

SAMMANFATTNING: PROTOKOLL FÖR PROVTAGNING OCH MILJÖGIFTSÖVERVAKNING MED ROVFÅGLAR OCH UGGLOR

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, Artic 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,

INLEDNING OCH MÅL

Forskning och övervakning *för* och *med* rovfåglar i Europa (EURAPMON) är ett European Science Foundation (ESF) Research Networking Programme (<http://www.eurapmon.net>). Ett syfte med EURAPMON är att sprida bästa praxis och bygga upp en kapacitet i Europa för en harmoniserad övervakning av rovfåglar och ugglor. Den 31 maj – 2 juni 2013 samlades representanter från sex länder i Murcia, Spanien, för att delta i en workshop om "Bästa praxis för övervakning av miljögifter i rovfåglar och ugglor i Europa", finansieret av EURAPMON. Workshopen resulterede i ett protokollskkast som sedan blev granskat och kompletterat av andra experter inom detta forskningsområde. Syftet med föreliggande insamlings- och provtagningsprotokoll är att ge vägledning om bästa praxis för att åstadkomma en harmonisering mellan existerande och nya miljögiftsundersökningar på rovfåglar och ugglor. Detta kommer maximera tillförlitlighet, jämförbarhet och gemensamt utnyttjande av data. Detta protokoll inrymmer provtagning av blod och fjädrar från levande fåglar, fjädrar och ägg, inre organ och vävnadsprover från döda individer, och andra prover som spillning och innehåll från gumpkörteln. Detta dokument är en sammanfattning av ett mer omfattande protokoll som kan laddas ner fritt från EURAPMON's hemsida (<http://www.eurapmon.net>).

1. GENERELLA RIKTLINJER

1.1. Tillstånd. Alla nödvändiga licenser och tillstånd skall införkaffas från respektive nationell myndighet innan arbetet påbörjas. Prover ska insamlas av för ändamålet utbildad, behörig/auktorerad personal.

1.2. Identifiering. Individuella provbehållare ska märkas med en unik kod före eller omedelbart efter att provet insamlats.

1.3. Undvik förorening. Lämpligt material för provtagning och förvaring ska användas. Utrustningen ska vara rengjord innan provtagning sker. Vid tveksamheter ska man rådfråga lab- eller annan relevant personal som har erfarenhet av provtagningen eller av att utföra miljögiftsanalyser. Se till att ingen rökning

eller förtäring av mat eller dryck sker i samband med provtagning. Notera om något skydd mot insekter eller annat (fästing) använts av de som tagit prover och ange vilken produkt som använts.

1.4. Personlig hälsa och säkerhet. Lämplig personlig skyddsutrustning bör användas och säkerhetsföreskrifter följas vid klättring och annan vistelse i fält.

1.5. Djurens välfärd. Onödig stress av fåglarna i samband med hantering och provtagning ska undvikas. Täck över fågelns huvud med mörkt tyg, och undvik oväsen (vid samtal, prata tyst). Undvik hantering eller att alls besöka bon vid förhållanden som kan medföra ökad stress, planera så att besöket vid boet blir så kortvarigt som möjligt. Kolla med laboratoriet vilken minsta provmängd som gäller för den aktuella undersökningen, och se till att provmängden som tas är säker för den aktuella individen vid tillfället och är i överensstämmelse med gällande tillstånd.

2. BASINFORMATION. Följande information ska antecknas i samband med provtagning, och kunna kopplas till de individuella proverna: identitet och kontaktuppgifter för observatör och den som har tagit provet, datum och tidpunkt för provtagning, län/kommun/lokakod/GPS-info, provtyp och antal, biologiska data (art, ringnr., ålder, kön, morfometri inkl. vikt, kondition/index, bo-information) och ev. övrigt av intresse.

3. PROTOKOLL FÖR VARJE PROV Typ

3.1. BLOD

- **Generella regler:** Före och efter blodprovstagning bör fågeln undersökas kliniskt, om möjligt av en veterinär, för att bedöma dess allmänna hälsotillstånd. Blodvolymen ska inte överstiga 1 % af kroppsvikten vid tillfället för provtagningen. Om provtagning av individen behöver upprepas vid senare tillfälle får den totala provmängden under en 14-dagarsperiod inte överstiga 2 % av kroppsvikten. Blodprover tas med hjälp av en kanyl (nål) och en spruta. Byt alltid nål och spruta mellan varje fågel. Venerna hos mycket små fåglar kan punkteras (t ex med steril skalpell eller kanyl) och blodet sugas upp i kapillär rör. Vakuumrör (vacutainers) bör undvikas. Så små kanyler som möjligt bör användas: 25-30 G och 1ml eller 2 ml spruta för fåglar <500 gram; 23 G och 5ml eller 10 ml spruta för fåglar >500 gram. Antikoagulanter behövs till helblod/plasma. Normalt rekommenderas heparin men rådfråga ditt laboratorium eller projektledaren.

