



LIFE AEGYPIUS RETURN

## PROTOCOLO

RECOLHA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS E DADOS BIOMÉTRICOS NA MARCAÇÃO DE CRIAS DE ABUTRE-PRETO (*Aegypius monachus*)

Maio 2024





Quase quatro décadas após se ter extinguido em Portugal como espécie nidificante, o abutre-preto (*Aegypius monachus*) recolonizou o país em 2010, resultado da nidificação de algumas aves oriundas de Espanha e graças aos esforços de conservação levados a cabo nos dois países por ONGs e pelas entidades governamentais, em territórios públicos e privados. Embora o número de casais reprodutores tenha vindo a aumentar, a população de abutres-pretos é ainda hoje demasiado frágil, e o seu futuro permanece incerto em Portugal. O projeto LIFE Aegypius Return, cofinanciado pela União Europeia, vem assegurar o regresso definitivo da espécie.

<https://4vultures.org/life-aegypius-return/>

## Beneficiário Coordenador



## Beneficiários Associados



## Financiamento



Co-funded by  
the European Union

O projeto LIFE21 NAT/NL/LIFE Aegypius Return/101074677 é cofinanciado pela União Europeia. Os pontos de vista e as opiniões expressas são as dos autores e não refletem necessariamente a posição da União Europeia ou da Agência de Execução Europeia do Clima, das Infraestruturas e do Ambiente (CINEA). Nem a União Europeia nem a agência financiadora podem ser tidas como responsáveis por essas opiniões.

# FICHA TÉCNICA

## Citação Recomendada

Delgado, D. (Coord.); Matos, M.; Santos, E.; Sargo, R.; Loureiro, F.; Couto, M.P.; Santos, N. 2024. Protocolo para a recolha de amostras biológicas e dados biométricos na marcação de crias de abutre-preto (*Aegypius monachus*). LIFE Aegypius Return. <https://doi.org/10.5281/zenodo.12521751>

## Coordenação

LPN - Liga para a Protecção da Natureza

## Contributos *(por ordem dos autores)*

LPN - Liga para a Protecção da Natureza

VCF - Vulture Conservation Foundation

HVUTAD – Hospital Veterinário da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

CIBIO - Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos

# ÍNDICE

<b>ENQUADRAMENTO .....</b>	<b>5</b>
1. PREÂMBULO .....	6
2. OBJETIVOS.....	7
3. COMPROMISSO.....	7
<b>PROCEDIMENTOS .....</b>	<b>8</b>
4. INTRODUÇÃO .....	9
5. CRONOLOGIA DA INTERVENÇÃO .....	10
6. EXPLORAÇÃO CLÍNICA DA CRIA .....	11
6.1. Registos iniciais .....	11
6.2. Anamnese .....	11
6.3. Exame físico.....	12
7. PRIMEIROS SOCORROS .....	13
8. RECOLHA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS DA CRIA.....	13
8.1. Na base do ninho .....	13
8.2. Nas instalações com eletricidade, próximas do ninho/local de marcação.....	17
8.3. Nas instalações do Hospital Veterinário da UTAD.....	18
9. RECOLHA DE DADOS BIOMÉTRICOS.....	19
10. ARMAZENAMENTO E ENVIO DAS AMOSTRAS.....	24
11. REFERÊNCIAS.....	25
<b>ANEXOS.....</b>	<b>28</b>
Anexo I. Material necessário para o acompanhamento médico-veterinário na marcação de crias de abutre-preto .....	29
Anexo II. Pautas para a etiquetagem das amostras .....	30
Anexo III. Escala para a estimacão da condição corporal da cria de abutre-preto .....	32
Anexo IV: Avaliação do estado de desidrataçã.....	34
Anexo V: Pautas para a administraçã de fluidos como terapia básica.....	35
Anexo VI: Exame dos dejetos.....	37
Anexo VII: Registos da exploraçã físcia.....	38
Anexo VIII: Registos da colheita de amostras biológcas .....	39
Anexo IX: Parâmetros a analisar na Hematologia e Bioquímica sanguínea:.....	40
Anexo X: Parâmetros a analisar em Toxicologia.....	43
Anexo XI: Parâmetros a analisar em Genética .....	45

Anexo XII: Parâmetros a analisar em Microbiologia .....	47
Anexo XIII: Parâmetros a analisar em Citologia/Histopatologia.....	48
Anexo XIII.a. Registos para a descrição da lesão detetada.....	49
Anexo XIII.b. Avaliação relativa das lesões detetadas.....	50
Anexo XIII.c. Árvore de decisão - Destino das crias de abutre-preto com base na pontuação das lesões detetadas. ....	51
Anexo XIV: Parâmetros a analisar em Parasitologia .....	52
Anexo XV. Parâmetros a analisar em Endocrinologia .....	53
Anexo XVI: Mapa para o Transporte e Acondicionamento de Amostras.....	54
Anexo XVII: Registos dos Dados Biométricos .....	55



©Paulo Monteiro/SPEA

# ENQUADRAMENTO

# 1. PREÂMBULO

O abutre-preto (*Aegypius monachus*) é uma espécie ameaçada, que detém o estatuto de conservação Em Perigo (EN), em Portugal, e Vulnerável (VU), em Espanha. A nível global está classificada como Quase Ameaçada (NT), pela União Internacional para a Conservação da Natureza. Está protegida pela Diretiva Habitats (Anexo I), sendo uma espécie de conservação prioritária no espaço europeu, pela Convenção de Berna (Anexo II), pela Convenção de Bona (Anexo II) e pela Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Fauna e Flora Silvestres Ameaçadas de Extinção (CITES – Anexo II-A).

Enquanto ave necrófaga, desempenha um papel ecológico fundamental, ao alimentar-se de carcaças, e minimizando a proliferação de doenças.

Ao longo do século XX, um vasto conjunto de ameaças causaram um severo declínio da espécie, e levaram ao seu desaparecimento na maior parte das suas áreas de distribuição na Europa. Em Portugal, o abutre-preto extinguiu-se, enquanto espécie reprodutora, no início da década de 1970. As populações espanholas atingiram mínimos de 250 casais reprodutores. Foram então adotadas várias medidas de recuperação da espécie e, graças a esses esforços, nas últimas décadas as populações de abutre-preto em Espanha recuperaram e totalizam hoje cerca de 3000 casais. Como resultado, foram sendo registadas cada vez mais incursões destas aves em território português. Em 2010, o abutre-preto voltou a nidificar em Portugal, no Parque Natural do Tejo Internacional. Desde então, mais casais começaram a instalar-se em diferentes regiões de Portugal, mas a população e as colónias reprodutoras continuam muito vulneráveis, o que torna necessária uma intervenção concertada.

O projeto LIFE Aegypius Return objetiva consolidar o regresso do abutre-preto em Portugal e na Espanha ocidental. Até ao final do projeto, em 2027, a equipa pretende duplicar a população reprodutora em Portugal, passando dos 40 casais em 4 colónias conhecidos em 2022 para pelo menos 80 casais em 5 colónias até 2027, melhorar o sucesso reprodutivo, fortalecer a conectividade entre colónias e baixar o estatuto nacional de ameaça de Criticamente em Perigo para Em Perigo (tendo esta alteração ocorrido em 2023, com a atualização da [Lista Vermelha](#) das Aves de Portugal Continental). O conjunto das iniciativas segue as recomendações do Multi-species [Action Plan](#) to Conserve African-Eurasian Vultures e contribui largamente para a implementação do Plano de Ação para a Conservação das Aves Necrófagas (PACAN), aprovado pelo Despacho n.º [7148/2019](#), de 12 de agosto.

## 2. OBJETIVOS

Os objetivos do projeto serão atingidos através de uma estratégia que visa mitigar as ameaças à conservação do abutre-preto, melhorar a sua disponibilidade alimentar, incrementar o seu sucesso reprodutor, e reforçar a população mais frágil e limítrofe, no norte de Portugal (Douro Internacional). Para o sucesso desta missão será crucial o empenho de todos os parceiros de projeto, mas também a colaboração de uma vasta rede de pessoas e entidades, desde as autoridades nacionais, organizações não-governamentais, agricultores, caçadores, biólogos, médicos veterinários, entre muitos outros, em diferentes áreas de atuação. A equipa de projeto pretende facilitar a articulação de todas estas partes interessadas, definindo pontos de convergência e maximizando a eficiência de todos os contributos, com vista à conservação da espécie.

Este protocolo, produzido no âmbito do projeto **LIFE Aegyptius Return**, visa propor um código deontológico e um conjunto de procedimentos que sistematizem os processos de recolha, armazenamento e processamento de amostras biológicas de abutres-pretos. O objetivo final é assegurar a obtenção de elementos comparáveis, recolhidos através de processos uniformizados, que enriqueçam o conhecimento existente sobre a espécie e, assim, auxiliem nos processos de tomada de decisão sobre o seu cuidado médico-veterinário e na conservação da espécie.

O projeto LIFE Aegyptius Return poderá, se necessário, promover reuniões ou workshops para a partilha de informação e experiências entre as entidades envolvidas, para a formação de profissionais ou clarificação de critérios e procedimentos em relação aos métodos propostos.

Adicionalmente, este protocolo contribui para o provimento dos Objetivos Específicos n.º 8 e n.º 13 do PACAN, a saber: Criação de um sistema de monitorização das causas de mortalidade/morbilidade de aves necrófagas e Monitorização das populações de aves necrófagas, respetivamente.

A este protocolo deve anexar-se qualquer acordo sobre vigilância sanitária ou gestão de fauna selvagem em perigo que seja aplicável.

## 3. COMPROMISSO

Todas as pessoas e entidades jurídicas que trabalham no âmbito das redes colaborativas do PACAN e, em particular, do projeto LIFE Aegyptius Return, comprometem-se a implementar as recomendações abaixo e a reunir os seus recursos a fim de partilhar as suas experiências e competências para o bem-estar das aves manuseadas. Cada uma destas pessoas é suscetível de intervir num ou em vários procedimentos de contacto com abutres-pretos, sendo, portanto, importante que as recomendações sejam seguidas.



©Milene Matos/VCF

# PROCEDIMENTOS

## 4. INTRODUÇÃO

Uma das fases críticas na conservação do abutre-preto consiste na monitorização das suas colónias durante a época de reprodução. Do ponto de vista médico-veterinário, a marcação (com anilhas e/ou emissores GPS) das crias ainda no ninho é um momento crucial para contribuir para a conservação desta espécie, através do exame clínico e da recolha de amostras biológicas.

A importância prática deste ato clínico reside principalmente em decidir se o animal examinado está apto para continuar o seu ciclo biológico em estado selvagem ou se, pelo contrário, necessita de apoio num Centro de Recuperação para a Fauna. Adicionalmente, o ato clínico também incluirá a recolha de amostras biológicas, o seu processamento inicial, e a adequação para o seu armazenamento e transporte. A informação recolhida permitirá aumentar o conhecimento sobre o estado de saúde dos indivíduos e, portanto, da respetiva colónia e população nacional.

**NOTA:** O presente protocolo descreve todos os procedimentos necessários para a recolha de amostras biológicas e biometrias de **crias** capturadas no ninho. No entanto, os procedimentos a seguir no caso de indivíduos **juvenis ou adultos** são, na sua essência, idênticos aos descritos para as crias (devendo, naturalmente, nesses casos ser desconsiderados os passos referentes à aproximação ao ninho). Cada equipa deverá organizar a logística e a cronologia da intervenção ao momento ou oportunidade de recolha (ex. capturas). A decisão de se proceder à recolha de amostras biológicas e dados biométricos de um adulto ou um juvenil no âmbito do projeto LIFE Aegyptius Return, bem como o envio/entrega das amostras biológicas, juntamente com as fichas de registo, deverá ser coordenada com a VCF.



Fig. 1. Preparação de material para a recolha de amostras biológicas de cria de abutre-preto junto ao ninho. ©VCF

## 5. CRONOLOGIA DA INTERVENÇÃO

**Briefing:** Antes de cada época de marcação, o projeto LIFE Aegyptius Return organizará uma reunião com todos os médicos veterinários e/ou técnicos que vão intervir na recolha de amostras das crias de abutre-preto, para discutir e esclarecer os aspetos relevantes para a implementação do presente protocolo.

**Equipa:** A equipa presente nos trabalhos junto ao ninho deverá restringir-se ao número mínimo de elementos necessários: o técnico credenciado para captura e marcação de abutres-pretos, o médico veterinário com licença para manuseamento de abutres-pretos e recolha de amostras de exemplares da fauna selvagem, e os seus assistentes, bem como o(s) técnico(s) encarregado(s) pela monitorização da colónia.

**Ato clínico:** O ato clínico médico veterinário (assinalado \*a verde, na lista abaixo) integra-se no processo de **marcação e recolha de dados biométricos** da cria de abutre-preto:

- O parceiro responsável pela monitorização da colónia está atento à idade das crias, seguindo o protocolo de monitorização da reprodução da espécie definido no âmbito do projeto LIFE Aegyptius Return (Santos *et al.* 2023), e informa o resto da equipa e o ICNF do período mais adequado para a marcação das crias da colónia que acompanha, atendendo ao método de marcação a utilizar. O parceiro responsável organiza a logística e coordena com os restantes intervenientes os detalhes necessários e o dia exato da marcação.

- \*Preparação, com antecedência, de todo o material necessário (ver Anexo I).

- Aproximação e subida ao ninho.

- Captura da cria de abutre-preto no ninho, colocação do caparão e introdução num saco.

- Descida da cria no interior do saco.

- \*Exploração clínica da cria (Ver ponto 6., página 11)

- \*Primeiros socorros (caso seja necessário) (Ver ponto 7., página 13)

- \*Recolha de amostras biológicas (Ver ponto 8., página 13)

- Recolha de dados biométricos (Ver ponto 9., página 19).

- Marcação: colocação de anilha(s) e de emissor GPS.

- Reintrodução no saco e subida ao ninho.

- Devolução da cria ao ninho.

- Afastamento do ninho.

- \*Observação à distância.

**Nota importante:** Deve fazer-se silêncio durante todo o processo de manuseamento e marcação da cria, evitando conversas e ruídos desnecessários nas proximidades do ninho. Sempre que seja inevitável ou necessário falar, no âmbito dos trabalhos em curso, deve-se fazê-lo em voz baixa. Intervenções calmas e coordenadas, onde todos os participantes estão focados nas suas funções e nas várias etapas do processo, resultam em manuseamentos menos prolongados no tempo, menor stress para a cria e para os adultos, e recuperações mais rápidas e eficazes. Também por motivos de salvaguarda do bem-estar da ave a marcar, deve manter-se o caparão colocado durante todo o processo (devendo ser retirado somente durante a exploração física da cabeça).

## 6. EXPLORAÇÃO CLÍNICA DA CRIA

A realizar pelo médico veterinário e assistentes da equipa. O médico veterinário fica responsável pelo registo dos dados a recolher. Para uniformizar o método, a informação deve ser recolhida utilizando as tabelas do Anexo VII.

