

Documento de debate elaborado por la Comisión de Normas Sanitarias para los Animales Acuáticos de la OMSA

1. Resumen

El seguimiento de los sistemas acuáticos mediante el ADN ambiental (ADNa) constituye un campo de investigación que progresa con rapidez y que permitirá poner a disposición métodos rentables y no invasivos para detectar los agentes patógenos, en particular los que afectan las poblaciones acuáticas silvestres, donde es difícil o no se recomienda la obtención de muestras.

La Comisión para los Animales Acuáticos es consciente de que se están aplicando métodos de ADN para detectar los agentes responsables de varias enfermedades de la lista de la OMSA. Dado que estos métodos están disponibles y se utilizan en la actualidad, la Comisión consideró conveniente brindar orientaciones relativas a su correcta aplicación y sus posibles límites.

La Comisión señala que, dado que no existen estimaciones precisas de los resultados del diagnóstico para diseñar programas de vigilancia que utilicen pruebas de ADN, los datos obtenidos con métodos de ADN no son adecuados para fundamentar las declaraciones de ausencia de las enfermedades incluidas en el listado. La confirmación de la infección por las enfermedades de la lista tampoco podría hacerse utilizando métodos de ADN porque un resultado positivo no demuestra la infección de uno o varios animales hospedadores susceptibles.

Sin embargo, los resultados positivos de ADN podrían aportar pruebas preliminares de una sospecha de infección tales como la presencia del patógeno ADN/ARN en la muestra. La utilización de métodos de ADN podría resultar particularmente útil para el seguimiento de animales de gran valor o raros, como alternativa a la colecta de muestras de tejido. Igualmente, puede desempeñar un papel en la detección temprana de la incursión de enfermedad en las poblaciones silvestres o en circunstancias en las que no es probable que la infección dé lugar a signos clínicos observables. Cabe destacar que, tras la sospecha basada en un resultado positivo obtenido por un método de ADN, las muestras obtenidas directamente de los animales acuáticos deben ser analizadas para confirmar o excluir el caso como se describe en los capítulos específicos de enfermedad correspondientes del *Manual Acuático*.

Deberá considerarse cuidadosamente la aplicación de los métodos de ADN para una finalidad concreta. Los métodos han de elegirse teniendo en cuenta todos los factores relevantes incluyendo el objetivo de la vigilancia, el patógeno diana, la del fiabilidad del método y el entorno en el que se toma la muestra. Es importante anticipar las implicaciones de resultados positivos de la aplicación de un método de ADN, ya que cualquier resultado positivo puede requerir llevar a cabo investigaciones que impliquen muestreo y pruebas de animales susceptibles para confirmar o excluir un caso sospechoso. Los métodos ADN no serán una elección apropiada para la vigilancia de muchas enfermedades de los animales acuáticos.

Este documento tiene como objetivo estudiar el posible uso de los métodos de ADN en el contexto de las normas del *Código Sanitario para los Animales Acuáticos (Código Acuático)* y del *Manual Acuático* de la OMSA, además de destacar sus ventajas y limitaciones.

Se incluyó el uso de un método de ADN para la detección de *Gyrodactylus salaris* en el Capítulo 2.3.3. del *Manual Acuático* relativo a la infección por *Gyrodactylus salaris*¹. La inclusión de este método se ajusta a las conclusiones del presente documento de debate.

2. Definiciones del ADN

Existen numerosas definiciones del ADN (por ejemplo, Bass *et al.*, 2015; Díaz-Ferguson y Moyer, 2014; Thomsen y Willerslev, 2015). La mayoría consideran el ADN como fragmentos cortos de ADN/ARN detectables de un organismo vivo derivados de componentes celulares o fluidos secretados en los componentes abióticos del medio ambiente circundante (es decir, agua, aire, sedimentos).

A efectos del presente documento, definimos el ADN como “ácidos nucleicos extraídos de muestras ambientales 'verdaderas' (como agua, suelo, sedimento y biofilm)”. Queda excluido de esta definición el material derivado directamente del hospedador (como las heces, las células muertas y las mucosas). Una vez extraídos de la muestra ambiental, los fragmentos de ADN buscado pueden detectarse empleando una variedad de métodos moleculares (Díaz-Ferguson & Moyer, 2014). Además, el ADN puede secuenciarse directamente como bibliotecas metagenéticas o tras la amplificación por PCR de regiones genéticas diana específicas (Bass *et al.*, 2015).

1 https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/aahm/current/2.3.03_GYRO_ESP.pdf



El rendimiento real de la detección basada en el ADN depende de la colecta de las muestras y de la metodología de procesamiento (por ejemplo, el volumen filtrado, la presencia y la eliminación de inhibidores de la PCR), de procesos biológicos (por ejemplo, tasas de diseminación, variación temporal) y de factores abióticos (degradación del analito, factores hidrodinámicos). Es importante evaluar estos factores empíricamente, con el fin de poder interpretar los resultados correctamente. Sólo con una clara comprensión de cómo influyen estos factores en la probabilidad de detección de agentes patógenos se podrá utilizar la detección basada en el ADN de forma fiable en diferentes entornos (Brunner, 2020).

3. Objetivos

En este documento se examinan i) las ventajas y ii) las limitaciones de los métodos de detección de agentes patógenos por ADN, iii) la validación de los métodos de ADN, iv) las condiciones para la inclusión de un método de ADN en un capítulo específico de enfermedades del *Manual Acuático* y v) el uso de las pruebas de ADN como criterio de diagnóstico.