- **Metodik:** (1) stimulera den lokala blodcirkulationen, (2) tvätta området där blodprovet ska tas med antiseptisk/steril våtservett, (3) ta provet från brachial/radial-venen, (4) för att undvika blödning och hematom: ta en ny antiseptisk/steril våtservett och tryck på punkturstället innan och när kanylen dras ut, och håll kvar med tryck i några minuter tills att inget blod tränger ut.

- **Procedur efter blodprovstagning:** nålen ska avvägsnas från sprutan innan provet sprutas i märkta kryorör. Proverna ska transporteras vid 4-10°C. Rör som innehåller antikoagulanter (ak) fylls så att rätt förhållande erhålls mellan blod och ak. Centrifugering för avskiljning av fraktioner bör ske så snart som möjligt, helst inom 6 timmar (max 12-24 timmar), ju längre tid desto större risk för klumpbildning och bristningar hos de röda blodkropparna. Blodet centrifugeras för att separera plasma/serum från erythrocyter [röda blodkroppar] (10 minuter, 1600-3000 g). Avskiljning av plasma/serum/röda blodkroppar kan bara göras på färskt blod. Alla avskiljda fraktioner sparas separat i märkta rör. För att undvika kors-kontaminering bör olika pipetter användas för varje prov vid uttag för överföring till enskilda rör.

- **Förvaring:** prover ska förvaras mörkt och nedfrusna till $-20/-80^{\circ}\text{C}$ /flytande kväve (beroende på analys och vad som ska mätas) fram till analys.

3.2. FJÄDRAR

- **Insamling:** antal och typ av fjädrar som behöver tas, och önskad ålder på fågeln som ska provtas, beror på vilken substans som ska undersökas, och på analysmetoden och syftet med undersökningen. Konturfjädrar kan plockas (ryckas) eller klippas (vid skinnet) både hos boungar och vuxna och är att föredra. Från de vuxna fåglarna kan ruggade fjädrar i eller under boet eller dess närhet insamlas. Dun rekommenderas inte för miljögiftsanalys. Normalt är 200-500 mg tillräckligt för att analysera POPs (organiska miljögifter), medan 10-200 mg är tillräckligt för metallanalyser. För analys av organiska miljögifter kan fjädrar transporteras vid rumstemperatur i aluminiumfolie och förseglade plastpåsar; för analys av metaller räcker det med plastpåsar.

- **Förvaring:** fjädrar kan förvaras vid rumstemperatur om blod och blodvävnad avläsnas och om proverna är torra. Fjädrar kan lagras i aluminiumfolie och/eller förseglade plastpåsar eller kuvert, i mörker, och på ett torrt ställe (eller använd ev. silica) om förvaring sker i rumstemperatur. Alternativt kan fjädrar frysas i förseglade plastpåsar. Märkning av fjäderproverna sker på etikett utanpå eller i påsarna; skriv inte direkt på fjädrarna.

- **Beskrivning av fjäderproverna:** ange vilken typ av fjäder provet utgör, och från vilken sida av fågeln provet kommer; för konturfjädrar anges var på kroppen (rygg, bröst, vingtäckare etc.). För ving- och stjärtpennor anges också position baserat på den konventionella numreringen (dvs inifrån och utåt för handpennor och stjärtpennor, utifrån och in mot bålen för armpennor). Basinformation ska anges (enligt punkt 2), och tidpunkt för senaste ruggning uppskattas (för fjädrar från vuxna). Längden av varje fjäder (i mm) mäts med skjutmått, från basen av fanet (dvs exkl. Calamus) till fjäderns spets. Calamus (den nakna basen av spolen) kapas/klippas bort med steril skalpell/sax vid gränsen mot fanet och sparas separat för ev. genetiska studier. Vikt av varje fjäder anges i mg. Beroende på vilken typ av analys som är aktuell tillämpas olika metoder för tvättning av fjäderprover (se detaljerat protokoll på <http://www.eurapmon.net>).

3.3. Okläckbara (döda) ägg

- **Insamling:** bara övergivna eller rötägg får insamlas från bon. Använd blyertspenna för att skriva på både äggskalet och behållaren. En lämplig hård behållare för transport är nödvändigt för att undvika att ägget går sönder. Skalbitar (kvar efter kläckningen eller krossade ägg) som hittas i eller vid boet insamlas och förvaras i förseglade plastpåsar som läggs i hård behållare. Anteckna boets innehåll i form av skalrester, hela ägg (levande och döda) och ungar (levande och döda), och försök uppskatta åldern på döda ägg som kan insamlas (tid efter äggläggning).

- **Förbehandling av prover och förvaring:** ägg bör inte frysas eftersom de kan spricka då. De ska förvaras kyligt och processas så snabbt som möjligt. Längd, bredd, vikt och ev. sprickor noteras. Ägget bör öppnas mitt på (alt. hål borras vid ekvatorn) och innehållet tömmas i glasbägare. Innehållet vägs och homogeniseras och hålls fruset i -20°C tills analys. En glasburk med teflonlock kan användas för material som ska analyseras för POPs. Plastburk kan användas till material som ska analyseras för oorganiska substanser (metaller) och PFAS (organiska fluorerade ämnen). Äggets status med avseende på förruttnelse, fosterutveckling och deformiteter ska undersökas och registreras. Foster kan avskiljas från resten av äggets

innehåll (före homogenisering av detta) och frysas in separat. Alternativt kan hela äggets innehåll homogeniseras.

