

Document de travail élaboré par la Commission des normes sanitaires pour les animaux aquatiques de l'OMSA

1. Résumé

Le suivi des systèmes aquatiques en ayant recours à l'ADN environnemental (ADNe) est un domaine de recherche qui progresse rapidement et qui permettra de disposer de méthodes économiques et n'occasionnant pas de destruction pour le dépistage d'agents pathogènes, notamment ceux affectant les populations aquatiques sauvages au sein desquelles il peut être difficile ou non souhaitable de prélever des échantillons.

La Commission des animaux aquatiques est informée que les méthodes de l'ADN environnemental sont appliquées pour la détection des agents pathogènes responsables de plusieurs maladies listées par l'OMSA, Ces méthodes étant disponibles et actuellement utilisées, la Commission est convenue qu'il serait souhaitable que des orientations relatives aux applications appropriées des méthodes de l'ADN environnemental et à leurs limites potentielles soient proposées.

La Commission indique que, dans la mesure où il n'existe pas d'estimations précises des performances en matière de diagnostic permettant de concevoir des programmes de surveillance ayant recours à des épreuves de l'ADN environnemental, les données obtenues par des méthodes de l'ADN environnemental ne sont pas appropriées pour étayer les déclarations d'absence de maladies listées. La confirmation des infections par des maladies listées ne peut pas non plus être effectuée en utilisant des méthodes de l'ADN environnemental car un résultat positif ne démontre pas qu'un ou des animaux hôte(s) sensible(s) est / sont infecté(s).

Les résultats positifs obtenus par des méthodes de l'ADN environnemental pourront toutefois constituer des éléments de preuve suffisants pour une suspicion d'infection, comme la présence de l'ADN/l'ARN de l'agent pathogène dans l'échantillon. Cette application des méthodes de l'ADN environnemental peut être particulièrement utile pour le suivi des animaux de haute valeur ou rares, comme solution de substitution à la collecte d'échantillons de tissus. Elle peut jouer un rôle dans la détection précoce de l'incursion d'une maladie dans des populations sauvages ou dans des circonstances où l'infection est susceptible de ne pas causer de signes cliniques observables. À la suite d'une suspicion fondée sur un résultat positif obtenu par une méthode de l'ADN environnemental, des échantillons collectés directement chez les animaux aquatiques doivent être analysés comme décrit dans les chapitres spécifiques à des maladies pertinents du *Manuel aquatique* – pour confirmer ou exclure le cas.

L'application de méthodes de l'ADN environnemental pour la réalisation d'un objectif précis doit être examinée avec précaution. Les méthodes doivent être choisies de façon appropriée, en prenant en considération l'ensemble des facteurs, notamment l'objectif de la surveillance, l'agent pathogène cible, la fiabilité de la méthode et l'environnement dans lequel est réalisé l'échantillonnage. Il est important que les conséquences de l'obtention de résultats positifs soient anticipées préalablement à l'application d'une méthode de l'ADN environnemental car tout résultat positif peut nécessiter la réalisation d'enquêtes impliquant un échantillonnage direct et un test de l'animal sensible afin de confirmer ou d'exclure un cas suspect. Le recours à des méthodes de l'ADN environnemental ne s'avérera pas être un choix opportun pour réaliser un certain nombre des objectifs de la surveillance des animaux aquatiques.

Le présent document a pour objectif d'étudier l'utilisation potentielle des méthodes de l'ADN environnemental dans le contexte des normes du *Code sanitaire pour les animaux aquatiques* (le *Code aquatique*) de l'OMSA et du *Manuel aquatique* et de mettre en évidence leurs avantages et leurs limites.

L'utilisation d'une méthode de l'ADN environnemental pour la détection de *Gyrodactylus salaris* a été incluse dans le chapitre 2.3.3. du *Manuel aquatique* intitulé « Infection à *Gyrodactylus salaris* »¹. L'inclusion de cette méthode est en ligne avec les conclusions de ce document de travail.