4. Revisión de los métodos de ADN publicados para la detección de agentes patógenos en animales acuáticos

Se realizó una revisión de la literatura para evaluar la aplicación de los métodos de ADN con fines de detección y estudio de patógenos y parásitos de los animales acuáticos. Se identificaron 33 publicaciones que informaban del uso del ADN para detectar 13 agentes patógenos de la lista de la OMSA (para más detalles, véase el Cuadro 1 del Anexo 1). Se han desarrollado métodos para la detección de los agentes causantes de los agentes patógenos de la lista de la OMSA de anfibios, crustáceos, peces y moluscos. La mayoría de las publicaciones se refieren a la detección de los agentes patógenos de la lista en poblaciones de animales acuáticos silvestres, en particular la infección por *Aphanomyces astaci*, la infección por *Batrachochytrium dendrobatidis*, la infección por *B. salamandrivorans*, la infección por especies de Ranavirus y la infección por *G. salaris*.

Se consultaron otras 13 publicaciones que tenían como objetivo otros agentes patógenos específicos (por ejemplo, *Microcytos mackini*), grupos de agentes patógenos (por ejemplo, de peces ornamentales) o que aplicaban los métodos de ADN a áreas de estudio más amplias (por ejemplo, la transmisión de virus a través del agua) (véase el Apéndice 1, Tabla 2 para más detalles).

5. Beneficios de los métodos de ADN para la detección de agentes patógenos de animales acuáticos

La detección de ADN es una herramienta prometedora que puede utilizarse para complementar el muestreo directo de los animales acuáticos con fines de vigilancia. Los métodos de ADN ofrecen algunas ventajas en comparación con el muestreo y las pruebas directas de los animales acuáticos, entre las que se incluyen, pero no se limitan a las siguientes:

1. Los métodos de ADN no requieren un muestreo intrusivo o letal de los animales acuáticos huéspedes. Pueden ser especialmente útiles para animales acuáticos raros o valiosos, o para animales silvestres en los que es difícil coleccionar muestras (por ejemplo, Rusch *et al.*, 2018).
2. Los métodos de ADN no requieren la manipulación de los animales, lo que evita el estrés asociado a la obtención de muestras de tejido no invasivas (Brunner, 2020).
3. El tiempo de obtención y procesamiento de las muestras y los costes asociados pueden reducirse sustancialmente en comparación con la toma y el procesamiento de muestras individuales de animales (Rusch *et al.*, 2018)
4. Dado que las muestras ambientales pueden contener analitos de toda la población cautiva, o de un gran porcentaje de ella, se necesitarían muchas menos muestras para detectar un agente patógeno (en comparación con las muestras individuales de animales), incluso cuando la sensibilidad diagnóstica del método de ADN sea baja (Brunner, 2020).
5. La misma muestra ambiental puede analizarse para detectar la presencia de especies hospedadoras (por ejemplo, véase Rusch *et al.*, 2018) y de múltiples patógenos.
6. Los métodos de ADN pueden emplearse para la evaluación de las posibles vías de introducción en las que no sea posible el muestreo de los huéspedes (por ejemplo, agua de lastre).

6. Límites de los métodos de ADN

Las limitaciones de la aplicación de la detección de agentes patógenos basada en el ADN son, entre otras, las siguientes:

1. En la muestra ambiental puede existir muy poco ADN disponible del patógeno buscado debido a la dilución en el medio ambiente y a la degradación de los ácidos nucleicos, lo que puede afectar negativamente la sensibilidad del método (Brunner, 2020).
2. La concentración de ADN diana en una muestra ambiental varía dependiendo de una serie de factores como la densidad de los huéspedes, la prevalencia y la intensidad de la infección, el método de muestreo (por ejemplo, el volumen de agua muestreado, el tamaño de los poros del filtro, las condiciones de almacenamiento) y las condiciones ambientales (por ejemplo, la cantidad de materia orgánica). Por lo tanto, la sensibilidad de los métodos de ADN puede variar más en función de los puntos de muestreo, del momento de realización de los estudios y de los taxones objetivo si se compara con el muestreo directo y el análisis de los tejidos animales (Brunner, 2020).
3. Si bien existen marcos formales para evaluar el rendimiento diagnóstico de las pruebas que utilizan muestras derivadas de animales, éstos todavía no se han desarrollado para los métodos de ADN. Esto significa que el diseño de encuestas para demostrar la ausencia de infección utilizando métodos de ADN es problemático.
4. Es más factible que una detección positiva de ADN del patógeno diana en una muestra ambiental se deba a una fuente de contaminación no representativa del patógeno viable (por ejemplo, patógeno inactivado de productos que han recibido un tratamiento térmico) en comparación con las muestras derivadas de animales. Del mismo modo, puede no indicar la infección de un animal huésped con el agente patógeno diana.

7. Validación de los métodos ADN

Cada vez es más probable que las decisiones de la gestión de las enfermedades se tomen basándose en los resultados de los estudios de ADN. Por lo tanto, es imperativo que los datos generados por los estudios de ADN sean fiables, defendibles y llevados a cabo con altos estándares de garantía de calidad (Klymus *et al.*, 2019). La validación empírica de la detección de patógenos basada en el ADN deberá centrarse en comprender las causas y las consecuencias de la variación de las características de la prueba a través de las condiciones de muestreo y necesita tomar en consideración una clara comprensión de lo que se ha muestreado/analizado para el caso de cada patógeno de interés.

