



Métodos de Muestreo en Campo para Aves



**Recolección de Tejidos
para Análisis de
Mercurio
2024**



Métodos de Muestreo en Campo para Aves

Recolección de Sangre y Plumas para Análisis de Contaminantes, Isótopos Estables y Genéticos

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, el aumento de la conciencia ambiental y la promoción de la toma de decisiones basada en la ciencia.



La iniciativa de Investigación Tropical para la Conservación de Aves y Ecotoxicología (TRACE) es una red internacional de investigación colaborativa que genera conocimiento científico para orientar la conservación de aves

tropicales mediante el monitoreo ecotoxicológico. TRACE surgió de más de una década de investigaciones sobre muestreo de aves realizadas por BRI en América Central y el Caribe. Actualmente, TRACE apoya y fomenta la colaboración directa con investigadores de todo el mundo, especialmente con estudiantes de instituciones tropicales, que recolectan sangre completa, plumas o huevos de aves tropicales. Contáctenos para más información

Cita Sugerida:

Evers DC, Savoy L, DeSorbo C, Regan K, Persico C, Sayers CJ II. 2024. Bird field sampling methods: collection of tissues for mercury analysis. Report BRI 2024-11, Biodiversity Research Institute, Portland, Maine, USA.

Fotografía portada © BRI-Ed Jenkins: From top: Hamerkop Kimangop; Black-tailed Oriole; African Darter.

Contents

1. Toma de Muestra de Sangre Completa	2
1.1 Suministros para Venopunción	3
1.2 Procedimiento de Extracción Directa Utilizando una Jeringa Manual (SOLO para Aves Grandes) ...	6
1.3 Procedimiento de Extracción Directa Utilizando una Aguja Mariposa (SOLO para Aves Grandes)...	9
1.4 Procedimiento de Punción.....	11
1.5 Procedimiento de Almacenamiento de Sangre en Tarjetas Whatman®	14
2. Colección de Plumas	15
2.1 Suministros para la recolección de plumas:.....	17
3. Colección de Huevos	17
3.1 Suministros para la Colección de Huevos	17
4. Tablas de Procedimientos	18
5. Requisitos de Metadatos	20
6. Almacenamiento de Muestras.....	21
7. Envío de Muestras.....	21
7.1 Permisos Requeridos.....	22
8. Referencias.....	23

1. Toma de Muestra de Sangre Completa

La recolección y análisis no letales de muestras de sangre completa en aves se utiliza para identificar la ingesta dietética reciente de contaminantes, como el mercurio (Evers 2018), y varios isótopos estables (como, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{34}\text{S}$) que permiten la reconstrucción de la dieta y la identificación de los orígenes migratorios. Las muestras de sangre se pueden obtener mediante dos técnicas de venopunción: extracción directa y punción. La extracción directa se utiliza típicamente en aves más grandes, como aves acuáticas y rapaces, y permite recolectar un mayor volumen de sangre. La punción es más adecuada para aves más pequeñas, como paseriformes migratorios. Aunque la sangre se puede extraer de cualquier ubicación en aves más grandes y puede ser determinada por el biólogo o veterinario en el lugar, BRI recomienda extraerla de las venas metatarsianas (pierna) o cutáneas ulnares (ala; Figura 1). En aves más pequeñas, la sangre solo debe extraerse de la vena cutánea ulnar (Figura 2).

Los tubos capilares de microhematocrito son más adecuados para análisis de laboratorio, pero requieren disposiciones específicas de almacenamiento y envío (ver 6.0 Almacenamiento de Muestras y 7.0 Envío de Muestras). Si los tubos capilares no están disponibles, los tubos de extracción sanguínea (vacutainers) son un reemplazo adecuado y pueden almacenar un volumen de muestra más grande.

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 facilitar el almacenamiento y envío de muestras, la sangre secada en tarjetas Whatman se puede usar tanto para análisis de contaminantes como de isótopos estables (Perkins y Basu 2018; Barst et al. 2020).
- BRI recomienda encarecidamente la recolección de sangre a través de tarjetas Whatman para evitar restricciones de importación/exportación. Sin embargo, BRI es un laboratorio certificado como BSL-2 y puede aceptar sangre completa a través de cualquier recipiente.

Regla general para el volumen máximo de sangre: La extracción de sangre nunca debe exceder el 1% del peso corporal total de un ave (Fair et al. 2010). Aproximadamente el 10% del peso de un ave es sangre (McGuill y Rowan 1989); por lo tanto, se puede extraer hasta el 10% del volumen de sangre en un ave. Por ejemplo, un colimbo común (*Gavia immer*) adulto de 5000 g tiene aproximadamente 500 g de sangre. A partir de esto, se puede extraer un máximo de 50 g de sangre (1 g = 1 mL). Un ave cantora de 20 g tiene 2 g de sangre; por lo tanto, se puede recoger un máximo de 0.2 mL o 200 μL de sangre.

IMPORTANTE

BRI no recomienda recoger la cantidad máxima en ninguna especie. Los procedimientos específicos de muestreo de sangre para diferentes grupos taxonómicos se revisan en las secciones 1.2 a 1.4.

1.1 Suministros para Venopunción

Checklist General	
Item	Propósito
☐ Hoja de datos o ficha técnica	For recording data
☐ Copia de los protocolos de muestreo	This Bird Field Methods Sampling SOP and project-specific sampling protocols
☐ Copia de los permisos requeridos	For example, state and federal banding and scientific collection permits
☐ Nevera portátil de 5L & Compresa de hielo	For storing collected blood while in the field
☐ Almohadillas de alcohol isopropílico o botella de spray	For clearing and sterilizing the puncture site
☐ Algodón en bolas o almohadillas	For stopping bleeding at the puncture site post collection. Can also be used as an additional blood sample for some analyses
☐ Marcador permanente Sharpie de punta fina	For labelling samples. Note that some markers contain contaminants such as PFAS. If blood will be stored in a
☐ Contenedor para descarte de agujas	For containing used needles while in the field

Procedimiento de extracción directa utilizando Jeringa manual (solo para aves grandes)	
Item	Propósito
☐ Jeringas de 3 cc con agujas de calibre 21-25 o	El tamaño de las agujas depende del tamaño de las especies
☐ Tubos de vacío con heparina de litio de 6 mL (Vacutainers® de tapa verde)	Para análisis de contaminantes
☐ Tubos de vacío estériles de 6 mL (e.g. Vacutainers®)	Para análisis de isótopos estables
☐ Tubos capilares microhematocritos	Para realizar el procedimiento de muestreo de sangre utilizando las tarjetas Whatman®
☐ Sobres de papel pequeños	Para guardar muestras de sangre en algodón

