

CAPÍTULO 6. PROCEDIMIENTOS MENORES DE MANIPULACION

A. Antecedentes

En las últimas dos décadas, el surgimiento en la ornitología de la inmunología, la endocrinología, y la genética ha incrementado la necesidad para la colecta de sangre y otros fluidos, plumas y tejidos de las aves. Las nuevas tecnologías y métodos facilitan resolver las dudas sobre cada aspecto de la vida de las aves utilizando información obtenida de muestras tomadas de aves silvestres. La mayoría de estos procedimientos tales como la inyección experimental de implantes de hormonas y medicamentos, la reproducción de vocalizaciones grabadas, y la utilización de señuelos han sido por mucho tiempo herramientas fundamentales para los ornitólogos y se consideran manipulaciones menores en aves. Las manipulaciones menores son procedimientos que se consideran menos invasivas que la cirugía y la administración de anestesia. Sin embargo el término “menores” se refiere a la naturaleza de la manipulación y no a los impactos potenciales. Todos los procedimientos que se discuten en esta sección tienen el potencial de tener impactos serios, incluyendo la muerte.

Existe un número de temas subyacentes para cada uno de los procedimientos que se discuten. Primero, cada técnica o procedimiento debe ser apropiado para la investigación y metas científicas. Segundo, existe la necesidad de entrenar y/o practicar con estas técnicas y el entrenamiento debe ser documentado. Tercero, en muchos casos se necesita de supervisión veterinaria, y por último, los permisos y aprobaciones necesarias deben de ser obtenidos antes del inicio de la investigación.

Si estas actividades involucran la manipulación del ave, se requiere de permisos federales (y generalmente estatales); para especies en peligro se necesitan permisos incluso cuando las aves no vayan a ser manipuladas (vea la Introducción y el sitio de internet de [Permisos del Consejo de Ornitología](#)). Se requiere la presentación del protocolo de investigación para su aprobación por un Comité Institucional de Cuidado y Uso Animal (IACUC), para todos los procedimientos aquí descritos.

Para todos los procedimientos que se tratan aquí, el tiempo de manipulación debe de ser el mínimo, especialmente con aves en reproducción. Si se necesitan rutinariamente periodos mayores a unos cuantos minutos, como cuando el muestreo es complejo, entonces se necesita una justificación en el protocolo presentado al IACUC y este debe de ser apropiado para los objetivos científicos. Adicionalmente los investigadores deben de estar preparados para realizar la eutanasia a las aves que sean lesionadas durante el proceso de manipulación y muestreo, y que no puedan ser llevadas de inmediato al veterinario (o a

algún centro de rehabilitación animal acreditado) y tengan una lesión severa tal, que en comparación a una lesión humana, ocasionaría molestia y dolor considerables (vea la sección en Manipulaciones Mayores sobre los métodos apropiados de eutanasia). El protocolo al IACUC debe describir los métodos de eutanasia que se utilizarían de ser necesarios.

B. Aves silvestres estudiadas en cautiverio

Muchos estudios que implican manipulaciones menores pueden ser hechos en campo, pero otros requieren que las aves silvestres sean sujetas a cautiverio. Las aves silvestres utilizadas en estudios en cautiverio deben de estar tan saludables y tan libres de trauma como sea posible cuando son introducidas inicialmente. Los investigadores deben determinar las condiciones de alimentación y alojamiento apropiadas, y deben de incluir las necesidades sociales y de comportamiento de las aves (vea sección en Alojamiento y Cautiverio). Se recomienda consultar con otros investigadores o zoológicos que hayan mantenido la misma especie o especies similares en cautiverio. Consulte con la Asociación Americana de Zoológicos y Acuarios (AZAA) los estándares específicos de alojamiento y manejo de la especie. Mantener algunas aves en cautiverio antes de capturar todas las que necesita para el estudio, puede ayudar a determinar sus condiciones específicas. Un periodo de aclimatación al cautiverio permite a las aves adaptarse al nuevo ambiente, y asegurar que los resultados de su estudio no sean afectados por el estrés resultante de la captura y cautiverio. También da tiempo al investigador de identificar y abordar temas de salubridad que emerjan durante el periodo de adaptación. Los estudios demuestran que las paseriformes requieren de tres a cuatro semanas para adaptarse al cautiverio antes de que inicien los experimentos (Cockren, et al. 2008; Hull et al. 2007; Wingfield et al. 1982). La masa corporal generalmente disminuye después de la captura, y los niveles de hormonas metabólicas y reproductivas en plasma son frecuentemente anormales. Wingfield et al. (1982) demostraron que la corticosterona disminuyó después de un periodo de adaptación de dos a tres semanas en los gorriones corona blanca (*Zonotrichia leucophrys*) mantenidos en jaulas pequeñas con otros individuos. Sin embargo, Marra et al (1995) encontraron que los niveles de corticosterona en aves aclimatadas por 35 días se mantuvo alto comparado con los *Zonotrichia* silvestres recientemente capturados. Después de tres a cuatro semanas, la masa corporal regresa los niveles previos a la captura y los niveles de hormona se estabilizan. Se sabe que el estrés por manejo incrementa la hormona de estrés corticosterona (Hull et al. 2007; Cockren et al. 2008), y también que el estrés de manejo puede afectar al sistema inmunológico del playero ártico (*Calidris canutus*) por periodos

cortos de tiempo (Bueler et al. 2008) y afectando principalmente la distribución de glóbulos blancos en el cuerpo (Dhabher 2009).

Las aves mantenidas en cautiverio por periodos prolongados, pueden no ser aptas para liberarse. En muchos casos los permisos y reglamentos federales o estatales prohíben su liberación. Además, la sobrevivencia de las aves puede ser afectada por los cambios en condición corporal y comportamiento que ocurrieron durante el estudio. Por ejemplo, las aves deben de ser mantenidas en jaulas de vuelo para permitir que los músculos del vuelo se ejerciten y deben ser alimentadas con alimentos naturales que imiten las condiciones naturales de forrajeo. Las aves deben de ser liberadas en el mismo tipo de hábitat en el que fueron capturadas. La liberación de aves sujetos de estudios en cautiverio podría plantear un riesgo a las poblaciones silvestres. Todas las aves deben de ser revisadas para enfermedades previo a su liberación, particularmente si fueron alojadas en instalaciones donde se alojaba a otras especies. Si los permisos no permiten la liberación, o si las aves no están en condiciones de ser liberadas, pueden ser mantenidas en cautiverio para otra investigación si las circunstancias lo permiten. De otra manera se requiere que sean sacrificadas. En tal caso, contacte a un museo o colección didáctica para hacer arreglos y donar los especímenes para estudios futuros. Vea el anexo sobre preparación de aves para donación a museos.

C. Colecta de muestras de sangre

Efectos del muestreo en la sobrevivencia y el comportamiento

Los métodos específicos para colecta de muestras de sangre de aves han sido revisados por Morton et al. (1993) y Campbell (1994). Existen muchos recursos disponibles sobre las técnicas apropiadas para la toma de muestras de sangre, incluyendo un [video instructivo](#) demostrando la colecta de sangre, que se encuentra disponible en el National Wildlife Health Center. Sin embargo, las técnicas de colecta de sangre, incluyendo la manera apropiada de sostener el ave, detener una hemorragia, y reducir el estrés, deben de ser aprendidas trabajando directamente con un instructor con experiencia, tal como un veterinario u ornitólogo experimentado. El investigador puede utilizar estas técnicas sin supervisión, solo después de suficientes prácticas bajo la guía de un maestro con experiencia.

Sheldon et al. (2008) proporcionan la revisión de literatura más exhaustiva a la fecha, sobre los efectos potenciales del muestreo de sangre. Existen huecos considerables de información sobre los impactos de la colecta de sangre, tales como los impactos en aves en

desarrollo o aves tropicales. En especies semi-cautivas o libres, la colecta de sangre ha demostrado no tener efectos sobre la sobrevivencia (Raveling 1970; Wingfield y Farner 1976; Bigler et al. 1977; Gowaty y Karlin 1984; Frederick 1986; Dufty 1988; Hoysak y Weatherhead 1991). Brown (1995) encontró que la colecta de muestras de sangre de la vena yugular en polluelos de gaviota de Delaware (*Larus delawarensis*) de 9 días de edad, no tenía efecto en las tasas de sobrevivencia a los 21 días, y la tasa de abandono del nido por los adultos tampoco se vio afectada. Lanctot (1994) determinó que la extracción de hasta 0.05ml de sangre de la vena yugular de polluelos de playerito canela (*Tryngites subruficollis*) en las primeras 24 horas después de la eclosión, no tenía efectos en el crecimiento o en la sobrevivencia al primer vuelo. Más aun, la ocurrencia de hematomas en la yugular de algunos polluelos, no afectó su sobrevivencia. Adicionalmente, Schmoll et al. (2004) encontraron que el muestreo de sangre no afectaba el éxito de los volantones de carbonero garrapinos (*Parus ater*), sin embargo, con polluelos es más importante la deshidratación que la pérdida de sangre, de manera que los investigadores deben proveer fluidos a las aves si es posible. Los líquidos muy calientes o muy fríos pueden conducir a problemas adicionales, tales como estrés por frío o calor. Demasiados fluidos aplicados de manera intravenosa pueden resultar en una reducción muy grande del volumen del hematocrito (la parte de la sangre compuesta de glóbulos rojos) o sólidos totales del plasma (Wicks and Schultz 2008).

No obstante, en un estudio estadísticamente riguroso utilizando comparaciones controladas de golondrina risquera (*Petrochelidon pyrrhonota*) muestreadas y no-muestreadas, Brown y Brown (2009) encontraron que el muestreo reducía la sobrevivencia anual durante el primer año después del muestreo. La sobrevivencia aparente de 2,945 aves muestreadas durante los más de 20 años de estudio se redujo entre un 21% y un 33%, dependiendo de la cantidad de sangre extraída. Las muestras de sangre variaron de un 0.3% a 1.2% de la masa corporal del ave. Las aves no muestreadas incluidas en el análisis de sobrevivencia fueron capturadas y manipuladas en los mismos sitios, al mismo tiempo, y de la misma manera que las aves muestreadas, excepto que no fueron sometidas a un falso muestreo, esto es, no fueron sostenidas en la postura en la que se sangra a un ave. Los mismos cuatro investigadores llevaron al cabo el muestreo durante el periodo del estudio. La sobrevivencia también fue afectada por la fumigación de las colonias para controlar los parásitos del nido, aunque las tasas de sobrevivencia fueron más altas para las aves en colonias fumigadas, el efecto del sangrado fue mayor entre las aves en colonias no fumigadas.

Estos resultados pueden tener una aplicación limitada a otras especies por el hecho de que los muestreos de sangre en este estudio fueron hechos con una venopunción braquial en una especie que se alimenta al vuelo y que vuela la mayor parte del día. Brown y Brown (2009) admiten la posibilidad que los hematomas que resultan de la venopunción braquial puedan ser un problema por esta misma razón. Un comentario muy detallado de Voss et al. (2010) hace notar también que el estudio de Bomberger y Brown (2009) fue el primero en una especie aérea, con tasas metabólicas de masa específica más altas, y una demanda más alta de oxígeno en los glóbulos rojos circulantes.

Puede haber efectos subletales o de corto plazo que alteren las formas de comportamiento o la fisiología, y que generalmente no se evalúan, particularmente si se llevan al cabo múltiples procedimientos de diferentes tipos en cada individuo. La manipulación y muestreo de sangre repetido en aves, ha demostrado tener efectos subletales a largo plazo (van Oers y Carere 2007). Individuos de carbonero común (*Parus major*) manipulados siete veces y sangrados cinco, tuvieron una tasa de respiración más alta y se comportaron más dóciles treinta días después que los carboneros que fueron manipulados tres veces y sangrados una, lo que sugiere que la manipulación repetida puede ocasionar cambios de comportamiento y fisiológicos de largo plazo.

