

Lo que el medio ambiente esconde: uso emergente de los muestreos no invasivos en sanidad animal

CARMEN HERRANZ¹, TERESA GARCÍA-SECO¹, ALBERTO PERELLÓ², ALBERTO DIEZ-GUERRIER^{1,3,4}, ANTONIO MARTÍNEZ-MURCIA⁵, CHRISTIAN GORTÁZAR², LUCAS DOMÍNGUEZ^{1,4}, MARTA PÉREZ-SANCHO^{1,4}

¹ Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria VISAVET, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.

² SaBio Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos, Ciudad Real, España.

³ MAEVA SERVET, SL, Alameda del Valle, Madrid, España

⁴ Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.

⁵ Departamento de Microbiología, Universidad Miguel Hernández; y Genetic PCR Solutions™, Orihuela, Alicante, España.

Introducción

La vigilancia basada en la detección y monitorización de patógenos de relevancia veterinaria constituye un pilar fundamental en la prevención sanitaria, particularmente significativo en el caso de agentes emergentes. Esto ha cobrado un especial interés en las últimas décadas impulsado por el enfoque “*One Health*” que propone vigilar la sanidad animal, proteger la salud pública y velar por la salud de los ecosistemas de una manera holística. Además, la aparición de nuevas enfermedades, muchas de ellas zoonóticas, plantea la necesidad de desarrollar estrategias alternativas que complementen y mejoren los sistemas tradicionales de detección, permitiendo superar los desafíos logísticos asociados a ellos. En este contexto, las aproximaciones metodológicas basadas en

muestreos ambientales están ganando interés para la detección, cuantificación y caracterización de patógenos (y factores asociados) que permiten, a su vez, minimizar el estrés en los animales relacionado con su manejo. Para ello, es fundamental utilizar métodos para la recolección de muestras que conlleven el menor nivel de perturbación posible, lo que se denomina muestreo no invasivo (Schilling et al., 2022).

El muestreo no invasivo en animales puede clasificarse según el nivel de consciencia del individuo con respecto al mismo. Así, se encuentran por un lado los muestreos no invasivos no percibidos, donde los animales no son conscientes del muestreo, p.ej. recolectar heces del suelo. Por otro lado, los muestreos no invasivos percibidos son aquellos donde los animales son conscientes, pero permanecen sin restricciones, sin

exhibir una respuesta de estrés ni experimentar una reducción en su supervivencia o reproducción, p.ej. recolección de garrapatas (Pauli et al., 2010).

Las muestras recolectadas de manera no invasiva asociadas al animal incluyen muestras biológicas, como heces, saliva u orina, así como las tomadas sobre la superficie del animal, como piel o pelo de diferentes áreas como el corvejón (Barroso-Arévalo et al., 2022; Herrero-García et al., 2024b; Martínez-Guijosa et al., 2020). El muestreo no invasivo también puede incluir las muestras tomadas del ambiente del animal como superficies inanimadas (comederos, bebederos, teleras, etc.), agua, suelo o aire (ENETWILD-consortium et al., 2022; Schilling et al., 2022; Veilleux et al., 2021). Precisamente, esta última aproximación metodológica sobre superficies es la que más ha ex-

plorado nuestro grupo de investigación en los últimos años: el uso de esponjas embebidas en un líquido surfactante que preserva el ADN/ARN ambiental (*environmental nucleic acid*, eNA, eDNA, eRNA) para la toma de muestras en superficies de objetos inanimados o de animales para la detección de patógenos de gran relevancia como micobacterias del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*, el virus de la peste porcina africana, SARS-CoV-2 y *Coxiella burnetii*, (Barroso-Arévalo et al., 2023; Herrero-García et al., 2024b). De hecho, para estos dos últimos patógenos, dicha estrategia de monitorización ambiental ya se ha aplicado con éxito en programas de vigilancia y control en la Comunidad de Madrid.

Las técnicas de detección de ácidos nucleicos ambientales (*environmental nucleic acid detection*, ENAD) han sido ampliamente aplicadas en muestras de agua para detectar múltiples patógenos y hospedadores, pudiendo proporcionar información relevante sobre la circulación de microorganismos o la biodiversidad (Bass et al., 2023). Sin embargo, esta aproximación metodológica está frecuentemente asociada a la toma de una cantidad considerable de muestra (que podría asociarse a una perturbación del ambiente) como ocurre en los muestreos de tierra y aire, además de implicar complicaciones en su transporte y gestión. Por ello, la utilización de hisopos y esponjas para el análisis de superficies (Spanu and Jordan, 2020) está ganando popularidad ya que requiere menor cantidad de muestra, supone unas condiciones de conservación menos exigentes y puede incorporar sustancias para la conservación de la muestra (ENETWILD-consortium et al., 2022). En este sentido, nuestro grupo de investigación ha participado en el desarrollo de

una patente que permite abordar esta problemática.