Procedimiento de extracción directa utilizando Aguja Mariposa (solo para aves grandes)	
Item	Propósito
☐ agujas mariposa de calibre 21-25 con tubos de 7 pulgadas	El tamaño de las agujas depende del tamaño de las especies
☐ Soportes para tubos de recolección de sangre.	Pueden ser usados múltiples veces
☐ Tubos de vacío con heparina de litio de 6 mL (Vacutainers® de tapa verde)	Para análisis de contaminantes
☐ Tubos de vacío estériles de 6 mL (e.g. Vacutainers®)	Para análisis de isótopos estables
☐ Sobres de papel pequeños	Para guardar muestras de sangre en algodón

Procedimiento de punción	
Item	Propósito
☐ Agujas hipodérmicas de calibre 22-25 (para aves grandes)	Needle sizes will be species dependent. In general, 22-25 gauge for large birds and 26-27 for smaller birds
☐ Tubos capilares microhematocritos heparinizados	For contaminant analyses
☐ Tubos capilares microhematocritos esteriles	For stable isotope analyses
☐ Sellador para capilares: Critocaps™ o Critoseal™	For sealing capillary tubes
☐ Vacutainer de archivo de 6 mL (Vacutainers®)	For storage of sealed capillary tubes

For Whatman® Card Storage	
Item	Purpose
☐ Tarjeta Whatman® Proteinsaver	Recolectar la muestra de sangre
☐ Paquetes de silica gel	Para mantener secas las tarjetas Whatman®
☐ Calipers	Para medir la cantidad de sangre en tubos capilares antes de depositarla en las tarjetas Whatman®
☐ Bolsas Ziploc® tipo sándwich	Para guardar las tarjetas Whatman®
☐ Vacutainer de archivo de 6 mL (Vacutainers®)	Para guardar los capilares sellados

1.2 Procedimiento de Extracción Directa Utilizando una Jeringa Manual (SOLO para Aves Grandes)

Normalmente, se recogen de 1 a 10 mL de sangre completa de aves más grandes. Se debe recoger un mínimo de 0.5 mL para el análisis de mercurio. Con fines de archivo, BRI recomienda la recolección de 1 mL, lo cual puede ser útil para análisis adicionales de contaminantes.

Siga este procedimiento:

1. Determine el volumen de sangre a recolectar según el peso y los análisis requeridos.
2. Determine el tamaño de aguja adecuado para la especie.
3. Coloque los suministros de muestreo en una superficie limpia y nivelada y al alcance de la mano (incluyendo extras de agujas, tubos, algodón, etc.).
4. Generalmente, se requiere una segunda persona para sostener al ave de manera segura en una posición que a) restrinja el movimiento y proteja contra lesiones (al ave y/o al equipo de muestreo) y b) permita al recolector de sangre acceder cómodamente a la vena elegida. Para algunas especies, una capucha u otro tipo de cobertura en la cabeza puede ayudar a mantener al ave tranquila y proteger ataques con el pico.
5. Localice la vena deseada. Este método se puede utilizar para extracciones de sangre de la vena yugular, subcutánea ulnar o metatarsiana.
 - Vena yugular: ubicada sobre el hombro, cerca de la parte frontal del cuello.
 - Vena ulnar: ubicada en la articulación del codo en la parte inferior del ala.
 - Vena metatarsiana: ubicada en el interior de la pierna en la articulación intertarsiana. Esta vena puede ser difícil de ver debido al engrosamiento de la piel en la pierna.
6. Esterilice el área de recolección con una toallita o spray de alcohol isopropílico.
7. Destape la aguja.
8. Después de que el alcohol se haya evaporado, inserte la aguja paralela a la vena con el bisel hacia arriba.
 - Vena yugular: inserte la aguja de arriba hacia abajo, acercándose desde la cabeza con la aguja apuntando hacia el cuerpo.
 - Vena ulnar: inserte la aguja de afuera hacia adentro, apuntando hacia el cuerpo.
 - Vena metatarsiana: inserte la aguja de abajo hacia arriba, acercándose desde el pie con la aguja apuntando hacia el cuerpo.
9. Extraiga la cantidad de sangre completa calculada en el paso 1 (Figura 1). Nota: si el flujo de sangre se ralentiza o se detiene, intente ajustar suavemente el ángulo de la aguja; a menudo, inclinarla ligeramente hacia abajo mueve el bisel de la aguja fuera de la pared de la vena y restablece el flujo de sangre.
10. Retire suavemente la aguja de la vena y presione el área de recolección con un algodón o gasa nueva hasta que la hemorragia se detenga (~10 segundos).

11. Si utiliza tarjetas Whatman®, use la jeringa para llenar parcialmente uno o más tubos capilares y siga los pasos en la Sección 1.5 Procedimiento de Almacenamiento de Sangre en Tarjetas Whatman® antes de continuar con el Paso 12.
12. Inyecte la sangre extraída en los tubos Vacutainer® heparinizados con tapa verde de litio o en tubos Vacutainer® estériles según el análisis deseado (ver Sección 4.0 Tablas de Procedimientos).

IMPORTANTE

Evite llenar los tubos Vacutainer® completamente, ya que la tapa puede salir bajo presión. BRI recomienda llenar los Vacutainer® entre la mitad (1/2) y dos tercios (2/3) de su capacidad

13. Etiquete cada tubo Vacutainer® con la metadata adecuada utilizando un marcador permanente, siguiendo las pautas de la Sección 5.0 Requisitos de Metadata.
14. Coloque la almohadilla de algodón utilizada para detener el sangrado en el sitio de punción dentro del sobre de papel pequeño y etiquete el sobre cómo se describe en la Sección 5.0 Requisitos de Metadata.
15. Almacene las muestras de sangre en un enfriador con paquetes de hielo inmediatamente en el campo y transfíralas a un congelador dentro de las 24 horas posteriores a la recolección (ver Sección 6.0 Almacenamiento de Muestras).
16. Deseche las agujas usadas y el exceso de envoltorios en un contenedor para objetos punzantes.