O médico veterinário fica também responsável por, posteriormente, inserir os resultados desta exploração clínica na base de dados a providenciar pelo projeto LIFE Aegyptius Return.

### 6.1. Registos iniciais

Código de amostragem (Cód. amos.). Composto por uma letra e dois dígitos. A letra faz referência à colónia de procedência da cria e os dígitos são a sequência das crias amostradas em cada colónia, sequencialmente, ao longo dos anos. Exemplos:

Colónia	Letra	Exemplos
Douro Internacional	D	D01, D02, D03...
Malcata	M	M01, M02, M03...
Tejo Internacional	T	T01, T02, T03...
Herdade da Contenda	C	C01, C02, C03...

Data da intervenção (Data: ), hora de chegada à base do ninho (Hora chegada: ), hora da extração do sangue (Hora extração: ), hora da saída da base do ninho (Hora saída: ), temperatura ambiente (T° amb: ), humidade relativa (Hum: ), altitude (Alt: ), pressão atmosférica (Pr. Atm: ).

### 6.2. Anamnese

Registar os dados abaixo, facilitados maioritariamente pelo responsável da monitorização da colónia acerca da cria:

- Local da colónia (Local: )
- Identificação ou referência do ninho (Ref. ninho: )
- Idade estimada da cria (Idade cria: )
- Código numérico da anilha metálica (Anilha metálica: ). Marcar o campo correspondente ao tarso utilizado para colocar a anilha metálica: tarso esquerdo ( T. esq.) ou tarso direito ( T. dir.)
- Código alfanumérico da anilha de PVC (Anilha PVC: ). Registar nos campos correspondentes a cor, ou uma abreviatura da mesma, tanto do fundo da anilha de PVC, como dos seus dígitos, (Cor fundo: ), (Cor código: ). Marcar o campo correspondente ao tarso utilizado para colocar esta anilha ( T. esq.) ou ( T. dir.).
- Referência do emissor GPS (Emissor GPS: ). Código alfanumérico e marca, e tipo de arnês colocado ( Leg loop ou  Backpack)

- Registrar no campo “Outras observações: “as questões assinaláveis, caso existam, relativas às observações realizadas durante a monitorização (possíveis perturbações, reações estranhas, etc.).

### 6.3. Exame físico

- Pesagem. Para minimizar o stress da ave e evitar manuseamentos desnecessários, aconselha-se realizar a pesagem a seguir à descida da cria do ninho, antes de tirá-la do saco (Peso 1: ). Pendura-se o saco com a cria numa balança vertical, e depois pesa-se o saco sem a cria (Peso 2: ). A diferença entre o peso total e o peso do saco corresponde ao peso da cria (Peso cria: ).

- Colocação do assistente numa posição cómoda para segurar a cria com caparão, de forma a facilitar o exame físico e a obtenção de amostras biológicas. O animal deverá ser contido, sempre que possível em posições erguidas (quando é segurado pelo assistente) ou decúbito esternal. Evitar o decúbito supino.

- Auscultação para avaliar o sistema respiratório e o coração. Registrar na ficha os batimentos cardíacos por minuto (Bpm: ) e os movimentos respiratórios por minuto (Resp / m: ). Registrar qualquer incidência detetada, no campo das observações.

- Observação e/ou palpação das diferentes partes da ave à procura de sinais de doença, anotando as incidências encontradas no campo das observações: bico, cera e narinas, cavidade orofaríngea, olhos, ouvidos, cabeça e pescoço, clavícula, esterno, abdómen, cloaca, costas, asas, membros pélvicos, pés, pele.

Simultaneamente, aquando da exploração do pescoço, comprovar e registar se há alimento no papo ou moela ( Papo cheio /  Papo vazio). Com a exploração do esterno, abdómen, axilas e virilhas, registar a condição corporal da cria segundo a escala explicada no Anexo III. Aproveitar a exploração da cloaca para tomar e registar a temperatura cloacal (T<sup>a</sup>: ). E, finalmente, registar no campo “outras observações” se a cria regurgitou, ou não, durante o processo de captura/manuseamento.

ATENÇÃO: Caso o médico veterinário detete, durante a exploração física, alguma incidência que comprometa a viabilidade da cria, deverá solicitar o encaminhamento da mesma para o Centro de Recuperação para a Fauna mais próximo<sup>1</sup>, aplicando os primeiros socorros, quando necessário.

Os contactos e as localizações dos Centros de Recuperação para a Fauna são disponibilizados no ponto 7.5 do [protocolo](#) Matos *et al.* 2023.

<sup>1</sup> Centros de Recuperação para a Fauna mais próximos, consoante a colónia de cria:

- Douro Internacional: CIARA, CRAS-HVUTAD
- Malcata: CERAS, CERVAS
- Tejo Internacional: CERAS
- Herdade da Contenda: CARAS, LxCRAS, RIAS

## 7. PRIMEIROS SOCORROS

(em caso de necessidade)

Quando existirem evidências de desidratação leve (até 6%) numa cria, e nenhum outro sinal clínico, o médico veterinário pode aplicar uma terapia básica de hidratação (Ver anexo V), sem a interrupção do processo de marcação e recolha de amostras biológicas, e com a posterior devolução da cria ao ninho. A desidratação moderada (8 a 10%) já requiere a instituição de fluido-terapia prolongada, pelo que o animal deve ser transportado para um Centro de Recuperação para a Fauna.

Quando uma ave é encontrada em choque ou estado crítico, interrompem-se os processos de exame clínico completo, amostragens e marcação. Após uma avaliação inicial, o veterinário da equipa pode instaurar uma terapia básica com o objetivo de estabilizar os sinais vitais da ave, e articular o encaminhamento para o Centro de Recuperação para a Fauna disponível mais próximo.

Os procedimentos de estabilização da ave devem obedecer aos princípios básicos de emergência médica. Após a verificação do estado ventilatório da ave, devem ter-se em conta as alterações do aparelho circulatório, atuando em conformidade. Quaisquer hemorragias identificadas devem ser controladas, deve ser aberta uma via para a administração de fluidoterapia e, se possível, realizar a imobilização de quaisquer fraturas ou luxações identificadas.

## 8. RECOLHA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS DA CRIA

### 8.1. Na base do ninho

#### 8.1.1. SANGUE

- A venopunção realizar-se-á preferencialmente na veia cubital ou metatarsiana, sempre com a utilização de luvas, e com prévia desinfeção da zona. No caso da veia cubital pode não ser necessária a ingurgitação da mesma. Deve utilizar-se a agulha de maior diâmetro possível (até 21G para veia cubital em cria de 85-90 dias), de forma a evitar a hemólise. Extraem-se 5 ml de sangue, lentamente, de forma a evitar a hemólise. Uma vez recolhida a amostra, retira-se a agulha da veia, de forma a evitar que esta se rasgue com o bisel da agulha, e aplica-se uma pressão leve com compressa de tecido não tecido sobre o ponto de punção, durante pelo menos 30 segundos, até estancar a hemorragia. Caso se observe sangue extravasado (hematoma) na zona, deve aplicar-se um creme anti trombótico.

O volume total de extração nunca deve superar 1% do peso vivo da ave (10 ml de sangue por cada kg de peso corporal). Deverão ser recolhidos **5 ml**: 2 ml necessários para Hematologia e Bioquímica sanguínea, 2 ml para Toxicologia e 0,5 ml para Genética. O volume restante será utilizado para outras análises (sexagem, medidas de glicose e lactato e esfregaços).

- Seguidamente, procede-se à separação da amostra de sangue nos correspondentes tubos, devidamente etiquetados (Ver Anexo II), nos capilares de microhematócrito e no papel secante, são realizadas as primeiras medições (glucose e lactato) e os esfregaços.

Para realizar a separação do sangue recolhido, retira-se a agulha da seringa, retira-se a tampa do tubo, apoia-se a seringa na face interior do tubo inclinado, deixa-se escorrer lentamente o volume de sangue adequado pela parede do tubo (de forma a evitar a hemólise), tapa-se o tubo e agita-se lentamente de 3 a 5 vezes para favorecer o contacto com o anticoagulante. Desta forma, reparte-se a amostra de sangue como segue:

- 2 ml de sangue num tubo com heparina de lítio para Hematologia e Bioquímica sanguínea.
- 2 ml de sangue num tubo com heparina de lítio para Toxicologia.
- 0,5 ml de sangue num tubo com EDTA para Genética.
- 3 a 5 gotas de sangue num papel absorvente para sexagem. (Esperar que seque e introduzir num envelope devidamente etiquetado - Ver Anexo II.)
- Encosta-se a seringa à tira teste do glicosímetro para esta absorver o volume de sangue necessário, faz-se a leitura e regista-se o resultado (Gluc: ) (*Exemplo de medidor de glucose [aqui](#).)*
- Encosta-se a seringa à tira teste do medidor de lactato para esta absorver o volume de sangue necessário, faz-se a leitura e regista-se o resultado (Lact: ). (*Exemplo de medidor de lactato [aqui](#).)*
- Preenchem-se dois capilares de microhematócrito por ave, com sangue **sem anticoagulante**. Sela-se uma das extremidades de cada capilar com plasticina. Marcam-se e adequam-se os capilares para o seu transporte até ao laboratório de campo.
- 1 gota de sangue **sem anticoagulante** por esfregaço. Realiza-se um mínimo de 3 esfregaços devidamente etiquetados (Ver Anexo II). Deve-se ter especial cuidado em evitar que poeiras caiam sobre as lâminas durante o processo. Esperar que sequem, e guardar nas caixas de transporte de lâminas.

## 8.1.2. MICRORGANISMOS

Flora microbiana digestiva (em todas as crias):

- Zaragatoa de orofaringe em meio AMIES viscoso: Abrir a embalagem da zaragatoa, remover a zaragatoa com cuidado para não a contaminar e esfregar com movimentos rotativos na respetiva mucosa. Remover a tampa do tubo de meio e introduzir a zaragatoa no seu interior, com todo o cuidado para evitar a contaminação. Etiquetar com o Código de amostragem e as letras "OF", de "orofaringe". Ex: D05/OF. (Ver Anexo II). Refrigerar.
- Zaragatoa de cloaca em meio AMIES viscoso: Abrir a embalagem da zaragatoa, remover a zaragatoa com cuidado para não a contaminar e esfregar com movimentos rotativos na respetiva mucosa. Remover a tampa do tubo de meio e introduzir a zaragatoa no seu interior, com todo o cuidado para evitar a contaminação. Etiquetar com o Código de Amostragem e a letra "C", de "cloaca". Ex: D05/C. (Ver Anexo II). Refrigerar.

### 8.1.3. LESÕES DETETADAS

A forma de atuação perante qualquer lesão detetada durante a exploração física da cria de abutre-preto fica definida dentro dos parâmetros expostos no Anexo XIII. A ficha de “lesão detetada”, o quadro de pontuação de lesões, e a árvore de decisão ali expostos servem de guia para a tomada de decisão. O modo de amostragem dessas lesões é o seguinte:

- Na colheita de amostras citológicas com zaragatoa em meio AMIES: Abrir a embalagem da zaragatoa, remover a zaragatoa com cuidado para não a contaminar e esfregar com movimentos rotativos na lesão. Remover a tampa do tubo de meio e introduzir a zaragatoa no seu interior, com todo o cuidado para evitar a contaminação. Repetir o procedimento para cada uma das lesões. Etiquetar com o código de amostra + as letras “LES” (de lesão) + um número sequencial que faça referência à quantidade de lesões detetadas nessa cria. Exemplo: T05/LES/01
- Na colheita de amostras citológicas com zaragatoa seca: abrir a embalagem, remover a zaragatoa e esfregar, com movimentos rotativos, sobre a lesão. De imediato efetuar o esfregaço por aposição, esfregando a zaragatoa sobre uma lâmina de vidro (para observação ao microscópio ótico) já previamente identificada, e colocar a lâmina numa caixa de transporte. Realizar pelo menos 2 esfregaços de cada lesão.
- Na colheita de **amostras sólidas por punção aspirativa** com agulha fina: acoplar uma agulha de tamanho adequado à lesão a uma seringa de 2ml, desinfetar a superfície da lesão com antisséptico e de seguida introduzir a agulha até ao centro da lesão. Promover a aspiração de conteúdo criando pressão negativa com a seringa 2 a 3 vezes. Libertar o êmbolo e remover a agulha na mesma direção. Aplicar pressão sobre o local de punção, enquanto outro interveniente desacopla a seringa da agulha, enche-a com ar, acopla novamente a agulha e expelle o conteúdo da agulha para o centro de uma lâmina de vidro para observação ao microscópio ótico. O corpo da agulha é utilizado então para espalhar o material pela lâmina de vidro, que depois de seco deve ser colocado numa caixa de transporte.
- Na colheita de **amostras líquidas por punção aspirativa** com agulha fina: acoplar uma agulha de tamanho adequado à lesão a uma seringa de 2ml, desinfetar a superfície da lesão com antisséptico e de seguida introduzir a agulha até ao centro da lesão. Promover a aspiração de conteúdo criando pressão negativa com a seringa 2 a 3 vezes. Libertar o êmbolo e remover a agulha na mesma direção. Aplicar pressão sobre o local de punção, enquanto outro interveniente abre a embalagem da zaragatoa meio AMIES viscoso, previamente identificada, remover o frasco coletor, retirar a tampa, expelir o conteúdo da seringa para o seu interior e voltar a tapar o recipiente. Uma parte da amostra é colocada posteriormente no centro de uma lâmina de vidro para observação ao microscópio ótico, já identificada. Outra lâmina é utilizada para espalhar o material pela lâmina de vidro formando um esfregaço, que, depois de seco, deve ser colocado numa caixa de transporte.

#### 8.1.4. PENAS

- Recolher 3 penas do peito, arrancando diretamente, com a ráquis intacta, para análises Genética. Introduzir as penas num envelope de papel devidamente etiquetado (Ver anexo II).
- Recolher 3 penas da região interescapular, para Toxicologia. Introduzir as penas num envelope de papel devidamente etiquetado (Ver anexo II).
- Recolher 4 penas da região interescapular, para Endocrinologia. Estas penas podem ser cortadas na sua base, pois a raiz não tem relevância para esta análise. Introduzir as penas num envelope de papel devidamente etiquetado (Ver anexo II).

#### 8.1.5. ECTOPARASITAS

- Ovos de parasitas colados às penas. Com uma tesoura, recortar uma porção da pena com as estruturas parasitárias e introduzir num tubo seco com buracos finos na tampa. Etiquetar (Ver anexo II).
- Ectoparasitas vivos. Introduzir num tubo seco e fazer buracos na tampa do tubo, de forma a permitir a circulação do ar. Caso seja uma carraça, introduzir também uma folha de erva/vegetação no tubo. Etiquetar (Ver anexo II).

#### 8.1.6. FEZES

- Sempre que se tenha acesso a uma dejeção fresca durante a marcação, introduzir num frasco estéril. Descrever macroscopicamente na ficha e etiquetar (Ver anexo II).

