

## Recomendación de la CMF: Tecnologías de secuenciación de alto rendimiento como instrumento de diagnóstico con fines fitosanitarios

### Historia de la publicación

Esta no es una parte oficial de la recomendación de la CMF; después de la adopción será modificada por la Secretaría de la CIPF.	
<b>Fecha de este documento</b>	2018-12-06
<b>Categoría del documento</b>	Proyecto de recomendación de la CMF
<b>Etapas actuales del documento</b>	<i>Remitido a la CMF-14 (2019)</i>
<b>Etapas principales</b>	<p>2018-3: Australia, la EPPO y Nueva Zelanda proponen la inclusión del tema <i>Tecnologías de secuenciación de alto rendimiento como instrumento de diagnóstico con fines fitosanitarios</i> en el programa de trabajo de la CIPF para una recomendación de la CMF.</p> <p>2018-04: En la CMF-13 se añadió el tema al programa de trabajo para una recomendación de la CIPF.</p> <p>2018-05: Se modificó después de la CMF-13.</p> <p>2018-05: Consulta (15 de mayo – 15 de agosto de 2018).</p> <p>2018-09: Se revisó tras el período de consulta.</p> <p>2018-10: Mesa de la CMF.</p> <p>2018-12: Mesa de la CMF.</p>
<b>Notas</b>	<p>Este borrador se presentó solo en inglés para el período de consulta.</p> <p>2018-08: A raíz de la consulta, se modificó el título (se cambió “secuenciación de nueva generación” por “secuenciación de alto rendimiento”)</p> <p>2018-10: Editado</p> <p>2018-12: Editado (en parte)</p>

### ANTECEDENTES

La Comisión de Medidas Fitosanitarias (CMF) reconoce que el diagnóstico de plagas exacto y oportuno es la base de la certificación de las exportaciones, la inspección de las importaciones y la aplicación de medidas fitosanitarias adecuadas<sup>1</sup>. En general, se considera que la capacidad para detectar e identificar una plaga de plantas varía en función de la exactitud, la reproducibilidad y la especificidad de los instrumentos de detección.

Las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, también denominadas “de secuenciación de nueva generación” o “secuenciación masiva”, son una buena alternativa a los métodos de diagnóstico tradicionales para detectar e identificar organismos (como bacterias, hongos, fitoplasmas, virus y viroides). Sin embargo, cabe la posibilidad de que los resultados del diagnóstico basado en la secuenciación de alto rendimiento no se relacionen con la evidencia de plagas vivas o daños en las

---

<sup>1</sup> Véase también la recomendación R-07 de la CMF: La importancia del diagnóstico de plagas (<https://www.ippc.int/es/publications/84234/>).

plantas o los productos vegetales ocasionados por estos organismos. Por ello, los resultados de estas tecnologías de alta sensibilidad, como la secuenciación de alto rendimiento, para detectar e identificar plagas se deberían interpretar con cautela. En particular, debería prestarse la debida atención a los riesgos y las consecuencias de aplicar los resultados de este instrumento de diagnóstico, al aplicar las medidas fitosanitarias. Además, es posible que las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento no sean adecuadas para todas las organizaciones nacionales de protección fitosanitaria (ONPF), debido al elevado costo en la plataforma y otros gastos operacionales. También cabe señalar que cada ONPF puede utilizar una plataforma distinta de secuenciación de alto rendimiento.

En el Apéndice 1 se proporciona más información acerca de las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento.

## **DIRIGIDA A**

Las partes contratantes y las organizaciones regionales de protección fitosanitaria.

## **RECOMENDACIONES**

La Comisión hace notar que existen desafíos y señala que es necesario continuar trabajando en las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento con fines de detección e identificación como base para aplicar las reglamentaciones fitosanitarias. Es necesario continuar investigando las detecciones de un microorganismo desconocido basadas en las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, con miras a demostrar el potencial de ese microorganismo para actuar como plaga y para ser calificado como plaga reglamentada.

La Comisión *alienta* a las partes contratantes que deseen utilizar estas tecnologías y los resultados que generen como fundamento de reglamentaciones fitosanitarias adecuadas a:

- a) *establecer* directrices sobre las medidas que deberían adoptarse tras la detección de un organismo desconocido (como hongos, bacterias o virus) o la detección de organismos inviables en material vegetal;
- b) *asegurarse* de que se dispone de la infraestructura y las inversiones en tecnología de la información y bioinformática adecuadas, así como de actividades de educación y capacitación en materia de bioinformática, para poder almacenar e interpretar debidamente los resultados de las pruebas, y de que estas tecnologías se utilizan de manera eficaz;
- c) *unificar y aplicar* las directrices operacionales sobre las mejores prácticas para la secuenciación de alto rendimiento, que comprendan la interpretación correcta de los resultados y las medidas de control de la calidad (por ejemplo, mecanismos de control de los procedimientos) que garanticen que los productos de los datos de secuenciación de alto rendimiento sean sólidos y exactos, tengan importancia biológica en un contexto fitosanitario y se apliquen de forma armonizada;
- d) *validar* la fiabilidad y la exactitud de la secuenciación de alto rendimiento mediante ensayos que comparen esta tecnología con otras plataformas de diagnóstico existentes;
- e) *informar* a la ONPF del país exportador acerca de la interpretación de los resultados de la secuenciación de alto rendimiento, en especial en lo relativo a las conclusiones sobre el riesgo fitosanitario que suponen los organismos detectados;
- f) *implementar* programas de capacitación en materia de secuenciación de alto rendimiento, incluida la impartición de cursos en línea sobre mejores prácticas de laboratorio, y *coordinar* las pruebas de competencia internacionales para evaluar de forma independiente las capacidades de laboratorio;

- g) *publicar* los protocolos de la secuenciación de alto rendimiento (elaborados para las correspondientes plataformas de secuenciación de alto rendimiento) y *compartir* directrices y material pedagógico en favor de la transparencia;
- h) *publicar* la información sobre asociaciones biológicas imprevistas de organismos cuarentenarios en plantas y productos vegetales que revela la secuenciación de alto rendimiento.

#### **RECOMENDACIONES SUSTITUIDAS POR ESTA RECOMENDACIÓN**

Ninguna.

El presente apéndice se presenta únicamente como referencia y no constituye una parte prescriptiva de la recomendación de la CMF.

## **APÉNDICE 1**

### **Antecedentes**

En diciembre de 2017, la Mesa de la Comisión de Medidas Fitosanitarias (CMF) examinó un informe preparado por el Comité de Normas (CN) que recogía los debates del Grupo técnico sobre protocolos de diagnóstico (GTPD) de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF) acerca de las oportunidades y los desafíos relacionados con el uso de tecnologías de secuenciación de alto rendimiento como instrumento de diagnóstico con fines fitosanitarios. Se solicitó a la Mesa que aprobara la presentación del documento de antecedentes a la CMF en su 13.<sup>a</sup> reunión, con la petición a la Comisión de que tomara nota de las dificultades asociadas al uso de las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento y de la necesidad de continuar trabajando en estas tecnologías para la detección e identificación de plagas.

El CN preparó un documento sobre el uso de las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento como instrumento de diagnóstico con fines fitosanitarios, basándose en el debate mantenido por el GTPD de la CIPF sobre las oportunidades y los desafíos de la secuenciación de alto rendimiento.

En diciembre de 2017, se pidió a la Mesa de la CMF que aprobara la presentación del documento de antecedentes a la CMF en su 13.<sup>a</sup> reunión, con la petición a la Comisión de que tomara nota de las dificultades asociadas al uso de las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento y de la necesidad de continuar trabajando en estas tecnologías para la detección y la identificación de plagas.

La Mesa de la CMF acordó que, dado que se trataba de una cuestión emergente que resultaría de interés para las partes contratantes, se debía formular una recomendación de la CMF que proporcionara orientación y asesoramiento en materia de políticas a las partes contratantes y las organizaciones regionales de protección fitosanitaria (ORPF) sobre el uso de las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento como instrumento de diagnóstico para fines fitosanitarios.

Australia, Nueva Zelanda y la Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas (EPPO) presentaron un proyecto de recomendación de la CMF durante la 13.<sup>a</sup> reunión de la Comisión, en la que se acordó incluir el tema en el programa de trabajo de la CIPF para una recomendación de la CMF sobre las “tecnologías de secuenciación de alto rendimiento como instrumento de diagnóstico con fines fitosanitarios”.

### **¿Qué es la secuenciación de alto rendimiento y en qué se diferencia de otros métodos de análisis?**

La secuenciación de alto rendimiento, también denominada “secuenciación de nueva generación” o “secuenciación masiva” permite secuenciar el genoma completo y se puede utilizar para todo tipo de organismos, si bien los no cultivables (como virus y viroides, algunas bacterias, oomicetos y hongos) son los que revisten especial interés. Las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento pueden utilizarse para detectar plagas reglamentadas específicas y para detectar organismos desconocidos (es decir, sin conocimiento *a priori*). Las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento permiten secuenciar material genético, lo que puede servir para identificar el genoma de microorganismos de interés fitosanitario que no se han podido identificar con las tecnologías tradicionales. Recientemente, la aplicación de estas tecnologías ha permitido descubrir microorganismos que no se habían detectado antes, como hongos, bacterias, fitoplasmas y, en particular virus, ya que el uso de la tecnología está más avanzado para ellos que para otros patógenos (los ejemplos facilitados en el presente documento se refieren a virus y viroides). Los investigadores y los especialistas en diagnóstico que utilizan las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento continuarán identificando y describiendo taxones

nuevos entre la gran cantidad de organismos que están por descubrir, y para los que las organizaciones nacionales de protección fitosanitaria (ONPF) deberán tomar decisiones rápidas y difíciles sobre la base de muy poca información y de una evaluación inexacta de los posibles riesgos fitosanitarios (Olmos *et al.*, 2018). Por consiguiente, estas tecnologías permiten adoptar un enfoque nuevo y global para la detección y caracterización de las plagas potenciales en una muestra biológica.