IMPORTANTE

Todas las muestras DEBEN tener un número de identificación único (I.D. #) que esté etiquetado correctamente



Figura 1. Extracción de sangre con aguja mariposa desde una jeringa.



Figura 2. Llenando los círculos de la tarjeta sanguínea Whatman con un tubo capilar lleno.

1.3 Procedimiento de Extracción Directa Utilizando una Aguja Mariposa (SOLO para Aves Grandes)

Siga este procedimiento:

1. Determine el volumen de sangre a recolectar según el peso y los análisis requeridos.
2. Determine el tamaño de aguja adecuado para la especie.
3. Coloque los suministros de muestreo en una superficie limpia y nivelada y al alcance de la mano (incluyendo extras de agujas, tubos, algodón, etc.).
4. Conecte la aguja mariposa al soporte del tubo de recolección de sangre.
5. Localice la vena deseada, ya sea la vena ulnar subcutánea o la vena metatarsiana, y esterilice el área de extracción usando una toallita o spray de alcohol.
6. Después de que el alcohol se haya evaporado, retire la cubierta de plástico en el extremo de mariposa de la aguja.
7. Sosteniendo la aguja en línea con la vena, con el bisel hacia arriba (alejado del hueso), penetre la piel e ingrese en la vena en un movimiento suave. Ingrese a la vena de manera que la punta de la aguja esté orientada hacia el ave

IMPORTANTE: no atraviese ambas paredes de la vena, solo la superior. Debería comenzar a entrar una pequeña cantidad de sangre en el tubo de la aguja mariposa.

8. Sosteniendo el barril de manera segura, conecte un Vacutainer® de heparina de litio (tapa verde) o Vacutainer® estéril de sangre (dependiendo del análisis deseado, ver 4.0 Tablas de Procedimientos), con el extremo grande del barril penetrando el tapón con la aguja recubierta de goma. La sangre debería fluir hacia el Vacutainer®. Nota: si el flujo de sangre se ralentiza o se detiene, intente ajustar suavemente el ángulo de la aguja; a menudo, mover el bisel de la aguja ligeramente hacia abajo lo aleja de la pared de la vena y restaura el flujo.
9. Cuando el Vacutainer® esté lleno hasta la cantidad deseada, retírelo del barril e invierta suavemente el tubo varias veces para asegurar que la sangre se mezcle con la heparina (Figura 3).
10. Cuando todos los Vacutainer® se hayan llenado y retirado del barril, sostenga una almohadilla de algodón sobre la aguja y retire suavemente la aguja de la vena suavemente.
11. Aplique presión en el punto de punción con la almohadilla de algodón hasta que se detenga el sangrado.
12. Utilice la sangre en el tubo de la aguja mariposa para llenar cuatro tubos capilares. Selle los tubos capilares con Critoseal® o Critocaps® y colóquelos en un Vacutainer® de archivo de 6 mL.

IMPORTANTE: Si utiliza tarjetas Whatman, seleccione uno de los tubos capilares y siga los pasos de la Sección 1.5 Procedimiento de Almacenamiento de Sangre en Tarjetas Whatman antes de continuar con el paso 13.

13. Etiquete adecuadamente todos los Vacutainer® con los metadatos apropiados utilizando un marcador permanente (ver 5.0 Requisitos de Metadatos).
14. Coloque la almohadilla de algodón en un sobre de papel pequeño y etiquete el sobre según se describe en la sección 5.0.
15. Almacene las muestras de sangre en una nevera con paquetes de hielo inmediatamente en el campo y transfíralas a un congelador dentro de las 24 horas posteriores a la recolección (ver 6.0 Almacenamiento de Muestras).
16. Deseche las agujas usadas y el envoltorio excedente en un contenedor de objetos punzantes.