#### 8.1.7. BRINCOS E OUTROS INDÍCIOS RELEVANTES

- Prospetar a base do ninho à procura de brincos de ruminantes, de suínos, ou de qualquer outro indício digno de registo que possa fornecer informação útil. Registrar na ficha (Outras amostras na base do ninho. Descrever: ). No caso dos brincos, escrever o código alfanumérico. Etiquetar (Ver anexo II). Fotografar.

- Se for necessário administrar fluidos, em caso de desidratação leve, tal terá de ser feito antes de devolver a cria ao ninho e depois da recolha de amostras. Ver anexos IV e V.

- Antes de abandonar a base do ninho, devem fotografar-se as fichas preenchidas, e **acondicionar as amostras recolhidas e etiquetadas para o seu transporte** até às instalações com eletricidade (ver também Anexo XVI: Mapa para o Transporte e Acondicionamento de Amostras).

- **Tubos de sangue e capilares de hematócrito:** Serão fixados dentro de uma geleira portátil com acumuladores de frio, de forma a evitar a hemólise e/ou a congelação (por contacto direto das amostras com os acumuladores de frio). Deve-se assegurar uma temperatura de refrigeração de, no máximo, até 8°C. Pode-se utilizar um termómetro introduzido também na geleira para monitorizar a temperatura. Devem evitar-se os movimentos bruscos da condução todo-o-terreno para evitar a hemólise das amostras.
- **Zaragatoas:** refrigerar para o transporte.

- **Pingos de sangue no papel absorvente:** Uma vez secos, colocá-los dentro do correspondente saco de plástico facilitado pelo laboratório (STABvida). Por sua vez, introduz-se este saco num envelope de papel devidamente etiquetado (Ver anexo II). Pode ser mantido a temperatura ambiente até à sua chegada ao laboratório.
- **Esfregaços.** As caixas com os esfregaços podem ser mantidas a temperatura ambiente.
- **3 penas do peito para Genética.** As penas podem ser armazenadas à temperatura ambiente (no escuro) até à sua chegada ao laboratório.
- **3 penas das costas para Toxicologia.** Estes envelopes devem ser mantidos em refrigeração.
- **4 penas das costas, cortadas (sem ráquis), para Endocrinologia.** O envelope com as penas pode ser armazenado à temperatura ambiente (no escuro) até à sua chegada ao laboratório.
- **Ectoparasitas.** Transportar refrigerados.
- **Fezes.** Transportar refrigeradas.

- Observação da cria à distância. Sempre que possível. Registrar a hora (Hora: ) e alguma descrição relativa à recuperação e estado aparente da ave.

## 8.2. Nas instalações com eletricidade, próximas do ninho/local de marcação

- Preparação da zona de laboratório de campo.
- Registos iniciais (Data: ), (Hora: ), temperatura ambiente (T<sup>a</sup>: )
- Cálculo do Hematócrito e os Sólidos Totais. Centrifugar os 2 capilares recolhidos por ave de micro hematócrito a 10.000 rpm x min. durante 5 min. Leitura e registo do valor do Hematócrito (Hematócrito: ). Leitura e registo do valor de Sólidos Totais (ST: ) com o refratómetro, a partir do plasma do capilar.
- Extração do plasma para Bioquímica sanguínea. Centrifugação do(s) tubo(s) com heparina para Bioquímica sanguínea a 5.000 rpm x min. durante 5 min. Extrair o plasma e colocar em tubo seco/eppendorf. Conservar o *pellet*. Etiquetar (Ver anexo II) e selar com parafilm. Manter em refrigeração até poder congelar o *pellet* e o plasma.
- Separação do sangue inteiro para Toxicologia. Homogeneizar e colocar a amostra de Toxicologia (tubo(s) com 2 ml de sangue inteiro com heparina) à temperatura ambiente. Tirar 0,5 ml e colocar num eppendorf. Etiquetar (Ver anexo II) e selar com parafilm.
- Extração do plasma para Toxicologia. Centrifugação do resto do sangue com heparina para Toxicologia (1,5 ml) a 5.000 rpm (1600-3000 G) x min. durante 10 min. Extrair o plasma e colocar em eppendorf. Conservar o *pellet*. Etiquetar (Ver anexo II) e selar com parafilm. Manter em refrigeração até poder congelar o *pellet* e o plasma.
- Coloração dos esfregaços mediante o método Diff-Quick. Etiquetar (Ver anexo II) e guardar nas caixas de transporte.
- Separação das amostras segundo o local de envio e o intervalo térmico de conservação:

<b>HVUTAD (Hematologia, Bioquímica, Citologia, Histopatologia, Parasitologia)</b>		<b>Laboratório (Microbiologia)</b>	
Congelação	Plasma, <i>pellets</i> , zaragatoas, fezes	Refrigeração	Zaragatoas
Refrigeração	Ectoparasitas, amostras para Citologia/Histopatologia		
Tª amb	Esfregaços, brincos e outros rastros		
<b>FMV. Univ. de Múrcia (Toxicologia)</b>		<b>Zoo Antuérpia (Genética)</b>	
Congelação	Plasma, <i>pellet</i> , sangue heparina	Tª ambiente	Sangue EDTA, penas
Refrigeração	Penas		
		<b>Laboratório STABvida (Sexagem)</b>	
		Tª amb	Pingos de sangue em papel
		<b>CIBIO, Univ. do Porto (Endocrinologia)</b>	
		Tª ambiente	Penas

- Intervalo de **congelamento**: de -20 a -4°C (congelador doméstico)
- Intervalo de **refrigeração**: de 0 a 8°C (monitorizar com termómetro)
- **Tª ambiente**: em lugar seco, fresco, escuro.

- Adequar as amostras que precisem de congelação/refrigeração para o transporte refrigerado.
  - Entregar as amostras, juntamente com as fichas preenchidas, ao responsável da entidade encarregada dessa colónia de abutre-preto.
  - Recolher o material e limpar a zona utilizada como laboratório de campo.
- (Ver também anexo XVI: Mapa para o Transporte e Acondicionamento de Amostras)

### 8.3. Nas instalações do Hospital Veterinário da UTAD

- Chegada/Entrega das amostras.
- Homogeneizar as amostras de 0,5 ml de sangue com EDTA para análise genética (Zoo Antuérpia, Bélgica).
- Aplicar 1 gota deste sangue nos cartões FTA (Ver Anexo XI).
- Etiquetar os cartões FTA (Código de amostra).
- Armazenar os tubos de sangue com EDTA para Genética, as penas para Genética e os cartões FTA à temperatura ambiente (se forem enviadas dentro de uma semana) ou congeladas (se tiverem de ser armazenadas por mais de uma semana). *Passo dependente da obtenção de licenças CITES.*
- Continuar com o processamento/armazenamento do restante das amostras.

## 9. RECOLHA DE DADOS BIOMÉTRICOS

A precisão e padronização da recolha de dados biométricos é crucial para a monitorização e conservação do abutre-preto. Neste ponto do protocolo descrevem-se os procedimentos padronizados para a recolha dos dados biométricos em campo. Todos os procedimentos devem ser realizados de maneira a minimizar o impacto sobre as crias e a garantir a qualidade dos dados obtidos.

A equipa encarregada da marcação da cria é também responsável pela recolha dos dados biométricos. Como em todos os restantes passos, a cooperação e coordenação com as autoridades e organizações de conservação são fundamentais para o sucesso destes esforços.

A recolha de dados biométricos está inserida no processo de marcação e recolha de amostras biológicas em crias de abutre-preto, conforme descrito no ponto 5. CRONOLOGIA DA INTERVENÇÃO (página 10) deste protocolo.

### Equipamento Necessário

- Caparão
- Paquímetro ou craveira
- Fita métrica e/ou régua
- Luvas de Proteção
- Ficha de Registo (Ver Anexo XVII)

### Procedimentos e registo das biometrias

Os parâmetros a registar na recolha de dados biométricos estão listados abaixo, assim como na Ficha de Registo do Anexo XVII.

Todas as medições e quaisquer observações adicionais devem ser registadas na respetiva ficha de registo.

Alguns **bibliografia útil** para detalhar estes procedimentos é: Svensson, 1992; Demongin, 2016; Pinilla, 2000.

**Peso Corporal (kg):** Para minimizar o stress por manuseamento, registar o resultado da pesagem realizada no início do exame físico (Ver ponto 6.3).

Após a recolha de amostras biológicas, a equipa veterinária cede a cria com caparão para se proceder à recolha de dados biométricos.

**Comprimento da Asa (cm)**

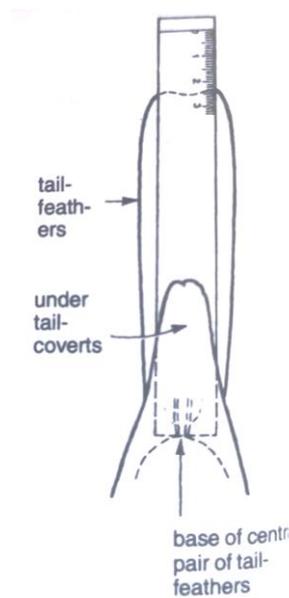


**Comprimento da 8ª pena primária (cm)**

**Comprimento da haste da 8ª pena primária (cm)**



**Comprimento da cauda (cm)**



(Esquema ©Svensson, 1992)

### Comprimento da cabeça (cm)



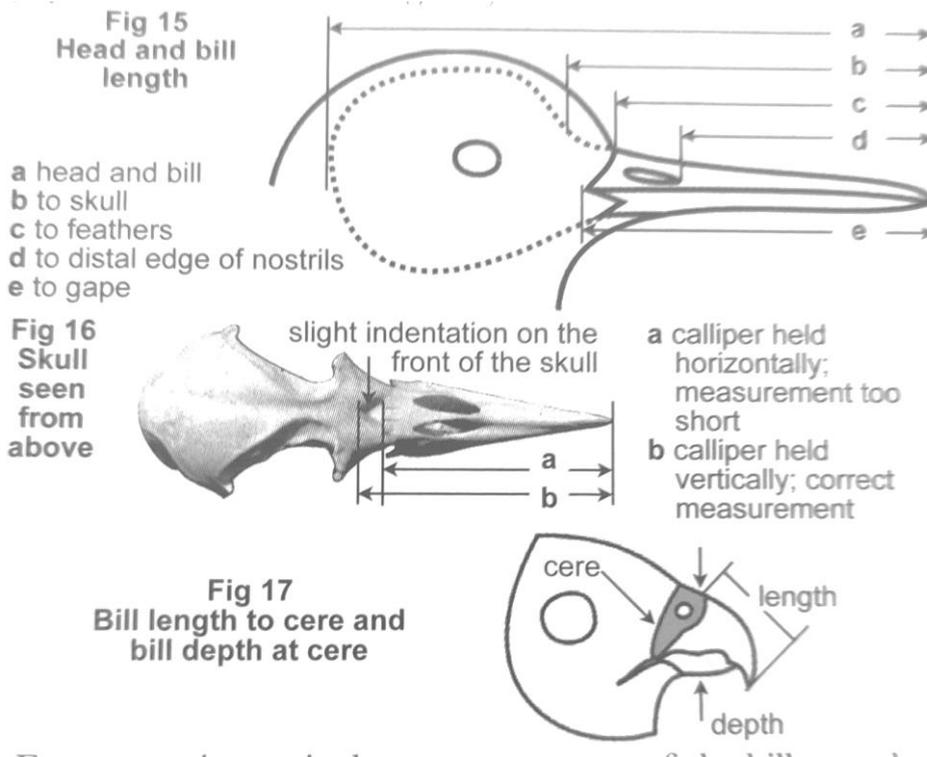
### Comprimento da cabeça mais bico (cm)



### Comprimento do bico à cera (mm)

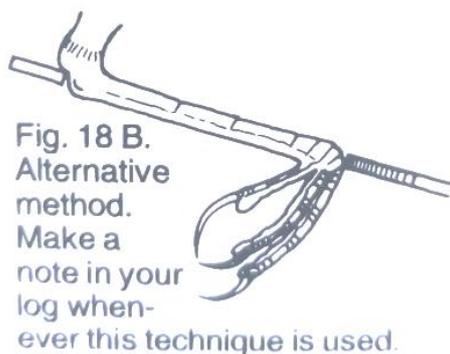
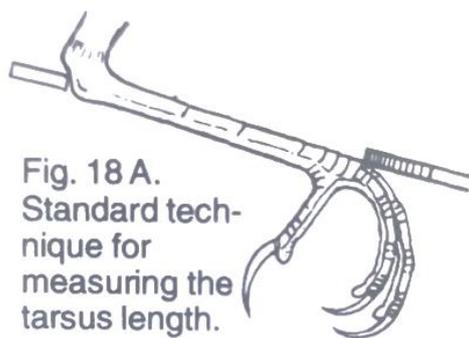
### Comprimento do bico e cera (mm)

### Largura da cabeça (cm)



Esquemas ©Demongin, 2016.

**Comprimento do tarso (cm)**



(Esquema ©Svensson, 1992)

### Comprimento da garra traseira (cm)

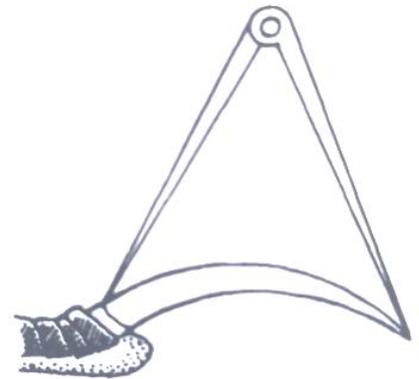


Fig. 20. Measuring a claw.

(Esquema ©Svensson, 1992)

### Processamento da Ficha de Registo

Após a recolha das biometrias: Os técnicos de campo devem compilar todas as fichas de registo e assegurar que os dados estão completos e legíveis. Devem manter um registo digital das fichas (scan ou fotografia), de modo a ficar com cópias de segurança. Devem posteriormente entregar as fichas de registo originais ao responsável pela monitorização da respetiva colónia, que as manterá junto com as fichas de recolha de amostras biológicas até serem entregues/enviadas, conforme as indicações da coordenação do projeto (VCF). Poderá ser solicitado aos responsáveis de colónia que preencham uma tabela de registo geral das biometrias, a facultar pela VCF.