Las actividades normales de alimentación e incubación, muda y habilidad de migrar, también han mostrado no verse afectadas por el muestreo de sangre (Wingfield y Farner 1976; Frederick 1986). En resumen, la colecta de sangre efectuada de manera apropiada en aves silvestres, no ha mostrado afectar los patrones de comportamiento o reproducción en aves silvestres.

Cantidad de sangre

En ediciones anteriores de estas *Guías*, se especificaba que “como norma general no se debía coleccionar más de 2% del peso corporal del animal en un periodo de 14 días, o no más del 1% en cualquier muestreo (McGuill y Rowan 1989). Para un ave de 10g, la máxima cantidad sería aproximadamente 100µl de sangre entera, o de uno a dos tubos capilares de 70µl, para un ave de 50g la cantidad máxima sería aproximadamente 500µl de sangre entera u ocho tubos capilares de 70µl”. Una lectura más cuidadosa de McGill y Rowan (1989) sugiere que una sola toma de sangre no debe incluir más del 15% del volumen total de sangre, en lugar de la norma general ampliamente utilizada en estudios de laboratorio, que asumía que el volumen total de sangre era el 10% de la masa corporal, y que el 10% del volumen de sangre podía ser extraído sin daños al animal. De hecho, el volumen total de

sangre puede ser menos del 10% de la masa corporal. Voss et al. (2010), teniendo en cuenta los resultados del estudio de Bomberger y Brown (2009) del impacto del muestreo de sangre en golondrina risquera, sugieren una metodología variada. Ellos sugieren, tal como lo hicieron McGuill y Rowan (1989) que “Un método más conservador para determinar con seguridad los volúmenes de sangre extraíbles, incluye el cálculo del volumen de sangre promedio para la masa corporal sin grasa de esa especie y limitar el volumen de la muestra a menos del 10% del volumen total de sangre”. Voss et al. (2009) reconocieron que el 1% de la masa corporal es una medida fácilmente adoptable para trabajo en campo, pero que urgía que se desarrollara investigación adicional que fuera más conservadora y apropiada para tomar en cuenta las variaciones estacionales e individuales en la composición corporal. Este método más conservador también podría proporcionar una medida de seguridad para animales que se estudian en libertad, ya que poco después de haber sido muestreados, a diferencia de los animales de laboratorio, tendrán que buscar su alimento y escapar de los depredadores cuando sean liberados. Además, el método más conservador puede abordar el hecho que algunos individuos tendrán menos volumen e sangre que otros. Una consideración adicional puede ser la manera de alimentarse de la especie y la demanda de oxígeno a los glóbulos rojos circulantes. Las especies con tasas metabólicas más altas, tales como colibríes, pueden ser más susceptibles a la pérdida de sangre. Voss et al. (2010) también sugieren que los investigadores tomen en cuenta las variables ambientales que pueden afectar la sobrevivencia después del muestreo de sangre. Específicamente, mencionan considerar la temperatura y humedad, que puede hacer más difícil para las aves compensar los efectos fisiológicos del muestreo. Finalmente, también proponen que se disminuya el volumen de sangre extraída cuando el ave enfrente factores estresantes adicionales, tales como infestación de parásitos severa, o durante periodos de demanda energética adicional tales como migración o reproducción. Adicionalmente, sugieren ajustar el volumen de sangre a extraer, a que refleje la masa corporal sin grasa de un individuo más que el promedio de la especie, lo cual puede ser útil cuando el promedio del volumen de sangre de una especie se desconoce.

Selección de métodos

Una de las consideraciones más importantes para la toma de muestras sanguíneas, es el sitio de donde se va a colectar la sangre (Sheldon et al. 2008). Existen muchos factores a considerar inicialmente cuando se selecciona el método de colecta de sangre, que incluyen: (1) de qué manera se utilizara la sangre, y en qué cantidad se necesita, (2) si se necesita la sangre completa, suero o plasma, (3) si se necesita sangre de la medula o de la periferia, (4)

el dominio de varias técnicas de extracción de sangre por parte del colector, y (5) cualquier consideración de orden estructural, fisiológicos, de comportamiento o ecológico de la especie de ave que se va a muestrear. Todas estas son consideraciones muy importantes que deben de hacerse antes de seleccionar el lugar apropiado para la colecta de sangre. El sitio de la colecta es importante no solo porque tiene diferentes impactos en las aves; sino porque también impacta las variables biológicas que se miden. Adicionalmente, tal como lo mencionan Sheldon et al. (2008), se requieren diferentes técnicas de manejo dependiendo del sitio de extracción de sangre. Las técnicas de colecta de sangre incluyen el uso de una jeringa para la obtención de sangre de la vena yugular, seno venoso occipital, de la vena ulnar en el ala, o punciones al corazón (vea también Dorrestein 1978; Vuillaume 1983). Si el animal no se va a sacrificar o incapacitar como parte del experimento, entonces el volumen de sangre a extraer es un tema importante (McGuill y Rowan 1989).

Puede haber razones científicas por las cuales la extracción de sangre medular sea necesaria. La sangre medular se obtiene de una punción al corazón por la ruta furcular o a través del esternón. La justificación científica para emplear este método debe de ser muy convincente, ya que la utilización de esta técnica puede resultar en una debilitación severa o la muerte, especialmente en especies pequeñas, aunque la punción a través del esternón no produjo mortandad o debilitamiento en varios grupos, incluyendo paseriformes (Utter et al. 1971). Esto puede ser resultado de la estructura del corazón; a través de la región furcular, la aguja puede pasar sin advertirlo por la aorta u otro vaso sanguíneo mayor, antes de entrar al corazón y por eso ocasionar daños irreparables, es difícil juzgar donde entra la aguja al corazón y determinar qué tipo de sangrado o daño puede ocurrir como resultado de emplear esta técnica. En estudios terminales, donde las aves están bajo anestesia, el desangramiento puede ser utilizado para sacar sangre y para hacer la eutanasia, cuando se utiliza en adición a otros agentes o métodos (Guías de AVMA 2007). Este método debe de ser efectuado solo por investigadores altamente capacitados o veterinarios.

Cuando se requiere de cantidades mayores de sangre, se prefiere comúnmente la vena yugular. Ahí no se generan hematomas tan fácilmente como en la vena braquial. Los hematomas que ocurren como resultado de la extracción de sangre, representan una pérdida adicional de sangre que se tiene que considerar cuando se extraen muestras máximas de sangre. Además, los hematomas pueden ser dolorosos, especialmente si están localizados sobre o junto a una articulación.

En un sangrado de la vena yugular, es importante que se aplique la técnica correcta y que posteriormente se haga presión sobre la vena para evitar que continúe sangrando. Para

alguien con experiencia en esta técnica, rara vez ocasiona problemas. Para extraer sangre de la yugular, el colector debe de ser muy hábil; ningún principiante debe de pretender hacerlo. No se recomienda el entrenamiento en el campo con sujetos de investigación, es mejor aprender en un ambiente controlado, y tal vez obtener aves de una tienda de mascotas (vea la sección de cuarentena en alojamiento en cautiverio antes de introducir esas aves al laboratorio, si en este se alojan o alojaran sujetos de investigación). Se deben utilizar tanto jeringas como agujas de calibre apropiado. Por ejemplo, para especies pequeñas que pesan menos de 10g, una aguja de calibre 30 con una jeringa para tuberculina de 0.33cc de volumen total, permite la medida de la muestra de sangre extraída en incrementos de 0.01ml. Las muestras de sangre donde más de una o dos gotas de sangre serán necesitadas, se obtienen mucho más rápido de la vena yugular que de la braquial o femoral, y es probable que ocasionen mucho menos estrés al ave (cuando se llevan a cabo por un individuo entrenado apropiadamente y con experiencia). El entrenamiento práctico y la supervisión inicial de alguien con experiencia en ésta técnica deben de ser requisitos para este procedimiento.

Dada la pequeña cantidad de sangre que se requiere para muchos estudios, los investigadores pueden preferir sacar pequeñas cantidad de sangre de la vena ulnar (ala) o de vasos sanguíneos en el tibio-tarso. Cualquiera de los dos proveerá una muestra de sangre de tamaño adecuado. En especies mayores, una jeringa con aguja es apropiada. Para especies pequeñas (p.e. menos de 100g) se recomienda que la vena sea punzada con una aguja calibre 26 o menor, y que la sangre sea colectada directamente en un tubo capilar microhematocrito. Utilizando el tubo microhematocrito para la colecta de sangre, se recomienda que las cantidades de un tercio a un medio tubo capilar (de 70 μ l para aves de menos de 7g, un tubo para aves de 7 a 15g, y dos tubos para aves mayores). Sin embargo, esta puede ser demasiada sangre si se hacen muestras repetitivas o las aves están estresadas de otra manera. El entrenamiento adecuado para sangrar de la vena ulnar es importante, ya que es fácil picar la arteria y tener un sangrado profuso. Si la aguja no se utiliza de manera adecuada, puede ocurrir un hematoma. Los investigadores novatos deben recibir entrenamiento de alguien con mucha experiencia para asegurar una colecta apropiada de sangre venosa con mínimo estrés. Los polluelos pueden ser más susceptibles a los hematomas en el tibio-tarso.

Los cortes de uñas son aceptables en campo solo para aves muy pequeñas tales como colibrís, si solo se requiere de una pequeña cantidad de sangre. Generalmente se necesita solo cortar la uña (Leonard 1969). Aunque el corte de uña puede tener el beneficio

adicional de identificar aves previamente muestreadas, no es un procedimiento aceptable para marcar aves.

Deteniendo el sangrado

El tiempo de coagulación para la mayoría de las aves no ha sido determinado, pero puede ser considerado en alrededor de 5 min. Por lo tanto es necesario no retirar la presión al área de punción de manera prematura.

Los investigadores deben estar siempre preparados para detener el sangrado si no ocurre coagulación de manera espontánea y rápida. En ocasiones el sangrado se detiene por sí mismo, pero esto no debe asumirse. Debe aplicarse una presión suave y directa sobre el área de punción. Puede utilizarse una torunda de algodón, aunque éste puede adherirse al coágulo y al quitarla el sangrado se reinicia. Una almohadilla de gaza no adhesiva puede aplicarse en vez de algodón. Generalmente estas almohadillas son algo rígidas, previniendo buen contacto con el sitio de punción, especialmente en aves más pequeñas. También el ave puede inclinarse de manera que la punción quede por encima del nivel del corazón. La fécula de maíz o harina pueden ayudar en la coagulación. Los veterinarios en ocasiones utilizan polvo estíptico tal como Kwik-Stop® el cual es útil para detener el sangrado de los cortes de uña, pero los avicultores han advertido sobre el uso de estípticos en tejidos suaves o en sangrado por caída de plumas. No está claro si esta preocupación surge por la picazón ocasionada por el estíptico, ya que no existe literatura que sugiera toxicidad u otras reacciones adversas.

Lo mejor es prevenir la hemorragia de la vena braquial que tratar de controlarla. Antes que se extraiga la aguja de la vena, se debe liberar la oclusión proximal de la vena y aplicar presión sobre el sitio de inserción. Esta presión debe incrementarse al retirar la aguja. Demasiada presión puede vaciar la vena de sangre lo que prevendría la coagulación. La presión adecuada solo se aprende con la experiencia.

Muestras de sangre

Una vez que se hayan tomado, las muestras de sangre (y otros tejidos) deben de ser preservados bajo condiciones de campo y se deben de establecer los protocolos para el manejo de las muestras antes de colectarlas para asegurarse que la sangre no será desperdiciada. Debido a que los eritrocitos de las aves son nucleados y que se han desarrollado mejores técnicas de ADN, una gota de sangre es ahora suficiente para la mayoría de los estudios genéticos. Se han estado desarrollando técnicas nuevas cada año

para hacer el análisis de ADN más económico y fácil de lograr en campo (Quintana et al. 2008). Por ejemplo, hasta el 2009, los análisis para sexado genético se apoyaban en la variación entre sexos del tamaño del intrón en dos genes de los cromosomas sexuales, pero en aproximadamente el 50% de las especies de aves, el tamaño del intrón no varía entre sexos (Griffiths et al. 1998). En el 2009, se desarrolló una técnica que utiliza la Reacción en Cadena de la Polimerasa multiplexada (Multiplex PCR), que debería funcionar para todas las especies de aves (Hen et al. 2009). Si solo se necesita ADN, los investigadores deben considerar el muestreo de plumas como se discute más adelante.