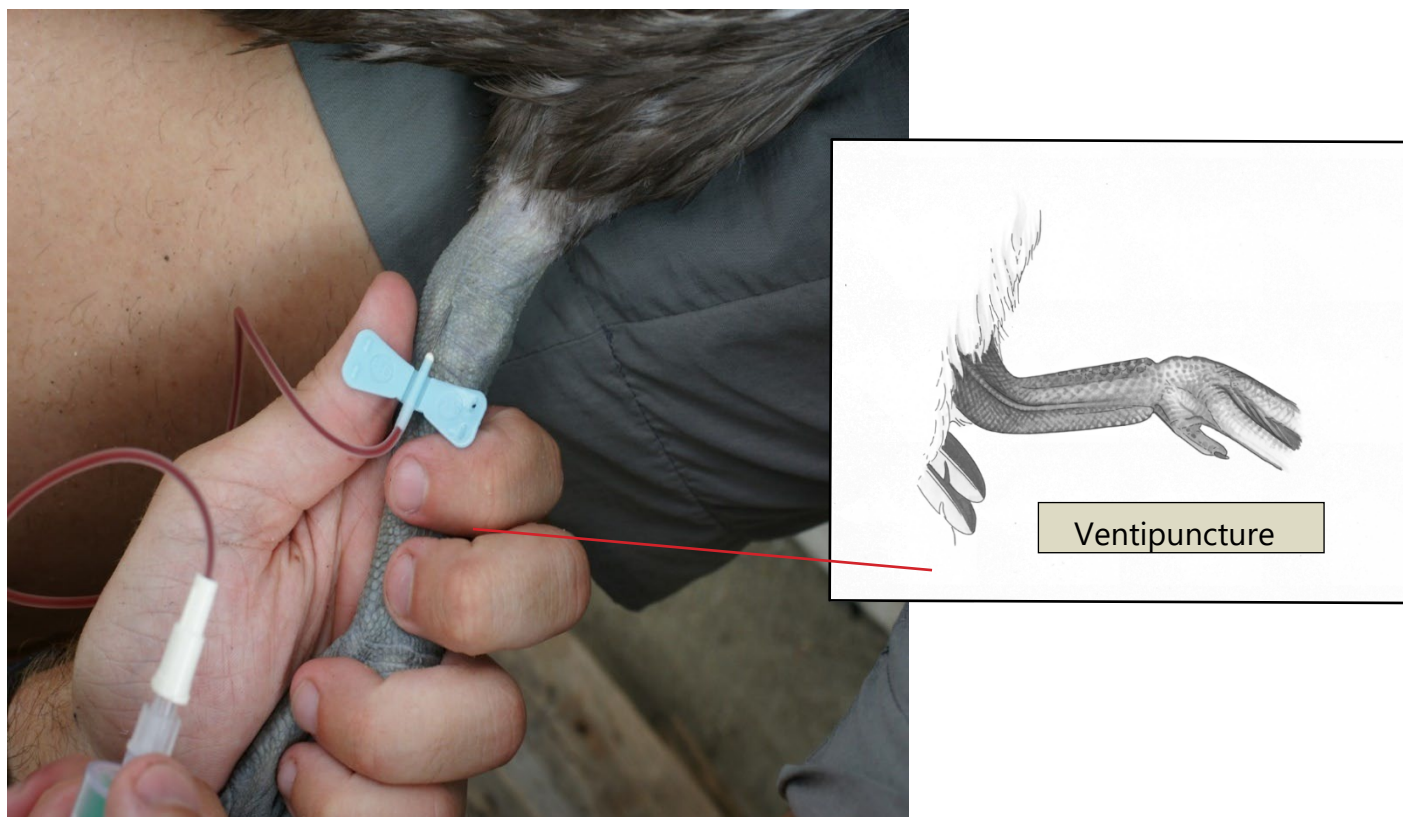


Figura 3. Extracción de sangre con aguja mariposa en un vacutainer desde la vena metatarsiana. Primer plano de la ilustración de la ubicación de la venopunción en la vena metatarsiana (inserto).

1.4 Procedimiento de Punción

Siga este procedimiento:

1. Determine el volumen de sangre a recolectar según el peso y los análisis requeridos.
2. Determine el tamaño de aguja adecuado para la especie.
3. Coloque los suministros de muestreo en una superficie limpia y nivelada y al alcance de la mano (incluyendo extras de agujas, tubos, algodón, etc.).
4. Para aves más pequeñas, la persona que toma la muestra de sangre puede sostener el ave en su mano no dominante, exponiendo la parte inferior del ave, de manera similar al agarre de un ave para anillar. El índice y el dedo medio se pueden usar para extender y mantener el ala abierta, pellizcando en la articulación carpiana para exponer la vena ulnar cutánea. Para aves más grandes, una segunda persona puede sostener el ave de forma segura con una mano y extender el ala con la otra.

IMPORTANTE:

Asegúrese de que el agarre del ave y del ala sea lo suficientemente firme para que no pueda mover el ala durante el muestreo.

5. Separe las plumas para localizar la vena ulnar cutánea en el ala (Figura 4 y 5). Nota: si la vena aparece pequeña y/o constreñida, aplicar presión suave sobre la vena por encima del sitio de punción (proximal al cuerpo) puede elevar y aumentar el tamaño de la vena, facilitando la punción.
6. Esteriliza el área de punción con una toallita de alcohol isopropílico y asegúrate de que el área de recolección esté libre de plumas, ya que estas coagularán la sangre rápidamente.
7. Destape la aguja.
8. Después de que el alcohol se haya evaporado, pinche la vena con la aguja, entrando suavemente en paralelo a la vena. No atraviese ambas paredes de la vena, solo la superior. Nota: si el alcohol no se ha evaporado completamente, este ayuda a dispersar la sangre dificultando la recolección.
9. Saque suavemente la aguja de la vena y permita que la sangre se acumule (generalmente ocurre muy rápidamente).
10. Recolecte la sangre colocando un tubo capilar con heparina de litio o estéril (dependiendo del análisis deseado, ver 4.0 Tablas de Procedimientos) debajo de la sangre acumulada. Sosteniendo el tubo en un ángulo descendente se facilitará que la sangre sea aspirada más fácilmente en el tubo mediante la acción capilar.
11. Colecte el número de capilares con base en el paso 1, llenando cada tubo capilar al menos hasta la mitad, pero no más del $\frac{3}{4}$ de su capacidad.

IMPORTANTE:

Observe cuidadosamente el progreso de la sangre en el tubo. Algunos se llenarán muy rápidamente y deberán ser reemplazados de inmediato, mientras que otros se llenarán muy lentamente, lo que requerirá mano firme y paciencia. Si la sangre deja de fluir hacia el tubo, puede intentar doblar y/o flexionar suavemente el ala para estimular el flujo de sangre. Nota: si el ave se encuentra en buen estado, se puede tomar sangre adicional de la otra ala si el flujo de sangre se detiene antes de alcanzar el volumen de muestra requerido.

12. Mantenga una bola de algodón fresca en el área de recolección hasta que se detenga el sangrado (aproximadamente 10 segundos).
13. Si está utilizando tarjetas Whatman, continúe con la sección 1.5, de lo contrario continúe con el paso 14.
14. Selle los tubos capilares utilizando arcilla selladora u otro tipo de cierre (Critoseal® o Critocaps®)
15. Colóquelos en un Vacutainer® de archivo de 6 mL. y etiquete adecuadamente todos los Vacutainer® con los metadatos apropiados utilizando un marcador permanente (ver 5.0 Requisitos de Metadatos).
16. Guarde las muestras de sangre en tubos capilares en una nevera con paquetes de hielo inmediatamente en el campo y transfíralas a un congelador dentro de las 24 horas posteriores a la recolección (ver Sección 6.0 Almacenamiento de Muestras).
17. Deseche las agujas usadas y los envoltorios sobrantes en un contenedor para objetos punzocortantes (Sharps container).