Los enfoques que implican ENAD podrían ser de utilidad, tras una validación adecuada, para evaluar la circulación de patógenos, vigilancia sanitaria, evaluación del riesgo de enfermedades y sistemas de alerta temprana (Bass et al., 2023). Los métodos moleculares como la PCR en tiempo real o PCR cuantitativa son los más comúnmente utilizados para la

detección de patógenos en muestras ambientales, identificando secuencias específicas de ADN/ARN de uno o varios patógenos simultáneamente. En los últimos años, se han logrado también importantes avances en los métodos basados en biosensores, que permiten la detección precisa de patógenos sin necesidad de extracción o amplificación de ADN/ARN (p.ej. para el análisis de *Salmonella* spp., *E. coli* y *L. monocytogenes* en muestras de comi-



Toma de muestra de esponja ambiental sobre diferentes superficies inanimadas. IREC

da) (ENETWILD-consortium et al., 2022).

Otra área emergente es la aplicación de muestreos ambientales en el monitoreo de resistencias antimicrobianas (RAM) (Guizado-Batista et al., 2024; Zainab et al., 2020) que permitan identificar cepas resistentes y adoptar medidas para reducir su diseminación. Sin embargo, sigue siendo necesario recabar más datos de vigilancia de RAM en el medio ambiente que justifiquen su aplicación en programas de vigilancia sistemática y permitan elaborar protocolos estandarizados (Bengtsson-Palme et al., 2023).

¿Qué aportan los muestreos ambientales frente a los métodos tradicionales para la detección de patógenos mediante herramientas moleculares?

En este sentido, el muestreo no invasivo ofrece ventajas que pueden complementar la información aportada por los métodos tradicionales ya que permiten mejorar la capacidad de detección al facilitar una cobertura espacio-temporal más amplia, mejorando los recursos empleados en la vigilancia sanitaria (optimizar las demandas económicas, temporales y de infraestructuras para una respuesta mejorada). Las aproximaciones no invasivas pueden suponer una alternativa adecuada frente a las invasivas en algunos escenarios epidemiológicos ya que permiten minimizar el estrés y la perturbación tanto en los animales como en el ecosistema. Además, la toma de muestras re-

quiere menos tiempo, dado que no es necesario capturar y manipular a cada individuo de manera directa. De manera adicional, los muestreos pueden repetirse con mayor frecuencia sin afectar la dinámica de las poblaciones animales y la salud del ecosistema (Bass et al., 2023; Veilleux et al., 2021) y permiten el estudio de especies silvestres y especies en peligro de extinción que, de otro modo, sería difícil de abordar (Ripa et al., 2023; Schilling et al., 2022; Veilleux et al., 2021). Un ejemplo de esta situación es la monitorización sanitaria del oso pardo (*Ursus arctos*) en regiones montañosas de Cantabria (Herro-García et al., 2024a).

Otro punto fuerte de estos métodos es que podrían permitir monitorizar el impacto de medidas de control aplicadas en un escenario epidemiológico como, por ejemplo, la efectividad de programas de limpieza y desinfección, evaluando la persistencia de agentes en el ambiente tras su aplicación (p.ej. *Listeria monocytogenes* en plantas de procesamiento de alimentos) (Martínez-Murcia et al., 2024; Spanu and Jordan, 2020). También resultan útiles para la vigilancia de patógenos cuya detección en animales está condicionada por factores estacionales o resultan difíciles de identificar en hospedadores individuales como puede ser *Coxiella burnetii*, que se excreta principalmente en épocas de parideras y lactancia y comúnmente con un patrón de excreción intermitente, pero puede persistir en el ambiente durante mucho más tiempo (Bauer et al., 2020; Byeon et al., 2022) o *Salmonella*, que presenta patrones de excreción intermitentes con picos asociados a momentos de estrés (p.ej. transporte o periodo de cría) (Jensen et al., 2006; Pires et al., 2013).

Como vemos, los muestreos no invasivos son relativamente

simples, económicamente abordables y no requieren de gran infraestructura, siendo frecuentemente una alternativa más viable en entornos con recursos limitados donde el acceso a métodos invasivos es poco práctico (Vijayakumar et al., 2024). Además, su aplicación más allá del ámbito ganadero puede extenderse a otros entornos como la industria alimentaria, el transporte (Giacomini et al., 2018) o los ecosistemas silvestres, facilitando una vigilancia integral y efectiva.

A pesar de sus ventajas, el muestreo no invasivo también presenta ciertas limitaciones. Se ha de considerar que no permite el diagnóstico a nivel de individuo. Además, uno de los principales desafíos es el mayor riesgo de contaminación cruzada, ya que las muestras tomadas del ambiente pueden contener material de múltiples individuos o especies, lo que dificulta la identificación precisa del origen del patógeno y puede afectar la fiabilidad de los resultados (Hood et al., 2021). Además, la falta de precisión en la detección puede verse afectada por las cargas microbianas en muestras ambientales, que suelen ser más bajas en comparación con muestras obtenidas directamente del hospedador, lo que puede reducir la sensibilidad de las pruebas diagnósticas (Smith et al., 2011). Otra limitación importante está en la dependencia de factores ambientales/climáticos, dado que la temperatura, humedad, viento y exposición a la luz UV pueden degradar el material genético a detectar (Sirois and Buckley, 2019; Żarczyńska et al., 2023) y junto con la presencia de sustancias inhibitorias, alterar su capacidad de detección mediante técnicas moleculares ("INSST, 2018.; Sales et al., 2019). Por lo tanto, aunque el muestreo no invasivo es una herramienta valiosa para la vigilancia sanitaria, es necesario complementarlo con nue-

vas técnicas moleculares, como la secuenciación de última generación o métodos de restauración de ADN degradado que reduzcan estas limitaciones y aumenten la robustez de los resultados obtenidos en escenarios donde sea necesario.