Actualmente, el análisis fitosanitario para detectar virus y viroides en plantas y productos vegetales se basa en una combinación de métodos específicos (molecular y serológico) y genéricos (inspección visual, microscopía electrónica e indicadores biológicos o bioensayos). Actualmente, estos son los métodos mejores y más utilizados en laboratorios de diagnóstico de plagas vegetales, pero tienen algunos puntos débiles intrínsecos. Los análisis específicos suelen requerir un conocimiento previo de los patógenos víricos y todas las pruebas deben ser desarrolladas y validadas (incluida la validación de la prueba para diferentes combinaciones de plaga y huésped), lo que exige recursos a las ONPF. Además, como estas pruebas específicas también pueden detectar trazas de proteínas o ácidos nucleicos de partículas de patógenos desintegrados, se sobrestima la presencia real de patógenos. No se ha definido correctamente la gama de huéspedes de muchos patógenos y los virus y viroides exóticos pueden pasar desapercibidos en las combinaciones de plaga y huésped de reciente aparición. Tradicionalmente los bioensayos se han utilizado para detectar virus desconocidos; no obstante, cuando se observan síntomas de enfermedad y se quiere confirmar la identidad del agente patógeno, en general se deben realizar pruebas moleculares o serológicas adicionales. En los bioensayos, la expresión de los síntomas depende en gran medida de las condiciones ambientales, y a menudo se obtienen resultados ambiguos como falsos positivos y falsos negativos.

Realizar los bioensayos implica que las plantas se guardan en estaciones de cuarentena posentrada durante períodos prolongados, lo que supone importantes costos y retrasos adicionales para los importadores. Otro inconveniente de los bioensayos es que las cepas pueden no ser detectadas si son asintomáticas en el huésped indicador. Los estudios realizados hasta la fecha han mostrado que la secuenciación de alto rendimiento es equivalente a los ensayos de indexación biológica o mejor que ellos, a la hora de detectar virus y viroides de importancia agronómica (Rott *et al.*, 2017; Rwahnih *et al.*, 2017; Rott *et al.*, 2017; Rwahnih *et al.*, 2015). Es más, los estudios han demostrado que la secuenciación de alto rendimiento es capaz de producir resultados en mucho menos tiempo que los bioensayos. No obstante, las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento se utilizan junto con otras pruebas existentes y no evitan la necesidad de confirmar la importancia biológica del organismo detectado.

Debido a las limitaciones de los métodos de diagnóstico tradicionales, se necesitan nuevos métodos sólidos, fiables y rentables que permitan detectar virus y viroides en las plantas y los productos vegetales de manera rápida y segura, pero también en otras plagas no cultivables o difíciles, y las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento abren esta posibilidad. Las tecnologías de metacódigo de barras o de secuenciación de alto rendimiento aplicadas a los amplicones obtenidos mediante reacción en cadena de la polimerasa de una región de código de barras de ADN también tienen aplicaciones diagnósticas con fines fitosanitarios. Estas aplicaciones podrían ser el método de secuenciación de alto rendimiento con más probabilidades de utilizarse con fines de diagnóstico, para detectar virus y otras plagas no cultivables o difíciles.

En las pruebas de diagnóstico rutinarias, algunas de las oportunidades y posibilidades para la utilización de tecnologías de secuenciación de alto rendimiento son para 1) entender la situación de una plaga en una región mediante programas de seguimiento, 2) certificar las semillas y el material de propagación vegetal, 3) hacer las pruebas de cuarentena (posentrada) y 4) dar seguimiento a los productos importados para detectar nuevos riesgos potenciales de plagas. La secuenciación de alto rendimiento ofrece una gran variedad de beneficios para todas estas aplicaciones (Al Rwahnih *et al.*, 2015; Hadidi *et al.*, 2016; Rott *et al.*, 2017). Sin embargo, también hay problemas asociados a la aplicación de estas tecnologías, como los requisitos de infraestructura de los laboratorios, la bioinformática, el intercambio de datos y la validación de los datos (Olmos *et al.*, 2018).