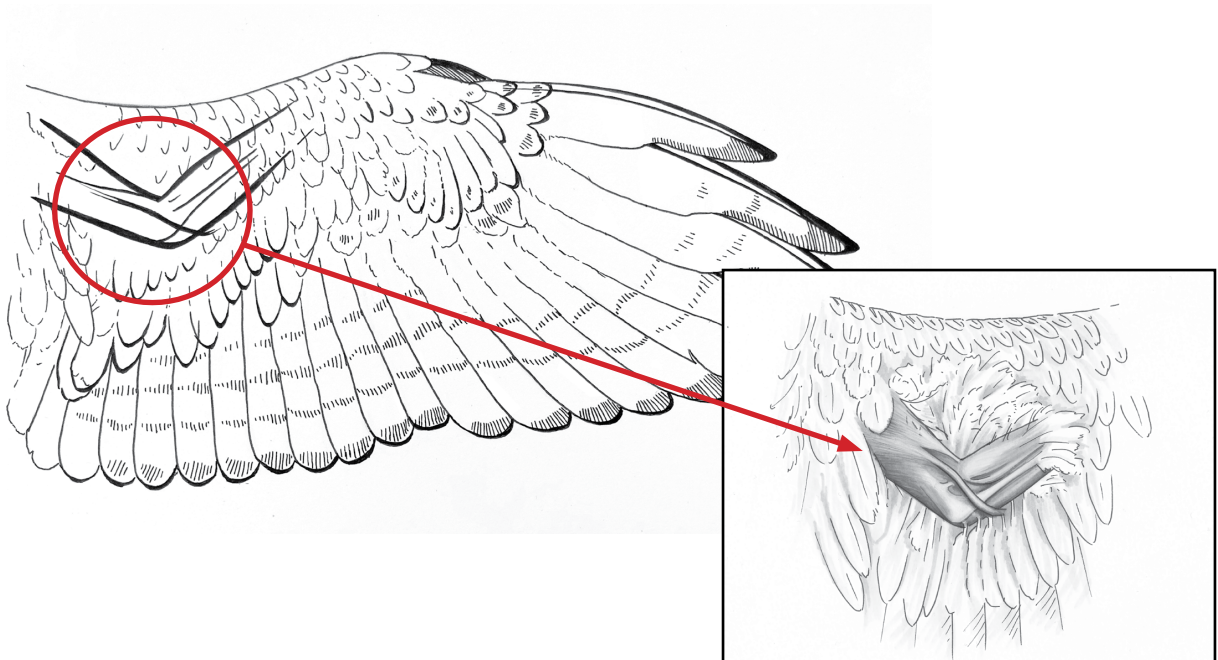


Figura 4. Ilustración de la vena ulnar cutánea y acercamiento del sitio de venopunción (recuadro).



Figura 5. Formación de una "gota" de sangre tras la punción de la vena ulnar subcutánea. El ave se sostiene con una modificación del agarre de anillador por parte de quien toma la muestra de sangre.



Figura 6. Acercamiento a la vena ulnar subcutánea de un chorlo llanero, sosteniendo la aguja paralela a la vena y con el bisel hacia arriba. El área ha sido despejada de plumas y esterilizada con alcohol.

1.5 Procedimiento de Almacenamiento de Sangre en Tarjetas Whatman®

1. Use un calibrador para medir la cantidad de sangre en el tubo capilar en milímetros.
Registre este valor.
2. Utilice el tubo capilar para saturar un círculo en la tarjeta Whatman® proteinsaver (Fig 7).



Figura 7. Llenado de los círculos de la tarjeta Whatman® Proteinsaver con sangre de un tubo capilar.

3. Si utiliza un tubo capilar para llenar dos círculos, mida la cantidad de sangre restante en el tubo después de llenar el primer círculo antes de llenar el segundo. Registre este valor.
4. Deje que la tarjeta Whatman® se seque al aire antes de etiquetarla con los metadatos correspondientes (ver Sección 5.0 Requisitos de Metadatos), incluyendo la cantidad de sangre depositada en cada círculo, utilizando un marcador permanente (Figura 8).
5. Almacene la tarjeta en una bolsa plástica con paquetes desecantes.

Cálculo del volumen de sangre (μL) a partir de mediciones con calibrador:

- -Para un tubo capilar de 70 μL y 75 mm, multiplique la medición del calibrador por un factor de conversión de 0.933 μL/mm para calcular el volumen de sangre en microlitros (μL).
- -Si dos círculos fueron llenados con un solo tubo, calcule la cantidad de sangre depositada en el primer círculo restando la cantidad registrada en el paso 3 del valor inicial registrado en el paso 1 y luego multiplicando por 0.933 μL/mm.

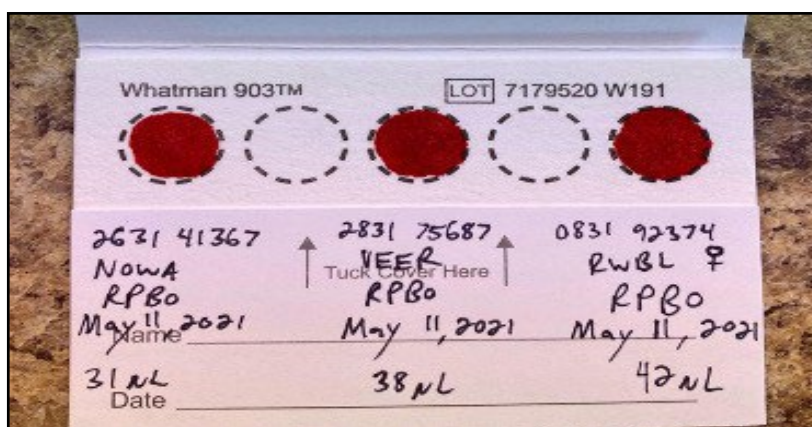


Figura 8. Tarjeta Whatman® completada con los metadatos correspondientes: ID único #, código de especie, código de ubicación, fecha y volumen de sangre

2. Colección de Plumas

La colección de muestras de plumas es útil para identificar la carga corporal de metales pesados, como el mercurio, porque el metilmercurio generalmente se transfiere a las plumas durante su crecimiento (Evers, 2018). La recolección simétrica de dos plumas es útil para medir la asimetría fluctuante. Las plumas también se analizan comúnmente para isótopos estables, lo que proporciona información sobre los orígenes de nacimiento o muda, el nivel trófico y los hábitos dietéticos. Dado que diferentes plumas pueden ser mudadas y regeneradas en diferentes momentos del año, los objetivos del estudio deben informar la selección de plumas.

Cualquier pluma puede analizarse en busca de mercurio, pero las plumas secundarias de vuelo, las plumas de la cola (rectrices), las plumas de la espalda y las plumas del costado son estándares útiles según la especie objetivo.

- Para aves más grandes, como las aves marinas, BRI generalmente recolecta dos plumas secundarias (S2), dos plumas exteriores de la cola (rectrices, R6) y 10 plumas del costado, siempre que sea posible (Figura 8).
- Para rapaces migratorias y paseriformes, la extracción de plumas de vuelo puede tener un impacto negativo en la eficiencia del vuelo, especialmente durante la migración, por lo que solo deben recolectarse las rectrices y las plumas del costado en estos taxones.
- Las plumas de la espalda también se muestrean comúnmente de rapaces porque las diferencias en el desgaste y la edad de las plumas son relativamente conspicuas.
- Las plumas del costado son especialmente útiles al realizar análisis retrospectivos de concentraciones de metilmercurio en especímenes de museo, ya que los curadores de museos generalmente no aprueban la extracción de plumas de vuelo y cola.

