

Recolección de Tejidos
para Análisis de Mercurio
2024



Métodos de muestreo en campo para murciélagos



MÉTODOS DE MUESTREO EN CAMPO PARA MURCIÉLAGOS

Recolección de Tejidos para Análisis de
Mercurio

Marzo 2024



Biodiversity Research Institute

276 Canco Road

Portland, Maine, USA 04103

+1 (207) 839-7600

bri@briwildlife.org

www.briwildlife.org

Biodiversity Research Institute (BRI) es una organización sin fines de lucro 501(c)3 ubicada en Portland, Maine, EE. UU. Fundada en 1998, BRI está dedicada a apoyar la salud global mediante la investigación ecológica colaborativa, la evaluación de la salud de los ecosistemas, la mejora de la conciencia ambiental y la toma de decisiones informadas basadas en la ciencia.

Citación sugerida:

Evers DC, Guilbert, JM. 2024. Bat field sampling methods: collection of tissues for mercury analysis. Report BRI 2024-12, Biodiversity Research Institute, Portland, Maine, USA.

Fotografías de Portada © Merlin Tuttle Foundation: Top: Egyptian slit-faced bat (*Nycteris thebaica*); Top row L to R: Damara woolly bat (*Kerivoula argentata*); Lappet-eared free-tailed bat (*Chaerephon major*); Dusky pipistelle (*Pipistrellus hesperidus*); Bottom row L to R: African yellow bat (*Scotophilus dinganii*); Egyptian fruit bat (*Rousettus aegyptiacus*); Rufous myotis (*Myotis bocagii*).

Tabla de Contenido

1.	Toma de muestra de sangre	2
1.1	Suministros para punción venosa	2
1.2	Recolección de Sangre de Murciélago	3
1.3	Formato de Etiquetado de Muestras de Sangre	3
2.	Recolección de Muestras de Pelo	5
2.1	Suministros para la Recolección de Pelo.....	5
2.2	Procedimiento de Recolección de Pelaje	5
2.3	Formato de Etiquetado de Muestras de Pelaje	6
3.	Tablas de Procedimientos	7
4.	Requisitos de Metadatos	7
5.	Almacenamiento de Muestras.....	8
6.	Envío de Muestras.....	8
7.	Permisos Requeridos	9
8.	Referencias.....	9
Appendix		
	Formulario de Metadatos de Murciélagos.....	10

1. Toma de muestra de sangre

La recolección no letal y el análisis de muestras de sangre total en murciélagos se utilizan para identificar el consumo reciente de contaminantes en la dieta, como el mercurio (Evers 2018), y varios isótopos estables ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{34}\text{S}$) que permiten la reconstrucción de la dieta y la identificación de los orígenes migratorios. Las muestras de sangre se pueden obtener mediante punción venosa en las venas del ala o la cola.

Para los análisis de laboratorio se prefiere el uso de tubos capilares de micro-hematocrito, pero estos requieren condiciones específicas de almacenamiento y envío. Si los tubos capilares no están disponibles, los vacutainers son un reemplazo adecuado y pueden almacenar un volumen mayor de muestra. **IMPORTANTE:** Los análisis de contaminantes requieren que la sangre se almacene en recipientes heparinizados con litio, mientras que los análisis de isótopos estables requieren que la sangre se almacene en recipientes estériles. Para un fácil almacenamiento y envío de las muestras, se pueden usar tarjetas Whatman con sangre seca para los análisis de contaminantes e isótopos estables (Perkins y Basu 2018; Barst et al. 2020).

Regla general para el volumen máximo de sangre: La extracción de sangre nunca debe exceder el 1% del peso corporal total de un individuo (Eshar & Weinberg 2010). Aproximadamente el 10% del peso de un murciélago es sangre (Eshar & Weinberg 2010); por lo tanto, se puede extraer hasta el 10% del volumen de sangre de un murciélago. Por ejemplo, un murciélago frugívoro adulto de 1000 gr tiene aproximadamente 100 gr de sangre. De esta cantidad, se pueden tomar hasta 10 gr de sangre (1 gr = 1 mL). Un murciélago que pesa 20 gr tiene 2 gr de sangre; por lo tanto, se puede recolectar un máximo de 0.2 mL o 200 μL de sangre.