Repetición de muestreos y tiempo del muestreo

La medición de las hormonas de estrés, función inmune, u otros criterios fisiológicos se ha vuelto una herramienta importante para establecer la salud y para medir los efectos de varios factores estresantes ambientales y antropogénicos en aves silvestres. Tales estudios a menudo requieren de muestreos repetidos y pueden ocasionar efectos permanentes en el ave, o pueden afectar los valores de los indicadores bioquímicos que se están midiendo (Davis 2005, Pérez-Rodríguez et al. 2007, van Oers y Carere 2007).

El muestreo repetido en un periodo corto de tiempo ha sido utilizado con éxito en especies pequeñas (Marra and Holberton 1998; Wilson y Holberton 2004) y no se ha demostrado que ocasione impactos negativos. La captura, manejo y la restricción son los factores estresantes de base, se asume que para todas las aves son estresantes la captura y el manejo (Wingfield 1994). Entre muestreos, las aves pueden ser mantenidas en sacos de tela, lo que permite una ventilación adecuada pero previene las lesiones si el ave forcejea. Estos sacos deben de ser colocados en un lugar seguro y libre de riesgos, en la sombra y cubiertos del efecto negativo directo del clima. Las bolsas para sándwich de papel pueden también utilizarse como una alternativa desechable que puede ayudar a reducir la posibilidad de transmisión de enfermedades entre individuos y poblaciones. Las bolsas no son una forma apropiada de confinamiento o restricción para especies de cuello, pico o patas largas, o toquís que pueden dislocarse las patas en las bolsas (ver discusión en Captura y Marcaje). En cautiverio las aves silvestres sobreviven bien después de muestreos repetidos de sangre (aun con intervalos de tres a cinco días), y la masa corporal permanece normal (Wingfield et al. 1982, Stangel 1986). Sin embargo los valores de hematocrito pueden reducirse por los muestreos repetidos (Aramaki y Weiss 1961; Fair et al. 2007) y el volumen combinado de la sangre muestreada durante un periodo de estrés no debe exceder el equivalente al 1% de la masa corporal por muestra. Con buen cuidado, es posible tomar muestras de sangre seriadas del mismo sitio, tal como la vena ulnar, sin crear múltiples punciones. Sin embargo,

no debe intentarse hacer colecta seriada de muestras de sangre por punción al corazón. Se debe tener cuidado también para asegurar que las aves en etapa reproductiva no sean mantenidas lejos de sus nidos por demasiado tiempo. Un periodo de 30 a 60 minutos antes o después del sangrado no representa un problema, a menos que el individuo sea separado de una parvada, o pudiera potencialmente perder su territorio. Se recomienda la cautela del investigador si las condiciones ambientales, luz de día, o climáticas han cambiado durante el periodo de retención.

El momento del muestreo puede afectar los valores de la hormona que se está muestreando. Para asegurar que las muestras de sangre contienen cantidades confiables de concentración de corticosterona (Romero y Romero 2002), se debe de coleccionar una muestra pequeña de sangre inicialmente dentro de los primeros dos a tres minutos de la perturbación, incluyendo el tiempo utilizado en la captura y manejo del ave antes de la colecta de sangre (Chloupek et al. 2009; Lynn y Porter 2008; Romero y Reed 2005; y Romero y Romero 2002). La comparación de la tasa de secreción de corticosterona sobre un periodo predeterminado de tiempo puede ser un indicador de la fuerza de la respuesta adrenocortical aguda (Wingfield 2005).

Maneras alternativas de obtener sangre o material para estudios genéticos, análisis de isotopos estables y contaminantes

Otra manera de obtener ADN de aves incluye plumas (Smithe et al. 2003; Quintana et al. 2008) o cascaron de huevo para ADN materno (Egloff et al. 2009). La pulpa de las plumas se colecta comúnmente para investigaciones genéticas (De Volo et al. 2008; Freedman et al. 2008; Hogan et al. 2008).

Recientemente una técnica menos invasiva ha sido desarrollada, y utiliza insectos hematófagos (Heteroptera, Triatominae) obtenidos de aves incubadoras (Becker et al. 2006); se encontró que la sangre colectada por este método contenía niveles de corticosterona similares a la colectada por otros métodos (Arnold et al. 2008). Cualquier técnica que involucre el movimiento y la introducción potencial de una especie no nativa a un área geográfica debe de ser evaluada cuidadosamente para consecuencias no deseadas.

Las muestras fecales ofrecen un medio no invasivo alternativo a la sangre, para medir los niveles de hormona de estrés, pero carecen de la precisión cronológica de la hormona en la sangre, y requieren una validación extensa para corregir las tasas de alimentación, tiempo de digestión y otros factores (Romero y Romero 2005)

D. Colecta de otros tejidos

La investigación fisiológica y genética a menudo requiere de biopsias de tejido. Una biopsia incluye la extracción de células o tejidos para su examen y lo más comúnmente muestreado (además de la sangre) es el tejido adiposo, musculo, hígado y gónadas. Muchos de los procedimientos utilizados podrían ser considerados como cirugías, y un veterinario debe de ser consultado en la planeación del procedimiento. Las muestras tomadas deben de extraer la cantidad mínima de tejido necesario para la validez científica. Dependiendo del tejido a muestrear, se puede requerir analgésicos o anestésicos para muestrear de manera efectiva y humanitaria, y el investigador debe considerar maneras de cerrar la incisión (pegamento quirúrgico o sutura). Asimismo, se debe cuidar que las técnicas invasivas se mantengan estériles durante el proceso. Revise las secciones relevantes en Manipulaciones Mayores para más detalle sobre técnicas de asepsia, manejo del dolor, y cierre de incisiones. La habilidad de sobrevivencia de las aves que son liberadas después de un procedimiento de biopsia no debe verse comprometida.

Varios estudios (Baker 1981; Westneat et al. 1986; Westneat 1986b) demuestran que la biopsia de musculo tiene un efecto mínimo sobre la condición del cuerpo y la sobrevivencia tanto en aves invernantes, como reproductivas. Después de una manipulación y liberación rápida, las aves a menudo volvieron a sus actividades de forrajeo y reproductivas. Los machos frecuentemente cantaban minutos después de haber sido liberados, y hasta los polluelos muestreados no mostraron debilidad, sino que pedían alimento y fueron alimentados normalmente por sus padres. Se encontró que incluso la biopsia del musculo pectoral mayor no afectó la capacidad de vuelo (Westneat 1986b). No obstante, Frederick (1986) determinó que los adultos de ibis blanco (*Eudocimus albus*) incubando cuando se les efectuaba la biopsia del musculo pectoral, abandonaban el nido y en consecuencia perdían sus polluelos. Otros íbices sujetos a muestreo de sangre solamente, no abandonaron sus nidos. La toma de biopsias musculares puede no ocasionar la muerte del ave, pero podría afectar su reproducción, dispersión, tasa de recaptura, y cambios a corto plazo en la masa corporal (Westneat 1986; Westneat et al. 1986).

Las biopsias quirúrgicas de hígado de ave se toman para estudios de contaminantes y para diagnostico de enfermedades. Degernes et al. (2002) describe minuciosamente las técnicas de anestesia y cirugía para la obtención de biopsias hepáticas en el campo, pero observó que los adultos sujetos a esta técnica abandonaban sus nidos.

Las plumas están siendo utilizadas cada vez más para análisis de isotopo estable (Hobson y Wassenaar 2008). La colecta de algunas plumas remeras o rectrices es generalmente un

procedimiento inofensivo, pero se debe cuidar de no extraer tantas plumas que perjudiquen el vuelo u otras funciones esenciales; lo que no sería problema en aves en cautiverio. La extracción de plumas en crecimiento puede ocasionar sangrado, y la liberación del ave debe ser hasta que éste se detenga. Además, los requerimientos de energía y las consecuencias de reemplazar las plumas colectadas en diferentes etapas no ha sido completamente entendido. El plumón de polluelos puede ser colectado de manera exitosa sin efectos serios (Stangel et al. 1988; Evans et al. 2009).

Los patógenos como la influenza aviar pueden permanecer en la cloaca o el tracto orofaríngeo, desde donde puede ser raspados para obtener muestras. La colecta de muestras por raspado en aves no se considera que tenga un impacto mayor, pero se debe cuidar al manipular el ave y completar la técnica de manera expedita, particularmente en los raspados orofaríngeos que pueden ocasionar molestias. Debido al gran número de investigadores que utilizan el raspado, se pueden obtener videos en línea para el entrenamiento en estas técnicas. Sin embargo los videos no son sustitutos de un entrenamiento práctico con investigadores experimentados. Por último, el manejo de las aves debe de incluir precauciones de seguridad apropiadas para la salud humana cuando estén presentes patógenos con potencial de ocasionar enfermedades serias en humanos (Ornithological Council 2006).

E. Colecta de muestras de alimento

La obtención de información acerca de la dieta de una especie en el campo es en ocasiones un componente importante de los estudios ecológicos y de nutrición. Históricamente los análisis de dieta incluían el sacrificio de aves para permitir la observación directa de los contenidos estomacales (Duffy y Jackson 1986; Barret et al. 2007). En algunos casos la colecta de muestras fecales y egagrópilas puede proveer la mayor parte de la información necesaria. Sin embargo, en algunas especies la materia fecal no es útil (p.e. frugívoros). En otros casos, tales como las aves marinas en el mar, no es posible colectar muestras fecales. Si las aves van a sacrificarse para la obtención de muestras estomacales, los investigadores deben de obtener permisos específicos de colecta científica y seleccionar la técnica de eutanasia más apropiada (vea la sección de Manipulaciones Mayores). Adicionalmente se deben hacer arreglos para asegurarse que los especímenes sean donados a una institución de enseñanza o colección de museo, u otra instancia de estudio científico.

Existen varias técnicas para el análisis de dieta que no requieren sacrificar al ave: ligaduras de cuello, análisis fecal, análisis de egagrópilas, bombeo o lavado estomacal, eméticos, y métodos bioquímicos (Rosenberg y Cooper 1990). Algunas aves marinas regurgitan el

contenido estomacal poco después de ser capturadas, en otras sin embargo, puede ser necesario el uso de otras técnicas.

Ligaduras al cuello de polluelos

El uso de ligaduras al cuello para la obtención de muestras de alimento en polluelos puede ser justificado en algunas ocasiones. Las ligaduras pueden ser utilizadas en los polluelos, mas no en los adultos, pues es necesaria la recaptura efectiva. En tales casos, el investigador debe de ser cuidadoso para asegurar la circulación normal de sangre y la función traqueal. Existen diferentes materiales para ligar, con diferentes niveles de eficacia, p.e. las ligaduras de cable plástico son más efectivas y menos peligrosas (50% menos fatalidades) que los limpia-pipas (Mellott y Woods 1993). Una variable adicional a considerar es la edad del polluelo (Johnson et al. 1980; Poulsen y Aebischer 1995), ya que si el polluelo es demasiado joven, los investigadores corren el riesgo de dañarlo como resultado del manejo, pero si el polluelo es muy grande, los investigadores corren el riesgo de que abandone el nido con las ligaduras puestas. En muchos casos se pueden utilizar métodos menos forzados que proporcionen los mismos resultados (p.e. análisis fecal, Poulsen y Aebischer 1995). Se debe tener en consideración si el procedimiento resultara en una privación de alimento tal que ponga en riesgo la sobrevivencia. No solo están los polluelos privados del alimento, sino que los padres pueden cambiar sus hábitos de alimentarlos debido a la presencia de las ligaduras (Robertson 1973) e incluso tratar de arrancarlas agresivamente de los polluelos (Little et al. 2009). McCarty y Winker (1991) utilizaron señuelos de polluelos cubiertos con pieles recuperadas de polluelos muertos, para incitar a los adultos de golondrina canadiense (*Tachycineta bicolor*) a alimentarlos; ésta técnica también funcionó con señuelos de polluelos fabricados de arcilla.