## 10. ARMAZENAMENTO E ENVIO DAS AMOSTRAS

- Assim que o médico veterinário faça a entrega das amostras biológicas, juntamente com as fichas de registo, a entidade encarregada pela colónia de abutre-preto fica responsável pela correta conservação das mesmas, até à adequação para o seu envio.
- As amostras que precisem de congelação ou refrigeração podem ser transportadas em condições de refrigeração até ao local de armazenamento.
- Depois da congelação das amostras que precisem, deve-se assegurar a manutenção do intervalo térmico adequado até à sua entrega nos respetivos laboratórios. Atenção: O processo de descongelação e recongelação do plasma altera os resultados analíticos.
- As entidades responsáveis pelas amostras serão contactadas pela VCF para receber instruções acerca do envio/entrega das amostras juntamente com as fichas de registo. As entidades encarregadas de cada colónia devem manter cópias das fichas de registo.
- A VCF fica responsável pela solicitação dos documentos necessários (e.g. CITES para envios internacionais) e pela gestão do envio das amostras nas condições adequadas, desde as entidades responsáveis pelas colónias, até aos respetivos laboratórios.
- O CIBIO fica responsável pelo transporte das amostras de Endocrinologia (penas cortadas - sem ráquis - à temperatura ambiente) a partir do HVUTAD.
- No Anexo XVI apresenta-se uma tabela-resumo das condições de acondicionamento para o transporte e armazenamento das amostras de cria de abutre-preto, nas suas diferentes etapas, desde que recolhidas na base do ninho até à sua chegada aos respetivos laboratórios.

## 11. REFERÊNCIAS

Plano de Ação para a Conservação das Aves Necrófagas (PACAN), aprovado pelo Despacho n.º 7148/2019, de 12 de agosto.

Almeida, A.M. 2012. Caracterização preliminar do proteinograma sérico do abutre-preto (*Aegypius monachus*) e do grifo (*Gyps fulvus*). Tese de Doutoramento. Universidade Técnica de Lisboa.

Atkinson, C.T.; Thomas, N.J.; Hunter, D.B. (Eds.). 2008. Parasitic Diseases of Wild Birds. Wiley-Blackwell.

Beaufrière, H.; Vergneau-Grosset, C. 2021. Clinical pathology. *In* Exotic animal emergency and critical care medicine, pp.563-581. <https://doi.org/10.1002/9781119149262.ch32>

Blanco, J.M.; Höfle, U. 2005. Rehidratación, nutrición y alimentación en aves rapaces en estado crítico. Fundación Aquila. Centro de Estudios de Rapaces Ibéricas. Toledo.

Blanco, J.M.; Höfle, U. 2005. Técnicas de laboratorio: Serología y nuevas técnicas para la detección de agentes infecciosos. I Simposium Internacional sobre Biomedicina en Aves de Presa. León.

Blanco, J.M.; Höfle, U.; Villaverde, S. 2005. Hematología, bioquímica sanguínea y proteínas séricas en aves rapaces. I Simposium Internacional sobre Biomedicina en Aves de Presa. León.

Botha, A. J.; Andevski, J.; Bowden, C. G. R.; Gudka, M.; Safford, R. J.; Tavares, J.; Williams, N. P. 2017. Multispecies Action Plan to Conserve African-Eurasian Vultures. CMS Raptors MOU Technical Publication No. 5. CMS Technical Series No. 35. Coordinating Unit of the CMS Raptors MOU, Abu Dhabi, United Arab Emirates.

Chakarov, N.; Blanco, G. 2021. Blood parasites in sympatric vultures: role of nesting habits and effects on body condition. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18:2431. <https://doi.org/10.3390/ijerph18052431>

Chung, O.; Jin, S.; Cho, Y.S.; Lim, J.; Kim, H.; Jho, S.; Kim, H.M.; Jun, J.; Lee, H.; Chon, A.; Ko, J. 2015. The first whole genome and transcriptome of the cinereous vulture reveals adaptation in the gastric and immune defense systems and possible convergent evolution between the Old and New World vultures. *Genome biology*, 16: 1-11.

Clark, P.; Boardman, W.; Raidal, S. 2009. Atlas of Clinical Avian Hematology. John Wiley & Sons.

Cooper, J. 2022. Birds of Prey: Health & Disease. Third Edition.

Costa, S. 2022. Protocolos para cuidados de suporte em aves silvestres. Relatório Final de Estágio para Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Universidade do Porto.

Daut, E.F. 2018. Raptor Nutrition and Emaciation Management. AZA Nutrition Advisory Group, 60.

Demongin, L. 2016. Identification Guide to Birds in the Hand. Privately published. Beauregard-Vendon.

Dobado, P.M.; Arenas, R. (Coords.) 2012. The Black Vulture: Status, Conservation and Studies. Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía, Cordoba. [Proceedings of the First International Symposium on the Black Vulture *Aegypius monachus* (Cordoba, Spain, 21–23 October 2004)]

Domínguez, J.C.; Cordero, J.G. 1993. Rehabilitación de aves salvajes heridas: técnicas de reparación de fracturas en las extremidades. Fondo Natural.

Fudge, A.M. 2000. Laboratory Medicine: Avian and Exotic Pets. Saunders Publisher.

Harrison, G. J.; Lightfoot, T.L. 2006. Clinical avian medicine (Vol. 2). L. R. Harrison (Ed.). Palm Beach, FL: Spix publishing.

Huyghe, M.; Izquierdo, P.; Bureau, E.; Llopis, A. 2023. EAZA Best Practice Guidelines for the cinereous vulture, *Aegypius monachus*. European Association of Zoos and Aquaria, Amsterdam, The Netherlands.

Laiseca, M.N. 2011. Programa de prácticas de formación en centros de recuperación de fauna. Manual del Alumno. Veterinaria y rehabilitación de aves silvestres. Edita: Asociación “Pueblos Vivos”.

Lennox, A.M.; Lichtenberger, M. 2011. Advanced fluid support for birds. Proceedings of the Association of Avian Veterinarians, 185–190.

Martínez-Díaz, R. A.; F. Ponce-Gordo, I.; Rodríguez-Arce, M. C.; Martínez-Herrero, F.; González González, R. A.; Molina-López, and M. T. Gómez-Muñoz. 2015. *Trichomonas gypaetini* n. sp., a new trichomonad from the upper gastrointestinal tract of scavenging birds of prey. Parasitology Research 114(1): 101–112. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4165-5>

Martín-Maldonado, B.; Mencía-Gutiérrez, A.; Andreu-Vázquez, C.; Fernández, R.; Pastor-Tiburón, N.; Alvarado, A.; Carrero, A.; Fernández-Novo, A.; Esperón, F.; González, F. 2023. A Four-Year Survey of Hemoparasites from Nocturnal Raptors (Strigiformes) Confirms a Relation between Leucocytozoon and Low Hematocrit and Body Condition Scores of Parasitized Birds. Veterinary Sciences, 10(1), 5.

Matos, M.; Andevski, J.; Azevedo, F.; Bogalho, V.; Brandão, R.; Brazio E.; Casero M.; Delgado D.; Infante S.; Llopis Á.; Loureiro F.; Monteiro P.; Pereira J.; Santos E.; Sargo R.; Tavares, J. 2023. Protocolo para o resgate, manuseamento e transporte de abutres-pretos (*Aegypius monachus*). LIFE Aegypius Return. <https://zenodo.org/records/10966254>

McLelland, J. 1990. A Colour Atlas of Avian Anatomy. Wolfe Publishing Ltd.

Moreno-Opo, R.; Guil, F. (Coords.) 2007. Manual de gestión de habitat y de las poblaciones de buitre negro en España. Dirección General para la Biodiversidad. Ministerio de Medio Ambiente. Madrid.

Nascimento, M.D.L. 2020. Characterization of the intestinal microbiome of the recovering Eurasian Griffon Vulture (*Gyps fulvus*) in mainland Portugal. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade de Lisboa.

Peleteiro, M.C. 2016. Selecção, recolha e envio de material para Laboratório. In Manual de Necropsia Veterinária. Editora Lidel.

Peleteiro, M.C. 2016. Terminologia descritiva para lesões macroscópicas. In Manual de Necropsia Veterinária. Editora Lidel.

Pereira, P.; Fandos Esteruelas, N.; Nakamura, M.; Rio-Maior, H.; Krofel, M.; Di Blasio, A.; Zoppi, S.; Robetto, S.; Llana, L.; García, E.; Oleaga, A.; López-Bao, J.V.; Fayos Martínez, M.; Stavenow, J.; Ågren, E.O.; Álvares, F.; Santos, N. 2022. Hair cortisol concentration reflects the life cycle and management of grey wolves across four European populations. *Scientific reports*, 12(1): 5697. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09711-x>

Pinilla, J. (Coord.) 2000. Manual para el anillamiento científico de aves. SEO/BirdLife y DGNC-MIMAM. Madrid.

Rodríguez-Quirós, J. 1997. Radiología básica en aves. *In* Resúmenes del curso teórico-práctico de medicina y cirugía de aves salvajes. Editorial: GREFA. Madrid.

Romero, L. M.; Fairhurst, G.D. 2016. Measuring corticosterone in feathers: strengths, limitations, and suggestions for the future. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 202: 112-122. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.05.002>

Samour, J. 2008. *Avian Medicine*. 2<sup>nd</sup> Edition. Mosby/Elsevier.

Santos, E. (Coord.), Alves, E., Gutiérrez, I., Infante, S., Matos M., Monteiro, P., Pacheco C., Pereira, J., Ribeiro, P., Rocha, P. 2023. Protocolo de monitorização de abutre-preto (*Aegypius monachus*). LIFE Aegypius Return. <https://doi.org/10.5281/zenodo.10972773>

Segovia, M.H. 1992. Rehabilitación de aves de presa y conservación: aspectos veterinarios. *Ardeola*: 39(2): 49-64.

Seok, S.H.; Jeong, D.H.; Park, S.J.; Lee, S.Y.; Lee, H.C.; Yeon, S.C. 2017. Hematologic and plasma biochemical values of cinereous vulture (*Aegypius monachus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 48(2): 514-517.

Svensson, L. 1992. Identification Guide to European Passerines. 4th edition. Published by the author. Torekov, Sweden.

Thomas, N.J.; Hunter, D.B.; Atkinson, C.T. (Eds.). 2007. *Infectious diseases of wild birds*. Blackwell Publishing.

Viana, M.S. 2010. Características Hematológicas e Ocorrência de Hemoparasitas em Aves de Rapina. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa.

Vila, L.G. 2013. Bioquímica em aves: revisão de literatura. Seminários aplicados. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - Escola de Veterinária e Zootecnia. Universidade Federal de Goiás.

Villegas, A.; Sánchez, J. M.; Costillo, E.; Corbacho, C. 2002. Blood chemistry and haematocrit of the black vulture (*Aegypius monachus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 132(2): 489-497.

Wobeser, G.A. 2007. *Disease in wild animals: Investigation and Management*. 2<sup>nd</sup> Edition. Springer.



©Palombar

## ANEXOS

## Anexo I. Material necessário para o acompanhamento médico-veterinário na marcação de crias de abutre-preto

### Material de campo

- Usar roupa cómoda e limpa, e calçado adequado (e.g. botas)
- Mochila para transporte do material
- Binóculos
- Caderno de campo e caneta
- Impressão deste protocolo e das fichas a preencher** (Anexos VII, VIII e XIII.a, XVII)
- Boné ou chapéu
- Protetor solar
- Água e comida
- Higiene: Sabonete, desinfetante de mãos, papel, saco para lixo

### Material para os procedimentos

#### Registos iniciais:

- Relógio
- Altímetro
- Barómetro
- Termómetro ambiente
- Higrómetro

#### Exploração física:

- Luvas
- Balança vertical ("pesola")
- Estetoscópio
- Oftalmoscópio
- Termómetro (capas, vaselina)
- Cronómetro

#### Primeiros socorros:

- Caixa de transporte de abutres
- Toalhas
- Luvas
- Soro
- Desinfetantes tópicos
- Gazes
- Algodão
- Seringas de 1-2-5-10-20 ml
- Agulhas de diferentes calibres
- Ligaduras

#### Recolha de amostras:

- Luvas
- Algodão
- Gazes
- Álcool
- Agulhas de diferentes calibres
- Seringas de 5 ml
- Creme hematomas
- Tubos recolha sangue e parasitas (EDTA, HEP, seco, eppendorf)
- Caneta marcadora
- Pipetas
- Lâminas microscópio
- Papel
- Frasco de lixo para cortantes
- Corante Diff-Quick
- Caixas para o transporte de lâminas tingidas
- Grades para os tubos
- Geleira portátil com acumuladores de frio
- Termómetro para monitorizar a refrigeração
- Capilares para micro hematócrito sem heparina
- Plasticina, parafilm
- Tubos para centrífuga
- Centrífuga 5000-10000 rpm
- Medidor de hematócrito ou régua
- Refratómetro
- Glicosímetro
- Medidor lactato
- Zaragatoas secas
- Zaragatoas microbiologia (amies viscosa)
- Escalpelo, tesouras, pinças
- Frascos para as amostras (p.e. 50ml)
- Frascos para amostras de fezes
- Sacos de plástico para as amostras
- Sacos/envelopes de papel para as penas

## Anexo II. Pautas para a etiquetagem das amostras

- Tanto nas **fichas** como em **todas as amostras** coletadas deve figurar o **código da amostragem**.
- O **código de amostragem** (Cód. amos.) é composto por uma letra e dois dígitos. A letra faz referência à colónia de procedência da cria e os dígitos são a sequência das crias amostradas em cada colónia. Exemplos:

Colónia	letra	exemplos
Douro Internacional	D	D01, D02, D03...
Malcata	M	M01, M02, M03...
Tejo Internacional	T	T01, T02, T03...
Herdade da Contenda	C	C01, C02, C03...

Além do código de amostragem, algumas das amostras deverão ter mais informação na etiqueta, conforme descrito a seguir:

- O(s) tubo(s) com heparina que contêm o sangue para Toxicologia, etiqueta(m)-se com o código da amostragem e a letra "E" (que será o tubo do *pellet* de "eritrócitos" depois de centrifugado).
- Etiquetar o eppendorf com os 0,5ml de sangue inteiro com heparina para Toxicologia com o código da amostragem e a letra "S" (sangue inteiro).
- Etiquetar o eppendorf com o plasma para Toxicologia com o código da amostragem e a letra "P" (plasma).
- A amostra para sexagem (gotas de sangue em papel absorvente) etiqueta-se com o código da amostragem e o número da anilha metálica da cria.
- As amostras rotineiras da flora digestiva (zaragatoas) etiquetam-se com o código da amostragem e as letras "OF" quando a zaragatoa é colhida na orofaringe, e com a letra "C" na zaragatoa da cloaca.
- As zaragatoas das lesões detetadas etiquetam-se com o código da amostragem, as letras "LES" de lesão, e um número que faz referência à quantidade de lesões diferentes amostradas nessa cria. Ex: "D01/LES/01, D01/LES/02". (Sempre que seja amostrada uma lesão, preenche-se a ficha "Descrição da lesão detetada" Anexo XIII.a). Da mesma forma, os esfregaços das lesões detetadas (a partir de zaragatoa seca ou de punção com agulha fina) também se etiquetam com o código de amostragem, as letras "LES" e o número que faz referência à quantidade de lesões diferentes amostradas nessa cria. Ex: "D01 LES 03, D01 LES 04". Tirar foto da lesão.
- As penas para Toxicologia etiquetam-se com o código da amostragem, e as letras "TOX".
- As penas para Endocrinologia etiquetam-se com o código da amostragem, e as letras "END".
- Os tubos com ectoparasitas etiquetam-se com o código da amostragem e as letras "PP" (siglas de parasita em plural).
- Os frascos com fezes etiquetam-se com o código da amostragem e as letras "FEZ".
- Brincos: marcar o brinco com o código da amostragem e fotografar. Conservar os brincos ou qualquer outro material encontrado num saco de plástico com o código da amostragem.