2. Définitions de l'ADN environnemental

De nombreuses définitions de l'ADN environnemental sont proposées (par exemple, Díaz-Ferguson et Moyer, 2014 ; Bass *et al.*, 2015 ; Thomsen et Willerslev, 2015). La plupart de ces définitions considèrent l'ADN environnemental comme de courts fragments d'ADN/ARN détectables, issus d'un organisme vivant et qui dérivent de composants cellulaires ou de fluides sécrétés dans les composants abiotiques du milieu environnant (c'est-à-dire l'eau, l'air, les sédiments).

Aux fins du présent document, nous définissons l'ADN environnemental comme suit : « acides nucléiques extraits de 'véritables' échantillons environnementaux (tels que l'eau, le sol, les sédiments, le biofilm) ». Les matériels dérivant directement de l'hôte (tels que les fèces, les cellules mortes et le mucus) ne sont pas couverts par cette définition. Une fois extraits de l'échantillon environnemental, les fragments d'ADN environnemental cible peuvent être détectés en ayant recours à des méthodes moléculaires variées (Díaz-Ferguson et Moyer, 2014). L'ADN environnemental peut en outre faire l'objet d'un séquençage direct, sous forme de bibliothèques métagénomiques ou après amplification par PCR de régions génétiques cibles spécifiques (Bass *et al.*, 2015).

1 https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/aahm/current/2.3.03_G_salaris.pdf



Les performances réelles de la détection de l'ADN environnemental dépendent de la collecte des échantillons et de la méthode de traitement (par exemple, le volume filtré, la présence et l'élimination des inhibiteurs de la PCR) et des processus biologiques (par exemple le taux d'excrétion, les variations temporelles) et de facteurs abiotiques (la dégradation des substances à analyser). Il est important d'évaluer ces facteurs de manière empirique, afin de pouvoir interpréter correctement les résultats. Ce n'est qu'en ayant une compréhension claire de la manière dont ces facteurs influent sur la probabilité de détection de l'agent pathogène, que la détection basée sur l'ADN environnemental peut être utilisée de manière fiable dans divers contextes (Brunner, 2020).

3. Objectifs

Ce document examine i) les avantages et ii) les limites afférentes aux méthodes de détection des agents pathogènes basées sur l'ADN environnemental, iii) la validation des méthodes de l'ADN environnemental, iv) les conditions d'inclusion d'une méthode de l'ADN environnemental dans un chapitre spécifique à une maladie du *Manuel aquatique* et v) l'utilisation des éléments de preuve produits par des méthodes de l'ADN environnemental en tant que critères de diagnostic.

4. Revue des méthodes de l'ADN environnemental pour la détection des agents pathogènes des animaux aquatiques ayant fait l'objet d'une publication

Une revue de la littérature a été entreprise pour évaluer les applications des méthodes de l'ADN environnemental pour la détection et l'étude des agents pathogènes et des parasites des animaux aquatiques. Trente-trois publications traitant de l'utilisation de l'ADN environnemental pour la détection de treize agents pathogènes listés par l'OMSA ont été identifiées (voir l'annexe 1, Tableau 1 pour plus de détails). Des méthodes ont été développées pour la détection des agents responsables de maladies listées par l'OMSA affectant des amphibiens, des crustacés, des poissons et des mollusques. La majorité des publications portent sur la détection dans des populations d'animaux aquatiques sauvages d'agents pathogènes listés, notamment l'infection à *Aphanomyces astaci*, l'infection à *Batrachochytrium dendrobatidis*, l'infection à *B. salamandrivorans*, l'infection par les espèces du genre *Ranavirus*, l'infection par *G. salaris*.

Treize publications supplémentaires traitant d'autres agents pathogènes spécifiques (par exemple, *Microcytos mackini*), de groupes d'agents pathogènes (par exemple, ceux de poissons d'ornement) ou appliquant des méthodes de l'ADN environnemental à des domaines d'étude plus larges (par exemple, la transmission de virus aquatiques) ont été identifiées (voir annexe 1, Tableau 2 pour plus de détails).