La detección molecular de patógenos en muestras no invasivas: ventajas y desventajas

El biomonitoreo basado en ADN ambiental tiene la capacidad de monitorear simultáneamente una amplia gama de organismos presentes en un entorno determinado (Veilleux et al., 2021), ya que puede permitir tanto la detección de ADN/ARN de microorganismos (algunos de ellos no cultivables o exigentes) como de hospedadores potenciales. La detección de eDNA mediante PCR ofrece ventajas significativas sobre los métodos convencionales basados en el cultivo, las pruebas bioquímicas y/o inmunológicas. En comparación con los métodos de cultivo, que puede requerir largos tiempos de incubación y múltiples pruebas confirmatorias (a veces inconcluyentes), el análisis de eDNA puede ser más rápido, preciso y capaz de detectar organismos sin necesidad de cultivarlos (Méndez-Álvarez and Pérez-Rotha, 2004). Además, permite cuantificar la cantidad de ADN/ARN de un patógeno específico presente en una muestra (Bigault et al., 2020; Lorusso et al., 2007) y puede ser capaz de proporcionar una identificación taxonómica más detallada, permitiendo incluso la detección de variantes genéticas (Koets et al., 2023). Frente a ciertos métodos inmunológicos,

que pueden presentar problemas de reacción cruzada en el caso de algunos patógenos, como *Mycobacterium bovis* con micobacterias no tuberculosas (Jenkins et al., 2018), el análisis de ADN ofrece mayor especificidad y sensibilidad en la detección. La inactivación de patógenos es un factor deseable que facilitaría significativamente el manejo de las mues-

tras en términos de bioseguridad y el transporte seguro de las mismas, es por ello que actualmente nuestro grupo de investigación está llevando a cabo una línea de estudio en este sentido con objeto de obtener datos concluyentes sobre esta cuestión.

Por supuesto, esta metodología no está exenta de limitaciones que deben ser consideradas, funda-



Toma de muestra de esponja ambiental (GPSponge®) sobre diferentes superficies inanimadas. IREC



mentalmente relacionadas con la cantidad y calidad del ADN de los microorganismos, generalmente más bajas en muestras ambientales que en muestras tradicionales invasivas (ENETWILD-consortium et al., 2022; Sales et al., 2019; Zemanova, 2021), siendo más susceptibles a la presencia de numerosas moléculas inhibitoras de PCR. Aunque los inhibidores ambientales pueden afectar a estas pruebas, existen métodos para eliminarlos y controles internos de reacción de PCR que minimizan el riesgo de falsos negativos (Hedman and Rådström, 2013). El biomonitorio basado en ADN ambiental, por sí solo, no proporciona información sobre el estatus sanitario individual, de tal manera, que no se puede aplicar en el diagnóstico a nivel de animal. Sin embargo, puede usarse como una herramienta complementaria a la evaluación tradicional basada en individuos aportando información sobre la circulación de patógenos en un entorno determinado (Bass et al., 2023; Smith et al., 2011; Veilleux et al., 2021). Es decir, teniendo en cuenta los tres actores

“ Los muestreos ambientales no invasivos y, en particular, la detección de eDNA/eRNA representan una herramienta complementaria prometedora a los métodos tradicionales y poseen un gran potencial dentro del enfoque One Health para la vigilancia sanitaria ”

principales que juegan un papel en la dinámica epidemiológica de las enfermedades, esto es, el propio patógeno, la comunidad de hospedadores y el ambiente en el que se dan las interacciones epistémicas, estas aproximaciones metodológicas se centran en abordar el “diagnóstico” sobre el ambiente, a diferencia de las intervenciones diagnósticas tradicionales que se centran en el componente animal. Por otra parte, la metodología de muestreo ambiental basada en esponjas o hisopos no es aplicable a todos los patógenos, teniendo un valor más limitado, por ejemplo, en agentes infecciosos intracelu-

lares transmitidos por vectores, como los virus propagados por mosquitos.

Si bien el aislamiento del patógeno y su posterior caracterización son fundamentales para la monitorización de enfermedades, en los últimos años ha existido (y sigue existiendo) un auge en el desarrollo de técnicas moleculares de última generación para la detección y secuenciación de alto rendimiento que pueden permitir superar los problemas de cantidad y calidad de ADN/ARN en muestras ambientales (Taberlet et al., 2012; Zemanova, 2021).

Muestreos no invasivos en el ámbito de la sanidad animal

La bibliografía relacionada con muestreos no invasivos o ambientales en el ámbito veterinario es amplia y el interés por los estudios relacionados con este tipo de aproximaciones ha aumentado significativamente en los últimos años (por ej. la búsqueda “environmental sampling AND animal health” en Pubmed muestra un incremento notable en el número de publicaciones que hasta 2010 fueron 6691, mientras que de 2010 al 2024 fueron 28196; Figura 1).

