organicznych oraz 10-200 mg przy analizie zanieczyszczeń metalami. Pióra mogą być transportowane w temperaturze pokojowej. Do analiz zanieczyszczeń pochodzenia organicznego pióra należy zabezpieczyć folią aluminiową oraz umieścić w woreczku strunowym, natomiast do analiz zanieczyszczeń metalami wystarczy umieścić pióro w plastikowym worku strunowym.
- **Przechowywanie:** Pióra mogą być przetrzymywane w temperaturze pokojowej o ile usunięte zostały wszelkie tkanki miękkie i krew oraz gdy są suche. Pióra mogą być przechowywane w ciemności, w suchym miejscu (można użyć środków pochłaniających wilgoć), zawinięte w folię aluminiową oraz/lub umieszczone w strunowych woreczkach plastikowych. Oznakowanie prób powinno polegać na nadaniu odpowiedniego numeru woreczkom, w których będą przechowywane pióra. Numerów nie należy nanosić bezpośrednio na pióro.
- **Charakterystyka prób:** typ(y) zebranych piór powinny być zidentyfikowane poprzez określenie z której części ciała ptaka pochodzą. W przypadku identyfikacji lotek należy bazować na konwencjonalnym systemie ich numeracji, tj. licząc od wewnętrznej do zewnętrznej strony skrzydła. Pióra konturowe należy przypisać do określonej części ciała. Należy zanotować datę zebrania prób oraz powinno się oszacować czas ostatniego pierzenia ptaka. Długość każdego pióra (w mm) należy zmierzyć z użyciem suwmiarki, od podstawy chorągiewki do jej końca. Przed wykonaniem pomiaru długości pióra, dudka (tzn. bliższa część stosiny bez chorągiewki) powinna być usunięta, poprzez przycięcie jej w miejscu gdzie wyrastają pierwsze promienie chorągiewki, z wykorzystaniem sterylnych nożyczek ze stali nierdzewnej. Tak spreparowana dudka zawiera komórki krwi, może być przechowywana i wykorzystana do analiz genetycznych. Każde pióro powinno być zważone (w mg). W zależności od związku(ów) które będą analizowane stosuje się różne techniki przemywania/wymywania w trakcie analizy (patrz Protokół rozszerzony).

### 3.3. NIEWYKLUTE JAJA

- **Pobieranie prób:** tylko porzucone jaja lub zbuki powinny zabrane z gniazda. Do zapisu informacji na jajku oraz pojemniku w którym jajo zostanie umieszczone należy wykorzystać ołówek. Do transportu jaj potrzebne są pojemniki zapobiegające rozbiciu jaja. Fragmenty skorupki (pozostałości po wyklutych lub rozbitych jajach) znalezione w gnieździe mogą być zbierane i przechowywane w zamkniętych plastikowych woreczkach. Zawartość gniazda, w tym żywe jaja i zbuki, oraz obecność piskląt, powinna być zanotowana; również należy oszacować wiek jaj (tj. czas, który upłynął od ich złożenia) w czasie ich kolekcji.
- **Wstępna obróbka próbek i przechowywanie:** jaja nie powinny być zamrażane, ponieważ mogą one pękać. Powinny być przechowywane w chłodzie i poddane analizom tak szybko, jak to możliwe. Należy zmierzyć długość i szerokość jaja oraz zanotować jego masę. Jajo powinno być otwarte na „równiku” jaja a jego zawartość należy opróżnić do kolby. Zawartość jaja należy zważyć, zhomogenizować i zamrozić w -20 ° C do czasu analizy. Mogą być stosowane szklane pojemniki z teflonowym, szczelnym zamknięciem jeżeli rozważane jest określenie zanieczyszczeń przemysłowych. Pojemniki z tworzywa sztucznego mogą być wykorzystywane do oznaczania zanieczyszczeń nieorganicznych i PFAS. Jaja powinny być ocenione pod kątem procesów gnilnych, rozwoju zarodka i deformacji. Jeśli zarodek jest obecny w jajku, powinien być on oddzielony od reszty zawartości jaj (przed homogenizacją) i przechowywany w stanie zamrożonym.

Skorupki jaj należy starannie płukać bieżącą wodą i wysuszyć w temperaturze pokojowej do uzyskania stałej masy (stałą wagę skorupki należy zanotować). Grubość skorupy powinna być zmierzona na

„równiku” jaja, należy to wykonać po wysuszeniu w temperaturze pokojowej przy użyciu suwmiarki. Indeks skorupy jaja i wskaźnik wysuszenia powinny być obliczone zgodnie z równaniami podanymi w Protokole rozszerzonym. Uzyskane wartości zanieczyszczeń powinny być skorygowane o wysuszenie skorupy/uratę wody.