En el Capítulo 1.1.2. del *Manual Acuático*, se describen los principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas. Las recomendaciones de este capítulo están destinadas a las pruebas de diagnóstico de muestras derivadas de animales; sin embargo, los principios y muchos de los métodos son aplicables a los métodos de ADN. Se recomienda aplicar los principios y métodos del Capítulo 1.1.2. a la validación de los métodos de detección de ADN para las enfermedades de la lista de la OMSA en algunos casos. Conviene observar que deberá hacerse hincapié y validarse el proceso de colecta de muestras, la concentración del ADN diana, la extracción del ADN, la sensibilidad y otros resultados (indicadores).

Se disponen de normas de diseño y notificación para los estudios que buscan evaluar la precisión diagnóstica de los métodos que utilizan muestras derivadas de animales acuáticos (por ejemplo, Laurin *et al.*, 2018). Muchas de las consideraciones sobre el diseño y la presentación de informes también son aplicables a los métodos de ADN y se recomienda emplear estas normas para los estudios de precisión diagnóstica del ADN.

Además de las orientaciones descritas anteriormente, se han publicado consideraciones sobre el diseño y la presentación de informes específicamente para los métodos de ADN (por ejemplo, Doyle & Uthicke, 2020; Goldberg *et al.*, 2016; Klymus *et al.*, 2019). Muchos de estos estudios informan sobre consideraciones que se encaminan más a la detección de macroorganismos que a los agentes patógenos; sin embargo, las consideraciones son generalmente relevantes para los métodos de detección de ADN para agentes patógenos. Estas orientaciones serán de especial utilidad para la colecta en el terreno, el procesamiento y la conservación de las muestras de ADN.

8. Requisitos mínimos para la inclusión de un método de ADN en el *Manual Acuático*

Se reconoce que muchos métodos de diagnóstico incluidos actualmente en el *Manual Acuático* no cumplen las etapas de validación descritas en el Capítulo 1.1.2. del *Manual Acuático* y con las normas de diseño y notificación descritas por Laurin *et al.*, 2018 (véase más arriba). De hecho, varias de las pruebas que figuran en el *Manual Acuático* sólo alcanzan a validarse hasta la etapa 1 o 2 descrita en el Capítulo 1.1.2. del *Manual Acuático*.

Por esta razón, la Comisión propone que se cumplan los siguientes requisitos mínimos de notificación para que un método de ADN sea considerado para su inclusión en el *Manual Acuático* [Adaptado de Goldberg *et al.*, (2016)]:

1. Definición clara de la finalidad o de la aplicación prevista de la prueba o del protocolo (téngase en cuenta que las finalidades de uso apropiadas para los métodos de ADN en el contexto de las normas de la OMSA se examinan más a fondo en la sección 9).
2. Descripción de los métodos de obtención de muestras y de las precauciones adoptadas para eliminar la contaminación, incluidos el volumen de recogida, el material de los recipientes, los controles negativos, el número de réplicas y los lugares y la profundidad de muestreo
3. Descripción de los métodos utilizados para concentrar el ADN/ARN objetivo (precipitación / filtro), tipo de filtro (si procede) y lugar del filtrado (por ejemplo, en el campo).
4. Descripción de la conservación y el almacenamiento de la muestra (método, temperatura, duración).
5. Descripción del proceso de extracción de ADN/ARN, incluidos los ajustes de protocolo, las precauciones relativas a la contaminación, los controles negativos y los controles positivos internos
6. Descripción del método de detección molecular y optimización de acuerdo con (Bustin *et al.*, 2009). Además, las pruebas de PCR en tiempo real deben ser validados (Nivel 1) en una matriz ambiental de acuerdo con su finalidad.

9. Posible aplicación de los métodos de detección de ADN en los capítulos específicos de enfermedad del *Manual Acuático*

En los capítulos del *Manual Acuático* dedicados a las enfermedades se recomiendan pruebas para identificar los casos sospechosos y para confirmar la sospecha en los animales aparentemente sanos (o de estado de salud desconocido) y clínicamente afectados. Las poblaciones aparentemente sanas pueden ser objeto de sospecha, y por lo tanto muestrearse, si existe uno o varios vínculos epidemiológicos con una población infectada. La proximidad geográfica o el movimiento de animales acuáticos o productos o equipos de animales acuáticos, etc., de una población infectada conocida equivalen a un vínculo epidemiológico. Por otro lado, en los estudios se toman muestras de poblaciones sanas para demostrar que están libres de enfermedad.

Los siguientes puntos describen la idoneidad de las pruebas de los métodos de detección de ADN para su inclusión como criterios de definición de casos en la sección 6 de los capítulos específicos de enfermedades del *Manual Acuático*.

a) Animales aparentemente sanos

i) Definición de caso sospechoso en una población de animales aparentemente sanos

Adecuado como criterio. Se considera que un resultado positivo obtenido con un método de ADN recomendado en el *Manual Acuático* proporciona pruebas adecuadas para ser incluido como criterio para un caso sospechoso cuando existen especies susceptibles conocidas en el entorno en el que se ha tomado la muestra.

ii) Definición de caso confirmado en animales aparentemente sanos

No es adecuado como criterio. Se considera que un resultado positivo obtenido a partir de un método de ADN recomendado en el *Manual Acuático* no proporciona pruebas adecuadas para confirmar un caso en animales aparentemente sanos. Los métodos que utilizan muestras derivadas de animales se consideran más apropiados como criterio para confirmar un caso. Las pruebas para confirmar un caso en animales aparentemente sanos deben cumplir con los requisitos de la Sección 6.1.2. del capítulo específico de la enfermedad correspondiente del *Manual Acuático*.