Na página seguinte, apresenta-se uma tabela-resumo com exemplos da etiquetagem das amostras.

Tabela 1. Tabela-resumo com exemplos da etiquetagem das amostras.

	AMOSTRA	ETIQUETAGEM	exemplo
8.1.1 Sangue	Tubo heparina - Hematologia	Cód. Amos.	C01
	Tubo heparina - Toxicologia	Cód. Amos. + "E"	M05 / E
	Tubo EDTA - Genética	Cód. Amos.	D09
	Cartão FTA - Genética	Cód. Amos.	D09
	Papel absorvente - Sexagem	Cód. Amos. + anilha metálica	T11 / 5834
	Esfregaço	Cód. Amos.	D05
8.1.2 Microorganismos	Zaragatoa orofaringe	Cód. Amos. + "OF"	C15 / OF
	Zaragatoa cloaca	Cód. Amos. + "C"	D01 / C
8.1.3 Lesão detetada	Zaragatoa lesão detetada	Cód. Amos. + "LES" + num	T02 / LES / 01
	Esfregaço lesão detetada	Cód. Amos. + "LES" + num	T05 / LES / 02
8.1.4 Penas	Penas - Genética	Cód. Amos. + GEN	D06 / GEN
	Penas - Toxicologia	Cód. Amos. + TOX	M35 / TOX
	Penas - Endocrinologia	Cód. Amos. + END	M35 / END
8.1.5 Ectoparasitas	Estruturas parasitárias	Cód. Amos. + "PP"	T22 / PP
	Parasites	Cód. Amos. + "PP"	C10 / PP
8.1.6 Fezes	Fezes	Cód. Amos. + "FEZ"	M10 / FEZ
8.1.7 Brincos e outros rastros	Brincos	Cód. Amos.	D07
	Outros achados	Cód. Amos.	M21
8.2 No laboratório de campo	Tubo plasma - Hematologia	Cód. Amos.	C01
	Tubo sangue inteiro - Toxicol	Cód. Amos. + "S"	M05 / S
	Tubo plasma - Toxicologia	Cód. Amos. + "P"	M05 / P

### Anexo III. Escala para a estimacão da condio corporal da cria de abutre-preto

Tradicionalmente, a condio corporal de uma ave era determinada exclusivamente pela palpao dos músculos peitorais e pela atribuio de uma pontuao corporal com base na cobertura muscular e de gordura do esterno. Embora útil como uma determinao superficial de emaciao, essa técnica não tem em conta que a maioria das aves não armazena gordura na região peitoral, podendo ainda assim transportar depósitos significativos de gordura, mesmo tendo uma condio corporal aparentemente normal. Molhar as penas sobre o abdmen, flancos, coxas e pescoço com álcool permite a visualizao de depósitos de gordura subcutânea, vistos como gordura amarela sob a pele, em vez do músculo rosado-avermelhado. **A combinao do registo de peso corporal, palpao dos músculos peitorais e exame da gordura subcutânea permite uma avaliao precisa da condio corporal.**

A escala que utilizaremos para a estimacão da condio corporal consta dos seguintes valores:

- 1 – Emaciao:** Observa-se uma perda de massa muscular generalizada e a ausência de gordura subcutânea, demonstrando músculos peitorais fracos com contornos muito deprimidos. A quilha do esterno protrai de forma evidente e  facilmente palpável. O contorno do conjunto da seco transversal do esterno e a musculatura peitoral, seria côncavo.
- 2 –** A musculatura peitoral já está um pouco desenvolvida, mas ainda não se observa gordura subcutânea. A proeminência da quilha do esterno  evidente e facilmente palpável. O contorno transversal seria plano ou de forma triangular.
- 3 – Ideal:** A musculatura peitoral apresenta uma textura firme, moderadamente desenvolvida e facilmente palpável. A quilha do esterno sobressai entre os músculos peitorais e  facilmente palpável. Já se observa alguma gordura subcutânea. Contorno convexo.
- 4 –** A musculatura peitoral está bem desenvolvida, apresentando um contorno suave e facilmente palpável. A quilha do esterno  menos proeminente, mas ainda palpável. Encontramos depósitos evidentes de gordura subcutânea. Contorno semicircular.
- 5 – Sobrepeso:** O grande desenvolvimento dos músculos peitorais e a elevada presença de depósitos de gordura subcutânea quase impedem a palpao da quilha do esterno. O contorno fica dividido em duas massas peitorais.

 evidente que a maioria das crias será classificada entre os valores de 1 a 3. Uma cria com condio corporal 1 (emaciao)  um firme candidato para o seu encaminhamento para um Centro de Recuperao para a Fauna. O médico veterinário pode usar valores intermédios (1.5, 2.5, etc.) na sua apreciao da condio corporal, se julgar necessário.

Na página seguinte, apresenta-se um esquema resumido da escala pretendida.

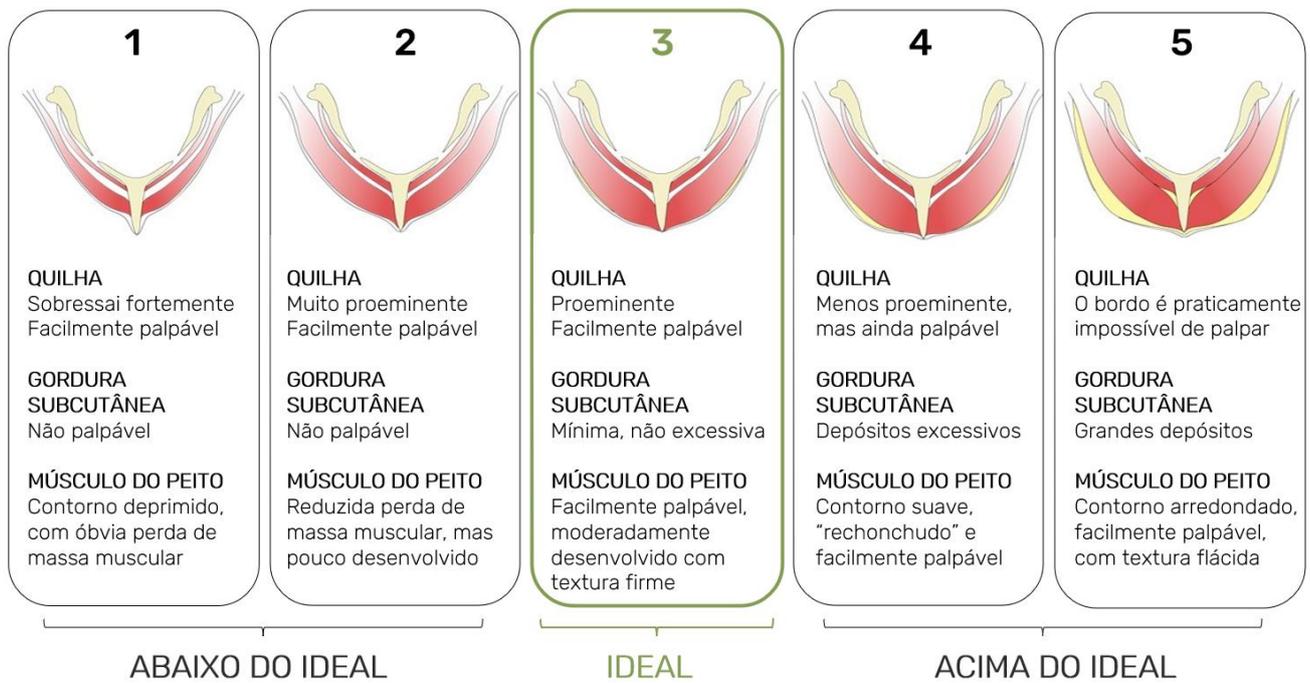


Fig. 2. Escala de condição corporal. Adaptado de Raptors and Poultry [blog post](#).

## Anexo IV: Avaliação do estado de desidratação

No geral, estimar a percentagem de desidratação em aves é complexo. A sua pele é muito fina e pouco elástica, pelo que nem sempre a prega de pele é um sinal fidedigno. O veterinário de campo deve observar uma série de sinais para determinar se a cria precisa da administração de fluidos ou não. Entre estes sinais, pode-se observar a coloração das mucosas e TRC (tempo de repleção capilar) através da eversão da mucosa cloacal, bem como pela conjuntiva e orofaringe. A perfusão vascular periférica também pode ser avaliada através da turgescência e tempo de repleção da veia basilar. Outros sinais clínicos como taquicardia, diminuição do débito cardíaco, fraqueza generalizada, prostração e pulso fraco também são característicos de hidratação deficiente.

Tabela 2. **Sinais de desidratação em aves (Beaufrère, 2021).**

<b>Percentagem de desidratação</b>	<b>Sinais clínicos</b>
<b>5%</b>	Desidratação subclínica, história de perda fluidos, retorno da prega palpebral normal
<b>7-8%</b>	Letargia, mucosas secas e pegajosas, fios de muco espesso na cavidade oral, pele do peito seca, retorno da prega palpebral lento
<b>10-12%</b>	Depressão, mucosas secas e pegajosas, fios de muco espesso na cavidade oral, pele do peito seca e a descamar, retorno da prega palpebral muito lento, olhos afundados
<b>15%</b>	Coma/estupor, mucosas secas, prega palpebral e da pele do peito permanece presente, olhos muito afundados
<b>Hipovolémia</b>	Alteração consciência, taquicardia, TRV veia ulnar maior que 1-2s, pulso dificilmente palpável, hipotermia, hipotensão
<b>Achados laboratoriais</b>	Aumento do Hematócrito, Proteína Total, albumina, ureia, ácido úrico, concentração de eletrólitos, osmolaridade plasmática e lactato sanguíneo

## Anexo V: Pautas para a administração de fluidos como terapia básica

A administração de fluidos deve ser ponderada caso a caso e respeitar as necessidades fisiológicas dos animais, mas também a presença de qualquer patologia. Os requisitos de manutenção são maiores em aves, cerca de 40-60 ml/kg/d, do que em mamíferos, devido à maior taxa metabólica (Lennox, 2011). Para um abutre de 4,5kg (4500g) estima-se que a taxa de manutenção diária varie entre 180 a 270ml.

A esta taxa de manutenção devemos somar as perdas por desidratação. O défice hídrico das aves pode ser calculado através da fórmula: % de desidratação x peso corporal (g) (Scott, 2021). Na tabela "Avaliação do estado de desidratação" do Anexo IV apresentam-se as percentagens de défice hídrico associadas aos marcadores de desidratação em aves.

Assim, para uma cria de abutre-preto de 4,5Kg (4500g), com uma taxa de desidratação de 5%, devemos calcular a taxa de manutenção e depois adicionar o défice de fluídos, como se mostra na tabela a seguir, resultando numa necessidade hídrica total de 405 ml.

Requisitos de manutenção	4,5 kg x 40 ml =	180 ml/dia
Défice hídrico	4500g X 0.05 (desidratação do 5%) =	225 ml
Necessidade hídrica total	requisitos de manutenção + défice hídrico =	405 ml/dia

A administração de fluidos com vista a compensar as necessidades hídricas de uma ave deve ser feita ao longo de 24h a 48h, dependendo das necessidades e do estado fisiológico do animal, independentemente da via de administração escolhida. Assim, não se deve administrar o volume total de uma só vez, mas sim dividi-lo ao longo das 24 a 48h.

Se for necessário administrar fluidos em caso de desidratação leve, o volume total da administração não deverá ultrapassar os 40ml/kg, por via oral (VO) e, no caso da via subcutânea (SQ), não deverá ultrapassar 1/3 da necessidade hídrica total. Seguindo o exemplo anterior de uma cria de abutre-preto de 4,5 kg e 5% de desidratação, o volume total a administrar antes de ser devolvida ao ninho seria de  $40 \times 4,5 = 180$  ml no máximo VO, ou  $405 / 3 = 135$  ml SQ. Este procedimento deverá ser realizado sempre antes de subir a ave ao ninho e sempre depois da colheita de amostras.

Nos casos de desidratação moderada a grave, os animais devem ser transportados para o Centro de Recuperação para a Fauna mais próximo. Se o animal estiver normotérmico, com uma condição corporal acima de 2 (ver escala Anexo III) e o estado de desidratação for moderado, a administração de fluidos SQ antes do transporte é possivelmente a melhor solução. Em casos de hipotermia ou desidratação grave, a via intravenosa (IV) ou intraóssea (IO) deve ser a escolhida, com a administração de um bólus de 10 ml/kg de fluidos (aquecido a 39° se existir hipotermia), ao longo de 15 a 30 minutos, antes do transporte. Nos casos em que a condição corporal for inferior em 2 (ver escala Anexo III), existe o risco de indução de edemas corporais através da administração de fluidoterapia, sendo que a formação de edema pulmonar poderá ser fatal. Nestes casos, os volumes administrados devem ser reduzidos para qualquer via parenteral, sendo que os *bólus* IV ou IO deverão respeitar uma taxa máxima de 2 ml/kg.

Na página seguinte, apresentam-se as indicações de utilização das vias de administração de fluidos em crias de abutre-preto.

Tabela 3. Indicações de utilização das vias de administração de fluidos em crias de abutre-preto.

<b>VIA</b>	<b>INDICAÇÃO</b>	<b>FLUIDO</b>
Oral (VO)	Animais conscientes e normotérmicos Desidratação leve, sem perdas associadas ao trato digestivo Manutenção na convalescença	Água, eletrólitos.
Subcutânea (SQ)	Desidratação leve Condição corporal igual ou maior que 2/5	NaCl
Intravenosa (IV) / intraóssea (IO)	Primeiros socorros e cuidados intensivos Reforço de déficits Início de terapia de manutenção	NaCl

## Anexo VI: Exame dos dejetos

É necessário avaliar as porções urinária e fecal das fezes. Ambas as porções são eliminadas simultaneamente pela cloaca.

A porção urinária encontra-se dividida em 2 fases, uma líquida incolor, e outra semissólida de cor branca, devido à presença de ácido úrico em grandes quantidades, formando um coloide.

A porção fecal é escura, embora a tonalidade possa variar de acordo com a dieta da ave e o estado da digestão.

A avaliação macroscópica de ambas porções pode revelar dados de importância clínica. A porção urinária pode evidenciar a presença de poliúria, biliverdina (o excesso de biliverdina é eliminado pela urina, presença de biliverdina na urina pode indicar comprometimento da funcionalidade hepática) ou sangue/hemoglobina.

Por meio do exame macroscópico da porção fecal, é possível detetar problemas digestivos, a partir de modificações na cor e consistência das fezes.

Fezes de tonalidade verde-esmeralda podem ser normais devido à bile não utilizada, possivelmente de manhã, antes da alimentação, quando o trato gastrointestinal está vazio.