Análisis fecal y de egagrópilas

El análisis fecal, ya sea de material colectado de manera oportunista, o de aves en cautiverio, tiene la ventaja de ser una técnica no invasiva pero se limita a establecer los componentes de la dieta del ave que sobreviven al proceso digestivo, tales como el exosqueleto de insectos. En algunos grupos de aves, el análisis fecal puede proporcionar resultados comparables a técnicas más invasivas, tales como bombeo estomacal (p.e. en aves playeras). En otras, sin embargo, el análisis fecal puede no ser tan útil ya que las heces pueden no contener material identificable (p.e. de frugívoros) o las heces no se depositan en sitios accesibles (p.e. aves marinas).

El análisis de egagrópilas ha sido utilizado en una gran variedad de especies incluyendo aves marinas (revisado en Barrett et al. 2007) y rapaces (Redpath et al. 2001). Al igual que en los análisis fecales, los análisis de egagrópilas no son invasivos, sin embargo es una técnica principalmente oportunista para el análisis de la dieta, que puede no prestarse al rigor estadístico o de diseño de experimentos (Rosenberg y Cooper 1990)

Lavado de estomago y buche

Wilson (1984) y Ryan y Jackson (1986) han desarrollado una bomba para lavar los contenidos estomacales. El estomago de las aves se llena con agua tibia administrada por un tubo de plástico, el ave se invierte sobre un recipiente y su estomago se palpa para estimular la regurgitación. La bomba proporciona datos cualitativos y cuantitativos (cuando menos en aves grandes) comparables a los obtenidos de aves sacrificadas, y sin efectos adversos aparentes en varios estudios (p.e. Robertson et al. 1994). Jahncke et al. (1999) utilizaron una bomba estomacal basada en el diseño de Wilson (1984) para muestrear las dietas del potoyunco peruano (*Pelecanoides garnotii*) y reportaron que cinco de 220 aves (2.3%) murieron durante el manejo, aunque no precisaron las causas de la muerte.

Hess (1997) utilizó el lavado estomacal con solución salina en carpinteros de Florida (*Picooides borealis*) sin efectos aparentes en la sobrevivencia de los adultos. Gionfriddo et al. (1995) tuvieron un éxito similar en gorriones caseros (*Passer domesticus*), lo que implica que el lavado estomacal puede ser una técnica viable en granívoros y otras aves con mollejas musculosas. Una clave para el éxito en ambos estudios fue la utilización cuidadosa del tubo de plástico para aplicar la solución de lavado y no perforar ni el saco aéreo ni el recubrimiento digestivo. El conocimiento de la especie de estudio es importante para evaluar si puede responder de manera adversa a las técnicas de regurgitación. Ryan y Jackson (1986) encontraron en varias especies de aves marinas, que el porcentaje de alimento recuperado en un solo bombeo estaba correlacionado con que tan lleno se encontraba el estomago, obteniendo entre un 70 a 100%. Los zambullidores de cualquier especie no deben de ser sujetos a ninguna técnica de regurgitación debido a las plumas en el buche; sin embargo sus egagrópilas pueden ser utilizadas para el análisis de dieta (Jordan 2005).

Eméticos

Cuando los análisis fecales y los lavados o bombeos estomacales no son prácticos ni recomendables, se pueden administrar soluciones eméticas para obtener los contenidos del buche. Para el propósito de éste trabajo, consideramos a los eméticos como cualquier

sustancia química diferente de cloruro de sodio o soluciones salinas, utilizadas para inducir la regurgitación. Existen tres consideraciones mayores en la aplicación de eméticos: tipo, dosis y método de administración (p.e. directa o por cánula de plástico). Los investigadores tienen un amplio rango de químicos de donde escoger, incluyendo el emético tartárico (tartrato de antimonio y potasio), apomorfina e ipecacuana. Debido a los efectos potenciales de algunos eméticos, ésta técnica debe ser considerada solo con la justificación científica más rigurosa.

El emético tartárico es la opción más ampliamente utilizada, a pesar de los reportes de alta mortalidad (Zach y Falls 1976; Lederer y Crane 1978). Existen dos problemas con la utilización de este emético: es tóxico si se absorbe al torrente sanguíneo y es difícil determinar la dosis correcta (Prÿs-Jones et al. 1974). Las dosis muy bajas pueden no inducir el vomito, permitiendo que el emético se absorba al torrente sanguíneo (Herrera e Hiraldo 1976, citado en Diamond et al. 2007); las dosis muy altas pueden resultar en trauma severo y choque (Prÿs-Jones et al. 1974).

Poulin et al. (1994) probaron la efectividad del emético tartárico en 3,419 aves de 137 especies de 25 familias. La dosis base fue de 0.8ml de una solución al 1.5% de tartrato de antimonio y potasio por 100 gr de masa corporal administrada a través de un tubo plástico. Se obtuvieron muestras analizables en 79% de las aves y 2% fallecieron. La mortalidad en aves de especies sensibles se redujo al bajar las dosis. Las tasas de mortalidad no difirieron entre aves que regurgitaron y aquellas que no lo hicieron. Poulin y Lefebvre (1995) analizaron 2,656 aves de 137 especies más. A diferencia de Poulin et al. (1994), las dosis básicas fueron ajustadas hacia abajo para las aves que pesaban menos de 10gr y hacia arriba para las que pesaban mas de 40gr. Se obtuvieron muestras analizables del 73% de las aves y el 2.6% de las aves fallecieron.

Durães y Marini (2003) probaron la efectividad de emético tartárico en 369 individuos de 44 especies. Se obtuvieron muestras analizables de 70% de las aves y 10% fallecieron previo a su liberación. Las aves fueron mantenidas en cajas oscuras y ventiladas hasta que regurgitaban, se revisaban periódicamente y se mantuvieron cautivas por un máximo de una hora. Para evaluar más precisamente los efectos del emético tartárico, las aves fueron liberadas hasta que no mostraron señales de efectos secundarios (somnolencia, desorientación) y podían volar normalmente. La mortalidad fue significativamente más alta durante las horas de la mañana, lo que llevó a los investigadores a sugerir que el muestreo con emético debería de hacerse durante las horas de la tarde, cuando las aves han tenido suficiente tiempo de reponer las reservas que se gastan durante la noche. Durães y Marini

(2003) también señalaron la diferencia significativa en tasas de mortalidad para las aves que no habían regurgitado (85% de los fallecimientos) y aquellas que regurgitaron (15% de los fallecimientos). Ésto último destaca la naturaleza crucial de la exactitud de las dosis al utilizar emético tartárico.

Carlisle y Holberton (2006) probaron la efectividad relativa de los análisis fecales contra la administración de eméticos al evaluar dieta de aves canoras migratorias. Las muestras regurgitadas permitieron una evaluación más rápida que las muestras fecales (p.e. se necesitaron menos muestras). Sin embargo, si se colectan suficientes muestras, el análisis fecal produce eventualmente una evaluación similar de la dieta. Las tasas de recaptura de aves tratadas con emético tartárico fueron menos de la mitad de aves sin tratar.

Es importante recordar que la administración de eméticos puede tener un efecto indirecto que puede no ser aparente inmediatamente durante el muestreo. Por ejemplo, Carlisle y Holberton (2006) reportaron que todas las aves tratadas con emético tartárico que fueron recapturadas, perdieron masa. Posteriormente hicieron un experimento de dosis con junco ojo oscuro (*Junco hyemalis*). Se incluyeron 18 individuos en el experimento: seis recibieron la dosis específica a su masa corporal (0.8 ml de una solución al 1.5% de tartrato de antimonio potasio por cada 100 gr de masa corporal), seis recibieron la mitad de la dosis recomendada, y seis más recibieron una cuarta parte de la dosis recomendada. Los 18 individuos estaban vivos entre 15 y 20 minutos después del tratamiento (el tiempo estándar de pre liberación); pero a los 30 minutos, 17 habían muerto.

Johnson et al. (2002) hicieron pruebas para otro efecto indirecto de los eméticos utilizando tasas de reavistamiento de aves canoras migratorias durante la temporada no reproductiva. Ellos capturaron 18 chipes azulnegro (*Setophaga caerulescens*) de los cuales a nueve se les administró emético tartárico (0.8 ml de una solución al 1.5% de tartrato de antimonio potasio por cada 100 gr de masa corporal, por vía oral a través de un tubo plástico de 1.5mm de diámetro) y fueron liberados. De las nueve aves tratadas solo se reavistó una la siguiente semana; siete de las aves de control fueron reavistadas durante el mismo periodo. Johnson et al. (2002) también capturaron 74 chipes de diferentes especies, de los cuales a 61 se les administró emético tartárico. Aun cuando el tamaño menor de la muestra de aves no tratadas, las tasas de avistamiento de éstas fue estadísticamente mayor que la de las aves tratadas, y hasta cuando no se tiene una conclusión directa, el comparativo de las tasas de reavistamiento sugiere un impacto.

Valera et al. (1997) analizaron la efectividad de un emético de apomorfina y reportaron efectividad y tasas de mortalidad similares a las reportadas en los estudios con emético

tartárico. En este estudio, solo los polluelos murieron; sin embargo las tasas de mortalidad de polluelos resultantes de la aplicación de apomorfina fueron menores que las reportadas con la utilización de ligaduras (Johnson et al. 1980). Una ventaja que puede tener la apomorfina es que se puede aplicar de manera repetida al mismo individuo sin efectos negativos aparentes, y este no es el caso de los eméticos tartáricos (Zach y Falls 1976).

Diamond et al. (2007) reintrodujeron el uso de ipecacuana como emético. Recomendado inicialmente por Kadochnikov (1967, citado por Diamond et al. 2007), la ipecacuana no ha sido utilizada con buenos efectos, probablemente debido a lo inadecuado de las dosis. En el estudio de Diamond et al. (2007), Se utilizaron ipecacuana y emético tartárico para evaluar las dietas de aves de Kenia; la dosis del emético tartárico utilizada fue de 0.025 ml/gr de peso corporal de una solución al 1% en agua; la dosis de ipecacuana utilizada fue de 0.1ml/gr de masa corporal en una solución en volumen de 1:20 de tintura de ipecacuana en agua. No hubo diferencia en la eficacia de los eméticos. De 63 aves tratadas con emético tartárico, tres (4.8%) murieron, mientras que ninguna de las 93 tratadas con ipecacuana murió. Diamond et al. (2007) reportaron que de 44 chipes de New Brunswick adicionales tratados con ipecacuana, todos regurgitaron y no hubo evidencia de efectos negativos en las aves. Además de ser menos toxico que el emético tartárico, la efectividad de la ipecacuana depende menos de la dosis de emético que se les administra a las aves. Dado que la ipecacuana parece ser cuando menos tan efectiva como el emético tartárico, debería de ser considerada como el emético para los estudios de análisis de dieta.

Los métodos bioquímicos de análisis de dieta incluyen el análisis de isotopos estables y análisis de la firma de los ácidos grasos. El análisis de la firma de ácidos grasos cuantitativa es principalmente adecuada para evaluar las dietas de organismos marinos y se basa en el hecho que los depredadores tienden a almacenar las marcas de los ácidos grasos de sus presas en el tejido adiposo (revisado en Barrett et al. 2007). Estos tejidos pueden ser muestreados sin ser destruidos utilizando biopsia (descrita posteriormente). El análisis de ácidos grasos permite una determinación más precisa de la dieta que el análisis de isotopos estables, pero utilizadas en conjunto pueden proveer una herramienta poderosa para la evaluación de las dietas.