b) Animales clínicamente afectados

i) Definición de caso sospechoso en animales afectados clínicamente

Adecuado como criterio. En general, no se recomienda tomar una muestra ambiental para investigar la causa de la enfermedad en una población de animales clínicamente afectados, ya que es más probable que las muestras de animales clínicamente afectados conduzcan a la detección de un agente patógeno y sean más adecuadas para la investigación de la enfermedad. Sin embargo, en algunas circunstancias, un método de ADN puede detectar un agente patógeno y conducir al reconocimiento de signos clínicos de enfermedad no observados previamente o no asociados con la misma. En estas circunstancias, se considera que un resultado positivo obtenido con un método de ADN recomendado en el *Manual Acuático* ofrece pruebas adecuadas para ser incluido como criterio de un caso sospechoso.

ii) Definición de caso confirmado

No es adecuado como criterio. Un resultado positivo de un método de ADN recomendado en el *Manual Acuático* no se incluiría como criterio para la confirmación de un agente patógeno en animales clínicamente afectados (o aparentemente sanos, véase el punto 9.a.ii. anterior). Cualquier prueba positiva de ADN requeriría una investigación adicional que incluya la obtención y el análisis de tejidos animales, tal y como se estipula en el capítulo específico de la enfermedad correspondiente del *Manual Acuático*. Las pruebas para confirmar un caso en animales clínicamente afectados deberán cumplir los requisitos del apartado 6.2.2. del capítulo correspondiente del *Manual Acuático* dedicado a la enfermedad.

10. Discusión

Las principales limitaciones del ADN son la falta de datos de validación y de rendimiento diagnóstico, lo que significa que los resultados negativos no pueden utilizarse para demostrar la ausencia de la enfermedad y que los resultados positivos siempre requieren la confirmación con muestras de animales (Brunner, 2020). Sin embargo, hay circunstancias en las que las ventajas del muestreo ambiental, en lugar del animal, permiten que los enfoques de ADN pueden integrarse de forma útil en un programa de vigilancia.

Un país o una zona que se declare libre de uno o varios agentes patógenos específicos deberá disponer de un sistema de detección precoz de la incursión de la enfermedad. La notificación de la morbilidad y la mortalidad por parte de los criaderos es un componente clave de un sistema de detección precoz. Las poblaciones cultivadas pueden actuar como centinelas de las poblaciones silvestres sólo si están conectadas epidemiológicamente (por ejemplo, a través de aguas compartidas). De lo contrario, se requiere una vigilancia activa de las poblaciones silvestres, ya que es poco probable que se notifique la morbilidad o la mortalidad (sobre todo porque es posible que los animales muertos o moribundos se les devore rápidamente o se los objeto de depredadores). El muestreo de animales de poblaciones silvestres puede presentar considerables desafíos logísticos, especialmente si las poblaciones son remotas, escasas o si el bajo número hace que el muestreo invasivo no sea deseable. Los métodos de detección de agentes patógenos basados en el ADN superan muchos de los desafíos del muestreo de animales acuáticos silvestres (Kamoroff & Goldberg, 2017; Trebitz *et al.*, 2017).

La infección por algunos agentes patógenos de la lista, en determinadas condiciones o en algunas especies hospedadoras, no causará invariablemente signos clínicos detectables. Los sistemas de detección precoz que se basan en las observaciones de mortalidad o morbilidad por parte de los criaderos (o de otras personas) son ineficaces en estas circunstancias y se requeriría una vigilancia activa. El muestreo frecuente de animales de cría, y a un nivel que permita detectar una baja prevalencia, presenta considerables desafíos logísticos y es probable que el coste sea inaceptable. Los métodos de ADN pueden ofrecer una alternativa viable (Trujillo-González *et al.*, 2019a) para la vigilancia activa de patógenos que pueden no causar de forma fiable la expresión de signos clínicos observables. Tienen la ventaja adicional de que la muestra contendrá analitos de un gran porcentaje, sino de toda la población cautiva. Por lo tanto, se necesitan relativamente pocas muestras ambientales, en comparación con las muestras de animales (siempre que se pueda extraer suficiente ADN/ARN).

11. Conclusiones

1. Los métodos de ADN pueden ser útiles para mejorar los sistemas de vigilancia pasiva en términos de detección precoz; en particular, en los casos en que las condiciones no son propicias para la expresión clínica de la enfermedad, o las poblaciones no están bajo suficiente observación para detectar la enfermedad clínica si se produce.
2. Los métodos de ADN pueden ser útiles para animales acuáticos silvestres raros, valiosos o difíciles de coleccionar, en los que el muestreo directo de los animales no es deseable o tiene un coste prohibitivo. También pueden ofrecer ventajas a nivel de precios para los programas de seguimiento de enfermedades en entornos de producción.
3. Actualmente no existen marcos que permitan evaluar el rendimiento diagnóstico de los métodos de ADN de forma similar a las muestras derivadas de animales. Por esta razón, las pruebas de los métodos de detección de ADN no pueden utilizarse como prueba para la autodeclaración de ausencia de enfermedad.
4. Los métodos de ADN se considerarán para su inclusión en los capítulos específicos de enfermedades del *Manual Acuático*, si se cumplen las normas mínimas de enfermedad y notificación descritas en este documento.
5. Los resultados positivos de los métodos de ADN que se han incluido en el *Manual Acuático* se considerarán como un criterio apropiado para un caso sospechoso de una enfermedad.
6. La aplicación de los métodos de ADN para una finalidad concreta han de considerarse cuidadosamente con respecto al patógeno detectado y al entorno objeto de prueba, la fiabilidad del método y las implicaciones de los resultados positivos que pueden requerir estudios de las poblaciones susceptibles para confirmar o excluir un caso sospechoso.
7. Los resultados positivos de un método de ADN incluido en el *Manual Acuático* no se considerarán un criterio apropiado para un caso confirmado de una enfermedad en animales aparentemente sanos o clínicamente afectados.