IMPORTANTE: BRI no recomienda recolectar la cantidad máxima en ninguna especie.

1.1 Suministros para punción venosa

Procedimiento General	Procedimiento de punción
☐ Hoja de datos / Ficha técnica	☐ Agujas de calibre 26–27 (para aves pequeñas)
☐ Mapa del area de estudio/pais	☐ Tubos capilares de micro-hematocrito (usar heparinizados para contaminantes, estériles para isótopos estables)
☐ Almohadillas de alcohol isopropílico	☐ Leica Microsystems Critoseal™ (Sellador de Criostato Leica Microsystems™)
☐ Marcador permanente Sharpie™ de punta extra fina	☐ Vacutainer de 6 mL
☐ Bolsas plasticas Ziploc™ tipo sandwich	☐
☐ Contenedor portátil de objetos cortopunzantes	☐
☐ Nevera portatil (~5L) y cubos de hielo	☐
☐ Algodon (Cojines o bolas)	
☐ Opcional: Tarjetas Whatman para sangre	
☐ Opcional: Silica gel (Almacenamiento tarjetas Whatman)	

1.2 Recolección de Sangre de Murciélago

Los protocolos estándar para la recolección de sangre de murciélagos se describen en esta sección. Para cada murciélago, debe realizarse una toma de datos estándar en el formulario de registro de muestra.

Procedimiento

1. Ubique la arteria ulnar en el ala (Figura 1) o una vena en la porción de la cola de la membrana del ala (preferido).
2. Pinche la vena con una aguja.

IMPORTANTE → No atravesie ambas paredes de la vena en el patagio, solo la superior; (solo en el uropatagio se puede pinchar la aguja a través de ambas paredes).

3. Permita que la sangre se acumule (generalmente ocurre muy rápido).
4. Recoja la sangre colocando los tubos capilares debajo de la sangre acumulada (un ángulo hacia abajo permitirá que la sangre ingrese más fácilmente al tubo capilar).
5. Recoja 1-2 tubos capilares o al menos 0.2 cc en un microtainer.

IMPORTANTE → Llene los tubos capilares solo entre $\frac{1}{4}$ y $\frac{1}{2}$ de su capacidad máxima.

6. Mantenga un hisopo de algodón fresco sobre el área de punción hasta que se detenga el sangrado (generalmente en 10 segundos).
Si usa tarjetas Whatman, seleccione uno de los tubos capilares, antes de sellarlo, para depositar la sangre sobre la tarjeta.
Almacene la tarjeta en una bolsa plástica con paquetes de silica gel.
7. Use Critocaps (preferido) o Critoseal para sellar cada extremo del tubo capilar.
8. Coloque los tubos capilares en un vial de vacío y etiquete adecuadamente todos los viales.
9. Almacene todas las muestras de sangre en una hielera con ice packs mientras esté en el campo.
10. Transfiera las muestras a un congelador para su almacenamiento lo antes posible; deben permanecer congeladas hasta el análisis.

1.3 Formato de Etiquetado de Muestras de Sangre

Incluir la siguiente información:

1. Fecha de recolección
2. Especie
3. Edad y sexo
4. Número de identificación (ID #)
5. Ubicación de la muestra (es decir, nombre del río o lago)
6. Estado o Provincia

IMPORTANTE

Todas las muestras deben tener un numero de identificacion ID # que este etiquetado y se pueda leer facilmente



Figura 1: Extracción directa de sangre de la vena ulnar cutánea utilizando una jeringa manual.

Whatman 903TM LOT 7179520 W191

--	--	--	--	--

2631 41367 NowA RPBo May 11, 2021 Name _____ 31 μ L Date _____	2831 75687 ↑ VEER Tuck Cover Here RPBo May 11, 2021 38 μ L	0831 92374 RWBL ♀ RPBo May 11, 2021 42 μ L
--	--	--

Figura 2: Tarjeta de Whatman completada con los metadatos correspondientes llenados.