F. Alimentación forzada

Las investigaciones nutricionales pueden requerir la alimentación forzada de sujetos experimentales (generalmente en cautiverio). La alimentación utilizando un tubo de hule suave o un tubo metálico atraumático del tamaño adecuado, y volúmenes de alimento que son apropiados para el tamaño del ave, es seguro y efectivo. Murphy y King (1986)

encontraron que la alimentación forzada insertando un tubo por el esófago, podía lesionar en algunos casos. El alimento tiene que ser proporcionado como una solución espesa y la regurgitación puede producir ahogamiento (especialmente en especies pequeñas). El sostener al ave verticalmente puede ayudar a prevenir la regurgitación. La inserción del tubo de manera inadecuada puede también lesionar las paredes del esófago, la coana (la abertura en el paladar) y la tráquea. El alimento en la tráquea puede ser broncoaspirado y ocasionar neumonía o la muerte por ahogamiento. Como alternativa, Murphy y King (1986) sugieren alimentar el alimento en forma de pelotita, colocándolas directamente en la faringe con un fórceps, e induciendo la deglución por reflejo. La mortalidad se reduce casi a cero y las pelotitas regurgitadas no conducen al ahogamiento; sin embargo el uso de éstas toma mucho más tiempo que la alimentación entubada. Los investigadores pueden solicitar ser entrenados por avicultores con experiencia en la alimentación por tubo a polluelos de loro y otras aves.

G. Lavado cloacal

Los estudios de modo y tiempo de inseminación son importantes para en análisis de tendencias de población, transferencia de información genética y sistemas de apareamiento. El lavado cloacal, tanto de machos como hembras, es una técnica para adquirir información acerca de la producción y transferencia de esperma (Quay 1985, 1986 y 1987). Sin embargo Immler y Birkhead (2005) también encontraron que el esperma puede ser encontrado en las muestras fecales utilizadas para obtener mucha información. El lavado cloacal se utiliza también para la investigación de patógenos en la parte baja del tracto digestivo (Brown et al. 1993; Yashkulov et al. 2008). El lavado cloacal utiliza agua destilada o solución salina en cantidades apropiadas para el tamaño de la especie. El agua es administrada por medio de una pipeta de plástico desechable que se introduce en la cloaca. Luego se aspira la mayor parte del agua de regreso a la pipeta y se transfiere a un tubo de ensayo. La técnica se extiende en ocasiones con la implantación de micro esferas cloacales (Quay 1988). Se deben de tener en consideración el dolor y molestias potenciales que puede ocasionar este procedimiento, y de hacerse lo debe efectuar una persona con preparación adecuada.

H. Inyección e inserción de implantes

La inyección de soluciones apropiadas o de implantes, ya sea subcutáneas, intramusculares, intracolémicas, o intravasculares puede efectuarse con muy pocos efectos en la sobrevivencia o conducta normales del ave. Algunas soluciones pueden irritar o dañar al sujeto si no se inyectan de manera apropiada. Los implantes pueden migrar o desactivarse

si nos son insertados de manera adecuada. Se recomienda ampliamente que las técnicas nuevas sean evaluadas en individuos cautivos antes de ser utilizadas en aves silvestres. El personal que efectúa el procedimiento de inyección o implantación, ya sea subcutáneo, intramuscular, intraperitoneal, o intravascular, debe de estar entrenado adecuadamente. En los Estados Unidos, la Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos establece que los medicamentos administrados de manera legal a los animales, deben de estar aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos, o reconocidas por expertos (p.e. de la agencia) como seguros y efectivos. La Ley de Clarificación de Uso de Drogas Medicinales en Animales establece que el medicamento aprobado debe ser utilizado si se encuentra disponible, pero existen pocos medicamentos aprobados para su uso en aves. Los veterinarios, bajo ciertas condiciones, pueden utilizar legalmente medicamentos aprobados para humanos y animales en maneras fuera de las especificadas. Por esto, el uso fuera de las especificaciones del medicamento, debe de hacerse bajo la supervisión de un veterinario y mantener registros adecuados de su uso

http://www.avma.org/reference/amduca/extralabel_brochure.pdf).

La inyección de sustancias experimentales es común en la investigación con aves. Las inyecciones subcutáneas e intramusculares son sencillas en el laboratorio y ocasionan poco trauma. Las inyecciones intravenosas requieren de ciertas habilidades. Las inyecciones intracolémicas requieren de justificaciones más estrictas ya que las sustancias pueden irritar o dañar mecánica o químicamente las vísceras. De igual manera, las sustancias para inyectar en el espacio colémico pueden fácilmente terminar en el sistema respiratorio del ave, dada la anatomía única de los sacos aéreos de las aves.

Ningún estudio ha investigado directamente los impactos de las inyecciones en la sobrevivencia individual. Sin embargo se han publicado cientos de estudios que incluyen la inyección, especialmente subcutánea, que apoyan la conclusión que estas inyecciones parecen tener poco o ningún impacto en la sobrevivencia. Esto sin duda varía con el tipo y cantidad de el material inyectado. Debido al número de tipos de inyecciones que pueden aplicarse, no especificamos aquí una revisión de cada tipo. Para estudios de largo plazo, se requiere en ocasiones de inyecciones repetidas, que requieren de múltiples capturas a intervalos frecuentes. Esto puede en si mismo ocasionar una perturbación en las actividades normales, por esto, los implantes en tubos de hule, las pelotillas o bombas mini osmóticas pueden ser utilizadas para proporcionar una administración de largo plazo de sustancias experimentales (hasta por varias semanas). Cuando sea posible, tales implantes deben de ser subcutáneos, ya que los intracolémicos en ocasiones se encapsulan por tejido

conectivo. Los implantes insertados bajo la piel del flanco o en los lados del tórax, son los más efectivos y más fáciles de extraer después de que termina el experimento. Los implantes colocados bajo la piel del dorso pueden reventar la piel facilitando infecciones. Es importante que el tamaño del implante sea tal que no ocasione presión a la piel, sin importar la ubicación. Los implantes bajo la piel del cuello no se recomiendan ya que pueden penetrar la cavidad torácica resultando en molestias severas en la respiración. Las bombas mini osmóticas, hechas a la medida, para animales de diferentes tamaños o para la administración de sustancias por periodos prolongados de tiempo, se consiguen en diferentes compañías que también proveen videos de entrenamiento gratuito para el uso de estas en roedores, y que pueden aplicarse a las aves. Al igual que cualquier técnica invasiva, el área de operaciones y los instrumentos deben de estar esterilizados, con juegos de instrumentos diferentes para cada cirugía de implante. Vea la sección de Manipulaciones Mayores para una discusión comprensiva de los procesos de esterilización.

El momento de la colocación del implante es también importante en algunos casos. El tratamiento de aves libres con hormonas generalmente no tiene efectos debilitantes, pero algunos tratamientos tales como esteroides sexuales pueden perturbar el progreso temporal normal de eventos reproductivos y asociados. Los impactos de esteroides sexuales adicionales en aves pueden ser varios e incluyen la supresión de la función inmunológica (Duffy et al. 2000; Castro et al. 2001). Por esto, se debe de hacer todo lo posible para retirar los implantes después del experimento. En especies que se reproducen en altitudes o latitudes altas, la temporada de reproducción corta permite solo muy poco tiempo para la muda. Si esas funciones se perturban por los implantes, puede producirse la muerte por la mala calidad del plumaje y el retraso de la migración. Si estos resultados son posibles bajo las condiciones del estudio en particular, el investigador debe eliminar los implantes de las aves experimentales y de control, ya sea extrayendo el implante o manteniendo cautivas a las aves. Sin embargo los sujetos del experimento con implantes de control, o implantes que ya difundieron toda la hormona, pueden sobrevivir el invierno de la misma manera que individuos sin implantes (Wingfield 1984). Más aun, es estrés de recaptura puede ocasionar problemas que interfieren con los resultados y ocasionar impactos al ave. Un elemento crucial en la evaluación de acciones apropiadas en todo lo mencionado anteriormente, es si el riesgo inducido por el experimento aplica principalmente a los individuos o a la población.

El campo de la inmunología en aves silvestres ha crecido de manera significativa en la última década, requiriendo de inyecciones de inmunizaciones o sustancias mitogénicas para

medir la respuesta inmunológica. De manera similar, la inyección de agua doblemente marcada es común en estudios de energía en aves. Wilson y Culik (1995) encontraron que las aves marinas inyectadas con agua doblemente marcada, diferían en sus parámetros de alimentación (p.e. profundidad de la inmersión, ángulo de inmersión y rangos de alimentación) de las aves no inyectadas. Los autores sugieren que los volúmenes de líquido relativamente grandes inyectados de manera intramuscular ocasionan molestias que perduran por lo menos dos días, lo que evita a las aves involucrarse en su comportamiento normal de alimentación, y sugieren que el problema puede aliviarse realizando varias inyecciones intramusculares más pequeñas o inyecciones intraperitoneales. Otros implantes incluyen transmisores de radio o satelitales subcutáneos (Berdeen y Otis 2006) o en el celoma de las aves. Esto se discute ampliamente en la sección de Captura y Marcaje.

I. Determinación de la viabilidad de los huevos

Ciertos procedimientos experimentales requieren de una estimación del número de huevos dentro de una nidada con embriones viables, y la edad de estos. El quebrar los huevos tiene efectos negativos indiscutibles en el éxito reproductivo, pero se puede justificar científicamente en algunos casos. Sin embargo se deben seguir otras alternativas cuando estén disponibles. Dos de éstas, que no son invasivas, y son económicas, son la transiluminación y la flotación.

La transiluminación implica la colocación del huevo frente a una fuente de luz y la estimación o medición de área oscura dentro del campo de visión (Westerskos 1950; Weller 1956). Una estimación más moderna de la transiluminación y fotografía permite una delimitación clara del desarrollo embriónico y está diseñada para minimizar el tiempo de manipulación del huevo y el tiempo que se mantienen alejado del adulto incubante, como consideración al bienestar animal (Young 1988; Lokemoen y Koford 1996).

La flotación involucra la colocación del huevo en agua u otra sustancia acuosa a temperatura ambiente; los huevos viables y la edad del embrión se determinan dependiendo de si el huevo flota o la orientación de la flotación de los huevos (Westerskov 1950; Fisher y Swengel 1991; Walter y Rusch 1997). Por ejemplo, si el huevo tiene más de diez días y no flota, no tiene un embrión viable. Devney et al. (2009) presenta resultados que sugieren que la flotación en agua salada, más que en agua sola, puede proporcionar resultados más acertados, por lo menos en aves marinas coloniales. La flotación de huevos es útil para huevos con cascarones muy gruesos o muy pigmentados como para ser transiluminados. La preocupación principal para el uso de la técnica de flotación es que puede reducir la tasa de eclosión al permitir un exceso de agua permeando el huevo. Sin

embargo Alberico (1995) estudió el efecto de la flotación de huevos y su capacidad de eclosión en 131 nidos de avoceta americana (*Recurvirostra americana*) y candelero americano (*Himantopus mexicanus*), y no detecto efectos significativos.

Recientemente Reiter y Anderson (2008) estudiaron la eficacia relativa de la flotación de huevos y la transiluminación para la estimación de días de incubación en nidos de ganso canadiense (*Branta canadensis*). Ambas técnicas sobreestimaron el día de incubación al inicio de ésta, y subestimaron el día de incubación al final de ésta. Aunque la flotación proporcionó resultados menos sesgados, ambas técnicas proporcionan el nivel de precisión que se requiere para la estimación firme de los parámetros de anidación.

Los dispositivos electrónicos tales como estetoscopios doppler y audio cartuchos que pueden detectar los latidos cardiacos del embrión o los movimientos dentro del cascaron, pueden ser útiles pero tienen potencial limitado en el campo (Mineau y Pedroza 1986; Tazawa et al. 1991).

J. Reproducción de vocalizaciones grabadas u utilización de otros señuelos

La reproducción a vocalizaciones grabadas del sujeto de estudio a conspecíficos, es una técnica común en investigación. Los llamados de depredadores, particularmente de pequeños depredadores de nidos tales como los tecolotitos, son comunes para la atracción de paseriformes. Los estudios del impacto de la reproducción de vocalizaciones son pocos, pero las consecuencias de la naturaleza de los impactos potenciales pueden hacerse por el hecho de que las aves son estimuladas a moverse como respuesta a los sonidos grabados. Por ejemplo, las aves anidantes pueden dejar desatendidos a sus huevos o polluelos. Las respuestas fisiológicas documentadas incluyen un aumento en los niveles de testosterona plasmática en hormigueros moteados (*Hylophylax n. naevioides*) (Wikelski et al. 1999). Mennill et al. (2002) determinaron que los carboneros gorrinegros (*Poecile atricapillus*) que fueron estimulados con grabaciones de vocalizaciones de machos agresivos durante seis minutos, perdieron la paternalidad de sus nidos al ponerse a competir con estos.