Dado que las concentraciones de metilmercurio comprenden el 95% o más del mercurio total en las plumas, el análisis de mercurio total, en lugar de metilmercurio, generalmente es suficiente para evaluar la exposición y el riesgo al mercurio (Evers, 2018). Sin embargo, las plumas de especímenes de museo probablemente estén comprometidas por conservantes a base de mercurio que los curadores de museos usan habitualmente. Para evitar esta interferencia por contaminación externa con mercurio, todas las plumas de los especímenes de museo deben analizarse para determinar las concentraciones de metilmercurio (Perkins et al., 2019).

Para determinar la ubicación de la segunda pluma secundaria (S2), examina dónde se encuentran las primarias y secundarias en el centro del ala (si es difícil determinarlo, la mayoría de las aves tienen 10 primarias, los zambullidores tienen 11 y los pájaros cantores tienen 9 o 10). En aves más grandes, corta la pluma S2 de cada ala (es decir, dos plumas en total) a lo largo del cálamo (eje) por encima del ombligo superior (Figura 9).

Para algunas especies, puede no ser factible o recomendado recolectar segundas plumas secundarias, por lo que se recomienda la colección simétrica de plumas exteriores de la cola (R6). Las plumas R6 y laterales pueden recolectarse arrancándolas para los pájaros cantores. Para aves más grandes, es posible que sea necesario cortar las plumas R6.

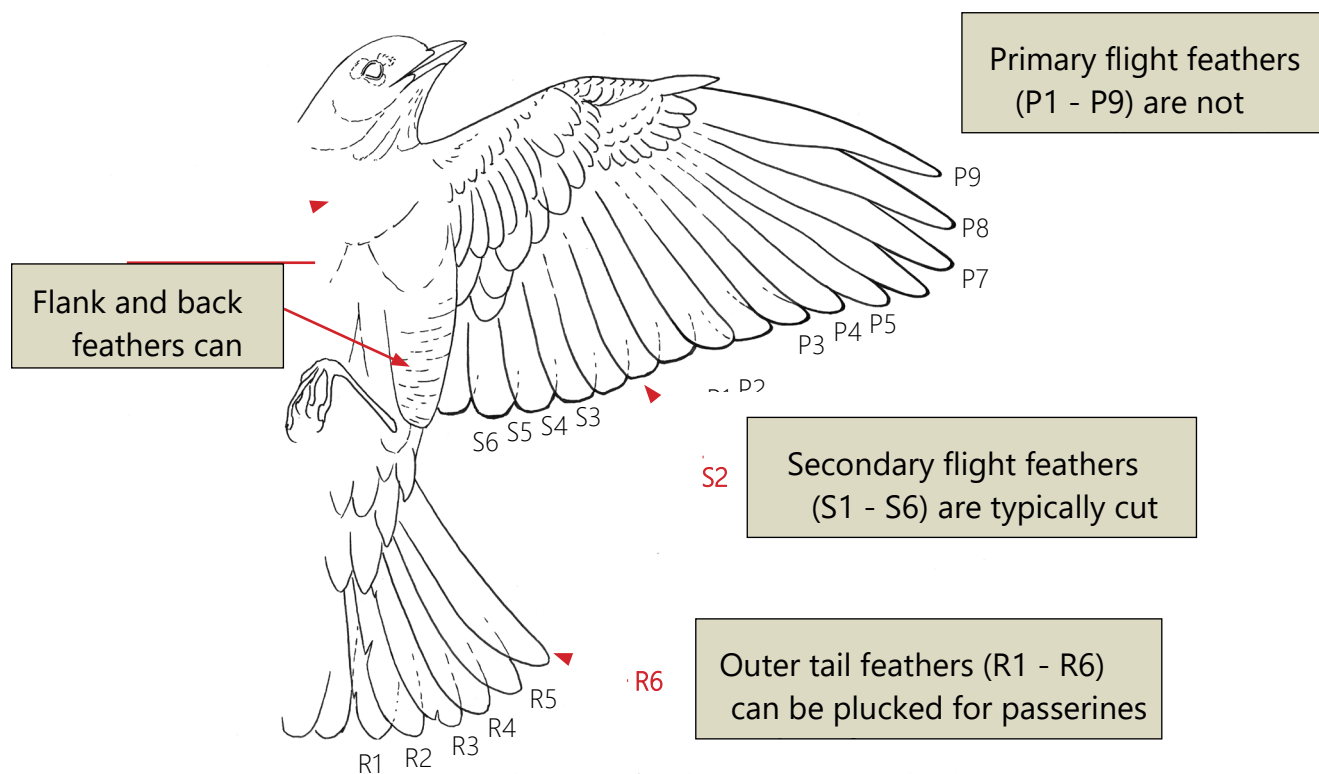


Figura 9. Ilustración de las ubicaciones estandarizadas para la recolección de plumas en un pájaro paseriforme típico.

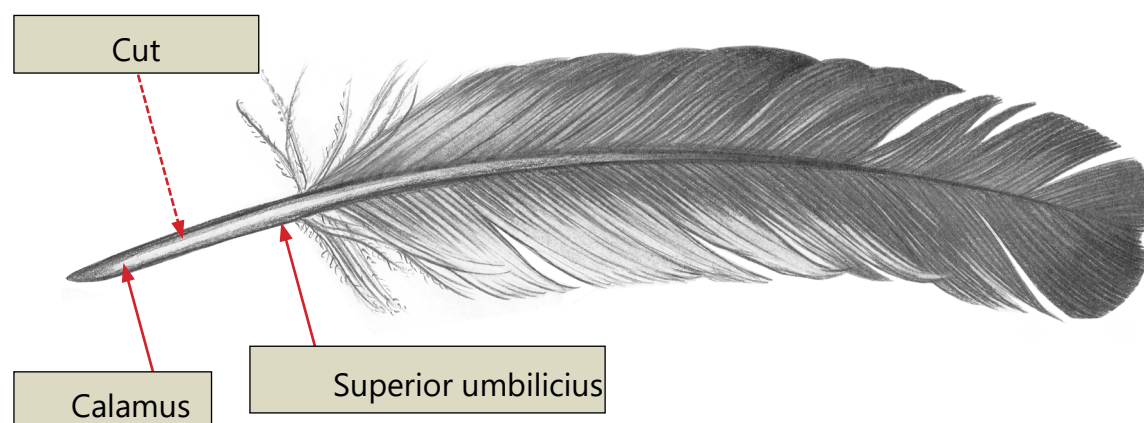


Figura 10. Recorte estandarizado de las plumas secundarias de vuelo en el campo.