5. Avantages afférents aux méthodes de l'ADN environnemental pour la détection des agents pathogènes des animaux aquatiques

La détection de l'ADN environnemental est un outil prometteur qui peut être utilisé à des fins de surveillance en complément de l'échantillonnage direct des animaux aquatiques. Les méthodes de l'ADN environnemental offrent certains avantages par rapport à l'échantillonnage et au dépistage directs chez les animaux aquatiques, qui comprennent, mais sans s'y limiter, les éléments suivants.

1. Les méthodes de l'ADN environnemental ne nécessitent pas la mise en œuvre de techniques d'échantillonnage des animaux aquatiques hôtes qui soient intrusives ou létales. Elles peuvent être particulièrement utiles pour les animaux aquatiques rares ou de haute valeur, ou pour les animaux sauvages chez lesquels la collecte d'échantillon est difficile (par exemple, Rusch *et al.*, 2018).
2. Les méthodes de l'ADN environnemental ne nécessitent pas de manipulation des animaux, ce qui évite le stress associé à l'obtention sans destruction d'échantillons de tissus (Brunner, 2020).
3. Le temps consacré à la collecte et au traitement des échantillons, ainsi que les coûts afférents peuvent être significativement réduits par rapport à la collecte et au traitement à l'échelle individuelle d'échantillons chez des animaux (Rusch *et al.*, 2018).
4. Étant donné que les échantillons environnementaux peuvent contenir des analytes issus de la totalité ou d'un pourcentage élevé d'une population captive cible, le nombre d'échantillons nécessaire pour détecter un agent pathogène peut être beaucoup plus faible (par rapport aux échantillons prélevés individuellement chez les animaux), même lorsque la sensibilité en matière de diagnostic de la méthode de l'ADN environnemental est faible (Brunner, 2020).
5. Un même échantillon environnemental peut faire l'objet d'analyses visant à détecter la présence d'espèces_hôtes (voir par exemple Rusch *et al.*, 2018) et d'agents pathogènes multiples.
6. Les méthodes de l'ADN environnemental peuvent être utilisées pour évaluer les voies d'introduction potentielles dans les cas où l'échantillonnage des hôtes ne peut pas être réalisé (par exemple, pour les eaux de ballast).

6. Limites afférentes aux méthodes de l'ADN environnemental

Les limites relatives aux applications de la détection des agents pathogènes basée sur l'ADN environnemental comprennent, mais sans s'y limiter, les éléments suivants :

1. La quantité d'ADN d'un agent pathogène cible présent dans l'échantillon environnemental peut être très faible, en raison de la dilution dans l'environnement et de la dégradation des acides nucléiques. Cette situation peut avoir une incidence négative sur la sensibilité de l'épreuve (Brunner, 2020).
2. La concentration de l'ADN cible dans un échantillon environnemental varie en fonction de divers facteurs tels que la densité des hôtes, la prévalence et l'intensité de l'infection, la méthode d'échantillonnage (par exemple, s'agissant d'eau, le volume prélevé, la taille des pores du filtre, les conditions de stockage) et les conditions environnementales (par exemple, la quantité de matière organique). La sensibilité des méthodes de l'ADN environnemental peut par conséquent présenter des variations plus marquées, en fonction des localités, des études menées à des moments différents et des taxons cibles, que celle de l'échantillonnage et de l'analyse directs de tissus animaux (Brunner, 2020).
3. Des cadres formels sont proposés pour l'évaluation des performances en matière de diagnostic des tests utilisant des échantillons issus des animaux, mais ils n'ont pas été élaborés pour les méthodes de l'ADN environnemental. De ce fait, la conception des études visant à démontrer l'absence d'infection en ayant recours à des méthodes de l'ADN environnemental est problématique.
4. Un résultat positif pour la détection de l'ADN d'un agent pathogène cible dans un échantillon environnemental est plus susceptible de provenir d'une source de contamination non représentative de l'agent pathogène viable (par exemple, un agent pathogène inactivé présent dans produit ayant été soumis à un traitement par la chaleur) que dans les échantillons issus des animaux. Il n'indique pas non plus nécessairement qu'un animal hôte est infecté par l'agent pathogène cible.