La reproducción de vocalizaciones ha sido utilizada como herramienta para evaluar la presencia y abundancia de especies (Johnson 1981; Proudfoot y Beasom 1996; Turcotte y Desrochers 2002) y para manipular la conducta en investigaciones etológicas y de ecología del comportamiento. Más recientemente han sido utilizadas para estudiar la actividad reproductiva (Gunn et al. 2000; Doran et al. 2005). Desafortunadamente estos estudios rara vez evalúan los impactos negativos potenciales de su uso. La reproducción de vocalizaciones grabadas a aves en libertad ocasiona poca perturbación si la duración de

éstas se mantiene dentro de límites normales (normalmente menos de 30 min, Turcotte y Desrochers 2002; Hahn y Silverman 2007; Celis-Murillo et al. 2009). La reproducción de grabaciones puede distraer a los sujetos de actividades que son esenciales para el éxito reproductivo. Se ha demostrado que la reproducción de vocalizaciones (tanto de conspecíficos como de depredadores) durante la temporada reproductiva afecta negativamente el estado de unión de la pareja así como el éxito reproductivo en algunas aves, tales como búhos (Springer 1969; McNicholl 1978 citado en Proudfoot y Beasom 1996) y en aves canoras (Baptista y Gaunt 1997). A menos que el experimento lo requiera, las bocinas no deben de ser colocadas cercanas a una ubicación de nido conocida. La sobreutilización de reproducción de vocalizaciones de conspecíficos y depredadores durante la temporada no reproductiva, especialmente en días fríos de invierno, puede ocasionar el gasto excesivo del tiempo de alimentación para contestar a estos llamados.

Los señuelos vivos se utilizan frecuentemente en conjunto con las grabaciones y requieren de atención particular en el campo. La preocupación por el bienestar de los animales se debe tener tanto con los señuelos como con los individuos libres. Este tema se trata con detalle en la sección de Captura y Marcaje. De manera general, se debe monitorear de cerca a los señuelos vivos para atraer halcones a redes de niebla o trampas. Evite estresar al señuelo proporcionando cubierta del sol directo y para escapar de la rapaz. Un señuelo vivo debe de ser observado de manera constante por el investigador. Excepto por breves periodos de tiempo, los señuelos vivos deben de tener acceso a alimento y agua (Evrard y Bacon 1998). Las aves utilizadas como señuelos vivos deben de estar habituadas a su alojamiento en jaula bajo condiciones de campo por lo menos un día antes del inicio del experimento.

Las trampas con señuelo deben de ser diseñadas tanto para sistemas terrestres (p.e. Burt 1980) y acuáticos (p.e. Anderson et al. 1980). Evrard y Bacon (1998) probaron la eficacia de cuatro diferentes tipos de trampas para capturar patos: trampas de ingreso nadando con cebo, trampas de ingreso nadando con señuelo vivo, trampas flotantes con cebo, y trampas con señuelo. Los dos tipos de trampa con señuelo fueron más efectivas que las trampas sin señuelo. Evrard y Bacon (1998) revisaron y alimentaron a los patos señuelos diariamente, y a pesar de eso, varios señuelos (no se proporciono el número exacto) y patos capturados fueron presa de visones y mapaches. La tasa de mortalidad fue más alta que la reportada previamente en otros estudios utilizando trampas con señuelos (p.e. Anderson et al. 1980; Sharp y Lokemoen 1987), probablemente debido a la diferencia en la comunidad de depredadores. Además de las perdidas por depredadores, Sharp y Lokemoen (1987)

reportaron la muerte de un señuelo en la cual éste atoró el pico en un costado de la trampa y se ahogó. Ellos también hicieron observaciones importantes sobre el desempeño superior que tuvieron los patos de granja como señuelos, sobre los patos silvestres.

K. Huevos artificiales

El uso de huevos artificiales es invaluable para muchos estudios de ornitología, permitiendo un menor riesgo durante el trampeo y proporcionando un valor especial para el desarrollo de los huevos (p.e. en el mantenimiento de poblaciones amenazadas). Los huevos artificiales compuestos de varios materiales tales como madera, papel maché, plástico y arcilla, han producido respuestas normales de anidación. Sin embargo el reconocimiento de los huevos varía ampliamente entre especies. En algunas especies, los individuos reconocen los patrones únicos de sus propios huevos (Antonov et al. 2006; Prather et al. 2007); en otras los mecanismos de reconocimiento de los huevos son más generales (Moskát et al. 2003). Cuando los huevos artificiales se utilizan por periodos breves, tales como durante el trampeo, una aproximación general de los huevos reales debe de ser suficiente. Sin embargo cuando se pretende que los huevos artificiales sean incubados por días o semanas, se debe tener mucho cuidado en la imitación de la forma, tamaño, patrón y marcas de los huevos originales (Marchetti 2000). Las aves que difícilmente se sientan sobre huevos ajenos o artificiales pueden abandonar el nido, lo que resulta en una pérdida de datos.

L. Manipulación experimental del plumaje

Las maneras experimentales de alteración de la apariencia exterior de un ave caen en dos categorías mayores: alteración del tamaño y forma de las plumas y otras partes del cuerpo, y la alteración de la coloración de las plumas. Una de las maneras experimentales de manipulación del tamaño y forma de las plumas, es la alteración de la estructura de la cola en el contexto de probar hipótesis y predicciones acerca de la teoría de la selección sexual. Probablemente la más famosa, de Andersson (1982) acortó y alargó experimentalmente la cola de obispo colilargo (*Euplectes progne*) para probar las preferencias de las hembras de las características sexuales secundarias del macho. Bajo condiciones de cautiverio, tales manipulaciones no son traumáticas a menos que como resultado, el sujeto experimental tenga dificultad para alimentarse o beber. Bajo condiciones naturales, sin embargo, es importante asegurarse que tales manipulaciones no afecten la capacidad de vuelo u otros tipos de movimiento. Ciertos tipos de cola larga, principalmente aquellos que parecen existir como resultado de la presión de selección sexual (p.e. obispo colilargo), comprometen la habilidad de vuelo del ave (Balmford et al. 1993; Norberg 1995). El incremento de una cola de por sí difícil de manejar, puede comprometer la salud y aptitud

del individuo. La manipulación de la cola puede también afectar la habilidad del ave de moverse en hábitats complejos; Romero-Pujante et al. (2005) reportaron que la manipulación experimental en el largo de la cola de bigotudo (*Panurus biarmicus*) afectó su habilidad de moverse en los pantanos enjuncados, que son su principal hábitat.

La manera actual más común de manipulación del color del plumaje es para esconder o eliminar una característica sobresaliente, por ejemplo; la utilización de tinte negro para teñir las plumas rojas del tordo sargento (*Agelaius phoeniceus*); y la manipulación del gradiente de coloración del plumaje hacia extremos de la expresión natural de la característica, como utilizar marcadores para alterar el plumaje del pinzón mexicano (*Haemorhous mexicanus*) (vea Hill 2006a, 2006b para un tratado completo sobre coloración de aves). Más recientemente los investigadores han estado criando aves en cautiverio con dietas libres de pigmentos (p.e. dietas libres de carotenoides; McGraw y Hill 2001), creando así un grupo de aves con mínima coloración y que pueden ser teñidos para satisfacer las necesidades de experimentos. La ventaja de esta propuesta es que los investigadores pueden manipular inicialmente el color del plumaje del ave sin recurrir a aplicaciones externas mientras se mantiene al ave saludable (p.e. McGraw y Hill 2000). Los cambios en la coloración del plumaje no parecen influenciar las tasas de depredación de las aves alteradas (Stutchbury y Howlett 1995). El principal interés de bienestar animal con respecto a la manipulación de color del plumaje es evitar el uso de marcadores o colorantes químicos que puedan ser tóxicos al ave. Sobre este asunto, la utilización de plumas marcadoras es preferible sobre la pintura para zapatos, tintes para el cabello, o aceites coloreados. Dado que las aves utilizan el pico para acicalar sus plumas, no es suficiente evitar el pico, fosas nasales y ojos al aplicar los tintes que se sabe son tóxicos (como lo recomienda Rodgers 1986)

REFERENCIAS

- ALBERICO, J. 1995. Floating eggs to estimate incubation stage does not affect hatchability. *Wildlife Society Bulletin* 23:212-216.
- ANDERSON, M., R. SAYLER, Y A. AFTON. 1980. A decoy trap for diving ducks. *Journal of Wildlife Management* 44:217-219.
- ANDERSSON, M. 1982. Female choice selects for extreme tail length in a widowbird *Euplectes progne*. *Nature* 299:818-820.
- ANON. 2007. AVMA Guidelines on Euthanasia. 36 pp. American Association of Veterinary Medicine, Schaumburg, Illinois. Available online at <www.avma.org/resources/euthanasia.pdf>

- ANTONOV, A., B. STOKKE, A. MOKSNES, Y E. RØSKAFT. 2006. Egg rejection in marsh warblers (*Acrocephalus palustris*) heavily parasitized by common cuckoos (*Cuculus canorus*). *Auk* 123:419-430. Revision date August 2010 156
- ARAMAKI, T., Y H. S. WEISS. 1961. Predictability of the changes in hematocrit which follow repeated withdrawal of blood. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 108:242-244.
- ARNOLD, J. M., S. A. OSWALD, C. C. VOIGT, R. PALME, A. BRAASCH, C. BAUCH, Y P. H. BECKER. 2008. Taking the stress out of blood collection: comparison of field blood-sampling techniques for analysis of baseline corticosterone. *Journal of Avian Biology* 39:588-592.
- BAKER, M. 1981. A Muscle Biopsy Procedure for Use in Electrophoretic Studies of Birds. *Auk* 98:392-393.
- BALMFORD, A., A. THOMAS, Y I. JONES. 1993. Aerodynamics and the evolution of long tails in birds. *Nature* 361:628-631.
- BAPTISTA, L., Y S. GAUNT. 1997. Bioacoustics as a tool in conservation studies. *Behavioral Approaches to Conservation in the Wild*:212-242.
- BARRETT, R. T., C. J. CAMPHUYSEN, T. ANKER-NILSSEN, J. W. CHARDINE, R. W. FURNESS, S. GARTHE, O. HÜPPOP, M. F. LEOPOLD, W. A. MONTEVECCHI, Y R. VEIT. 2007. Diet studies of seabirds: a review and recommendations. *ICES Journal of Marine Science* 64:1675-1691.
- BECKER, P. H., C. C. VOIGT, J. M. ARNOLD, Y R. NAGEL. 2006. A non-invasive technique to bleed incubating birds without trapping: a blood-sucking bug in a hollow egg. *Journal of Ornithology* 147:115-118.
- BERDEEN, J. B., Y D. L. OTIS. 2006. Effects of Subcutaneous Transmitter Implants on Mourning Doves. *Wildlife Society Bulletin* 34:93-103.
- BIGLER, W., G. HOFF, Y L. SCRIBNER. 1977. Survival of mourning doves unaffected by withdrawing blood samples. *Bird-Banding* 48:168.
- BROWN, J., J. C. COULSON, Y G. P. MORRIS. 1993. Occurrence of oocysts of *Cryptosporidium* sp. in *Larus* spp. gulls. *Epidemiology and Infection* 110:135-143.
- BROWN, K. 1995. Does blood sampling ring-billed gulls increase parental desertion and chick mortality? *Colonial Waterbirds* 18:102-104. Revision date August 2010 157
- BROWN, M. B., Y C. R. BROWN. 2009. Blood sampling reduces annual survival in Cliff Swallows (*Petrochelidon pyrrhonota*). *Auk* 126:853-861.