Äggskal skjöljs försiktigt med vanligt kranvatten och får torka i rumstemperatur till en konstant vikt, som ska registreras. Äggskalstjockleken hos rengjorda och torra skal mäts vid äggets ekvator med skjutmått, eller motsvarande specialverktyg för mätning genom borrhål. Skalindex och uttorkningsindex beräknas enligt formlerna i protokollet (<http://www.eurapmon.net>). Uppmätta halter av miljögifter ska korrigeras för uttorkning av ägget.

3.4. Inre organ och vävnader

- **Generella överväganden:** kroppar ska före obduktion och provtagning förvaras i förseglade plastpåsar för att undvika uttorkning, och märkas med etikett både inne i påsen (använd blyerts eller vattenfast märkpena) och utanpå påsen (använd vattenfast märkpena). All information om individen ska registreras i enlighet med punkt 2 i tillämpliga delar, och här också med tillägg av fyndomständigheter och kontaktuppgifter till upphittaren, och uppgift om kadaverstatus (komplett eller ej) och grad av förruttelse.
- **Obduktion:** obduktioner bör om möjligt ske på färska kadaver, eller alternativt kan fågeln frysas (-20°C) tills obduktion och provtagning kan ske. Om fågeln har frusits ner ska den tinas över natten. Extern undersökning av kroppen är nödvändig för att hitta tecken på trauma, och kliniska symptom före döden. Näringstillstånd bör undersökas (se det utvidgade protokollet på <http://www.eurapmon.net>). Under obduktion undersöks och noteras organvikter, skador, kön och gonadstatus (utvecklingsstadium). Ett standardiserat protokoll bör följas (se det utvidgade protokollet).
- **Provtagning:** Diskutera med ansvariga för provbank och undersökningslab vilka vävnadstyper som ska provtas. Professionell dissektionsutrustning bör användas och utrustningen rengöras mellan organproverna och mellan varje individ. Tillvaratagande av lever, njure och andra inre organ bör om möjligt omfatta hela organet. Muskelprov bör i första hand tas från bröstmuskeln. Om analys ska göras på fett så använd kroppsfett i stället för underhudsfett. Provtagning från olika individer bör ske konsekvent från samma delar av kroppen enligt ett standardiserat mönster.
- **Förvaring:** organprover sparas i separata, tydligt uppmärkta burkar/plastpåsar. Förpackningar av material som kan påverka eller förstöra analysen av de ämnen som ska analyseras måste undvikas. Vid osäkerhet om lämpligheten att använda plast till prover som ska analyseras för PFAS används aluminiumfolie (rengjord med vatten och metanol), men aluminiumfolie bör inte användas till prover som ska analyseras för metaller. Organprover ska förvaras vid -20°C eller -80°C. Om någon osäkerhet finns om hur proverna bör förvaras ska man rådfråga ansvarig på institution eller lab.
- **Andra överväganden:** omhändertagande av dissektionsrester och kadaver ska ske i enlighet med gällande nationella bestämmelser för biologiskt avfall. Där det är möjligt bör de viktigaste organen, fjädrar och ben arkiveras in provbank. I Sverige finns den nationella miljörovbanken vid Naturhistoriska riksmuseet.

3.5. Andra prover

- Färsk spillning kan erhållas från levande individer under hantering. Gammal (torr) spillning vid boplatser kan vara kontaminerad och rekommenderas inte till analys av miljögifter. Hela gumpkörteln kan avskiljas från döda fåglar. Hos levande individer kan man försiktigt pressa olja ur gumpkörteln till ett sterilt provrör. Spybollar kan samlas in vid boplatser och sittplatser. Insamlade prover förvaras i tydligt märkta sterila

provrör (spillning/gumpolja) eller plastpåsar (spillning/gumpkörtel/spyballar), med samma information som anbefalls för organ ovan (se avsnitt 3.4). Kolla med analyslab vilka mängder som krävs för analys, och vilka omständigheter som gäller för transport. Normalt bör prover hållas kylda under transport och förvaras i frys vid -20° tills kemisk analys, men andra förhållanden kan gälla i speciella fall.

Tack. Författarna tackar för det finansiella stödet från European Science Foundation (ESF) genom EURAPMON Research Networking Programme. Tack också till Lee Walker för hans värdefulla kommentarer till det utförligare protokollet, och till Mark Wilson, Amy Challis och Chris Wernham för deras kommentarer till denna sammanfattning.

För mer detaljerad information, figurer och referenser, se det utförligare protokollet som finns på EURAPMON's hemsida (<http://www.eurapmon.net/>).

April 2015