Fezes de tonalidade verde-lima sugerem alterações nos processos de motilidade e absorção - frequentemente observadas com toxicidade por chumbo, mas também com aspergilose, coccidiose ou infeção gastrointestinal anaeróbica.

A observação macroscópica das fezes permite também avaliar a presença de hematoquezia e, no caso de fezes muito escuras, sugerir a presença de melena.

Cód. amos.

## Anexo VII: Registos da exploração física

IDENTIFICAÇÃO DA CRIA DE ABUTRE-PRETO ( <i>AEGYPIUS MONACHUS</i> ) E DO LOCAL					
Data:	Hora chegada:	T° amb:	Hum:	Alt:	Pr Atm:
		Local:		Ref. ninho:	
<b>Anilha metálica:</b> <input type="checkbox"/> T. esq. / <input type="checkbox"/> T. dir.		<b>Anilha PVC:</b> <input type="checkbox"/> T. esq. / <input type="checkbox"/> T. dir.		Cor fundo: Cor código:	
Idade cria:		Emissor GPS: <input type="checkbox"/> <i>Leg loop</i> <input type="checkbox"/> <i>Backpack</i>			
EXAME CLÍNICO					
Peso cria no saco:		Peso saco:		Peso cria:	
examinar	ok	Observações			
Auscultação	<input type="checkbox"/>	Bpm:	Resp/min:		
Bico	<input type="checkbox"/>				
Cera e narinas	<input type="checkbox"/>				
Cavidade orofaríngea	<input type="checkbox"/>				
Olhos	<input type="checkbox"/>				
Ouvidos	<input type="checkbox"/>				
Cabeça e pescoço	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Papo cheio / <input type="checkbox"/> Papo vazio			
Porção anterior do esterno	<input type="checkbox"/>				
Esterno	<input type="checkbox"/>				CC: (1-5)
Abdómem	<input type="checkbox"/>				
Cloaca	<input type="checkbox"/>	T°:			
Costas	<input type="checkbox"/>				
Asas	<input type="checkbox"/>				
Membros pélvicos	<input type="checkbox"/>				
Pés	<input type="checkbox"/>				
Pele	<input type="checkbox"/>				
Hidratação	<input type="checkbox"/>	Desidratação: <input type="checkbox"/> 5% <input type="checkbox"/> 7-8% <input type="checkbox"/> 10-12% <input type="checkbox"/> 15% <input type="checkbox"/> Hipovolemia			
Outras observações	Regurgita durante o manuseamento? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não				

Cód. amos.

**Anexo VIII: Registos da colheita de amostras biológicas**

<b>BASE DO NINHO</b>					
Sangue	Hora extração:		<input type="checkbox"/> 5 ml Volume total	<input type="checkbox"/> 2 ml Heparina Hematologia e Bq	<input type="checkbox"/> 2 ml Heparina Toxicologia
	<input type="checkbox"/> 0,5 ml EDTA Genética	<input type="checkbox"/> 3-5 gotas em Papel. Sexagem	Gluc:	Lact:	<input type="checkbox"/> esfregaços N°:
Microrganismos	<input type="checkbox"/> Zaragatoa orofaringe (OF)		<input type="checkbox"/> Zaragatoa Cloaca (C)		
Lesões	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim. Preencher Anexo XIII.a				
Penas	<input type="checkbox"/> 3 penas peito com cálam - GENETICA	<input type="checkbox"/> 3 penas costas com cálam - TOXICOLOGIA	<input type="checkbox"/> 4 penas costas <b>sem</b> cálam - ENDOCRINO		
Ectoparasitas	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim. Descrever:				
Fezes	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim. Descrever Porção urinária: <input type="checkbox"/> Normal. <input type="checkbox"/> Poliúria. <input type="checkbox"/> Biliverdina. <input type="checkbox"/> Sangue/hemoglobina.  Porção fecal: <input type="checkbox"/> Normal. <input type="checkbox"/> Cor verde-lima. <input type="checkbox"/> Hematoquezia. <input type="checkbox"/> Melena.				
Outras amostras na base do ninho	Descrever:				
Hidratação <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim	Hora:		<input type="checkbox"/> NaCl <input type="checkbox"/> Outro:	Vol:	
Afastamento do ninho	Hora saída:				
Observação da ave à distância	Hora:				
<b>LABORATÓRIO CAMPO</b>					
Data:		Hora início:		T°:	
<input type="checkbox"/> Hematócrito:			<input type="checkbox"/> Sólidos totais: (Refratómetro)		
<input type="checkbox"/> Passar 0,5 ml de sangue inteiro com heparina do tubo para TOXICOLOGIA a um eppendorf. Etiquetar "S". Selar.					
<input type="checkbox"/> Centrifugação sangue Para HEMATOLOGIA	Hemólise? <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Tubo pellet		Volume plasma (ml):	
<input type="checkbox"/> Centrifugação sangue Para TOXICOLOGIA	Hemólise? <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Tubo pellet "E"		Volume plasma "P" (ml):	
<input type="checkbox"/> Corar os esfregaços (Diff-Quick), etiquetar, secar, guardar nas caixas de transporte					
Observações:					

## Anexo IX: Parâmetros a analisar na Hematologia e Bioquímica sanguínea:

Os estudos do hemograma e da bioquímica sanguínea, para além de essenciais para a avaliação do estado de saúde da ave, permitem compreender e interpretar o eventual efeito/lesões dos tóxicos potencialmente identificados na análise toxicológica, nos diferentes órgãos de cada animal. A acumulação deste tipo de informação permitirá a identificação de ameaças ao nível populacional, o que por sua vez orientará a conservação da espécie.

O **Hemograma** é uma das ferramentas mais úteis para o diagnóstico de doenças em aves. É fundamental para confirmar um diagnóstico, determinar um prognóstico ou gravidade de uma doença, ou acompanhar a evolução de um paciente em tratamento.

Em seguida apresentam-se os parâmetros do hemograma que vão ser analisados no âmbito do projeto LIFE Aegyptus Return, assim como uma breve descrição da sua utilidade.

Tabela 4. parâmetros do hemograma que vão ser analisados no âmbito do projeto LIFE Aegyptus Return.

HEMOGRAMA	
PARÂMETRO	INDICAÇÃO
Contagem de leucócitos	Identificação de processos inflamatórios. Avaliação da imunodepressão
Fórmula leucocitária	Proporciona informação sobre o estado de saúde e a resposta imunitária. Alterações desta fórmula podem indicar infeções, inflamação, stress ou doenças sistémicas
Contagem de eritrócitos	Avaliação da hidratação, anemia e estado geral
Hematócrito	Avaliação da hidratação, anemia, hemólise.
Contagem Trombócitos	Coagulação sanguínea. Este parâmetro diminui em casos de doenças infecciosas, deficiências nutricionais, toxicidade, doenças imunomediadas
Hemoglobina	Avaliação do estado geral, anemia e infeções crónicas
Índice eritrocitário	Classificação e etiologia das anemias
Morfologia celular (com fotografias)	Determinação de infeções, intoxicações, resposta celular e gravidade

O(s) método(s) utilizado(s) para o cálculo destes parâmetros é/são:

- **Estimativa do número total de leucócitos.** É contabilizado o número de leucócitos em 12 campos de ampliação 400x, os valores dos extremos são eliminados e os restantes somados e divididos por 10, de forma a encontrar um valor médio. Este é multiplicado por 2000 indicando o resultado o número estimado da contagem total de leucócitos.

- **Contagem diferencial e avaliação morfológica** de esfregaço. É necessária a standardização da coloração para uma correta identificação. No âmbito deste protocolo, o esfregaço será sempre realizado

a partir de sangue fresco sem anticoagulante, e a coloração pelo método de *Diff-Quick* será efetuada imediatamente ou poucas horas depois da realização do esfregaço.

- **Hematócrito:** percentagem de eritrócitos no sangue. Cálculo desta percentagem a partir da centrifugação de uma amostra de sangue total sem anticoagulante, num capilar de hematócrito, a 12000 rpm durante 5 minutos. Devem ser preparados dois tubos capilares com a mesma amostra de sangue sem anticoagulante e centrifugados ao mesmo tempo. Após a avaliação do valor do hematócrito de cada um, valida-se o teste se a diferença entre ambos for inferior a 10%. De seguida, calcula-se a média dos valores e o resultado é registado como sendo o valor de hematócrito da ave.

- Concentração de **Hemoglobina**. Calcular usando fórmula: Valor do Hematócrito x 0.3

A **Bioquímica Sanguínea** fornece informações importantes sobre o estado e a função dos diferentes órgãos e sistemas da ave. É uma ferramenta útil para conhecer o estado fisiológico dos animais na natureza. Permite avaliar o estado de saúde das populações através de técnicas minimamente invasivas. No entanto, a sua aplicabilidade vai além do âmbito clínico.

Os estudos dos parâmetros bioquímicos em populações silvestres também estão associados: 1) à avaliação da qualidade nutricional do habitat, sendo de vital importância para a gestão dessas populações e do ambiente, e 2) à determinação das alterações provocadas pelo Homem nas populações de animais silvestres.

A avaliação dos parâmetros bioquímicos de uma determinada amostra apenas tem valor quando enquadrada com a história clínica do animal e o seu exame de estado geral aquando da colheita.

O valor das proteínas totais medidas no sangue com o refratómetro será sempre maior do que o obtido pelo método de química líquida (método do Biureto) devido ao considerável número de substâncias presentes no plasma avícola. Portanto, diferenciamos os valores de ambos os métodos como "sólidos totais" quando medidos com refratómetro, ou "proteínas totais" quando é usado o método do Biureto. É importante considerar as circunstâncias fisiológicas da ave, pois os valores são mais baixos em aves juvenis e mais altos em fêmeas durante o período reprodutivo. A comparação dos níveis de proteínas e o valor do hematócrito ajuda-nos a entender melhor o estado de hidratação ou de anemia da ave. Os sólidos totais serão mensurados aquando da determinação do hematócrito, utilizando o plasma separado no tubo capilar sem anticoagulante, pós-centrifugação, para efetuar a medição com um refratómetro de mão. As proteínas totais serão mensuradas através do método do biureto no Laboratório de Patologia Clínica do HVUTAD.

As proteínas plasmáticas das aves incluem pré-albumina, albumina, alfa, beta e gama globulinas. A correta identificação destas frações pode ser realizada através da eletroforese das proteínas plasmáticas e aporta informação importante acerca do sistema imunitário, do estado inflamatório do indivíduo e da sua função hepática. A eletroforese capilar das proteínas plasmáticas será efetuada num laboratório externo, recorrendo a um aparelho de eletroforeses capilar Sebia CAPILLARYS II.

A enzimologia é uma parte importante da bioquímica sanguínea. As enzimas estão distribuídas por todo o organismo, mas a bioquímica clínica centra-se nas enzimas intracelulares. A libertação destas enzimas intracelulares no plasma deve-se à substituição celular contínua. A libertação durante processos patológicos nos tecidos produz um aumento da sua atividade no plasma. Dessa forma, as enzimas que encontramos no plasma são o resultado do dano celular e do aumento da substituição celular, mas também da indução na sua produção e da libertação na corrente sanguínea de secreções exócrinas ou da diminuição da sua eliminação.

A especificidade e a sensibilidade de uma enzima são conceitos importantes na hora de determinar o valor clínico da mesma. A maior parte das enzimas em aves são pouco específicas, ou seja, não se encontram

em um órgão em particular. Contudo, existem algumas muito sensíveis, ou seja, mudanças patológicas mínimas podem aumentar consideravelmente a atividade plasmática.

Na interpretação do perfil enzimático é importante considerar as condições da técnica laboratorial utilizada (temperatura de trabalho e método). Também é importante considerar a espécie, idade e estado reprodutivo, pois podem existir diferenças significativas.

As análises laboratoriais correspondentes à Hematologia e Bioquímica sanguínea, serão realizadas no Laboratório de Patologia Clínica do HVUTAD.

Em seguida, apresentam-se os parâmetros da bioquímica sanguínea que vão ser analisados no âmbito do projeto LIFE Aegyptius Return, assim como uma breve descrição da sua utilidade.

Tabela 5. Parâmetros da bioquímica sanguínea que vão ser analisados no âmbito do projeto LIFE Aegyptius Return.

<b>BIOQUÍMICA SANGUÍNEA</b>	
<b>PARÂMETRO</b>	<b>INDICAÇÃO</b>
Proteínas totais / sólidos totais	Estado de hidratação, função hepática, homeostasia
Perfil proteico (proteinograma)	Estado inflamatório, estado nutricional, avaliação do sistema imunitário
Lactato	Homeostasia
Glicose	Potencial patologia endócrina, septicemia, neoplasia
Ac. Úrico	Função renal, desidratação
Ureia	Desidratação
Creatinina	Função renal ou desidratação (pouco específico em ave)
Triglicérides	Deteção de inanição, estado geral
Colesterol	Avaliação da dieta. Função hepática
Ácidos biliares	Função hepática
Cálcio	Homeostasia, função renal, estado nutricional
Fósforo	Homeostasia, função renal, estado nutricional
Magnésio	Homeostasia
Sódio	Homeostasia
Potássio	Homeostasia
AST (Aspartato aminotransferase)	Função hepática, lesão muscular e nos tecidos moles.
CK (Creatina quinase)	Lesões musculares, emaciação.

## Anexo X: Parâmetros a analisar em Toxicologia

A secção do documento referente à toxicologia apresenta a metodologia concebida para a obtenção de amostras biológicas (sangue e penas) de crias de abutre-preto (*Aegypius monachus*), sendo também aplicável a adultos.

As substâncias a detetar nas amostras biológicas (sangue e penas) de abutre-preto, no âmbito da Toxicologia, são as seguintes:

- Metais pesados
- Antibióticos
- Anti-inflamatórios

A metodologia foi concebida pela equipa do Grupo de Toxicologia e Veterinária Forense da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Múrcia, um grupo com mais de duas décadas de experiência no estudo e investigação científica de toxinas em aves selvagens, em geral, e aves de rapina em particular.



As análises toxicológicas serão realizadas pela mesma equipa.

A maioria das análises serão efetuadas com base nas amostras de sangue. No caso das penas, estão a ser usadas no estudo de metodologias menos invasivas para a obtenção da informação.

### **Recolha de sangue**

1. Colher 2 ml de sangue e conservá-los num tubo com heparina.
2. Desta quantidade, 0,5 ml de sangue total devem ser armazenados num eppendorf e mantidos congelados.
3. Os restantes 1,5 ml são centrifugados e, após a centrifugação, todo o plasma é recolhido noutra eppendorf.

Para a recolha de plasma, ver o seguinte vídeo: <https://youtu.be/C5gM3zkRMxo>

Centrifugação: 1.600-3.000 g; 10 minutos.

O sedimento da centrifugação do plasma deve ser mantido congelado.