2. Recolección de Muestras de Pelo

La recolección de muestras de pelo es útil para identificar la carga corporal de metales pesados, como el mercurio, debido a que el metilmercurio generalmente se transfiere al pelo durante el crecimiento del mismo (Evers 2018). Las muestras recolectadas proporcionarán información importante para desarrollar conciencia sobre los riesgos potenciales asociados con la contaminación por mercurio. Es importante asegurarse de que todas las muestras se colecten de manera segura y limpia. Se solicita a las organizaciones colaboradoras que registren la información básica de cada muestra. La recolección de pelo de murciélago es indicativa de una exposición crónica al mercurio en los murciélagos.

2.1 Suministros para la Recolección de Pelo

- ☐ Hoja de datos
- ☐ Mapa del país/sitio de muestreo
- ☐ Tijeras de cutícula de acero inoxidable
- ☐ Sobres de papel pequeños (tipo monedas), pequeñas bolsas plásticas tipo ziplock y viales
- ☐ Marcador permanente y esfero

2.2 Procedimiento de Recolección de Pelaje

1. Registre la especie de murciélago y el nombre común en la hoja de datos.
2. Recoja una muestra de pelo usando tijeras pequeñas de cutícula de acero inoxidable.
3. Recorte pelo del abdomen, la espalda y otras ubicaciones según sea necesario. Recorte lo más cerca posible de la piel sin cortar al murciélago. No es necesario recolectar el folículo piloso. Se necesitarán 4-5 cortes con tijeras (~0.01 gramos de pelo).
4. Almacene el pelo en envases de muestra etiquetados individualmente (por ejemplo, sobres de monedas, bolsas plásticas tipo ziplock o viales).
5. Asegúrese de limpiar las tijeras entre cada murciélago muestreado, frotándolas con copitos de algodón con alcohol e inspeccionándolas visualmente para asegurarse de que no haya pelo del murciélago anterior para evitar la contaminación cruzada.
6. Las muestras no necesitan ser refrigeradas ni congeladas.

2.3 Formato de Etiquetado de Muestras de Pelaje

Siga este formato para etiquetar las muestras de pelaje:

- ☐ Use un código alfanumérico para la especie [código convencional de 2 letras]
- ☐ Mes, Día, Año
- ☐ Especie (nombre científico)
- ☐ Ubicación (Sitio, Pueblo, Condado, Estado o Provincia, País)
- ☐ Longitud del antebrazo (mm), masa corporal (g)
- ☐ Edad (AD = adulto; J = juvenil)
- ☐ Sexo (M = macho; F = hembra)
- ☐ Condición reproductiva para hembras (P = preñada; L = lactancia; PL = post-lactancia; NR = no reproductiva)
- ☐ Condición reproductiva para machos (longitud y ancho de los testículos)