Para arrancar las plumas, pellizca el cálamo firmemente, relativamente cerca de la base, y tira suavemente hacia afuera de la piel. Coloca muestras de diferentes tipos de plumas en sobres pequeños separados y etiqueta con metadatos apropiados usando un marcador permanente (ver 5.0 Requisitos de Metadatos).

2.1 Suministros para la recolección de plumas:

- ☐ Alicates de corte pequeños
- ☐ Sobres de papel para monedas de 3 ⅜" x 6"
- ☐ Rotulador permanente Ultra-fino Sharpie™
- ☐ Bolsas de plástico Ziploc™ tamaño sándwich

3. Colección de Huevos

La recolección de muestras de huevos para análisis de contaminantes, especialmente mercurio, es útil para identificar la carga corporal de las hembras, ya que el metilmercurio puede ser transferido a los huevos en desarrollo durante el período de puesta (Heinz et al., 2010).

Procedimiento para recolectar huevos:

Los huevos enteros se recolectan a menudo cuando se tiene certeza de que han fallado. Si el huevo está frío o tiene mal olor, márcalo con una "X" usando un marcador permanente.

Regresa al día siguiente. Si la "X" está en la misma posición en que la dejaste el día anterior, lo que indica que el huevo no ha sido volteado en 24 horas, recolecta el huevo.

Etiqueta una ficha impermeable con los metadatos correspondientes (ver 5.0 Requisitos de Metadatos) y colócala con el huevo dentro de una bolsa plástica.

Mientras estés en el campo, almacena las muestras de huevos en una nevera con paquetes de hielo y luego transfírelas a un refrigerador o congelador tan pronto como sea posible (ver 6.0 Almacenamiento de Muestras). Para el manejo de huevos inviables sigue los mismos procedimientos que los huevos viables.

3.1 Suministros para la Colección de Huevos

- ☐ Bolsas de plástico tamaño sándwich Ziploc™
- ☐ Etiquetas de muestra impermeables (por ejemplo, páginas Rite-in-the Rain™)
- ☐ Marcador permanente Ultra-fino Sharpie™

4. Tablas de Procedimientos

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

Tejido Deseado	Método de recolección	Grupos Taxonómicos Específicos	Recipiente	Cantidad Mínima	Almacenamiento
Sangre	Extracción directa	Aves acuáticas, Rapaces	Vacutainer con heparina de litio	0.5 mL	Congelador
			Tarjeta Whatman	1 Tarjeta	Refrigerador o temperatura ambiente
	Punción	Todos los grupos	Capilar con heparina de litio	0.4 µL	Congelador
			Tarjeta Whatman	1 Tarjeta	Refrigerador o temperatura ambiente
Plumas Secundarias (S2)	Recortadas	Aves acuáticas	Sobre de papel para monedas	2 plumas simétricas	Congelador
Plumas de la cola (R6)	Recortadas	Aves acuáticas	Sobre de papel para monedas	2 plumas simétricas	Refrigerador o temperatura ambiente
	Arrancadas	Aves cantoras	Sobre de papel para monedas	2 plumas simétricas	Refrigerador o temperatura ambiente
Plumas del flanco	Arrancadas	Todos los grupos	Sobre de papel para monedas	5 plumas	Refrigerador o temperatura ambiente
Plumas de la espalda	Arrancadas	Rapaces	Sobre de papel para monedas	5 plumas	Refrigerador o temperatura ambiente
Huevos	NA	Todos los grupos	Bolsa Ziplog	1 huevo	Congelador

Recolección de Tejidos para Análisis de Mercurio

Tabla 2. Diagrama de flujo del procedimiento para el muestreo de tejidos para el análisis de isótopos estables. La selección de tejidos depende del(los) grupo(s) taxonómico(s) focal(es) y del(los) objetivo(s) de investigación.

Tejido Deseado	Método de recolección	Grupos Taxonómicos Específicos	Recipiente	Cantidad Mínima	Almacenamiento
Sangre	Extracción directa	Aves acuáticas, Rapaces	Vacutainer estéril	0.5 mL	Congelador
			Tarjeta Whatman	1 Tarjeta	Refrigerador o temperatura ambiente
	Punción	Todos los grupos	Tubo Capilar estéril	0.4 µL	Congelador
			Tarjeta Whatman	1 Tarjeta	Refrigerador o temperatura ambiente
Plumas Secundarias (S2)	Recortadas	Aves acuáticas	Sobre de papel para monedas	2 plumas simétricas	Congelador
Plumas de la cola (R6)	Recortadas	Aves acuáticas, Rapaces	Sobre de papel para monedas	2 plumas simétricas	Refrigerador o temperatura ambiente
	Arrancadas	Aves cantoras	Sobre de papel para monedas	2 plumas simétricas	Refrigerador o temperatura ambiente
Plumas del flanco	Arrancadas	Todos los grupos	Sobre de papel para monedas	5 plumas	Refrigerador o temperatura ambiente
Plumas de la espalda	Arrancadas	Rapaces	Sobre de papel para monedas	5 plumas	Refrigerador o temperatura ambiente
Huevos	NA	Todos los grupos	Bolsa Zipplog	1 huevo	Congelador

5. Requisitos de Metadatos

Por favor, imprima claramente la siguiente información y péguela en cada tubo, sobre de papel moneda o etiqueta de muestra utilizando un marcador permanente:

- ☐ Número del anillo, si aplica, u otro ID # de identificación
- ☐ Nombre común de la especie o código estándar de la especie (incluya también el nombre científico si la recolección se realiza fuera de los Estados Unidos). Sería útil actualizar los nombres taxonómicos de acuerdo con la lista de eBird/Clements:
[\(https://www.birds.cornell.edu/clementschecklist/introduction/updateindex/october-2023/download/\)](https://www.birds.cornell.edu/clementschecklist/introduction/updateindex/october-2023/download/)
- ☐ Fecha (utilice letras para el mes en lugar de números, por ejemplo, Mar 11, 2021)
- ☐ Nombre del lugar de muestreo, estado o provincia y país
- ☐ Tipo de pluma, si aplica
- ☐ Edad y sexo del individuo (por ejemplo, "Después del segundo año, macho"), si aplica

Por favor, organice todos los metadatos utilizando las plantillas preferidas. Puede encontrar más información sobre formularios y presentaciones en el Apéndice.