Los muestreos no invasivos pueden jugar un papel clave en la



Toma de muestra de esponja sobre superficie animal. VISAVET-UCM

prevención sanitaria pudiendo ser empleados para estudiar la circulación de patógenos en diferentes poblaciones y el riesgo de posibles enfermedades así como para establecer sistemas de alerta temprana (Bass et al., 2023). Por ejemplo, permiten identificar la presencia de bacterias como *Salmonella* spp. o *Escherichia coli* en superficies de contacto, bebederos o comederos, facilitando la implementación de medidas de bioseguridad (Herrero-García et al., 2024b) o en muestras de polvo, hisopos y heces, en granjas de gallinas ponedoras (Pacholewicz et al., 2023). Así mismo se ha demostrado su utilidad para contribuir a la detección temprana del virus de la hepatitis E (VHE) en corrales con cerdos portadores mediante el análisis de calzas y pool de heces (Meester et al., 2023) o del virus de la fiebre aftosa en áreas endémicas utilizando hisopos ambientales (Colenutt et al., 2018). Igualmente, se han empleado con éxito para monitorizar la excreción de ciertos patógenos en especies salvajes, como las cebras, donde la recolección directa de muestras puede ser difícil o incluso imposible (Seeber et al., 2017).

En este sentido, cabe destacar la utilidad de los métodos de muestreo basados en esponjas ambientales en el área de la sanidad animal. Se trata de una herramienta no invasiva basada en una esponja de celulosa previamente hidratada con un líquido surfactante y conservante de ácidos nucleicos (actualmente, se encuentra comercializada por Genetic PCR Solutions™ con el nombre de GPSponge®). Ha demostrado ser eficaz como indicador del riesgo de exposición al Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) a nivel de rebaño en granjas de ganado vacuno (Martínez-Guijosa et al., 2020) y para la detección y monitoreo de patógenos virales como SARS-CoV-2 (Barroso-Aré-

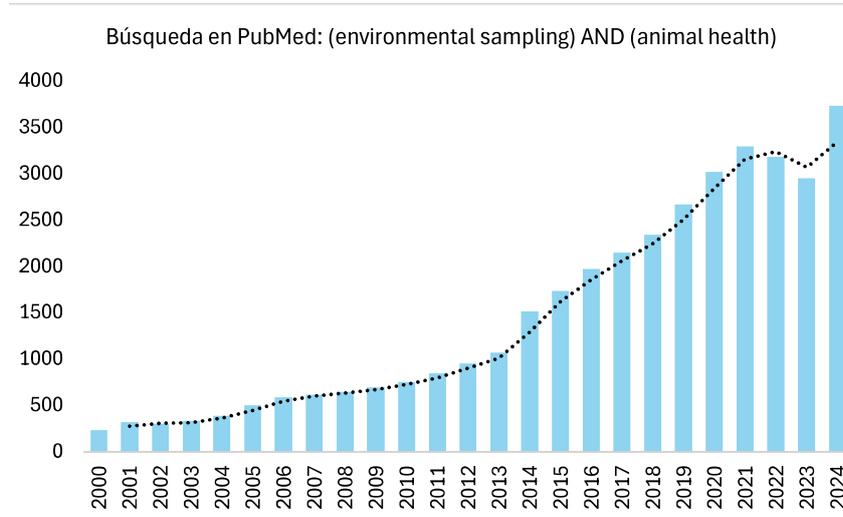


Figura 1.- Número de artículos publicados en PubMed asociados a la búsqueda "environmental sampling AND animal health" desde el año 2000 al 2024.

valo et al., 2022; Fernández-de-Mera et al., 2021) y el virus de la peste porcina africana (ASFV) (Barroso-Arévalo et al., 2023; Kosowska et al., 2021). El ENAD basado en esponjas también se ha implementado para la vigilancia y detección ambiental de *Brucella suis* (Rebollada-Merino et al., 2022) y para evaluar los vínculos entre la bioseguridad en granjas, la riqueza de vertebrados y la detección de patógenos ambientales en granjas al aire libre o explotaciones extensivas (Herrero-García et al., 2024b).

Como se resalta más adelante, cada aplicación basada en muestreos no invasivos debería validarse siempre utilizando un enfoque específico para cada caso, teniendo en cuenta diferentes escenarios epidemiológicos (Bass et al., 2023). Por ello, es importante evaluar el impacto de diferentes factores ambientales y de manejo de la muestra en el rendimiento de la detección molecular basado en eDNA, la capacidad de inactivación/conservación en diferentes matrices orgánicas, el impacto de las condiciones de conservación, etc. en esponjas.

¿Qué nos queda por saber sobre los muestreos no invasivos y su aplicación en sanidad animal?

A medida que los enfoques no invasivos se vuelven cada vez más comunes en la vigilancia veterinaria, es esencial evaluar los factores que pueden afectar el rendimiento de detección de patógenos en este tipo de métodos, ya que diferentes autores han destacado la falta de información al respecto (Bass et al., 2023; ENETWILD-consortium et al., 2022). Los trabajos futuros deberían centrarse en la estandarización y optimización de protocolos de toma de muestra, procesamiento y extracción de ADN/ARN a partir de este tipo de matrices, acompañado de la implementación de técnicas moleculares que permitan reducir al máximo los problemas asociados a la cantidad y calidad de ADN en estas muestras apostando por ir más allá de la mera detección y



explorando aspectos como la caracterización molecular (Bass et al., 2023; Zemanova, 2021).