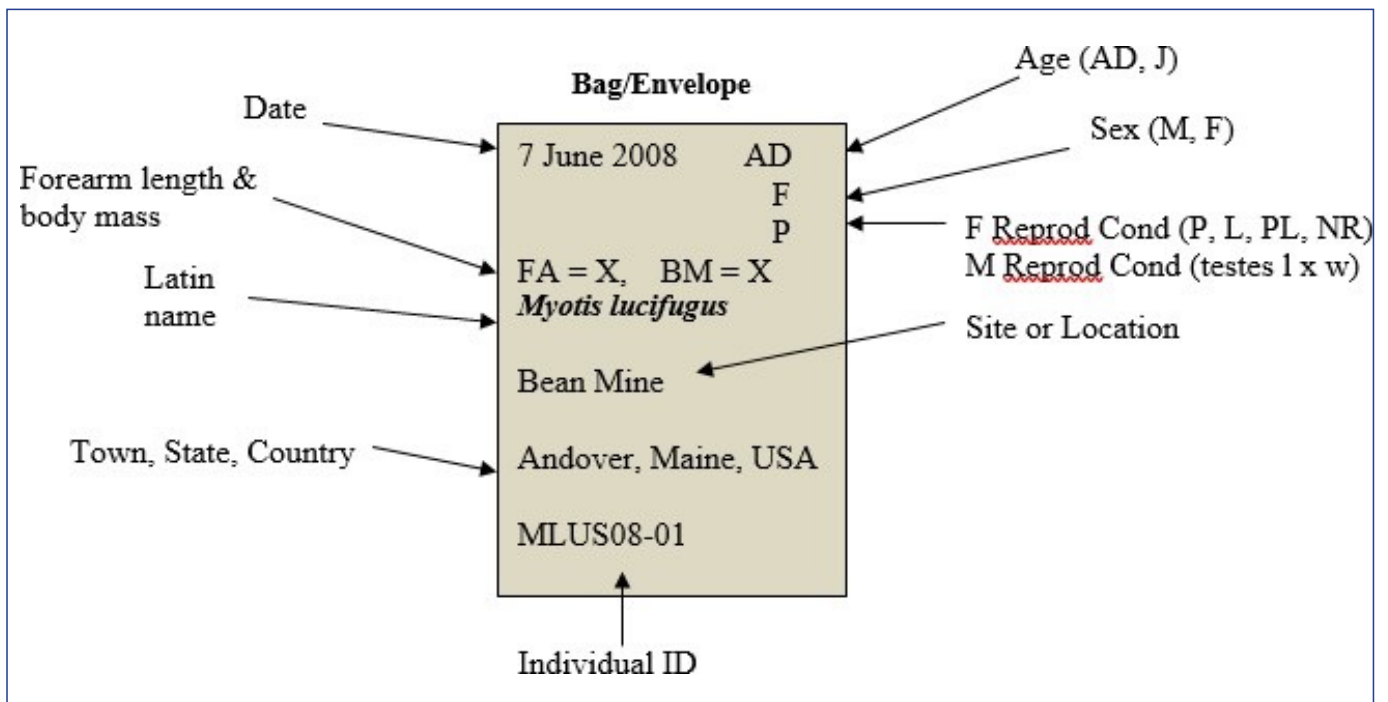


Figura 3: Convención correcta de etiquetado para muestras individuales enviadas.

3. Tablas de Procedimientos

Tabla 1. Diagrama de flujo del procedimiento de muestreo de tejidos para análisis de mercurio. La selección del tejido depende del grupo(s) taxonómico(s) de interés y los objetivos de la investigación.

Tejido	Método de Recolección	Taxones focales adecuados	Recipiente	Cantidad mínima	Almacenamiento
Sangre	Punción	Todos los taxones	Tubo capilar heparinizado con litio	0.4 µl	Congelador
			Tarjeta Whatman	1 Tarjeta	Refrigerador o Temperatura ambiente
Pelo	Recorte	Todos los taxones	Sobre de papel para monedas	0.01 gr	Refrigerador o Temperatura ambiente

4. Requisitos de Metadatos

Imprima claramente al menos la siguiente información en cada vial de archivo, sobre de papel para monedas o etiqueta de muestra usando un marcador permanente:

- ☐ Número de anillo, si aplica
- ☐ Nombre común de la especie (incluir también el nombre en latín si la muestra se recolecta fuera de EE. UU.)
- ☐ Fecha (use letras para el mes en lugar de números, por ejemplo, "Mar 11, 2021")
- ☐ Nombre del lugar de muestreo, estado o provincia, y país
- ☐ Edad y sexo del individuo (por ejemplo, "Después del segundo año, macho"), si aplica

Organice todos los metadatos utilizando las plantillas preferidas y envíelos a BRI a través de los formularios correspondientes.

IMPORTANTE: Si va a contribuir con muestras a BRI u otro grupo/agencia de investigación, inicie la colaboración lo antes posible.