- BUELER, D. M., N. BHOLA, D. BARJAKTAROV, W. GOYMANN, I. SCHWABL, B. I. TIELEMAN, Y T. PIERSMA. 2008. Constitutive immune function responds more slowly to handling stress than corticosterone in a shorebird. *Physiological and Biochemical Zoology* 81:673-681.
- BURTT, H. E. 1980. The stimulus value of the decoy trap. *North American Bird Bander* 5:11-12.
- CAMPBELL, T. W. 1994. Hematology. Pages 176-198 in *Avian Medicine: Principles and Application* (B. W. Ritchie, G.J. Harrison and L.R. Harrison, Ed.). Wingers Publication, Inc, Lakeworth, FL.
- CARLISLE, J. D., Y R. L. HOLBERTON. 2006. Relative efficiency of fecal versus regurgitated samples for assessing diet and the deleterious effects of a tartar emetic on migratory birds. *Journal of Field Ornithology* 77:126-135.
- CASTO, J. M., J. NOLAN, VAL, Y E. D. KETTERSON. 2001. Steroid hormones and immune function: experimental studies in wild and captive dark-eyed juncos (*Junco hyemalis*). *The American Naturalist* 157:408-420.
- CELIS-MURILLO, A., J. L. DEPPE, Y M. F. ALLEN. 2009. Using soundscape recordings to estimate bird species abundance, richness, and composition. *Journal of Field Ornithology* 80:64-78.
- CHLOUPEK, P., E. VOŠLÁROVÁ, P. SUCHY, JR., I. BEDÁNOVÁ, PIŠTEKOVÁ, F. VITULA, J. CHLOUPEK, Y V. VECEREK. 2009. Influence of pre-sampling handling duration on selected biomechanical indices in the common pheasant (*Phasianus colchicus*). *Acta Veterinaria Brno* 78:23-28.
- COCKREM, J. F., M. A. POTTER, D. P. BARRETT, Y E. J. CANDY. 2008. Corticosterone responses to capture and restraint in emperor and Adelie penguins in Antarctica. *Zoological Science* 25:291-298.
- DAVIS, A. K. 2005 Effect of handling time and repeated sampling on avian white blood cell counts. *Journal of Field Ornithology* 76:334-338. Revision date August 2010 158
- DEGERNES, L. A., C. A. HARMS, G. H. GOLET, Y D. M. MULCAHY. 2002. Anesthesia and liver biopsy techniques for pigeon guillemots (*Cephus columba*) suspected of exposure to crude oil in marine environments. *Journal of Avian Medicine and Surgery* 16:291-299.
- DE VOLO, S. B., R. T. REYNOLDS, M. R. DOUGLAS, Y M. F. ANTOLIN. 2008. An improved extraction method to increase DNA yield from molted feathers. *Condor* 110:762-766.
- DIAMOND, A., V. FAYAD, Y P. MCKINLEY. 2007. Ipecac: an improved emetic for wild birds. *Journal of Field Ornithology* 78:436-439.

- DORAN, P., P. GULEZIAN, Y M. BETTS. 2005. A test of the mobbing playback method for estimating bird reproductive success. *Journal of Field Ornithology* 76:227-233.
- DORRESTEIN, G. M., B.J. BLAAUBOER, N.A. MILTENBURG, Y P.P. DELEY. 1978. A modified method of blood sampling from birds. *Laboratory Animal* 12:193-194.
- DUFFY, D. C., Y S. JACKSON. 1986. Diet studies of seabirds: a review of methods. *Colonial Waterbirds* 9:1-17.
- DUFFY, D. L., G. E. BENTLEY, D. L. DRAZEN, Y G. F. BALL. 2000. Effects of testosterone on cell-mediated and humoral immunity in non-breeding adult European starlings. *Behavioral Ecology* 11:654-662.
- DUFTY, A. M. 1988. The effects of repeated blood sampling on survival in brown-headed cowbirds. *Condor* 90:939-941.
- DURÃES, R., Y M. A. MARINI. 2003. An evaluation of the use of tartar emetic in the study of bird diets in the Atlantic Forest of southeastern Brazil. *Journal of Field Ornithology* 74:270-280.
- EGLOFF, C., A. LABROSSE, C. HEBERT, Y D. CRUMP. 2009. A nondestructive method for obtaining maternal DNA from avian eggshells and its application to embryonic viability determination in herring gulls (*Larus argentatus*). *Molecular Ecology Resources* 9:19-27.
- EVANS, K. O., L. W. BURGER JR., B. C. FAIRCLOTH, W. E. PALMER, Y J. P. CAROLL. 2009. Effects of tissue collection methods on morphometrics and survival of captive neonatal northern bobwhite. *Journal of Wildlife Management* 73:1241-1244. Revision date August 2010 159
- EVARD, J. O., Y B. R. BACON. 1998. Duck trapping success and mortality using four trap designs. *North American Bird Bander* 23:110-114.
- FAIR, J., S. WHITAKER, Y B. PEARSON. 2007. Sources of variation in haematocrit in birds. *Ibis* 149:535-552.
- FISHER, I. J., Y S. R. SWENGEL. 1991. A guide for aging sandhill crane eggs. *Wildlife Society Bulletin* 23:494-497.
- FREDERICK, P. 1986. Parental desertion of nestlings by white ibis (*Eudocimus albus*) in response to muscle biopsy. *Journal of Field Ornithology* 57:168-169.
- FREEDMAN, B., F. K. AMMER, Y R. S. FRITZ. 2008. Optimization of DNA isolation from feathers. *Journal of the Pennsylvania Academy of Science* 82:48-51.
- GIONFRIDDO, J., L. BEST, Y B. GIESLER. 1995. A saline-flushing technique for determining the diet of seed-eating birds. *Auk* 112:780-782.

- GOWATY, P., Y A. KARLIN. 1984. Multiple Maternity and Paternity in Single Broods of Apparently Monogamous Eastern Bluebirds (*Sialia sialis*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 15:91-95.
- GUNN, J. S., A. DESROCHERS, M.-A. VILLARD, J. BOURQUE, Y J. IBARZABAL. 2000. Playbacks of mobbing calls of black-capped chickadees as a method to estimate reproductive activity of forest birds. *Journal of Field Ornithology* 71:472-483.
- HAN, J-I., J-H KIM, S. KIM, S-R PARK, Y K-J NA. 2009. A simple and improved DNA test for avian sex determination. *Auk* 126:779-783.
- HAHN, B. A., Y E. D. SILVERMAN. 2007. Managing breeding forest songbirds with conspecific song playbacks. *Animal Conservation* 10:436-441.
- HERRERA, C. M., Y F. HIRALDO. 1976. Food niche and trophic relationships among European owls. *Ornis Scandinavica* 7:29-41.
- HESS, C. A. 1997. Stomach flushing: sampling the diet of red-cockaded woodpeckers. *Wilson Bulletin* 109:535-539.
- HILL, G. E., Y K.J. MCGRAW. 2006a. *Bird Coloration. Volume I: Mechanisms and Measurements*. Harvard University Press, Cambridge. Revision date August 2010 160
- HILL, G. E., Y K.J. MCGRAW. 2006b. *Bird Coloration. Volume II: Function and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- HOBSON, K. A., Y L. I. WASSANAAR, Eds. 2008. *Tracking Animal Migration with Stable Isotopes*. Academic Press.
- HOGAN, F. E., R. COOKE, C. P. BURRIDGE, Y J. A. NORMANO. 2008. Optimizing the use of shed feathers for genetic analysis. *Molecular Ecology Resources* 8:561-567.
- HOYSAK, D. J., Y P. J. WEATHERHEAD. 1991. Sampling of blood from birds: a technique and an assessment of its effect. *Condor* 93:746-752.
- HULL, K. L., J. F. COCKREM, J. P. BRIDGES, E. J. CANDY, Y C. M. DAVIDSON. 2007. Effects of corticosterone treatment on growth, development, and the corticosterone response to handling in young Japanese quail. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular & Integrative Physiology* 148:531-543.
- IMMLER, S., Y T. R. BIRKHEAD. 2005. A non-invasive method for obtaining spermatozoa from birds. *IBIS: The International Journal of Avian Science* 147:827-830.
- JAHNCKE, J., A. GARCIA-GODOS, Y E. GOYA. 1999. The diet of the Peruvian diving-petrel at La Vieja and San Gallan, Peru. *Journal of Field Ornithology* 70:71-79.

- JOHNSON, E. J., L. B. BEST, Y P. A. HEAG. 1980. Food sampling biases associated with the 'ligature method'. *Condor* 82:186-192.
- JOHNSON, M. D., D. R. RUTHRAUFF, J. G. JONES, J. R. TIETZ, Y R. J.K. 2002. Short-term effects of tartar emetic on resighting rates of migratory songbirds in the non-breeding season. *Journal of Field Ornithology* 73:191-196.
- JOHNSON, R. R., B.T. BROWN, L.T. HEIGHT, Y J.M. SIMPSON. 1981. Playback recording as a special avian censusing technique. Pages 68-75 in *Estimating Numbers of Terrestrial Birds*, vol. 6 (C. J. R. a. J. M. Scott, Ed.). Allen Press, Lawrence, KS.
- JORDAN, M. J. R. 2005. Dietary analysis for mammals and birds: a review of field techniques and animal-management applications. *International Zoo Yearbook* 39:108-116.
- KADOCHNIKOV, N. P. 1967. A procedure of vital study of feeding habits of adult birds [Engl. sum.]. *Byul Mosk Obshchest Ispyt Prer Otd Biol* 72:29-34. Revision date August 2010 161
- KORSCHGEN, C. E., S. J. MAXSON, Y V. B. KUECHLE. 1984. Evaluation of implanted radio transmitters in ducks. *Journal of Wildlife Management* 48:982-987.
- LEDERER, R. J., Y R. CRANE. 1978. The effects of emetics on wild birds. *North American Bird Bander* 3:3-5.
- LEONARD, J. L. 1969. Clinical laboratory examinations. Pages 189-215 in *Diseases of Cage and Aviary Birds* (M. L. Petrack, Ed.). Lea and Febiger, Philadelphia.
- LOKEMOEN, J. T., Y R. R. KOFORD. 1996. Using candlers to determine the incubation stage of passerine eggs. *Journal of Field Ornithology* 67:660-668.
- LYNN, S. E. Y A. J. PORTER. 2008. Trapping initiates stress response in breeding and non-breeding house sparrows *Passer domesticus*: implications for using unmonitored traps in field studies. *Journal of Avian Biology* 39:87-94.
- MARCHETTI, K. 2000. Egg rejection in a passerine bird: size does matter. *Animal Behaviour* 59:877-883.
- MARRA, P. P., Y R. L. HOLBERTON. 1998. Corticosterone levels as indicators of habitat quality: Effects of habitat segregation in a migratory bird during the non-breeding season. *Oecologia* 116:284-292.
- MCCARTY, J. P., Y D. W. WINKLER. 1991. Use of an artificial nestling for determining the diet of nestling tree swallows. *Journal of Field Ornithology* 62:211-217.
- MCGRAW, K. J., Y G. E. HILL. 2001. Carotenoid access and intraspecific variation in plumage pigmentation in male American goldfinches (*Carduelis tristis*) and northern cardinals (*Cardinalis cardinalis*). *Functional Ecology* 15:732-739.