IMPORTANTE:

Número de identificación para aves sin anillar:

Si un ave no puede ser anillada en el campo, el individuo y la muestra correspondiente deben recibir un número de identificación único (por ejemplo, "Organización-País-SinAnillar0001"), el cual debe estar disponible tanto en el recipiente de la muestra como en las hojas de datos.

Envío de muestras a BRI o TRACE:

Si contribuye con muestras a BRI o a la iniciativa Tropical Research for Avian Conservation and Ecotoxicology (TRACE) para colaboración, por favor envíe, lo antes posible, cualquier dato de anillamiento correspondiente a todas las aves muestreadas como una hoja de cálculo en formato Excel o archivo .csv.

Nuestro sistema preferido para la gestión de datos y anillamiento sigue los estándares de los programas MAPS y MoSI.

6. Almacenamiento de Muestras

- Las muestras de sangre completa en tubos capilares o vacutainers deben almacenarse inmediatamente en una nevera con hielo o paquetes de hielo mientras estén en el campo.

IMPORTANTE:

Las muestras de sangre deben transferirse a un congelador **LO ANTES POSIBLE**, o dentro de las 24 horas posteriores a la recolección, y deben permanecer congeladas hasta su análisis. Aunque los metales pesados, como el mercurio, son estables en sangre, congelar las muestras previene la degradación de la sangre.

- Las manchas de sangre seca en tarjetas Whatman deben almacenarse con un paquete desecante dentro de bolsas plásticas selladas por separado (para reducir la influencia de la humedad). Idealmente, estas deben guardarse en un refrigerador a 4°C (para prevenir la formación de moho), aunque también pueden almacenarse a temperatura ambiente, alejadas de la luz solar directa, antes del envío y análisis.

7. Envío de Muestras

Si está enviando muestras a BRI o a la Iniciativa TRACE para colaboración, ¡gracias por contribuir! Al menos dos semanas antes de enviar cualquier muestra, complete el formulario de envío de metadatos para permitir suficiente tiempo para que BRI presente los permisos adecuados. BRI enviará un formulario USFWS 3-177, USFWS MBTA y un permiso USDA 16-3 VS completados por correo electrónico una vez que los permisos hayan sido emitidos. Después de que se hayan aprobado todos los demás permisos (ver 7.1. Permisos Requeridos), programe un envío con el servicio de mensajería de su elección.

Para empacar las muestras de tejido:

- Utilice una nevera pequeña para asegurar y aislar todas las muestras de sangre y huevos durante el envío.
- Coloque ice packs o hielo dentro de la nevera para aislar la sangre y los huevos congelados.
- Si los viales de archivo son de vidrio, o si se incluyen muestras de huevo en el envío, es **IMPORTANTE** acolchar las muestras con burbujas o papel periódico dentro de la nevera para evitar roturas.
- Las plumas y las manchas secas de sangre en tarjetas Whatman no necesitan un embalaje especial y no es necesario mantenerlas frías (si se envían dentro de 3–4 meses después de la recolección).
- Coloque la nevera en una caja de cartón y llene el espacio vacío con materiales de embalaje adicionales, como burbujas o papel periódico, para asegurar la nevera durante el envío.
- Incluya un juego de todos los permisos y formularios necesarios en la parte superior del material de embalaje antes de sellar el paquete con cinta adhesiva (ver 7.1. Permisos Requeridos).

Recolección de Tejidos para Análisis de Mercurio

- Adjunte una segunda copia de los permisos en una bolsa de plástico en el exterior del paquete.

IMPORTANTE: Para evitar retrasos postales o aduaneros, las muestras deben enviarse un lunes o martes, y nunca justo antes de un feriado federal. Cuando le pregunten al representante de envío si está enviando algo perecedero, ¡responda "NO!"

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

7.1 Permisos Requeridos

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

- Una copia del permiso federal de anillado de aves del colector.
- Una copia del permiso estatal de recolección científica del colector.
- Una copia del permiso de importación del USDA del importador (no es necesario si las muestras fueron recolectadas dentro de los Estados Unidos).

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 3-177 del USFWS (Declaración de importación o exportación de peces o vida silvestre).
- Una copia de los permisos federales y provinciales de anillado de aves y recolección científica del colector, según sea necesario.
- Declaración de Envíos Biológicos de FedEx.*
- Factura Comercial de FedEx.
- Permiso de exportación CITES, si es aplicable.
- Una copia del permiso de exportación del país de origen, si es aplicable.

*Formularios proporcionados por BRI por correo electrónico.

IMPORTANTE:

Los envíos que lleguen a los Estados Unidos pueden ser denegados, destruidos o devueltos si no incluyen los permisos apropiados. Para preguntas adicionales o aclaraciones, o si está interesado en colaborar, no dude en ponerse en contacto con BRI por teléfono, correo electrónico o visitándonos en nuestro sitio web:

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

Kevin Regan, M.S.
TRACE Project Manager/International Bird Mercury
Lead Kevin.regan@briwildlife.org
Biodiversity Research Institute | Portland, ME USA
+1 (207) 839-7600
bri@briloon.org
www.briloon.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>
- 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
- Fair JM, Paul E, Jones J (eds) (2010) *Guidelines to the use of wild birds in research*, third edition. Ornithological Council. Washington, DC
- Heinz GH, Hoffman DJ, Klimstra JD, Stebbins KR (2010) Predicting mercury concentrations in mallard eggs from mercury in the diet or blood of adult females and from duckling down feathers. *Environ Toxicol Chem* 29:389–392. <https://doi.org/10.1002/etc.50>
- McGuill MW, Rowan AN (1989) Biological Effects of Blood Loss: Implications for Sampling Volumes and Techniques. *ILAR J* 31:5–20. <https://doi.org/10.1093/ilar.31.4.5>
- Perkins M, Basu N (2018) Dried blood spots for estimating mercury exposure in birds.

Environ Pollut 236:236– 246. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.036>

- 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 songbirds. *Ecotoxicology* 29:1161–1173. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02054-w>