7. Validation des méthodes de l'ADN environnemental

Il est de plus en plus probable que des décisions en matière de gestion des maladies seront prises sur la base des résultats d'études utilisant des méthodes de l'ADN environnemental. Il est donc impératif que les données générées par ces études soient fiables, défendables et respectent des normes d'assurance qualité élevées (Klymus *et al.*, 2019). La validation empirique de la détection d'agents pathogènes basée sur l'ADN environnemental doit être focalisée sur la compréhension des causes et des conséquences des variations des caractéristiques des tests en fonction des conditions d'échantillonnage ; elle nécessite une bonne compréhension de ce qui fait l'objet de l'échantillonnage/l'épreuve pour chaque agent pathogène d'intérêt.

Le chapitre 1.1.2. du *Manuel aquatique* décrit les principes et les méthodes de validation des épreuves de diagnostic utilisées pour les maladies infectieuses. Les recommandations de ce chapitre concernent les analyses de diagnostic des échantillons issus des animaux ; toutefois, les principes et nombre des méthodes qui y figurent sont applicables aux méthodes de l'ADN environnemental. Il est recommandé que les principes généraux et les méthodes exposés dans le chapitre 1.1.2. soient appliqués à la validation des méthodes de l'ADN environnemental de détection des maladies listées par l'OMSA, dans certains cas. Il convient de noter que le processus de collecte des échantillons, la concentration en ADN cible, l'extraction de l'ADN, la sensibilité et les indicateurs de performance doivent être définis et validés.

Des normes en matière de conception et de communication de l'information sont proposées pour les études visant à évaluer la précision du diagnostic de méthodes utilisant des échantillons issus des animaux aquatiques (par exemple, Laurin *et al.*, 2018). Nombre des considérations relatives à la conception et à la communication de l'information sont également applicables aux méthodes de l'ADN environnemental et il est recommandé que ces normes soient appliquées pour les études visant à évaluer la précision du diagnostic basé sur l'ADN environnemental.

En plus des orientations décrites ci-dessus, des considérations relatives à la conception et à la communication de l'information, spécifiques aux méthodes de l'ADN environnemental, ont été publiées (par exemple, Doyle et Uthicke, 2020 ; Goldberg *et al.*, 2016 ; Klymus *et al.*, 2019). Nombre de ces études portent sur la détection de macro-organismes et non d'agents pathogènes ; en général, les considérations sont toutefois pertinentes pour les méthodes de détection de l'ADN environnemental concernant des agents pathogènes. Ces orientations seront particulièrement utiles pour la collecte sur le terrain, le traitement et la conservation des échantillons d'ADN environnemental.

8. Exigences minimales pour l'inclusion d'une méthode de l'ADN environnemental dans le *Manuel aquatique*

Il est reconnu que la procédure de validation décrite au chapitre 1.1.2. du *Manuel aquatique* et les normes en matière de conception et de communication de l'information décrites par Laurin *et al.*, 2018 (voir ci-dessus) ne sont pas respectées par nombre de méthodes de diagnostic figurant actuellement dans le *Manuel aquatique*. En effet, beaucoup d'épreuves figurant dans le *Manuel aquatique* peuvent être validées en se limitant au niveau 1 ou 2 de la procédure de validation décrite au chapitre 1.1.2. du *Manuel aquatique*.

De ce fait, la Commission des animaux aquatiques propose que les exigences minimales de communication de l'information suivantes soient respectées pour qu'une méthode de l'ADN environnemental soit prise en considération pour une inclusion dans le *Manuel aquatique* [Adapté de Goldberg *et al.* (2016)] :

1. L'objectif ou l'application prévu de l'épreuve ou du protocole doit être clairement défini (noter que les objectifs appropriés d'utilisation des méthodes de l'ADN environnemental dans le contexte des normes de l'OMSA sont examinés plus en détail dans la partie 9).
2. La description des méthodes de collecte des échantillons et des précautions mises en œuvre pour prévenir la contamination, notamment le volume collecté, le matériau du conteneur, les contrôles négatifs, le nombre de répétitions et les lieux / la profondeur de l'échantillonnage.
3. La description des méthodes utilisées pour la concentration de l'ADN/l'ARN cible (précipitation / filtration), du type de filtre (s'il y a lieu) et du lieu où est effectuée la filtration (par exemple, sur le terrain).
4. La description des conditions de conservation et de stockage des échantillons (méthode, température, durée).
5. La description du processus d'extraction de l'ADN/l'ARN, notamment les ajustements du protocole, les précautions relatives aux contaminations, les contrôles négatifs et les contrôles positifs internes.
6. La description de la méthode de détection moléculaire et de son optimisation conformément à Bustin *et al.* (2009). En outre, les épreuves doivent en outre être validées (niveau 1) dans une matrice environnementale en fonction de son objectif d'utilisation.