Si bien ciertas muestras no invasivas están bien establecidas para aplicaciones específicas [por ejemplo, la detección por PCR de *Legionella* en muestras de agua (Yin et al., 2022) o de *Giardia duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. en muestras de heces (Barrera et al., 2024)], existen otras que necesitan ser exploradas en profundidad para poder ser implementadas [por ejemplo, el análisis de SARS-CoV-2 en aguas naturales (Salvador et al., 2022)]. Por ello, es muy importante que la metodología se ajuste a la finalidad del ensayo (Schilling et al., 2022; Zemanova, 2021). La optimización de la metodología basada en la detección de ADN/ARN, especialmente la eliminación de inhibidores presentes en la muestra es esencial para mejorar el éxito de la detección, por ello, se hace ne-

diante un sistema automatizado de extracción (resultados aún no publicados). Además, se observó que la fracción de muestra analizada (pellet, sobrenadante o interfase) puede influir en la capacidad de detección de algunos patógenos, lo que resalta la importancia de optimizar el protocolo según el tipo de muestra y el microorganismo a estudiar (resultados aún no publicados).

Es importante explorar el impacto de otros factores que pueden afectar a la preservación del material genético en muestras no invasivas. Variables como la temperatura y el tiempo de almacenamiento pueden afectar la integridad del ADN/ARN y, en consecuencia, al éxito en su detección (Karched et al., 2017). Establecer protocolos de conservación específicos, para cada tipo de muestra y ambiente, es fundamental para mejorar la calidad de los resultados obtenidos. En esta

ción están permitiendo evaluar muestras de ADN/ARN degradadas e incluso describir comunidades completas mediante la metabarcodificación de muestras de ADN ambiental procedentes de agua y suelo (Berry et al., 2019; Taberlet et al., 2012; Zemanova, 2021). La combinación de métodos emergentes de secuenciación de alto rendimiento (secuenciación metagenómica o de captura dirigida) y optimización de los métodos de procesamiento y extracción de ADN/ARN para muestras ambientales pueden suponer una revolución en la monitorización de patógenos de relevancia veterinaria y/o para la salud del ecosistema.

Conclusiones

Los muestreos ambientales no invasivos y, en particular, la detección de eDNA/eRNA representan una herramienta complementaria prometedora a los métodos tradicionales y poseen un gran potencial dentro del enfoque *One Health* para la vigilancia sanitaria. Su combinación con técnicas de secuenciación de alto rendimiento ofrece ventajas significativas en términos de rapidez, precisión y alcance espaciotemporal. Sin embargo, requiere la optimización de protocolos para superar las limitaciones intrínsecas a este tipo de muestras como son la calidad y cantidad de ADN o la presencia de inhibidores de PCR para maximizar la eficiencia en la detección para diferentes patógenos y entornos/muestras. La integración de estas estrategias con tecnologías emergentes de secuenciación y análisis molecular podría transformar la detección temprana de patógenos, fortaleciendo la prevención y el control de enfermedades en la interfaz animales, humanos y ambiente.

“ La integración de estas estrategias con tecnologías emergentes de secuenciación y análisis molecular podría transformar la detección temprana de patógenos, fortaleciendo la prevención y el control de enfermedades en la interfaz animales, humanos y ambiente ”

cesario utilizar protocolos específicos de extracción para muestras ambientales (Schilling et al., 2022) como muestras de heces o esponjas con restos de materia orgánica. En nuestra experiencia, la extracción manual de ADN mediante columnas de sílice permitió reducir significativamente las inhibiciones de PCR asociadas a la detección de algunos patógenos mejorando el rendimiento diagnóstico en comparación con la extracción automatizada con microesferas magnéticas me-

línea, se han realizado estudios con el líquido surfactante para hidratar esponjas mencionado previamente, con el fin de evaluar su capacidad para inactivar y preservar el material genético durante periodos largos, sin necesidad de congelación (Barroso-Arévalo et al., 2023).

A pesar de las limitaciones relacionadas con el material genético procedente de muestras ambientales, las técnicas de secuenciación de última genera-