Referencias

- ALZAYLAEE H., COLLINS R.A., RINALDI G., SHECHONGE A., NGATUNGA B., MORGAN E.R. & GENNER M.J. (2020). Schistosoma species detection by environmental DNA assays in African freshwaters. *PLOS Neglect. Trop. Dis.*, **14**:e0008129.
- AUDEMARD C., REECE K.S. & BURRESON E.M. (2004). Real-Time PCR for Detection and Quantification of the Protistan Parasite *Perkinsus marinus* in Environmental Waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 6611–6618.
- BASS D., STENTIFORD G.D., LITTLEWOOD D.T.J. & HARTIKAINEN H. (2015). Diverse Applications of Environmental DNA Methods in Parasitology. *Trends Parasitol.*, **31**, 499–513.
- BASTOS GOMES G., HUTSON K.S., DOMINGOS J.A., CHUNG C., HAYWARD S., MILLER T.L. & JERRY D.R. (2017). Use of environmental DNA (eDNA) and water quality data to predict protozoan parasites outbreaks in fish farms. *Aquaculture*, **479**, 467–473.
- BASTOS GOMES G., HUTSON K.S., DOMINGOS J.A., INFANTE VILLAMIL S., HUERLIMANN R., MILLER T.L. & JERRY D.R. (2019). Parasitic protozoan interactions with bacterial microbiome in a tropical fish farm. *Aquaculture*, **502**, 196–201.
- BERNHARDT L., MYRMEL M., LILLEHAUG A., QVILLER L. & WELI S. (2020). Filtration, concentration and detection of salmonid alphavirus in seawater during a post-smolt salmon (*Salmo salar*) cohabitant challenge. *Dis. Aquatic. Org.*, **144**, 61–73.
- BRANNELLY L.A., WETZEL D.P., OHMER M.E.B., ZIMMERMAN L., SAENZ V. & RICHARDS-ZAWACKI C.L. (2020). Evaluating environmental DNA as a tool for detecting an amphibian pathogen using an optimized extraction method. *Oecologia*, **194**, 267–281.
- BRUNNER J.L. (2020). Pooled samples and eDNA-based detection can facilitate the “clean trade” of aquatic animals. *Sci. Rep.*, **10**, 10280.
- BUSTIN S.A., BENES V., GARSON J.A., HELLEMANS J., HUGGETT J., KUBISTA M., MUELLER R., NOLAN T., PFAFFL M.W., SHIPLEY G.L., VANDESOMPELE J. & WITTEWER C.T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.*, **55**, 611–622.
- DIAZ-FERGUSON E.E. & MOYER G.R. (2014). History, applications, methodological issues and perspectives for the use environmental DNA (eDNA) in marine and freshwater environments. *Rev. Biol. Trop.*, **62**, 1273–1284.
- DOYLE J. & UTHICKE S. (2020). Sensitive environmental DNA detection via lateral flow assay (dipstick) – A case study on corallivorous crown-of-thorns sea star (*Acanthaster cf. solaris*) detection. *Environ. DNA*, 1–20.
- FOSSOY F., BRANDSEGG H., SIVERTSGÅRD R., PETERSEN O., SANDERCOCK B.K., SOLEM Ø., HINDAR K. & MO T.A. (2020). Monitoring presence and abundance of two gyrodactylid ectoparasites and their salmonid hosts using environmental DNA. *Environ. DNA*, **2**, 53–62.
- GOLDBERG C.S., TURNER C.R., DEINER K., KLYMUS K.E., THOMSEN P.F., MURPHY M.A., SPEAR S.F., MCKEE A., OYLER-McCANCE S.J., CORNMAN R.S., LARAMIE M.B., MAHON A.R., LANCE R.F., PILLIOD D.S., STRICKLER K.M., WAITS L.P., FRIEMER A.K., TAKAHARA T., HERDER J.E. & TABERLET P. (2016). Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods Ecol. Evol.*, **7**, 1299–1307.
- GREGORY A., MUNRO L.A., SNOW M., URQUHART K.L., MURRAY A.G. & RAYNARD R.S. (2009). An experimental investigation on aspects of infectious salmon anaemia virus (ISAV) infection dynamics in seawater Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, **32**, 481–489.
- HALL E.M., CRESPI E.J., GOLDBERG C.S. & BRUNNER J.L. (2016). Evaluating environmental DNA-based quantification of ranavirus infection in wood frog populations. *Molec. Ecol. Resour.*, **16**, 423–433.
- HARAMOTO E., KITAJIMA M., KATAYAMA H. & OHGAKI S. (2007). Detection of koi herpesvirus DNA in river water in Japan. *J. Fish Dis.*, **30**, 59–61.
- HOLT C., FOSTER R., DANIELS C.L., VAN DER GIEZEN M., FEIST S.W., STENTIFORD G.D. & BASS D. (2018). *Haliotidida noduliformans* infection in eggs of lobster (*Homarus gammarus*) reveals its generalist parasitic strategy in marine invertebrates. *J. Invertebr. Pathol.*, **154**, 109–116.
- HONJO M.N., MINAMOTO T. & KAWABATA Z. (2012). Reservoirs of Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3) DNA in sediments of natural lakes and ponds. *Vet. Microbiol.*, **155**, 183–190.
- HONJO M.N., MINAMOTO T., MATSUI K., UCHII K., YAMANAKA H., SUZUKI A.A., KOHMATSU Y., IIDA T. & KAWABATA Z. (2010). Quantification of cyprinid herpesvirus 3 in environmental water by using an external standard virus. *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 161–168.
- HUVER J.R., KOPRIVNIKAR J., JOHNSON P.T.J. & WHYARD S. (2015). Development and application of an eDNA method to detect and quantify a pathogenic parasite in aquatic ecosystems. *Ecol. Appl.*, **25**, 991–1002.