Envíe los datos de anillado para todos los murciélagos muestreados como una hoja de cálculo en Excel o archivo .csv. Una copia de estas hojas de datos puede obtenerse de josh.guilbert@gmail.com

La identificación de murciélagos individuales se puede lograr mediante identificación fotográfica de una o ambas alas. La recolección de estos datos es recomendable si no es posible anillar o si el trabajo se realiza en una zona donde se ha utilizado identificación fotográfica en el pasado. Tome una foto clara de la parte ventral del ala extendida con las fibras de colágeno visibles. Anote los números de las fotos en la hoja de datos.

IMPORTANTE: Si no se puede anillar a un murciélago en el campo, el individuo y la muestra correspondiente DEBEN recibir un número de identificación único (por ejemplo, "Organización-País-SinAnilla0001").

5. Almacenamiento de Muestras

Por favor, siga estos requisitos:

- Las muestras de sangre en tubos capilares o vacutainers deben almacenarse inmediatamente en una nevera portátil con paquetes de hielo en el campo. **IMPORTANTE:** las muestras de sangre deben transferirse a un congelador TAN PRONTO COMO SEA POSIBLE, o dentro de las 24 horas posteriores a la recolección, y deben permanecer congeladas hasta el análisis. Aunque los metales pesados como el mercurio son estables, congelar las muestras previene la degradación de la sangre.
- Las manchas de sangre seca en tarjetas de Whatman deben almacenarse con sílica gel en bolsas de plástico selladas por separado (para reducir la influencia de la humedad). Idealmente, deben guardarse en un refrigerador a 4°C (para evitar el moho), pero también pueden almacenarse a temperatura ambiente, alejadas de la luz solar directa antes del envío y análisis.
- Los sobres de muestras de pelo deben almacenarse idealmente en una bolsa de plástico sellada en un refrigerador a 4°C (para evitar el moho), pero también pueden guardarse en una bolsa de plástico sellada a temperatura ambiente, alejadas de la luz solar directa antes del envío y análisis.

6. Envío de Muestras

Si va a enviar muestras a BRI para colaborar, ¡gracias por su contribución! Al menos dos semanas antes de enviar cualquier muestra, complete el formulario de envío de metadatos para dar tiempo suficiente a BRI para tramitar los permisos necesarios. BRI enviará todos los formularios completados requeridos para el transporte una vez que se hayan emitido los permisos. Después de que se hayan aprobado todos los permisos (ver 7.1. Permisos Requeridos), programe un envío con el servicio de transporte de su elección.

Para empaquetar las muestras de tejido, siga estas instrucciones:

- Use una pequeña nevera para asegurar y aislar todas las muestras de sangre durante el envío.
- Coloque ice packs dentro de la nevera para mantener la sangre congelada.
- Si los viales de archivo son de vidrio, es **IMPORTANTE** acolchar las muestras con plástico de burbujas o papel periódico dentro de la nevera para evitar fracturas.
- El pelo y las manchas de sangre seca en tarjetas Whatman no requieren empaque especial y no necesitan mantenerse fríos (si se envían dentro de los 3–4 meses posteriores a la recolección).
- Coloque la nevera en una caja de cartón y llene el espacio vacío con materiales de embalaje adicionales, como plástico de burbujas o papel periódico, para evitar movimiento durante el envío.
- Incluya una copia de todos los permisos y formularios necesarios en la parte superior del material de embalaje antes de sellar el paquete con cinta de embalaje (ver 7.0. Permisos Requeridos). Adjunte un segundo juego de copias de permisos en una bolsa de plástico en el exterior del paquete.

Por favor, incluya los siguientes detalles en la etiqueta de envío y en el exterior del paquete:

Biodiversity Research Institute
276 Canco Road
Portland, Maine 04103 USA
WILDLIFE :: USFWS :: MBTA

COPIAS ADICIONALES DE DOCUMENTOS DENTRO DE LA CAJA

IMPORTANTE

Para evitar retrasos en la aduana, envíe las muestras un lunes o martes, y nunca justo antes de un día festivo.