9. Applications potentielles des méthodes de détection de l'ADN environnemental dans les chapitres spécifiques à des maladies du *Manuel aquatique*

Les chapitres spécifiques à des maladies du *Manuel aquatique* contiennent des recommandations ayant trait aux tests destinés à identifier les suspicions de cas et à confirmer la suspicion chez les animaux paraissant en bonne santé (ou dont le statut sanitaire est inconnu) et les animaux cliniquement affectés. Les populations d'animaux paraissant en bonne santé peuvent faire l'objet de suspicions, et donc être soumises à des prélèvements d'échantillons, si elles présentent un ou des liens épidémiologiques avec une population infectée. La proximité géographique avec une population réputée infectée, ou le mouvement d'animaux aquatiques, de produits issus d'animaux aquatiques ou de matériels, etc., depuis une telle population sont considérés comme des liens épidémiologiques. Par ailleurs, des populations paraissant en bonne santé sont soumises à un échantillonnage dans le cadre d'études visant à démontrer l'absence de maladie.

Les points suivants décrivent la pertinence des éléments de preuve obtenus par les méthodes de détection de l'ADN environnemental, en vue de leur inclusion en tant que critères de définition des cas dans la partie 6 des chapitres spécifiques à des maladies du *Manuel aquatique*.

a) Animaux paraissant en bonne santé

i) Définition d'une suspicion de cas dans une population d'animaux paraissant en bonne santé

Utilisation pertinente en tant que critère. Un résultat positif obtenu par une méthode de l'ADN environnemental recommandée dans le *Manuel aquatique* est considéré comme étant un élément de preuve suffisant pour être inclus en tant que critère pour une suspicion de cas sous réserve de la présence d'une espèce reconnue comme étant sensible dans l'environnement où l'échantillon a été prélevé.

ii) Définition d'une confirmation de cas chez les animaux paraissant en bonne santé

Utilisation non pertinente en tant que critère. Un résultat positif obtenu par une méthode de l'ADN environnemental recommandée dans le *Manuel aquatique* n'est pas considéré comme étant un élément de preuve approprié pour confirmer un cas chez des animaux paraissant en bonne santé. Des méthodes utilisant des échantillons issus des animaux sont considérées comme plus pertinentes en tant que critère pour confirmer un cas. Les éléments de preuve permettant la confirmation d'un cas chez des animaux paraissant en bonne santé doivent impérativement satisfaire aux exigences de la partie 6.1.2 du chapitre spécifique à une maladie pertinent du *Manuel aquatique*. Un élément de preuve basé sur l'ADN environnemental ne sera pas inclus en tant que critère dans ladite section.

b) Animaux cliniquement affectés

i) Définition d'une suspicion de cas chez les animaux cliniquement affectés

Utilisation pertinente en tant que critère. Le prélèvement d'un échantillon environnemental pour rechercher la cause d'une maladie dans une population d'animaux cliniquement affectés n'est généralement pas recommandé, car les échantillons issus d'animaux cliniquement affectés sont plus susceptibles de permettre la détection d'un agent pathogène et sont plus appropriés pour la recherche de la maladie. Toutefois, dans certaines circonstances, une méthode de l'ADN environnemental peut permettre de détecter un agent pathogène et conduire à la reconnaissance de signes cliniques de la maladie qui n'avaient été ni observés ni associés auparavant. Dans ces circonstances, un résultat positif obtenu par une méthode de l'ADN environnemental recommandée dans le *Manuel aquatique* est considéré comme étant un élément de preuve suffisant pour être inclus en tant que critère d'une suspicion de cas.