4. Após a centrifugação, transferir o plasma para um eppendorf ou um pequeno tubo.
5. O sedimento ou pellet resultante da centrifugação deve ser igualmente conservado.
6. Os três tubos devem ser rotulados com o Código de Amostra. Adicionalmente, o tubo de sangue completo deve ser identificado com um "S" (sangue), o tubo de plasma com um "P" (plasma) e o tubo de sedimento com um "E" (eritrócitos) (Ver Anexo II).

7. No terreno, as amostras devem ser mantidas refrigeradas. À chegada ao laboratório ou à base de campo, procede-se à centrifugação (recomenda-se a centrifugação do sangue o mais rapidamente possível e nas 12 horas seguintes à colheita) e os três tubos eppendorf obtidos de cada indivíduo são congelados até serem enviados para o laboratório.

8. No final da época, o projeto organizará o envio de todas as amostras para análise.

### **Recolha de penas**

Devem ser recolhidas 3 ou 4 penas do dorso. É importante que uma ou duas destas penas tenham um pouco de sangue no cálam e serão guardadas num envelope de papel, no qual se coloca a identificação do indivíduo (Ver anexo II). As outras duas penas devem ser guardadas num outro envelope de papel, também com a identificação do indivíduo (Ver Anexo II). Estes envelopes devem ser mantidos no frigorífico.

O projeto organizará o envio de todas as amostras em fase posterior.

Sobre a toxicologia, em caso de dúvida ou questão, deve contactar-se:

Alfonso Godino  
Carretera de Jerez, 9. 06120 Oliva de la Frontera (Badajoz).  
Telemóvel: +34 627268029  
Email: alfonsogodino@gmail.com

## Anexo XI: Parâmetros a analisar em Genética

De um modo geral, a análise genética de indivíduos de abutre-preto em liberdade pode fornecer informações sobre o estado da espécie e ajudar a avaliar a eficácia das ações de conservação que serão desenvolvidas durante o projeto LIFE Aegypius Return. A avaliação dos tamanhos populacionais efetivos, dos níveis de endogamia e das tendências na diversidade genética podem ser um bom indicador da capacidade de evolução da espécie a longo prazo. De forma mais concreta, a análise genética das amostras de abutre-preto no âmbito deste projeto pode ser colocada ao serviço dos seus objetivos através de:

- O estudo da conectividade e dos movimentos entre as colónias existentes em Portugal.
- A avaliação das tendências no tamanho efetivo das populações reprodutoras. O material genético recolhido das crias fornecerá ao longo do tempo informações sobre quantos adultos são reprodutores ativos. Por sua vez, esta informação oferecerá uma visão mais profunda da frequência de reprodução e, potencialmente, do uso dos ninhos.
- A avaliação do sucesso reprodutivo das aves de *soft release*, em comparação com o recrutamento na natureza.
- A identificação molecular do sexo das aves fornecerá informações sobre tudo o que está ligado ao sexo: proporção de sexos nas populações, padrões de dispersão enviesados por sexo, etc.
- O suporte a casos forenses.

### Amostras de sangue:

- Recolher no mínimo 0,5 ml em um tubo com EDTA. Agitar várias vezes para garantir uma mistura adequada da amostra e do anticoagulante.
- Etiquetar com o Código de amostra.
- Se as amostras puderem ser transferidas para o respetivo laboratório (Centro de Investigação e Conservação do Zoo de Antuérpia, Bélgica) no intervalo de uma semana, o envio pode ser feito à temperatura ambiente.
- Se as amostras precisarem de ser armazenadas por mais de uma semana antes do envio (o que é expectável, devido à demora na obtenção das licenças CITES), devem ser congeladas. Nesse caso, a transferência das amostras deve ser feita usando uma caixa de poliestireno ou similar que inclua elementos de esfriamento.
- As amostras de sangue devem ser embaladas em um segundo recipiente que possa ser selado (geralmente são usados sacos zip) e incluir material absorvente suficiente (por exemplo, papel absorvente) para absorver possíveis vazamentos.
- Antes do envio, a documentação CITES deve ser processada.

### Cartões FTA:

Os cartões "Whatman FTA" (Flinders Technology Associates) são uma tecnologia desenvolvida pela Whatman, uma empresa de biotecnologia. Esses cartões são impregnados com uma matriz de filtro especial que permite a captura, a lise e a estabilização do DNA presente na amostra biológica, como o

sangue. Uma vez que a amostra seja aplicada ao cartão FTA, o DNA é lisado e fixado na matriz, permitindo seu armazenamento e transporte à temperatura ambiente sem a necessidade de congelamento.

- Aplicar uma gota de sangue no cartão FTA (pode ser sangue com EDTA).
- Etiquetar o cartão (Código amostra).
- Armazenar e enviar à temperatura ambiente.

#### **Amostras de penas:**

- Recolher 3 penas frescas (idealmente que contenham sangue ou partes da bainha que encapsulam o desenvolvimento de novas penas).
- Armazenar num envelope de papel etiquetado (Código de amostra + GEN) à temperatura ambiente.
- Enviar à temperatura ambiente.

#### **Amostras post-mortem:**

No caso lamentável de se ter acesso a um cadáver de abutre-preto, podem ser recolhidas as seguintes amostras:

- Excisão de uma almofada de dedo (0,5x0,5x0,5cm) e armazenamento em etanol.
- Biópsia de órgão ou músculo armazenada em etanol. Mantidas em etanol, essas amostras podem ser mantidas à temperatura ambiente por algumas semanas a um mês. Para o envio das mesmas, devem ser embaladas em um segundo recipiente que possa ser selado (geralmente são usados sacos zip) e incluir material absorvente suficiente (por exemplo, papel absorvente) para absorver possíveis vazamentos. No caso de não haver conservante disponível, as amostras devem ser congeladas e enviadas em condições de frio.

As análises genéticas, no âmbito do projeto LIFE Aegyptius Return, contam com o apoio da equipa do Dr. Philippe Helsen, em:

Centre for Research and Conservation  
Royal Zoological Society of Antwerp (KMDA)  
Koningin Astridplein20-26  
2018 Antwerp  
Belgium

## Anexo XII: Parâmetros a analisar em Microbiologia

Tendo como objetivo a monitorização do estado de saúde geral das crias de abutre-preto, este protocolo pretende realizar, de forma rotineira, uma identificação e caracterização da microbiota gastrointestinal destes indivíduos.

Embora a influência da microbiota intestinal na saúde do hospedeiro tenha sido intensivamente estudada em aves domésticas, ainda não há bibliografia suficiente que sustente como determinados microrganismos podem afetar as aves necrófagas. Isto deve-se às dificuldades em determinar quais os critérios de comparação quanto (1) à composição e (2) à dinâmica da microbiota do trato gastrointestinal.

As dinâmicas da microbiota gastrointestinal podem ser influenciadas por uma variedade de fatores (a) extrínsecos e (b) intrínsecos:

a) Extrinsecamente, no estado selvagem, estas dinâmicas dependerão das condições ambientais em habitats preferenciais, nos locais de nidificação e de quaisquer interações sociais.

- ◆ Exemplo disso poderão ser as crias que, no momento da colheita, terão passado toda a vida circunscritas a uma área específica, e, quando comparadas às aves com grandes áreas de distribuição, estarão menos expostas a diferentes ecossistemas. Portanto, a microbiota gastrointestinal destas crias tenderá a ser menos propensa a flutuações.

b) Os fatores intrínsecos são inerentes ao hospedeiro, desde a sua predisposição genética, idade, sexo, regime alimentar específico da espécie, estado de saúde, até à sua microbiota comensal. A microbiota comensal poderá interagir indiretamente com potenciais microrganismos patogénicos e/ ou diretamente por exclusão competitiva de microrganismos.

Assim, considerando o nicho ecológico dos abutres-pretos e das suas crias, a identificação dos microrganismos e da diversidade da sua microbiota gastrointestinal permitirá criar mais uma ferramenta de monitorização destes indivíduos (caracterização do potencial simbiótico entre os indivíduos e a sua microbiota gastrointestinal).

No âmbito do projeto LIFE Aegyptus Return serão recolhidas amostras, de forma rotineira, da cavidade orofaríngea e da cloaca. Para este efeito, serão utilizadas zaragatoas em meio AMIES viscosa. Estas amostras serão posteriormente processadas no âmbito do desenvolvimento de um projeto de doutoramento em Biodiversidade, Conservação e Genética, numa instituição/laboratório a designar. Parte da investigação terá como objetivos: (a) o isolamento e identificação da microbiota de cada uma destas regiões anatómicas, bem como (b) a avaliação da variação entre o microbioma das mesmas; (c) a identificação das possíveis interações e funções dos microrganismos inerentes à homeostasia do trato gastrointestinal do abutre-preto, e (d) de que forma estas interações poderão representar uma adaptação benéfica deste necrófago ao seu ecossistema.

Mais, prevê-se a interpretação dos resultados tendo em conta as condições ambientais e contexto ecológico do hospedeiro, de forma a melhor se interpretarem as possíveis relações sintróficas entre os diferentes microrganismos. Assim, os resultados da recolha deverão ser interpretados considerando o exame de estado geral do indivíduo, o seu contexto biológico e as informações objetivas resultantes desta análise.

## Anexo XIII: Parâmetros a analisar em Citologia/Histopatologia

No contexto deste projeto, podemos definir “**lesão detetada**”, como qualquer alteração (física ou estrutural) macroscópica, num órgão ou tecido biológico, encontrada através de um exame de estado geral rotineiro. Esta alteração macroscópica poderá indicar a presença de doença, lesão, infeção ou de qualquer outra condição atípica não-patológica.

O objetivo da monitorização a nível citológico e histopatológico consiste em selecionar e identificar as eventuais lesões detetadas nos indivíduos de cria de abutre-preto no campo.

Esta monitorização inicia-se com a **descrição** das alterações identificadas no exame de estado geral do indivíduo, concentrando-se exclusivamente nas características observáveis da lesão detetada.

Para que se consiga uma análise consistente e objetiva, as lesões devem ser sempre caracterizadas de forma clara, rigorosa e organizada, através de terminologia descritiva para lesões macroscópicas. Assim, uma vez identificada uma lesão, dever-se-á indicar a sua localização, forma, dimensão, cor, consistência, número, extensão, distribuição, conteúdo e percentagem de envolvimento no órgão ou cavidade específica – sendo, por isso, necessário o preenchimento de um relatório uniformizado (ver: Anexo XIII.a).

Desta forma, o veterinário de campo deve **avaliar** em cada caso se é prático e necessário coletar a amostra da lesão detetada e devolver a cria de abutre-preto ao ninho ou apenas fotografar/descrever a lesão detetada, permitindo que a amostra seja recolhida num Centro de Recuperação para a Fauna, caso se decida que esse seja o destino do animal doente. Para ajudar a padronizar essa tomada de decisão, evitando o encaminhamento desnecessário de crias para os Centros de Recuperação para a Fauna, ou o retorno ao ninho de crias com lesões que comprometam a sua viabilidade, foram desenvolvidas as seguintes ferramentas:

- Quadro de pontuação das lesões (Anexo XIII.b), para a identificação e avaliação relativa de lesões detetadas em crias de abutre-preto.  
Em função da sua gravidade, podem ser classificadas em 4 graus:
  - 1 – 2: Lesões de gravidade leve a moderada.
  - 3 – 4: Lesões de gravidade severa a grave.
- Árvore de decisão perante uma lesão detetada numa cria de abutre-preto (Anexo XII.c).

A colheita de fragmentos de lesão detetada, quando realizada em campo, deverá ser feita sem causar danos ao indivíduo, sendo por isso necessário recolher apenas tecido/amostra suficiente para se conseguir caracterizar histopatologicamente.

A documentação fotográfica das lesões detetadas deve, sempre que possível, acompanhar o relatório descritivo.

O estudo Citológico e Histopatológico destas amostras será realizado nas instalações do Hospital Veterinário da Universidade de Trás-os-Montes.

## Anexo XIII.a. Registos para a descrição da lesão detetada

<b>Descrição da LESÃO DETETADA</b>		
<b>Amostra Recolhida:</b> <input type="checkbox"/> Fotografia da lesão <input type="checkbox"/> Zaragatoa seca + esfregaço		<input type="checkbox"/> Zaragatoa AMIES <input type="checkbox"/> PAF + esfregaço <b>(Cód. amos)</b>
<b>Tipo de Lesão:</b> <input type="checkbox"/> Massa (tridimensional). <input type="checkbox"/> Linha (unidimensional);		
<input type="checkbox"/> Placa (bidimensional), <input type="checkbox"/> Ausência de tecido - solução de continuidade.		
<b>Consistência:</b> <input type="checkbox"/> Firme; <input type="checkbox"/> Mole; <input type="checkbox"/> Gelatinosa; <input type="checkbox"/> Pastosa; <input type="checkbox"/> Friável; <input type="checkbox"/> Crepitante – estruturas que contêm gás; <input type="checkbox"/> Flutuante – estruturas que contêm líquido (*).		<b>Forma:</b> <input type="checkbox"/> Circular <input type="checkbox"/> Esférica <input type="checkbox"/> Ovoide <input type="checkbox"/> Discoide; <input type="checkbox"/> Pedunculada ou ampla - no caso de lesões salientes.
<b>Cor:</b> <input type="checkbox"/> Uniforme: _____ <input type="checkbox"/> Variação cromática: _____		<b>Margens:</b> <input type="checkbox"/> Contornos lineares e regulares <input type="checkbox"/> Limites bem definidos <input type="checkbox"/> Contornos de transição anormais e irregulares <input type="checkbox"/> Limites difíceis de avaliar
<b>Quanto ao número:</b> <input type="checkbox"/> Individual <input type="checkbox"/> Múltiplas: <input type="checkbox"/> < 5 <input type="checkbox"/> 5-10 <input type="checkbox"/> 10-20 <input type="checkbox"/> > 20		
<b>Distribuição:</b> <input type="checkbox"/> Focais – concentram-se apenas numa área; <input type="checkbox"/> Multifocais – individuais que formam distintos aglomerados; <input type="checkbox"/> Difusas – distribuídas de forma uniforme; <input type="checkbox"/> Aleatórias – sem padrão arquitetural definido; <input type="checkbox"/> Simétricas; <input type="checkbox"/> Tubulares; <input type="checkbox"/> Fasciculadas - feixes.		<b>Dimensões (mm):</b> <input type="checkbox"/> Bidimensional • Comprimento: • Largura: <input type="checkbox"/> Tridimensional (necessita de medição precisa em Centro de Recuperação para a Fauna) • Comprimento: • Largura: • Espessura: <input type="checkbox"/> Unidimensional • Comprimento: <input type="checkbox"/> Solução de Continuidade • Extensão da lesão:
<b>(*) Caso exista:</b> acumulação de líquido anormal de material <input type="checkbox"/> pastoso <input type="checkbox"/> gelatinoso <input type="checkbox"/> líquido		<b>Dimensão relativa (%)</b> _____ (Extensão da lesão em relação à sua ocupação na totalidade do órgão/região)
Possível de drenar e recolher a campo? <input type="checkbox"/> Sim    –    ID    amostra: _____ <input type="checkbox"/> Não – necessita de drenagem em Centro de Recuperação para a Fauna.		
<b>Localização:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>A região anatómica: _____</li> <li>Em relação às <u>estruturas circundantes</u> (sublinhar a referência):             <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> cranial/caudal a _____</li> <li><input type="checkbox"/> dorsal/ventral a _____</li> <li><input type="checkbox"/> proximal/ distal a _____</li> <li><input type="checkbox"/> à direita/ à esquerda de _____</li> </ul> </li> </ul>		