Cuando el representante de envío le pregunte si está enviando algo perecedero, responda **NO**.

7. Permisos Requeridos

Para envíos fuera de los Estados Unidos, incluya lo siguiente:

- Una copia del permiso de importación del USDA del importador*
- Una copia del permiso del CDC del importador.
- Formulario USFWS 3-177 (Declaración de importación o exportación de peces o vida silvestre)
- Declaración de Envíos Biológicos de FedEx*
- Factura Comercial de FedEx
- Permiso de exportación CITES, si corresponde
- Una copia del permiso de exportación del país de origen, si corresponde

*Formularios proporcionados por BRI por correo electrónico; Información abajo

IMPORTANTE:

Los envíos que lleguen a los Estados Unidos pueden ser rechazados, destruidos o devueltos si no incluyen los permisos adecuados. Para preguntas o aclaraciones adicionales, o si está interesado en colaborar, no dude en contactar a BRI por teléfono, correo electrónico o visitar nuestro sitio web.

Para preguntas o aclaraciones adicionales, o si está interesado en colaborar, no dude en contactar a BRI por teléfono, correo electrónico, o visitar nuestro sitio web:

Josh Guilbert, Ph.D., Director, Programa de Mamíferos
josh.guilbert@briwildlife.org
Biodiversity Research Institute | Portland, ME, EE. UU.
+1 (207) 839-7600
bri@briwildlife.org
www.briwildlife.org

8. Referencias

Barst BD, Wooller MJ, O' Brien DM, et al (2020) Dried blood spot sampling of landlocked Arctic char (*Salvelinus alpinus*) for estimating mercury exposure and stable carbon isotope fingerprinting of essential amino acids. *Environ Toxicol Chem* 39:893-903. <https://doi.org/10.1002/etc.4686>

Eshar D, Weinberg M (2010) Venipuncture in bats. *Lab Amin* 39 p175-176

Evers DC (2018) The effects of methylmercury on wildlife: a comprehensive review and approach for interpretation. In: Dellasala DA, Goldstein MI (eds) *Encyclopedia of the anthropocene*, vol. 5. Elsevier, New York, pp 181-194

Perkins M, Lane OP, Evers DC, Sauer A, Adams EM, O' Driscoll NJ, Edmunds ST, Jackson AK, Hagelin JC, Trimble J, Sunderland EM (2019) Historical patterns in mercury exposure for North American

BAT Metadata Form

SITE: _____ COUNTRY: _____ X: _____ Y: _____

DATE (YYYY-MM-DD) PAGE: OF STAFF: _____

		Recapture?	CODES (U)known	SEX: (M)ale, (F)emale AGE: (A)dult, (J)uvenile						MALE REPRODUCTIVE: (N)on-Reproductive, (TD)Testes Descended FEMALE REPRODUCTIVE: (N)on-Reproductive, (L)actating, (PR)egnant, (PO)st-Lactating					
				SPECIES GGG SSS	AGE	SEX	REPRO	Weight (g)	Forearm (mm)	Ear (mm)	Tragus (mm)	Tail (mm)	Wing Score	#	Height M
#	TIME	Y	BRM42069	TAD BRA	A	F	PR	11	43	19	10	16	0	A	2
1	23:03														
2															
3															
4															
5															
6															
7															
8															
9															
10															
11															
12															
13															
14															
15															

Wing Score 0: <5% splotches, no discolored flaking forearm, no necrotic tissue, no holes, membrane intact.

Wing Score 1: 5-50% splotches, discolored flaking forearm, no necrotic, no holes, membrane intact

Wing Score 2: 50-90% splotches, discolored flaking forearm, few areas of necrotic issue, small holes <50 mm in diameter holes, Necrosis edges no loss of area

Wing Score 3: >90% splotches, discolored flaking forearm, Abundant necrosis, large holes >50 mm in diameter holes, Noticeable loss of membrane area

Discolored flaking forearm alone automatically scores Wing Score of 1