ii) Définition d'une confirmation de cas

Utilisation non pertinente en tant que critère. Un résultat positif obtenu par une méthode de l'ADN environnemental recommandée dans le *Manuel aquatique* ne sera pas inclus en tant que critère pour la confirmation d'un agent pathogène chez des animaux cliniquement affectés (ou des animaux paraissant en bonne santé, voir point 9.a ii ci-dessus). Tout test de l'ADN environnemental dont le résultat est positif nécessite des investigations complémentaires impliquant la collecte et l'analyse de tissus animaux, comme stipulé dans le chapitre spécifique à une maladie pertinent du *Manuel aquatique*. Les éléments de preuve permettant de confirmer un cas chez des animaux cliniquement affectés doivent satisfaire aux exigences de la partie 6.2.2. du chapitre spécifique à une maladie pertinent du *Manuel aquatique*. Un élément de preuve basé sur l'ADN environnemental ne sera pas inclus en tant que critère dans ladite partie.

10. Discussion

Les principales limites en matière d'ADN environnemental sont le manque de données de validation et de performance en matière de diagnostic, ce qui signifie que les résultats négatifs ne peuvent pas être utilisés pour démontrer l'absence de maladie et les résultats positifs nécessitent une confirmation systématique en ayant recours à des échantillons issus d'animaux (Brunner, 2020). Les avantages afférents à l'échantillonnage environnemental par rapport à l'échantillonnage d'animaux, dans certaines circonstances, impliquent que les approches de l'ADN environnemental peuvent être intégrées de manière utile dans un programme de surveillance.

Un pays ou une zone pour lequel une déclaration d'absence d'un ou plusieurs agents pathogènes spécifiques est déposée, doit avoir un système de détection précoce des incursions de la maladie en vigueur. Le signalement de la morbidité et de la mortalité par les éleveurs est un élément essentiel de ce système de détection précoce. Les populations d'élevage ne peuvent servir de sentinelle pour les populations sauvages que si elles présentent un lien épidémiologique (par exemple, lorsqu'elles partagent les mêmes eaux). Dans le cas contraire, une surveillance active des populations sauvages est requise, car il est peu probable que la morbidité ou la mortalité soit signalée (en particulier parce que les animaux morts ou mourants sont susceptibles d'être rapidement consommés ou victimes de prédateurs). L'échantillonnage d'animaux de populations sauvages peut comporter des difficultés logistiques considérables, en particulier si les populations sont isolées, éparses ou si leur faible nombre rend l'échantillonnage occasionnant une destruction non souhaitable. Les méthodes de détection des agents pathogènes basée sur l'ADN environnemental permettent de surmonter bon nombre de ces défis liés à l'échantillonnage des animaux aquatiques sauvages (Kamoroff et Goldberg, 2017 ; Trebitz *et al.*, 2017).

L'infection par certains agents pathogènes listés, dans des conditions particulières ou chez des espèces hôtes données, ne provoquera pas systématiquement des signes cliniques détectables. Les systèmes de détection précoce qui reposent sur l'observation par les éleveurs (ou d'autres parties prenantes) de la mortalité ou de la morbidité s'avèrent inefficaces dans ces circonstances et une surveillance active est alors nécessaire. L'échantillonnage des animaux d'élevage à une fréquence élevée et à un niveau permettant de détecter une faible prévalence, comporte des difficultés logistiques considérables et leur coût peut être inacceptable. Les méthodes de l'ADN environnemental peuvent constituer une solution de substitution viable (Trujillo-González *et al.*, 2019a) pour la surveillance active des agents pathogènes qui sont susceptibles de ne pas causer de manière fiable l'expression de signes cliniques observables. Elles présentent l'avantage supplémentaire de disposer d'échantillons qui contiennent des analytes provenant d'un grand pourcentage, si ce n'est de la totalité, de la population captive. Ainsi, le nombre d'échantillons environnementaux nécessaire est relativement faible par rapport au nombre d'échantillons issus d'animaux (à condition qu'une quantité suffisante d'ADN/d'ARN puisse être extraite).