Lecturas recomendadas

- Barrera, J.P., Miró, G., Carmena, D., Foncubierta, C., Sarquis, J., Marino, V., Estévez-Sánchez, E., Bailo, B., Checa, R., Montoya, A., 2024. Enhancing diagnostic accuracy: Direct immunofluorescence assay as the gold standard for detecting *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in canine and feline fecal samples. BMC Vet. Res. 20, 445. <https://doi.org/10.1186/s12917-024-04297-0>
- Barroso-Arévalo, S., Díaz-Frutos, M., Kosowska, A., Pérez-Sancho, M., Domínguez, L., Sánchez-Vizcaíno, J.M., 2023. A useful tool for the safe diagnosis and control of the two main pandemics of the XXI century: COVID-19 and African Swine Fever disease. PLOS ONE 18, e0282632. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282632>
- Barroso-Arévalo, S., Sánchez-Morales, L., Barasona, J.A., Rivera, B., Sánchez, R., Rivalde, M.A., Agulló-Ros, I., Sánchez-Vizcaíno, J.M., 2022. Evaluation of the clinical evolution and transmission of SARS-CoV-2 infection in cats by simulating natural routes of infection. Vet. Res. Commun. 46, 837–852. <https://doi.org/10.1007/s11259-022-09908-5>
- Bass, D., Christison, K.W., Stentiford, G.D., Cook, L.S.J., Hartikainen, H., 2023. Environmental DNA/RNA for pathogen and parasite detection, surveillance, and ecology. Trends Parasitol. 39, 285–304. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2022.12.010>
- Bauer, B., Prüfer, L., Walter, M., Ganter, I., Frangoulidis, D., Runge, M., Ganter, M., 2020. Comparison of *Coxiella burnetii* Excretion between Sheep and Goats Naturally Infected with One Cattle-Associated Genotype. Pathogens 9, 652. <https://doi.org/10.3390/pathogens9080652>
- Bengtsson-Palme, J., Abramova, A., Berendonk, T.U., Coelho, L.P., Forslund, S.K., Gschwind, R., Heikinheimo, A., Jarquín-Díaz, V.H., Khan, A.A., Klümper, U., Löber, U., Nekoro, M., Osińska, A.D., Ugarcina Perovic, S., Pitkänen, T., Rødland, E.K., Ruppé, E., Wasteson, Y., Wester, A.L., Zahra, R., 2023. Towards monitoring of antimicrobial resistance in the environment: For what reasons, how to implement it, and what are the data needs? Environ. Int. 178, 108089. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.108089>
- Berry, T.E., Saunders, B.J., Coghlan, M.L., Stat, M., Jarman, S., Richardson, A.J., Davies, C.H., Berry, O., Harvey, E.S., Bunce, M., 2019. Marine environmental DNA biomonitoring reveals seasonal patterns in biodiversity and identifies ecosystem responses to anomalous climatic events. PLOS Genet. 15, e1007943. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007943>
- Bigault, L., Brown, P., Bernard, C., Blanchard, Y., Grasland, B., 2020. Porcine epidemic diarrhea virus: Viral RNA detection and quantification using a validated one-step real time RT-PCR. J. Virol. Methods 283, 113906. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113906>
- Byeon, H.S., Nattan, S., Kim, J.H., Han, S.T., Chae, M.H., Han, M.N., Ahn, B., Kim, Y., Kim, H., Jeong, H.W., 2022. Shedding and extensive and prolonged environmental contamination of goat farms of Q fever patients by *Coxiella burnetii*. Vet. Med. Sci. 8, 1264–1270. <https://doi.org/10.1002/vms3.780>
- Colenutt, C., Brown, E., Nelson, N., Wadsworth, J., Maud, J., Adhikari, B., Chapagain Kafle, S., Upadhyaya, M., Kafle Pandey, S., Paton, D.J., Sumption, K., Gubbins, S., 2018. Environmental Sampling as a Low-Technology Method for Surveillance of Foot-and-Mouth Disease Virus in an Area of Endemicity. Appl. Environ. Microbiol. 84, e00686-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00686-18>
- ENETWILD-consortium, Alves, P.C., Gavier-Widen, D., Ferroglio, E., Queirós, J., Rafael, M., Santos, N., Silva, T., Gonçalves, C., Vada, R., Zanet, S., Smith, G., Gethöffer, F., Keuling, O., Staubach, C., Sauter-Louis, C., Blanco, J., Podgorski, T., Larska, M., Richomme, C., Knauf, S., Rijks, J.M., Pasetto, C., Benatti, F., Poncina, M., Gómez, A., Dups-Bergmann, J., Neimanis, A., Vicente, J., 2022. Literature review on the main existing structures and systematic/academic initiatives for surveillance in the EU for zoonoses in the environment and the methods for surveillance of pathogens in the environment. EFSA Support. Publ. 19. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2022.EN-7792>