- JORGENSEN L., VON G., NIELSEN J.W., VILLADSEN M.K., VISMANN B., DALVIN S., MATHIESSEN H., MADSEN L., KANIA P.W. & BUCHMANN K. (2020). A non-lethal method for detection of *Bonamia ostreae* in flat oyster (*Ostrea edulis*) using environmental DNA. *Sci. Rep.*, **10**, 1–9.
- JULIAN J.T., GLENNEY G.W. & REES C. (2019). Evaluating observer bias and seasonal detection rates in amphibian pathogen eDNA collections by citizen scientists. *Dis. Aquat. Org.*, **134**, 15–24.
- KAMOROFF C. & GOLDBERG C.S. (2017). Using environmental DNA for early detection of amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* prior to a rapid die-off. *Dis. Aquat. Org.*, **127**, 75–79.
- KLYMUS K.E., MERKES C.M., ALLISON M.J., GOLDBERG C.S., HELBING C.C., HUNTER M.E., JACKSON C.A., LANCE R.F., MANGAN A.M., MONROE E.M., PIAGGIO A.J., STOKDYK J.P., WILSON C.C. & RICHTER C.A. (2019). Reporting the limits of detection and quantification for environmental DNA assays. *Environ. DNA*, 1–12.
- KONGRUENG J., YINGKAJORN M., BUNPA S., SERMWITTAYAWONG N., SINGKHAMANAN K. & VUDDHAKUL V. (2015). Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease in southern Thailand. *J. Fish Dis.* **38**, 957–966.
- LAFFERTY K.D. & BEN-HORIN T. (2013). Abalone farm discharges the withering syndrome pathogen into the wild. *Front. Microbiol.*, **4**, 1–5.
- LAURIN, E., THAKUR, K.K., GARDNER, I.A., HICK, P., MOODY, N.J., CRANE, M. & ERNST, I. (2018). Design standards for experimental and field studies to evaluate diagnostic accuracy of tests for infectious diseases in aquatic animals. *J. Fish Dis.*, **41**, 729–749.
- MAHON A.R., HORTON D.J., LEARMAN D.R., NATHAN L.R. & JERDE C.L. (2018). Investigating diversity of pathogenic microbes in commercial bait trade water. *PeerJ.*, 6:e5468.
- MIAUD C., ARNAL V., POULAIN M., VALENTINI A. & DEJEAN T. (2019). eDNA increases the detectability of ranavirus infection in an alpine amphibian population. *Viruses*, **11**, 1–15.
- MOSHER B.A., HUYVAERT K.P., CHESTNUT T., KERBY J.L., MADISON J.D. & BAILEY L.L. (2017). Design- and model-based recommendations for detecting and quantifying an amphibian pathogen in environmental samples. *Ecol. Evol.*, **7**, 10952–10962.
- NATIVIDAD K.D.T., NOMURA N. & MATSUMURA M. (2008). Detection of White spot syndrome virus DNA in pond soil using a 2-step nested PCR. *J. Virol. Methods*, **149**, 28–34.
- OIDTMANN B., DIXON P., WAY K., JOINER C. & BAYLEY A.E. (2018). Risk of waterborne virus spread – review of survival of relevant fish and crustacean viruses in the aquatic environment and implications for control measures. *Rev. Aquacult.*, **10**, 641–669.
- PIERSON T.W. & HORNER A.A. (2016). Environmental DNA (eDNA) sampling for amphibian pathogens. Southeastern Partners in Amphibian and Reptile Conservation (SEPARC), Disease, Pathogens and Parasites Task Team: Information Sheet #19.
- POLINSKI M.P., MEYER G.R., LOWE G.J. & ABBOTT C.L. (2017). Seawater detection and biological assessments regarding transmission of the oyster parasite *Mikrocytos mackini* using qPCR. *Dis. Aquat. Org.*, **126**, 143–153.
- QUANG N.D., HOA P.T.P., DA T.T. & ANH P.H. (2009). Persistence of white spot syndrome virus in shrimp ponds and surrounding areas after an outbreak. *Environ. Monit. Assess.*, **156**, 69–72.
- ROBINSON C.V., UREN WEBSTER T.M., CABLE J., JAMES J. & CONSUEGRA S. (2018). Simultaneous detection of invasive signal crayfish, endangered white-clawed crayfish and the crayfish plague pathogen using environmental DNA. *Biol. Conserv.*, **222**, 241–252.
- RUSCH J.C., HANSEN H., STRAND D.A., MARKUSSEN T., HYTTERØD S. & VRÅLSTAD T. (2018). Catching the fish with the worm: a case study on eDNA detection of the monogenean parasite *Gyrodactylus salaris* and two of its hosts, Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Parasite. Vector.*, **11**, 333.
- RUSCH J. C., MOJŽIŠOVÁ M., STRAND D.A., SVOBODOVÁ J., VRÅLSTAD T. & PETRUSEK A. (2020). Simultaneous detection of native and invasive crayfish and *Aphanomyces astaci* from environmental DNA samples in a wide range of habitats in Central Europe. *NeoBiota*, **58**, 1–32.
- SALAMA N. & RABE B. (2013). Developing models for investigating the environmental transmission of disease-causing agents within open-cage salmon aquaculture. *Aquacult. Env. Interac.*, **4**, 91–115.
- SANA S., WILLIAMS C., HARDOUIN E.A., BLAKE A., DAVISON P., PEGG J., PALEY R., ZHANG T. & ANDREOU D. (2018). Phylogenetic and environmental DNA insights into emerging aquatic parasites: implications for risk management. *Int. J. Parasitol.*, **48**, 473–481.
- SPITZEN-VAN DER SLUIJS A., STARK T., DEJEAN T., VERBRUGGHE E., HERDER J., GILBERT M., JANSE J., MARTEL A., PASMANS F. & VALENTINI A. (2020). Using environmental DNA for detection of *Batrachochytrium salamandrivorans* in natural water. *Environ. DNA*, **2**, 565–571.