### 3.4. ORGANY WEWNĘTRZNE I TKANKI

- **Uwagi ogólne:** Martwe ptaki powinny być zabezpieczone w zamkniętych workach plastikowych, aby uniknąć wysychania. Należy umieścić na workach etykiety, zarówno wewnątrz (opis wykonać ołówkiem lub markerem wodoodpornym) oraz na samym worku (wodoodporny marker). Wszystkie informacje dotyczące martwego ptaka powinny być zanotowane, w tym data, miejsce, okoliczności śmierci/znalezienia, gatunek, wiek, płeć, masa ciała, pomiary biometryczne, informacje na temat stopnia rozkładu oraz dane kontaktowe znalazcy.
- **Sekcja zwłok:** Jeśli jest to możliwe sekcja powinna być wykonana na świeżo padłych ptakach lub też padłego ptaka należy zamrozić (-20°C) aż do sekcji. Przed wykonaniem sekcji zamrożone osobniki należy rozmrozić przez noc. Obdukcja martwego ptaka jest konieczna ażeby stwierdzić ewentualne oznaki urazów lub objawy kliniczne, które poprzedzały śmierć. Należy określić kondycję ptaka (patrz Protokół rozszerzony). Podczas sekcji zwłok określa się masę narządów, uszkodzenia ciała/ wszelkie zmiany, płeć i stadium rozwojowe gonad. Należy przestrzegać znormalizowanego protokołu sekcji zwłok (patrz Protokół rozszerzony).
- **Pobieranie prób:** W sprawie wyboru tkanek do analizy należy zasięgnąć porady laboratorium które będzie przeprowadzać analizą chemiczną. Należy używać odpowiedniego sprzętu do wykonania sekcji, sprzęt ten musi być też czyszczony pomiędzy pobieraniem próbek z różnych narządów oraz pomiędzy poszczególnymi osobnikami. W miarę możliwości należy pobierać całe organy od martwych ptaków, w tym m.in. wątrobę i nerki. Podczas pobierania tkanki mięśniowej, preferowanym mięśniem powinien być mięsień piersiowy. Jeśli planuje się wykorzystanie do analiz tkanki tłuszczowej, lepiej jest pobrać tłuszcz z jamy brzusznej niż z podskórnej tkanki tłuszczowej. Jeśli materiał do analiz pobierany jest od wielu osobników i z wielu tkanek, np. z tkanki tłuszczowej lub kości, zaleca się aby próbki pobierane były z tych samych części ciała u wszystkich osobników (lub jeśli są to próbki pobierane z kości – pobierać z tego samego miejsca szkieletu).
- **Przechowywanie:** Narządy powinny być przechowywane w oddzielnych, oznakowanych pojemnikach / workach foliowych. Należy unikać wykorzystywania pojemników, wykonanych z materiałów, które mogą zakłócać lub wpłynąć na wynik analizy zanieczyszczeń. W przypadku analizy związków perfluorowanych do owijania próbek może być stosowana folia aluminiowa (przemyta wodą i metanolem) jeśli są wątpliwości co do przydatności pojemników plastikowych. Folia aluminiowa nie powinna być stosowana w przypadku planowania analiz metali śladowych. Organy powinny być przechowywane w temperaturze -20°C lub -80°C. W przypadku wątpliwości dotyczących wszelkich aspektów przechowywania należy skonsultować się z laboratorium, w którym będą prowadzone analizy.
- **Inne uwagi:** utylizacja odpadów po sekcji oraz martwych ptaków powinna być wykonana zgodnie z krajowymi przepisami dotyczącymi odpadów biologicznych. Jeśli istnieje taka możliwość główne organy, pióra i kości powinny być przechowywane w archiwum długoterminowym.

### 3.5. INNE PRÓBY

- Można pobierać świeże odchody poprzez sztuczną prowokację ptaka do ich oddania. Ponieważ istnieje możliwość potencjalnej kontaminacji prób ze starych odchodów pochodzącymi z gniazda nie są one rekomendowane do analizy zanieczyszczeń. W przypadku pobierania próbek z wydzieliny gruczołu kuprowego od ptaków martwych możliwe jest pobranie całego gruczołu kuprowego. Przyżyciowo, wydzielinę z gruczołu kuprowego można pozyskać poprzez delikatnie uciśnięcie gruczołu. Uzyskaną wydzielinę należy umieścić w sterylnej probówce. Świeże wypluwki mogą być zbierane bezpośrednio w gnieździe, w miejscach noclegowych lub w miejscach przesiadywania ptaków. Próbkę należy umieszczać w jednoznacznie opisanych, sterylnych probówkach (odchody /wydzielina z gruczołu kuprowego) lub

plastikowych woreczkach (odchody /gruczoły kuprowe /wypluwki) z informacją analogiczną jak na innych próbach zebranych od danego martwego osobnika (patrz punkt 3.4). Należy skontaktować się z laboratorium w którym będą prowadzone analizy w celu doprecyzowania wielkości/ objętości próby oraz sposobu i warunków transportu/ przechowywania prób. Zwykle transportowanie prób odbywa się w niskich temperaturach, natomiast ich przechowywanie, aż do wykonania analiz chemicznych, w temperaturze -20°C. W niektórych przypadkach, przechowywanie prób w alternatywnej temperaturze (od temperatury pokojowej do -80°C, w zależności od planowanych analizy) może być bardziej odpowiednie.

*Bardziej szczegółowe informacje, ryciny i literatura, znajdują się w Protokole rozszerzonym dostępnym na stronie internetowej EURAPMON (<http://www.eurapmon.net/>).*

**Podziękowanie.** Autorzy dziękują za wsparcie finansowe przekazane przez Europejską Fundację Nauki (ESF) w ramach Research Networking Programme EURAPMON. Dziękuję również Lee Walker za jego cenne uwagi dotyczące rozszerzonego protokołu i Mark Wilson, Amy Challis i Chris Wernham za komentarze do tego podsumowania.

Kwiecień 2015

(tłumaczenie MZN)