- MCGUILL, M. W., Y A. N. ROWAN. 1989. Biological effects of blood loss: implications for sampling volumes and techniques. *ILAR News* 31:5-18.
- MCNICHOLL, M. K. 1978. A census of screech owls (*Otus asio*) using tape-recorded calls. *Jack-Pine Warbler* 52:99-101.
- MELLOTT, R. S., Y P. E. WOODS. 1993. An improved ligature technique for dietary sampling in nestling birds. *Journal of Field Ornithology* 64:205-210. Revision date August 2010
162
- MENNILL, D., L. RATCLIFFE, Y P. BOAG. 2002. Female eavesdropping on male song contests in songbirds. *Science* 296:873.
- MINEAU, P., Y M. PEDROSA. 1986. A portable device for nondestructive determination of avian embryonic viability. *Journal of Field Ornithology* 57:53-56.
- MORTON, D. B., D. ABBOT, R. BARCLAY, B. S. CLOSE, R. EWBANK, D. GASK, M. HEATH, S. MATTIE, T. POOLE, J. SEAMER, J. SOUTHEE, A. THOMPSON, B. TRUSSELL, C. WEST, Y M. JENNINGS. 1993. Removal of blood from laboratory mammals and birds. *Laboratory Animals* 27:1-22.
- MOSKÁT, C., T. SZEKELY, T. KISBENEDEK, Z. KARCZA, Y I. BÁRTOL. 2003. The importance of nest cleaning in egg rejection behavior of great reed warblers *Acrocephalus arundinaceus*. *Journal of Avian Biology* 34:16-19.
- MURPHY, M., Y J. KING. 1986. A Safe and Accurate Method for Force-Feeding Small Granivorous Birds. *Auk* 103:429-431.
- NORBERG, U. M. 1995. How a long tail and changes in mass and wing shape affect the cost for flight in animals. *Functional Ecology* 9:48-54.
- ORNITHOLOGICAL COUNCIL. 2006 . Avian Influenza: what ornithologists and bird banders should know.
<http://www.nmnh.si.edu/BIRDNET/OC/fact/Avian.Influenza.Fact.Sheet.pdf>
- PARRISH, J. D., M. L. WHITMAN, Y S. B. COMINGS. 1994. A facilitated method for collection of fecal samples from mist-netted birds. *North American Bird Bander* 19:49-51.
- PÉREZ-RODRÍGUEZ, L., C. ALONSO-ALVAREZ, and J. VIÑUELA. 2007. Repeated sampling but not samplin hour affects plasma carotenoid levels. *Physiological and Biochemical Zoology* 80:250-254.
- POULIN, B., Y G. LEFEBVRE. 1995. Additional information on the use of tartar emetic in determining the diet of tropical birds. *Condor* 97:897-902.

- POULIN, B., G. LEFEBVRE, Y R. MCNEIL. 1994. Effect and efficiency of tartar emetic in determining the diet of tropical land birds. *Condor* 96:98-104. Revision date August 2010 163
- POULSEN, J. G., Y N. J. AEBISCHER. 1995. Quantitative comparison of two methods of assessing diet of nestling skylarks (*Alauda arvensis*). *Auk* 112:1070-1073.
- PRATHER, J. W., A. CRUZ, P. F. WEAVER, Y J. W. WILEY. 2007. Effects of experimental egg composition on rejection by village weavers (*Ploceus cucullatus*). *Wilson Journal of Ornithology* 119:703-711.
- PROUDFOOT, G. A., Y S. L. BEASOM. 1996. Responsiveness of cactus ferruginous pygmy-owls to broadcasted conspecific calls. *Wildlife Society Bulletin* 24:294-297.
- PRŶS-JONES, R. P., L. SCHIFFERLI, Y D. W. MACDONALD. 1974. The use of an emetic in obtaining food samples from passerines. *Ibis* 16:90-94.
- QUAY, W. 1988. Marking of insemination encounters with cloacal microspheres. *North American Bird Bander* 13:36-40.
- QUAY, W. B. 1985. Cloacal sperm in spring migrants occurrence and interpretation. *Condor* 87:273-280.
- QUAY, W. B. 1986. Timing and location of spring sperm release in northern thrushes. *Wilson Bulletin* 98:526-534.
- QUAY, W. B. 1987. Spontaneous continuous release of spermatozoa and its predawn surge in male passerine birds. *Gamete Research* 16:83-92.
- QUINTANA, F., G. C. LOPEZ, Y G. SOMOZA. 2008. A Cheap and Quick Method for DNA-based Sexing of Birds. *Waterbirds* 31:485-488.
- RAVELING, D. 1970. Survival of Canada geese unaffected by withdrawing blood samples. *Journal of Wildlife Management* 34:941-943.
- REDPATH, S. M., R. CLARKE, M. MADDERS, Y S. J. THIRGOOD. 2001. Assessing raptor diet: comparing pellets, prey remains, and observational data at hen harrier nests. *Condor* 103:184-188.
- ROBERTSON, G., S. KENT, Y J. SEDDON. 1994. Effects of the water-offloading technique on Adelie penguins. *Journal of Field Ornithology* 65:376-380.
- ROBERTSON, R. J. 1973. Optimal niche space of the red-winged blackbird III. Growth rate and food of nestlings in marsh and upland habitat. *Wilson Bulletin* 85:209-222. Revision date August 2010 164

- RODGERS, J. A. 1986. A field technique for color-dyeing nestling wading birds without capture. *Wildlife Society Bulletin* 14:399-400.
- ROMERO-PUJANTE, M., H. HOI, Y D. BLOMQUIST. 2005. The importance of tail length for habitat use in the bearded tit *Panurus biarmicus*: an experimental study. *Ibis* 147:464-470.
- ROMERO, L. M. Y J. M. REED. 2005. Collecting baseline corticosterone samples in the field: is under 3 min good enough? *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 140:73-79.
- ROMERO, M. L., Y M. J. ROMERO. 2005. Corticosterone responses in wild birds: the importance of rapid sampling. *Condor* 104:129-135.
- ROMERO, M. L., Y R. C. ROMERO. 2002. Corticosterone responses in wild birds: The importance of rapid initial sampling. *Condor* 104:129-135.
- ROSENBERG, K. V., Y R. J. COOPER. 1990. Approaches to avian diet analysis. *Studies in Avian Biology* 13:80-90.
- RYAN, P. G., Y S. JACKSON. 1986. Stomach Pumping: Is Killing Seabirds Necessary? *The Auk* 103:427-428.
- SCHMOLL, T., V. DIETRICH, W. WINKEL, Y T. LUBJUHN. 2004. Blood sampling does not affect fledging success and fledgling local recruitment in coal tits (*Parus ater*). *Journal of Ornithology* 145:79-80.
- SHARP, D. E., Y J. T. LOKEMOEN. 1987. A decoy trap for breeding-season mallards in North Dakota. *Journal of Wildlife Management* 51:711-715.
- SHELDON, L. D., E. H. CHIN, S. A. GILL, G. SCHMALTZ, A. E. M. NEWMAN, Y K. K. SOMA. 2008. Effects of blood collection on wild birds: an update. *Journal of Avian Biology* 39:369-378.
- SPRINGER, D. G. 1969. Foot surveys versus owl calling surveys: a comparative study of two great horned owl census techniques. *Inland Bird Banding News* 50:83-92.
- STANGEL, P. W. 1986. Lack of effects from sampling blood from small birds. *Condor* 88:244-245. Revision date August 2010 165
- STANGEL, P. W., and M. R. LENNARTZ. 1988. Survival of red-cockaded woodpecker nestlings unaffected by sampling blood and feather pulp for genetic studies. *Journal of Field Ornithology* 59:389-394.
- STUTCHBURY, B. J., Y J. S. HOWLETT. 1995. Does male-like coloration of female hooded warblers increase nest predation? *Condor* 97:559-564.

- TAZAWA, H., O. KURODA, Y G. WHITTOW. 1991. Noninvasive Determination of Embryonic Heart Rate During Hatching in the Brown Noddy (*Anous stolidus*). *Auk* 108:594-601.
- TURCOTTE, Y., Y A. DESROCHERS. 2002. Playbacks of mobbing calls of black-capped chickadees help estimate the abundance of forest birds in winter. *Journal of Field Ornithology* 73:303-307.
- UTTER, J. M., E. A. LE FEBVRE, Y J. S.GREENLAW. 1971. A Technique for Sampling Blood from Small Passerines. *Auk* 88:169-171.
- VALERA, F., J. E. GUTIERREZ, Y R. BARRIOS. 1997. Effectiveness, biases and mortality in the use of apomorphine for determining the diet of granivorous passerines. *Condor* 99:765-772.
- VAN OERS, K. and C. CARERE. 2007. Long-term effects of repeated handling and bleeding in wild caught Great Tits *Parus major*. *Journal of Ornithology* 148 Supplement 2:185-190.
- VOSS, M., D. SHUTLER, and J. WERNER. 2010. A hard look at blood-sampling of birds. *Auk* 127:704-708.
- VUILLAUME, A. 1983. A New Technique for Taking Blood Samples from Ducks and Geese. *Avian Pathology* 12:389-391.
- WALTER, S. E., Y D. H. RUSCH. 1997. Accuracy of egg flotation in determining age of Canada goose nests. *Wildlife Society Bulletin* 25:854-857.
- WELLER, M. W. 1956. A simple field candler for waterfowl eggs. *Journal of Wildlife Management* 20:111-113.
- WICKS, R. M. Y D. J. SCHULTZ. 2008. The effect of a single intravenous fluid bolus on packed cell volume and plasma total solids concentration in Red-collared Lorikeets (*Trichoglossus haematodus rubritorquis*). *Australian Veterinary Journal* 86:106-109. Revision date August 2010 166
- WESTERSKOV, K. 1950. Methods for determining the age of game bird eggs. *Journal of Wildlife Management* 14:56-67.
- WESTNEAT, D., R. PAYNE, Y S. DOEHLERT. 1986. Effects of muscle biopsy on survival and breeding success in indigo buntings. *Condor* 88:220-227.
- WESTNEAT, D. F. 1986b. The effects of muscle biopsy on survival and conditions in white-throated sparrows (*Zonotrichia albicollis*). *Wilson Bulletin* 98:280-285.
- WIKELSKI, M., M. HAU, Y J. C. WINGFIELD. 1999. Social instability increases plasma testosterone in a year-round territorial neotropical bird. *Proceedings Royal Society of London* 266:551-556.

- WILSON, R.P. Y B. M. CULIK. 1995. Energy studies of free-living seabirds: do injections of doubly-labeled water affect Gentoo Penguin behavior? *Journal of Field Ornithology* 66:484-491.
- WILSON, C. M., Y R. L. HOLBERTON. 2004. Individual risk versus immediate reproductive success: A basis for latitudinal differences in the adrenocortical response to stress in Yellow Warblers (*Dendroica petechia*). *Auk* 121:1238-1249.
- WILSON, R. P. 1984. An improved stomach pump for penguins and other seabirds. *Journal of Field Ornithology* 55:109-112.
- WINGFIELD, J. 1984. Androgens and Mating Systems: Testosterone-Induced Polygyny in Normally Monogamous Birds. *Auk* 101:665-671.
- WINGFIELD, J. 1994. Modulation of the adrenocortical response to stress in birds. *Perspectives in Comparative Endocrinology*:520-528.
- WINGFIELD, J. C., Y D. S. FARNER. 1976. Avian endocrinology - field investigations and methods. *Condor* 78:570-573.
- WINGFIELD, J. C., J. P. SMITH, Y D. S. FARNER. 1982. Endocrine responses of white-crowned sparrows to environmental stress. *Condor* 84:399-409. Revision date August 2010
167
- YASHKULOV, K. B., M. Y. SHCHELKANOV, S. S. LVOV, S. D. DZHAMBINOV, I. V. GALKINA, I. T. FEDYAKINA, B. T. BUSHKIYEVA, T. N. MOROZOVA, D. Y. KIREYEV, D. S. AKANINA, K. Y. LITVIN, Y. V. USACHEV, A. G. PRILIPOV, T. V. GREBENNIKOVA, V. L. GROMASHEVSKY, S. S. YAMNIKOVA, A. D. ZABEREZHNYI, Y D. K. LVOV. 2008. Isolation of influenza virus A (Orthomyxoviridae, Influenza A virus), Dhori (Orthomyxoviridae, Thogotovirus), and Newcastle's disease (Paromyxoviridae, Avulavirus) on the Malyi Zhemchuzhnyi island in the northwestern area of the Caspian Sea. *Voprosy Virusologii* 53:34-38.
- YOUNG, A. D. 1988. A portable candler for birds' eggs. *Journal of Field Ornithology* 59:266-268.
- ZACH, R., Y J. B. FALLS. 1976. Bias and mortality in the use of tartar emetic to determine the diet of Ovenbirds *Aves Parulidae*. *Canadian Journal of Zoology* 54:1599-1603.