- STRAND D.A., HOLST-JENSEN A., VILJUGREIN H., EDVARDSEN B., KLAVENESS D., JUSSILA J. & VRÅLSTAD T. (2011). Detection and quantification of the crayfish plague agent in natural waters: Direct monitoring approach for aquatic environments. *Dis. Aquat. Org.*, **95**, 9–17.
- STRAND D.A., JUSSILA J., JOHNSEN S.I., VIJAMAA-DIRKS S., EDSMAN L., WIIK-NIELSEN J., VILJUGREIN H., ENGDAHL F. & VRÅLSTAD T. (2014). Detection of crayfish plague spores in large freshwater systems. *J. Appl. Ecol.*, **51**, 544–553.
- THOMSEN P.F. & WILLERSLEV E. (2015). Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biol. Conserv.*, **183**, 4–18.
- TREBITZ A.S., HOFFMAN J.C., DARLING J.A., PILGRIM E.M., KELLY J.R., BROWN E.A., CHADDERTON W.L., EGAN S.P., GREY E.K., HASHSHAM S.A., KLYMUS K.E., MAHON A.R., RAM J.L., SCHULTZ M.T., STEPIEN C.A. & SCHARDT J.C. (2017). Early detection monitoring for aquatic non-indigenous species: Optimizing surveillance, incorporating advanced technologies, and identifying research needs. *J. Environ. Manage.*, **202**, 299–310.
- TRUJILLO-GONZALEZ A., BECKER J.A., HUERLIMANN R., SAUNDERS R.J. & HUTSON K.S. (2019a). Can environmental DNA be used for aquatic biosecurity in the aquarium fish trade? *Biol. Invasions*, **22**, 1011–1025.
- TRUJILLO-GONZALEZ A., EDMUNDS R. C., BECKER J.A. & HUTSON K.S. (2019b). Parasite detection in the ornamental fish trade using environmental DNA. *Sci. Rep.*, **9**, 1–9.
- VILACA S.T., GRANT S.A., BEATY L., BRUNETTI C.R., CONGRAM M., MURRAY D.L., WILSON C.C. & KYLE C.J. (2020). Detection of spatiotemporal variation in ranavirus distribution using eDNA. *Environ. DNA*, **2**, 210–220.
- VRÅLSTAD T., STRAND D., RUSCH J., TOVERUD O., JOHNSEN S.I., TARPAL A., RASK-MOLLER P. & GJERVE A.-G. (2016). The surveillance programme for *Aphanomyces astaci* in Norway 2016. Norwegian Veterinary Institute.
- WALKER S.F., SALAS M.B., JENKINS D., GARNER T.W.J., CUNNINGHAM A.A., HYATT A.D., BOSCH J. & FISHER M.C. (2007). Environmental detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in a temperate climate. *Dis. Aquat. Org.*, **77**, 105–112.
- WELI S.C., BERNHARDT L.-V., QVILLER L., MYRMEL M. & LILLEHAUG A. (2021). Development and evaluation of a method for concentration and detection of salmonid alphavirus from seawater. *J. Virol. Methods*, **287**, 113990.
- WITTEWER C., NOWAK C., STRAND D.A., VRÅLSTAD T., THINES M. & STOLL S. (2018a). Comparison of two water sampling approaches for eDNA-based crayfish plague detection. *Limnologica*, **70**, 1–9.
- WITTEWER C., STOLL S., STRAND D., VRÅLSTAD T., NOWAK C. & THINES M. (2018b). eDNA-based crayfish plague monitoring is superior to conventional trap-based assessments in year-round detection probability. *Hydrobiologia*, **807**, 87–97.
-

Apéndice 1. Publicaciones que describen los métodos de ADN para agentes patógenos de animales acuáticos

Tabla 1. Aplicaciones publicadas de métodos de ADN para la detección de agentes patógenos de animales acuáticos incluidos en la lista de la OMSA