- Fernández-de-Mera, I.G., Rodríguez del-Río, F.J., Fuente, J., Pérez-Sancho, M., Hervás, D., Moreno, I., Domínguez, M., Domínguez, L., Gortázar, C., 2021. Detection of environmental SARS-CoV-2 RNA in a high prevalence setting in Spain. Transbound. Emerg. Dis. 68, 1487–1492. <https://doi.org/10.1111/tbed.13817>
- Giacomini, E., Gasparrini, S., Lazzaro, M., Scali, F., Boniotti, M.B., Corradi, A., Pasquali, P., Alborali, G.L., 2018. The role of transportation in the spread of *Brachyspira hyodysenteriae* in fattening farms. BMC Vet. Res. 14, 10. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1328-5>
- Guizado-Batista, A., Porres-Camacho, A., Vargas-Villalobos, S., Cortez-Martínez, M., Umaña-Castro, R., Sancho-Blanco, C., Solano-Campos, F., Quesada-Alvarado, F., Spínola-Parallada, M., Madrigal-Mora, A., Jiménez-Serrano, A., Vargas-Calvo, J., Villalobos-Sequeira, J., Stoos, K.B., Blanco-Peña, K., 2024. Antimicrobial-resistant genes in feces from otters (*Lontra longicaudis*) within the Peñas Blancas river basin, Costa Rica. Heliyon 10, e40927. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e40927>
- Hedman, J., Rådström, P., 2013. Overcoming Inhibition in Real-Time Diagnostic PCR, in: Wilks, M. (Ed.), PCR Detection of Microbial Pathogens, Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 17–48. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-353-4_2
- Herrero-García, G., Barroso, P., Dashti, A., González-Barrio, D., Naves, J., Fernández-Gil, A., Ugarte-Ruiz, M., Pérez-Sancho, M., Royo, L.J., Carmena, D., De Miguel, A., García-Rodríguez, A., Gortázar, C., Domínguez, L., Balseiro, A., 2024a. Non-invasive surveillance of shared pathogens in the Eurasian brown bear (*Ursus arctos*) human interface. One Health 18, 100746. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2024.100746>
- Herrero-García, G., Pérez-Sancho, M., Barroso, P., Herranz-Benito, C., Relimpio, D., García-Seco, T., Perelló, A., Díez-Guerrier, A., Pozo, P., Balseiro, A., Domínguez, L., Gortázar, C., 2024b. One Health Farming: Noninvasive monitoring reveals links between farm vertebrate richness and pathogen markers in outdoor hoofstock. One Health 19, 100924. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2024.100924>
- Hood, G., Roche, X., Brioudes, A., Von Dobschuetz, S., Fasina, F.O., Kalpravidh, W., Makonnen, Y., Lubroth, J., Sims, L., 2021. A literature review of the use of environmental sampling in the surveillance of avian influenza viruses. Transbound. Emerg. Dis. 68, 110–126. <https://doi.org/10.1111/tbed.13633>
- Jenkins, A.O., Gormley, E., Gcebe, N., Fosgate, G.T., Conan, A., Aagaard, C., Michel, A.L., Rutten, V.P.M.G., 2018. Cross reactive immune responses in cattle arising from exposure to *Mycobacterium bovis* and non-tuberculous mycobacteria. Prev. Vet. Med. 152, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.02.003>
- Jensen, A.N., Dalsgaard, A., Stockmarr, A., Nielsen, E.M., Baggesen, D.L., 2006. Survival and Transmission of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in an Outdoor Organic Pig Farming Environment. Appl. Environ. Microbiol. 72, 1833–1842. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1833-1842.2006>
- Karched, M., Bhardwaj, R.G., Pauline, E.M., George, S., Asikainen, S., 2017. Effect of preparation method and storage period on the stability of saliva DNA. Arch. Oral Biol. 81, 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.04.011>
- Koets, L., Van Leeuwen, K., Derlagen, M., Van Wijk, J., Keijzer, N., Feenstra, J.D.M., Gandhi, M., Sorel, O., Van De Laar, T.J.W., Koppelman, M.H.G.M., 2023. Efficient SARS-CoV-2 Surveillance during the Pandemic-Endemic Transition Using PCR-Based Genotyping Assays. Microbiol. Spectr. 11, e03450-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03450-22>