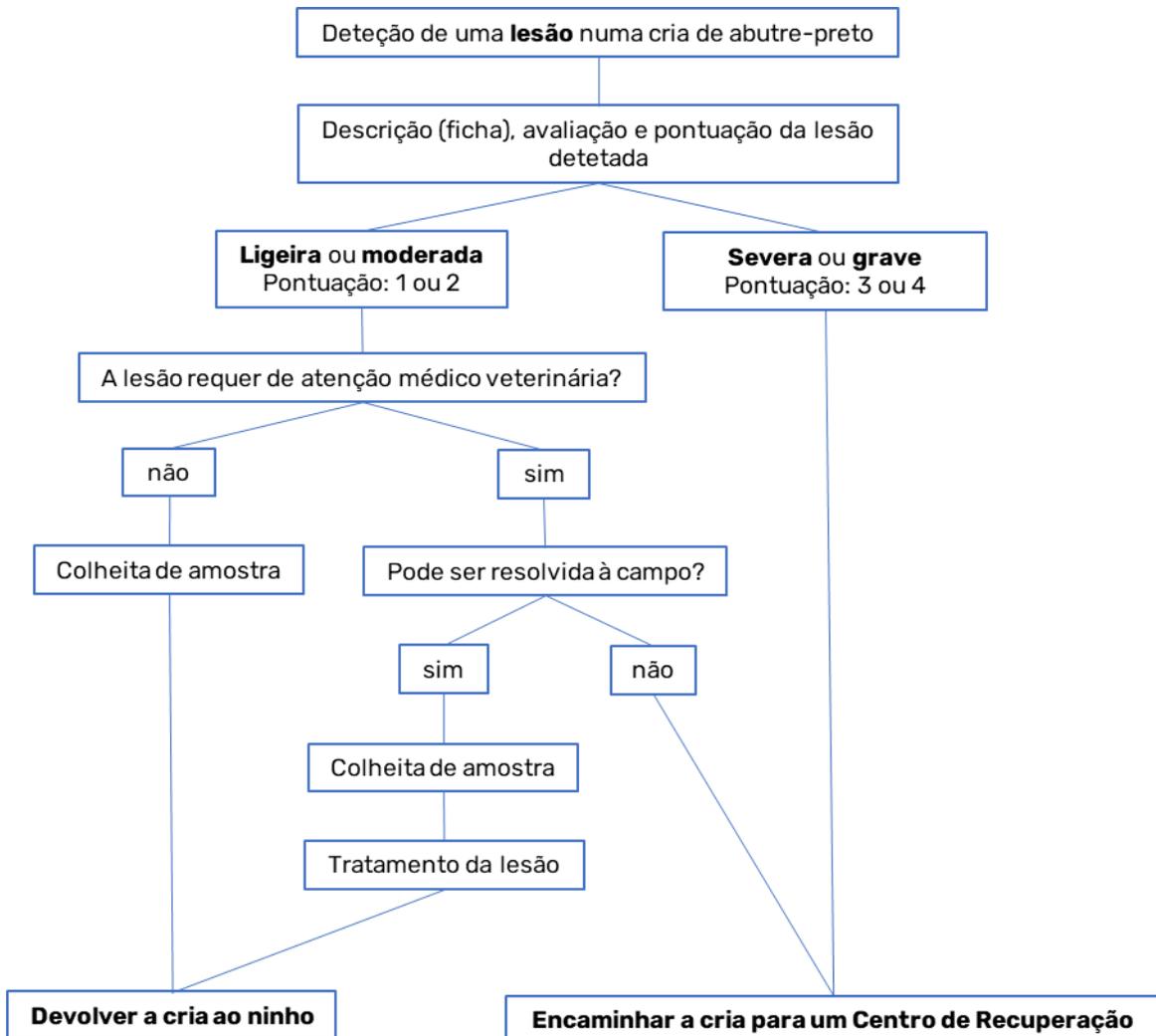
## Anexo XIII.b. Avaliação relativa das lesões detetadas

Avaliação relativa das lesões detetadas nas crias de abutre-preto	
Pontuação	Descrição
1	Lesão <b>ligeira</b> (unidimensional ou bidimensional). Consistência branda e friável. Contornos lineares e regulares. Limites bem definidos. Dimensão relativa* <10%. Padrão aleatório e/ou focal. Exame de estado geral sem alterações dignas de registo.
2	Lesão <b>moderada</b> (bidimensional ou por descontinuidade). Contornos lineares e regulares. Limites bem definidos. Dimensão relativa* menor ou igual a 20%. Exame de estado geral com alterações discretas a registar.
3	Lesão <b>severa</b> (bidimensional ou tridimensional). Consistência alterada. Contornos irregulares. Limites mal definidos. Dimensão relativa* acima de 20%. Requer monitorização e/ou intervenção. Exame de estado geral alterado
4	Lesão <b>grave</b> que pode pôr em causa a vida do indivíduo e/ou que necessitam de cuidados médico-veterinários. (Hipovolémia; Desidratação > 10%; CC <1.5.)

(\*) Dimensão relativa: Extensão da lesão em relação à sua ocupação na totalidade do órgão/região, em termos percentuais.

Nota: As lesões de nível de transição (2 -> 3), deverão ser consideradas tendo em conta o contexto clínico de cada indivíduo.

### Anexo XIII.c. Árvore de decisão - Destino das crias de abutre-preto com base na pontuação das lesões detetadas.



## Anexo XIV: Parâmetros a analisar em Parasitologia

Existe uma grande incidência de parasitismo em aves, e muitas doenças podem ter origem parasitária. No entanto, no estado selvagem, a patogenicidade destes parasitas é discutível, uma vez que normalmente eles estabelecem uma relação de simbiose com o hospedeiro.

A deteção de ectoparasitas pode realizar-se macroscopicamente, com a inspeção da superfície do corpo e a identificação com lupa.

Os endoparasitas, podem ser detetados nas fezes nas suas fases adultas ou reprodutoras através do exame coprológico.

Os hemoparasitas das aves, na sua maioria protozoários, podem ser detetados nos esfregaços. Anteriormente considerados como não patogénicos por alguns autores, estudos mais recentes indicam um potencial efeito nosológico destes agentes, quando presentes em diferentes espécies e a sua relação com má condição corporal e anemia (por exemplo *Leucocytozoon* spp., *Haemoproteus* spp., *Plasmodium* spp. e *Trypanosoma* spp.). Muito recentemente, confirmou-se a relação existente entre a parasitose de *Strigiformes* por *Leucocytozoon* e a diminuição do hematócrito e da condição corporal nestas aves (Martín-Maldonado 2023). No caso concreto das crias de abutre-preto, foi encontrado um efeito aparentemente prejudicial dos haemosporídios sobre o peso corporal destas aves (Chakarov 2021).

Outros protozoários podem ser identificados no trato digestivo ou respiratório, como é o caso das *Trichomonas* sp e das Coccídias (*Isospora*, *Eimeria*). Noutras aves estudadas, as tricomonas causam frequentemente vômitos crónicos e perda de peso, apresentando ainda lesões na orofaringe com placas brancas, que podem coalescer, ou sinais de sinusite que se estendem para o palato e restante mucosa oral. As coccidioses são mais comuns em aves jovens e levam a diarreia, por vezes com sangue. No caso das crias de abutre-preto, desconhece-se esta relação direta entre presença de protozoários no trato digestivo e o desenvolvimento de sintomas de doença. Já foi encontrado *Trichomonas gallinae* na cavidade orofaríngea de abutres-pretos em centros espanhóis de recuperação de fauna, que não apresentavam qualquer sintoma de tricomoníase (Martinez-Díaz 2015).

Os parâmetros a analisar de forma rotineira nas crias de abutre-preto, no âmbito do projeto LIFE Aegyptius Return serão:

- **Identificação de ectoparasitas:** Serão recolhidos exemplares de ectoparasitas, quando presentes no exame de estado geral de cada ave. Posteriormente, serão identificados no Laboratório de Parasitologia do HVUTAD.
- **Exame coprológico:** Sempre que se tenha acesso a fezes frescas durante a manipulação, serão recolhidas amostras para a pesquisa e identificação de estruturas parasitárias no Laboratório de Parasitologia do HVUTAD.
- **Hemoparasitas:** Será realizada no Laboratório de Patologia Clínica do HVUTAD, a pesquisa de hemoparasitas a partir dos esfregaços de sangue fresco efetuados aquando da colheita de sangue nas crias de abutre-preto.

## Anexo XV. Parâmetros a analisar em Endocrinologia

O stress pode ser definido como um desafio somático ou psicológico à homeostase que ativa primeiro o sistema nervoso simpático e depois o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, aumentando assim os níveis de glucocorticóides (Pereira et al., 2022). Os glucocorticóides são os principais mediadores endócrinos do stress, pelo que são os biomarcadores de stress mais utilizados em animais. No entanto, a concentração sanguínea de corticosterona, o principal glucocorticóide em aves, é influenciada pelo stress agudo, como a captura, limitando a sua utilidade como marcador de stress de origem ambiental. Pelo contrário, a concentração de corticosterona em penas é um biomarcador cada vez mais utilizado para estudar o stress crónico na fauna selvagem (Romero & Fairhurst, 2017). A concentração de corticosterona nas penas pode refletir as condições ambientais, nutricionais, de saúde, a experiência dos progenitores e as perturbações antropogénicas durante a fase de crescimento das penas.

Pensa-se que a corticosterona é incorporada nas penas principalmente por difusão passiva a partir do sangue, durante o crescimento da pena. Assim sendo, a corticosterona nas penas reflete a fração integrada de corticosterona no soro (Romero & Fairhurst, 2017). A vantagem de usar penas para medir a concentração de corticosterona é que fornecem uma visão integrada e retrospectiva de médio prazo da fisiologia do corticosterona (Romero & Fairhurst, 2017)

Resumidamente, uma vez no laboratório, as penas são sujeitas a uma descontaminação externa, o cálamo é removido, e a ráquis e barbas reduzidas a pó. A corticosterona é extraída por sonicação e incubação com metanol, que depois é evaporado. A concentração de corticosterona é determinada por testes imunoenzimáticos de competição (no nosso laboratório, utilizamos R&D Systems, USA).

Os parâmetros a analisar de forma rotineira nas crias de abutre-preto, no âmbito do projeto LIFE Aegypius Return serão:

- **Concentração de corticosterona em penas:** a concentração de corticosterona nas penas (ráquis e barbas) é determinada por técnicas imunoenzimáticas, após extração por metanol.

Este parâmetro será analisado nas instalações do CIBIO - Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos da Universidade do Porto.

## Anexo XVI: Mapa para o Transporte e Acondicionamento de Amostras

	Etapas → ↓ Amostras	Base do ninho	Lab. de campo	Entidade responsável da colónia	HVUTAD	FMVUM	Lab STAB vida	Zoo Antuérpia	CIBIO
<b>HVUTAD (Hemat, Bq, Mb, Cit, PP)</b>	Tubos sangue com heparina	Estabilizar Refrigerar	a) b)	-	-	-	-	-	-
	a) Tubo pellet post- centrifugaç.	-	Refrigerar	Congelar	Congelar	-	-	-	-
	b) Plasma	-	Refrigerar	Congelar	Congelar	-	-	-	-
	Capilares hematócrito	Estabilizar Refrigerar	-	-	-	-	-	-	-
	Esfregaços	Tª ambiente	Tª ambiente	Tª ambiente	Tª ambiente	-	-	-	-
	Zaragatoas	Refrigerar	Refrigerar	Congelar	Congelar	-	-	-	-
	Ectoparasitas	Refrigerar	Refrigerar	Refrigerar	Refrigerar	-	-	-	-
	Fezes	Refrigerar	Refrigerar	Congelar	Congelar	-	-	-	-
<b>FMVUM (Toxicol.)</b>	Tubos sangue com heparina	Refrigerar	c) d) e)	-	-	-	-	-	-
	c) Tubo "E"	-	Refrigerar	Congelar	Congelar	Congelar	-	-	-
	d) Tubo "S"	-	Refrigerar	Congelar	Congelar	Congelar	-	-	-
	e) Tubo "P"	-	Refrigerar	Congelar	Congelar	Congelar	-	-	-
	Penas costas Tox	Refrigerar	Refrigerar	Refrigerar	Refrigerar	Refrigerar			-
<b>Lab STABvida (Sexagem)</b>	Pingos de sangue no papel absorvente	Tª ambiente	Tª ambiente	Tª ambiente	-	-	Tª amb	-	-
<b>Zoo Antuérpia (Genética)</b>	Pingos sangue EDTA	Tª ambiente	Tª ambiente	Tª ambiente	Tª ambiente	-	-	Tª ambiente	-
	Penas peito Gen	Tª ambiente	Tª ambiente	Tª ambiente	Tª ambiente	-	-	Tª ambiente	-
	Cartão FTA	-	-	-	Tª amb se <1 semana armaz, Congelado se >1 semana armaz.	-	-	Tª amb se <1 semana armaz, Congelado se >1 semana armaz.	-
<b>CIBIO (Endocrin)</b>	Penas costas sem cálamo	Tª ambiente	Tª ambiente	Tª ambiente	Tª ambiente	-	-	-	Tª amb

## Anexo XVII: Registos dos Dados Biométricos

IDENTIFICAÇÃO DA CRIA DE ABUTRE-PRETO ( <i>AEGYPIUS MONACHUS</i> ) E DO LOCAL			
Data:	Código de amostra:	Local:	Ref. ninho:
<b>Anilha metálica:</b> <input type="checkbox"/> T. esq. / <input type="checkbox"/> T. dir.		<b>Anilha PVC:</b> <input type="checkbox"/> T. esq. / <input type="checkbox"/> T. dir.	
Idade cria (dias):		N° Emissor GPS: <input type="checkbox"/> <i>Leg loop</i> <input type="checkbox"/> <i>Backpack</i>	
DADOS BIOMÉTRICOS			
Peso cria no saco (kg)	Peso saco (kg)		Peso cria (kg)
Comprimento da Asa (cm)		Comprimento da 8ª Pena Primária (mm)	
Comprimento da haste da 8ª pena primária (cm)		Comprimento da cauda (cm)	
Comprimento da cabeça (cm)		Comprimento da cabeça mais bico (cm)	
Comprimento do bico à cera (mm)		Comprimento do bico e cera (mm)	
Largura da cabeça (cm)		Comprimento do tarso (mm)	
Comprimento da garra traseira (mm)			
Observações:			