Enfermedades incluidas en la lista de la OMSA	Publicación
Enfermedades de los anfibios	
Infección por <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	Brannelly <i>et al.</i> , 2020; Julian <i>et al.</i> , 2019; Kamoroff & Goldberg, 2017; Mosher <i>et al.</i> , 2017; Pierson & Horner, 2016; Walker <i>et al.</i> , 2007
Infección por <i>Batrachochytrium salamandrivorans</i>	Brunner, 2020; Spitzen-van der Sluijs <i>et al.</i> , 2020
Infección por las especies de <i>Ranavirus</i>	Hall <i>et al.</i> , 2016; Julian <i>et al.</i> , 2019; Miaud <i>et al.</i> , 2019; Pierson & Horner, 2016; Vilaca <i>et al.</i> , 2020
Enfermedades de los peces	
Infección por <i>Gyrodactylus salaris</i>	Fossoy <i>et al.</i> , 2020; Rusch <i>et al.</i> , 2018;
Infección por las variantes con supresión en la HPR y HPRO del virus de la anemia infecciosa del salmón	Gregory <i>et al.</i> , 2009
Infección por el herpesvirus de la carpa koi	Haramoto <i>et al.</i> , 2007; Honjo <i>et al.</i> , 2010; 2012
Infección por el alfavirus de los salmónidos	Bernhardt <i>et al.</i> , 2020; Weli <i>et al.</i> , 2021
Enfermedades de los crustáceos	
Enfermedad de la necrosis pancreática aguda	Kongrueng <i>et al.</i> , 2015
Infección por <i>Aphanomyces astaci</i> (plaga del cangrejo de río)	Robinson <i>et al.</i> , 2018; Rusch <i>et al.</i> , 2020; Strand <i>et al.</i> , 2011; 2014; Vralstad <i>et al.</i> , 2016; Wittwer <i>et al.</i> , 2018a; 2018b
Infección por el virus del síndrome de las manchas blancas	Natividad <i>et al.</i> , 2008; Quang <i>et al.</i> , 2009
Enfermedades de los moluscos	
Infección por <i>Bonamia ostreae</i>	Jorgensen <i>et al.</i> , 2020
Infección por <i>Perkinsus marinus</i>	Audemard <i>et al.</i> , 2004
Infección por <i>Xenohaliotis californiensis</i>	Lafferty & Ben-Horin, 2013

Tabla 2. Estudios publicados de ADN de agentes patógenos de animales acuáticos no incluidos en la lista de la OMSA

Asunto	Publicación
Detección de parásitos de peces ornamentales	Trujillo-Gonzalez <i>et al.</i> , 2019b; 2019a
Parasitología	Bass <i>et al.</i> , 2015
Brotos de parásitos protozoarios en piscifactorías	Bastos Gomes <i>et al.</i> , 2017; 2019
Transmisión de enfermedades en jaulas de salmón en aguas abiertas	Salama & Rabe, 2013
Parásitos acuáticos emergentes	Sana <i>et al.</i> , 2018
Microbios patógenos en cebos	Mahon <i>et al.</i> , 2018
Detección de virus transmitidos por el agua	Oidtmann <i>et al.</i> , 2018
<i>Haliotida noduliformans</i> en langostas	Holt <i>et al.</i> , 2018
<i>Microcytos mackini</i>	Polinski <i>et al.</i> , 2017
Parásito trematodo <i>Ribierioia ondatrae</i>	Huver <i>et al.</i> , 2015
<i>Schistosoma</i> sp.	Alzaylaee <i>et al.</i> , 2020

© Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA), 2022



Algunos derechos reservados. Esta obra está disponible bajo la licencia de Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 IGO (CC BY-NC-SA 3.0 IGO; <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo/legalcode>).

De acuerdo con las condiciones de la licencia, se permite copiar, redistribuir y adaptar la obra para fines no comerciales, siempre que se cite correctamente, como se indica a continuación. En ningún uso que se haga de esta obra debe darse a entender que la Organización Mundial de Sanidad Animal refrenda una organización, productos o servicios específicos. No se autoriza la utilización del logotipo de la Organización Mundial de Sanidad Animal. Si se realizan adaptaciones, se debe contar con la misma licencia Creative Commons o equivalente. En caso de que se efectúe una traducción, se debe incluir el siguiente descargo de responsabilidad junto con la siguiente cita: «Esta traducción no es obra de la Organización Mundial de Sanidad Animal. La Organización Mundial de Sanidad Animal no son responsable del contenido ni de la exactitud de esta traducción. La edición original en inglés es la edición autorizada».

Todo litigio que surja en el marco de la licencia y no pueda resolverse de forma amistosa se resolverá a través de mediación y arbitraje, según lo dispuesto en el artículo 8 de la licencia, a no ser que se disponga lo contrario en el presente documento. Las reglas de mediación vigentes serán el reglamento de mediación de la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (<http://www.wipo.int/amc/en/mediation/rules>) y todo arbitraje se llevará a cabo de manera conforme al reglamento de arbitraje de la Comisión de las Naciones Unidas para el Derecho Mercantil Internacional (CNUDMI).

Materiales de terceros. Si se desea reutilizar el material contenido en esta obra que sea propiedad de terceros, como por ejemplo cuadros, gráficos o imágenes, corresponde al usuario determinar si se necesita una autorización para tal reutilización y obtenerla del titular del derecho de autor. El riesgo de que se deriven reclamaciones de la infracción de los derechos de uso de un elemento que sea propiedad de terceros recae exclusivamente sobre el usuario.

Ventas, derechos y licencias. Las publicaciones de la Organización Mundial de Sanidad Animal están disponibles en el sitio web de la Organización Mundial de Sanidad Animal (www.woah.org) o pueden adquirirse en la librería en línea de la Organización Mundial de Sanidad Animal (www.woah.org/es/ebookshop/).