11. Conclusions

1. Les méthodes de l'ADN environnemental présentent un intérêt pour améliorer les systèmes de surveillance passive aux fins de la détection précoce, en particulier dans les cas où les conditions ne sont pas propices à l'expression clinique d'une maladie ou lorsque les populations ne sont pas soumises à une observation suffisante pour détecter la maladie clinique, si elle devait survenir.
2. Les méthodes de l'ADN environnemental peuvent être utiles pour les animaux aquatiques sauvages rares, de haute valeur ou chez lesquels la collecte d'échantillons est difficile, lorsque l'échantillonnage direct des animaux n'est pas souhaitable ou que son coût est prohibitif. Elles peuvent également présenter des avantages en termes de coûts pour les programmes de suivi des maladies dans les environnements de production.
3. Contrairement à ce qui existe pour les échantillons issus d'animaux, il n'y a actuellement aucun cadre similaire permettant d'évaluer les performances en matière de diagnostic des méthodes de l'ADN environnemental. De ce fait, un élément de preuve obtenu par des méthodes de l'ADN environnemental ne peut être utilisé pour étayer une auto-déclaration d'absence de maladie.
4. Les méthodes de l'ADN environnemental seront prises en considération en vue d'être intégrées dans les chapitres spécifiques à des maladies du *Manuel aquatique*, si des normes minimales relatives aux maladies et à la communication des informations, comme décrit dans le présent document, sont respectées.
5. Les résultats positifs obtenus avec des méthodes de l'ADN environnemental qui ont été intégrées dans le Manuel aquatique seront considérés comme un critère suffisant pour une suspicion de cas de maladie.
6. L'application de méthodes de l'ADN environnemental pour la réalisation d'un objectif précis doit être examinée avec précaution, en tenant compte de l'agent pathogène à détecter, de l'environnement dans lequel les échantillons sont prélevés, de la fiabilité de la méthode ainsi que des conséquences de l'obtention de résultats positifs, qui peuvent nécessiter la réalisation d'enquêtes au sein des populations d'animaux sensibles afin de confirmer ou d'exclure un cas suspect.

7. Les résultats positifs obtenus avec des méthodes de l'ADN environnemental qui ont été intégrées dans le *Manuel aquatique* ne seront pas considérés comme un critère suffisant pour une confirmation de cas de maladie, que ce soit chez des animaux paraissant en bonne santé ou des animaux cliniquement affectés.

Références bibliographiques

- 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. & WITTEWIT 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., PETTERSEN 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., FREMIER 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., MOJIŠOVÁ 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., EDVARSEN 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., VILJAMAA-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.
- WITTWER 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.
- WITTWER 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.
-

Annexe 1. Publications décrivant les méthodes de l'ADN environnemental pour les agents pathogènes des animaux aquatiques

Tableau 1. Applications des méthodes de l'ADN environnemental pour la détection des agents pathogènes des animaux aquatiques listés par l'OMSA ayant fait l'objet d'une publication

Maladie listée par l'OMSA	Publication
Maladies des amphibiens	
Infection à <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
Infection à <i>Batrachochytrium salamandrivorans</i>	Brunner, 2020; Spitzen-van der Sluijs <i>et al.</i> , 2020
Infection par les espèces du genre <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
Maladies des poissons	
Infection à <i>Gyrodactylus salaris</i>	Fossoy <i>et al.</i> , 2020; Rusch <i>et al.</i> , 2018;
Infection par le virus de l'anémie infectieuse du saumon (virus présentant des délétions dans la région hautement polymorphe)	Gregory <i>et al.</i> , 2009
infection par l'herpèsvirus de la carpe koï	Haramoto <i>et al.</i> , 2007; Honjo <i>et al.</i> , 2010; 2012
l'infection par l'alphavirus des salmonidés (maladie du pancréas du saumon)	Bernhardt <i>et al.</i> , 2020; Weli <i>et al.</i> , 2021
Maladies des crustacés	
Maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë	Kongrueng <i>et al.</i> , 2015
Infection à <i>Aphanomyces astaci</i> (peste de l'écrevisse)	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
Infection par le virus du syndrome des points blancs	Natividad <i>et al.</i> , 2008; Quang <i>et al.</i> , 2009
Maladies des mollusques	
Infection à <i>Bonamia ostreae</i>	Jorgensen <i>et al.</i> , 2020
Infection à <i>Perkinsus marinus</i>	Audemard <i>et al.</i> , 2004
Infection à <i>Xenohaliotis californiensis</i>	Lafferty & Ben-Horin, 2013