- Kosowska, A., Barasona, J.A., Barroso-Arévalo, S., Rivera, B., Domínguez, L., Sánchez-Vizcaino, J.M., 2021. A new method for sampling African swine fever virus genome and its inactivation in environmental samples. *Sci. Rep.* 11, 21560. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00552-8>
- Lorusso, A., Decaro, N., Greco, G., Corrente, M., Fasanella, A., Buonavoglia, D., 2007. A real-time PCR assay for detection and quantification of *Mycoplasma agalactiae* DNA. *J. Appl. Microbiol.* 103, 918–923. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03324.x>
- Martínez-Guijosa, J., Romero, B., Infantes-Lorenzo, J.A., Díez, E., Boadella, M., Balseiro, A., Veiga, M., Navarro, D., Moreno, I., Ferreres, J., Domínguez, M., Fernández, C., Domínguez, L., Gortázar, C., 2020. Environmental DNA: A promising factor for tuberculosis risk assessment in multi-host settings. *PLOS ONE* 15, e0233837. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233837>
- Martínez-Murcia, A., Navarro, A., Miró-Pina, C., 2024. Identification of *Listeria* Isolates by Using a Pragmatic Multilocus Phylogenetic Analysis. *Microbiol. Res.* 15, 2114–2128. <https://doi.org/10.3390/microbiolres15040142>
- Meester, M., Rademaker, A., Bouwknegt, M., Hakze-van Der Honing, R.W., Stegeman, A., Van Der Poel, W.H.M., Tobias, T.J., 2023. Evaluation of Non-Invasive Sampling Methods for Detection of Hepatitis E Virus Infected Pigs in Pens. *Microorganisms* 11, 500. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020500>
- Méndez-Álvarez, S., Pérez-Rotha, E., 2004. La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enfermedades Infecc. Microbiol. Clínica* 22, 183–192. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(04\)73059-1](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(04)73059-1)
- Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo (INSST). NTP 611: Agentes biológicos: análisis de las muestras [Internet]. Madrid: INSST; 2018 [consultado 2025 may 14]. Disponible en: <https://www.insst.es/documentacion/colecciones-tecnicas/ntp-notas-tecnicas-de-prevencion/18-serie-ntp-numeros-611-a-645-ano-2003/ntp-611-agentes-biologicos-analisis-de-las-muestras>
- Pacholewicz, E., Wisselink, H.J., Koene, M.G.J., Van Der Most, M., Gonzales, J.L., 2023. Environmental Sampling Methods for Detection of *Salmonella* Infections in Laying Hens: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Microorganisms* 11, 2100. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11082100>
- Pauli, J.N., Whiteman, J.P., Riley, M.D., Middleton, A.D., 2010. Defining Noninvasive Approaches for Sampling of Vertebrates. *Conserv. Biol.* 24, 349–352. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2009.01298.x>
- Pires, A.F.A., Funk, J.A., Bolin, C.A., 2013. Longitudinal study of *Salmonella* shedding in naturally infected finishing pigs. *Epidemiol. Infect.* 141, 1928–1936. <https://doi.org/10.1017/S0950268812002464>
- Rebollada-Merino, A., Pérez-Sancho, M., Rodríguez-Bertos, A., García, N., Martínez, I., Navarro, A., Domínguez, L., García-Seco, T., 2022. Environment and Offspring Surveillance in Porcine Brucellosis. *Front. Vet. Sci.* 9, 915692. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.915692>
- Ripa, A., Díaz-Caballero, J.A., Palacios-González, M.J., Zalba, J., Espinosa, A., García-Zapata, J.L., Gómez-Martín, A., Tkach, V., Fernández-García, J.L., 2023. Non-Invasive Wildlife Disease Surveillance Using Real Time PCR Assays: The Case of the Endangered *Galemys pyrenaicus* Populations from the Central System Mountains (Extremadura, Spain). *Animals* 13, 1136. <https://doi.org/10.3390/ani13071136>
- Sales, N.G., Wangensteen, O.S., Carvalho, D.C., Mariani, S., 2019. Influence of preservation methods, sample medium and sampling time on eDNA recovery in a neotropical river. *Environ. DNA* 1, edn3.14. <https://doi.org/10.1002/edn3.14>
- Salvador, D., Caeiro, M.F., Neto, C., Carneiro, R.N., 2022. One-Year Surveillance of SARS-CoV-2 Virus in Natural and Drinking Water. *Pathogens* 11, 1133. <https://doi.org/10.3390/pathogens11101133>
- Schilling, A.-K., Mazzamuto, M.V., Romeo, C., 2022. A Review of Non-Invasive Sampling in Wildlife Disease and Health Research: What's New? *Animals* 12, 1719. <https://doi.org/10.3390/ani12131719>
- Seeber, P.A., Soilemetzidou, S.E., East, M.L., Walzer, C., Greenwood, A.D., 2017. Equine behavioral enrichment toys as tools for non-invasive recovery of viral and host DNA. *Zoo Biol.* 36, 341–344. <https://doi.org/10.1002/zoo.21380>
- Sirois, S.H., Buckley, D.H., 2019. Factors governing extracellular DNA degradation dynamics in soil. *Environ. Microbiol. Rep.* 11, 173–184. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12725>
- Smith, R.L., Schukken, Y.H., Pradhan, A.K., Smith, J.M., Whitlock, R.H., Van Kessel, J.S., Wolfgang, D.R., Grohn, Y.T., 2011. Environmental contamination with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in endemically infected dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 102, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.06.009>
- Spanu, C., Jordan, K., 2020. *Listeria monocytogenes* environmental sampling program in ready-to-eat processing facilities: A practical approach. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 19, 2843–2861. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12619>
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., Rieseberg, L.H., 2012. Environmental DNA. *Mol. Ecol.* 21, 1789–1793. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x>
- Veilleux, H.D., Misutka, M.D., Glover, C.N., 2021. Environmental DNA and environmental RNA: Current and prospective applications for biological monitoring. *Sci. Total Environ.* 782, 146891. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146891>
- Vijayakumar, S., Narayan, P.K., Kumari, S., Ranjan, R., Kumar, V., Kumar, A., Alti, D., 2024. A review of non-invasive samples and tools in kala-azar diagnosis and test of cure. *Exp. Parasitol.* 259, 108713. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2024.108713>
- Yin, X., Chen, Y.-Z., Ye, Q.-Q., Liao, L.-J., Cai, Z.-R., Lin, M., Li, J.-N., Zhang, G.-B., Peng, X.-L., Shi, W.-F., Guo, X.-G., 2022. Detection performance of PCR for *Legionella pneumophila* in environmental samples: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 21, 12. <https://doi.org/10.1186/s12941-022-00503-9>
- Zainab, S.M., Junaid, M., Xu, N., Malik, R.N., 2020. Antibiotics and antibiotic resistant genes (ARGs) in groundwater: A global review on dissemination, sources, interactions, environmental and human health risks. *Water Res.* 187, 116455. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116455>
- Żarczyńska, M., Żarczyński, P., Tomsia, M., 2023. Nucleic Acids Persistence—Benefits and Limitations in Forensic Genetics. *Genes* 14, 1643. <https://doi.org/10.3390/genes14081643>
- Zemanova, M.A., 2021. Noninvasive Genetic Assessment Is an Effective Wildlife Research Tool When Compared with Other Approaches. *Genes* 12, 1672. <https://doi.org/10.3390/genes12111672>