Tableau 2. Études portant sur l'ADN environnemental des agents pathogènes des animaux aquatiques non listés par l'OMSA, ayant fait l'objet d'une publication

Sujet	Publication
Détection des parasites de poissons d'ornement	Trujillo-Gonzalez <i>et al.</i> , 2019b; 2019a
Parasitologie	Bass <i>et al.</i> , 2015
Foyers de protozoaires parasites en exploitations piscicoles	Bastos Gomes <i>et al.</i> 2017; 2019
Transmission des maladies dans les cages à saumon en eau libre	Salama & Rabe, 2013
Parasites aquatiques émergents	Sana <i>et al.</i> , 2018
Micro-organismes pathogènes dans les appâts	Mahon <i>et al.</i> , 2018
Virus d'origine aquatique	Oidtman <i>et al.</i> , 2018
<i>Halioticida noduliformans</i> chez les homards	Holt <i>et al.</i> , 2018
<i>Microcytos mackini</i>	Polinski <i>et al.</i> , 2017
Trématode parasite <i>Ribierioia ondatrae</i>	Huver <i>et al.</i> , 2015
<i>Schistosoma</i> sp.	Alzaylaee <i>et al.</i> , 2020

© Organisation mondiale de la santé animal (OMSA), 2022



Certains droits sont réservés. Ce travail est mis à la disposition du public selon les termes de la licence 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>).

Selon les termes de cette licence, ce travail peut être copié, diffusé et adapté à des fins non commerciales, sous réserve que le travail soit cité de manière appropriée. Pour toute utilisation de ce travail, il ne doit en aucun cas être suggéré que l'Organisation mondiale de la santé animale avalise une organisation, des produits ou des services spécifiques. L'utilisation du logo de l'Organisation mondiale de la santé animale n'est pas autorisée. Si ce travail est adapté, il doit impérativement faire l'objet d'une licence Creative Commons identique ou d'une licence équivalente. Si ce document fait l'objet d'une traduction, elle doit impérativement inclure la clause de non-responsabilité suivante, accompagnée de la citation requise ci-après :

« Cette traduction n'a pas été réalisée par l'Organisation mondiale de la santé animale. L'Organisation mondiale de la santé animale n'est pas responsable du contenu ou de l'exactitude de cette traduction. L'édition originale en anglais doit être l'édition faisant foi. »

Tout litige ayant trait à la licence qui ne peut être réglé à l'amiable sera soumis à une procédure de médiation et d'arbitrage telle que décrite à l'article 8 de la licence, sauf dispositions contraires (au pluriel) indiquées dans les présentes. Les règles de médiation applicables seront celles de l'Organisation mondiale de la propriété intellectuelle (www.wipo.int/amc/en/mediation/rules), et tout arbitrage sera mené conformément au Règlement d'arbitrage de la Commission des Nations Unies pour le droit commercial international (CNUDCI).

Documents de tierce partie. Les utilisateurs qui souhaitent réutiliser des contenus de ce travail qui sont attribués à un tiers, tels que des tableaux, des figures ou des images, ont la responsabilité de déterminer si une autorisation est requise pour cette réutilisation et d'obtenir l'autorisation du détenteur des droits d'auteur. Le risque de réclamations résultant de la violation de tout élément du travail détenu par une tierce partie incombe exclusivement à l'utilisateur.

Ventes, droits et licences. Les publications de l'Organisation mondiale de la santé animale sont disponibles sur le site web de l'Organisation mondiale de la santé animale (www.woah.org) ou peuvent être acquises via la boutique en ligne de l'Organisation mondiale de la santé animale (www.woah.org/fr/ebookshop).