## **Desafíos reglamentarios y científicos**

A medida que aparecen nuevas tecnologías, surgen también los desafíos asociados. Las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento entrañan desafíos parecidos a los de otras tecnologías de detección molecular o de detección basada en la secuenciación. No obstante, los resultados de las investigaciones basadas en tecnologías de secuenciación de alto rendimiento tienen implicaciones importantes desde el punto de vista fitosanitario. Por ejemplo, existe el riesgo de que el material vegetal tenga restringido el movimiento porque se ha detectado un microorganismo (antes desconocido) que no puede ser patógeno para dicho material vegetal. No todos los organismos asociados a las plantas se consideran plagas y, sin embargo, forman parte del microbioma de las plantas; algunos pueden ser mutualistas y resultar beneficiosos para la planta huésped o pueden ser agentes comensales. Garantizar que las decisiones reglamentarias se tomen en relación con plagas, y no con agentes mutualistas o comensales, es un criterio fundamental para la adopción de la secuenciación del genoma completo como método de diagnóstico. Además, existe el riesgo, como sucede con otros métodos indirectos, de que las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento puedan detectar organismos no viables.

La identificación o predicción correcta de plagas a partir de la secuencia completa del genoma son dos desafíos diferentes pero importantes de utilizar estas tecnologías. La correcta interpretación de los resultados es otra gran dificultad de utilizar tecnologías de secuenciación de alto rendimiento. Se necesitan bases de datos muy grandes y bien gestionadas de códigos de barras o genomas completos de plagas y microorganismos conocidos, para utilizarlas como referencia en la comparación con datos de secuencias generadas mediante secuenciación de alto rendimiento. Debido al ritmo creciente de descubrimiento de nuevos microorganismos, las ONPF se enfrentarán al problema de tener que tomar decisiones sobre la importancia biológica de una detección, por ejemplo, la capacidad de un microorganismo de infectar plantas o productos vegetales, a partir del análisis de los datos sobre ácidos nucleicos sin tener información completa (o incluso sin tener ninguna información). Este proceso de toma de decisiones, para determinar si el organismo en cuestión es una plaga, aleja el resultado diagnóstico del análisis de la patogenicidad y genera dudas para decidir si los datos están relacionados con la presencia real de una entidad biológica viable y patógena que es una plaga cuarentenaria. Sin embargo, los métodos de secuenciación molecular y de secuenciación de primera generación también se enfrentan a este mismo desafío, en especial en el caso de los virus que son “nuevos para la ciencia”, por lo que el problema en sí no es desconocido. Martin *et al.*, (2016), Massart *et al.* (2017) y Olmos *et al.* (2018) señalan otras dificultades de utilizar la secuenciación de alto rendimiento con fines reglamentarios.

Con objeto de inspirar confianza a las ONPF para que adopten las tecnologías de secuenciación de nueva generación para el diagnóstico de plagas, se requieren enfoques armonizados internacionalmente que incorporen la elaboración de directrices operacionales para ejecutar de forma fiable y repetida la secuenciación de alto rendimiento, entre otras cosas, con controles de calidad y datos de validación que permitan interpretar los resultados de la secuenciación (Boonham *et al.*, 2014). Asimismo, es necesario validar la tecnología cotejándola con métodos existentes, con miras a tener en cuenta los límites de los procedimientos actuales. Para demostrar que cumplen con su finalidad prevista, las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento deben validarse completamente para cada plaga objetivo y matriz. Los protocolos de laboratorio, además de una descripción de la preparación de las muestras, el proceso del análisis de datos y las bases de datos que deben utilizarse, deberían ser accesibles.

## **Colaboración mundial**

Existen varias iniciativas en curso en distintas regiones del mundo que estudian la utilización de tecnologías de secuenciación de alto rendimiento como instrumento de diagnóstico con fines fitosanitarios (Australasia, Europa y América del Norte). Entre ellas figuran los debates sobre las políticas conexas que se pueden elaborar. Es necesario coordinar los resultados de estas iniciativas para avanzar en la elaboración oportuna de normas armonizadas en el nivel internacional sobre el uso de tecnologías de secuenciación de alto rendimiento en un contexto reglamentario.

## Referencias

- Al Rwahnih, M., Daubert, S., Golino, D., Islas, C. y Rowhani, A.** 2015. Comparison of next-generation sequencing versus biological indexing for the optimal detection of viral pathogens in grapevine. *Phytopathology*, 105(6): 758-763.
- Barrero, R.A, Napier, K.R., Cunnington, J., Liefting, L., Keenan, S., Frampton, R.A., Szabo, T., et al.** 2017. An internet-based bioinformatics toolkit for plant biosecurity diagnosis and surveillance of viruses and viroids. *BMC Bioinformatics*, 18: 26.
- Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., van der Vlugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J., y Mumford, R.** 2014. Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing. *Virus Research*, 186: 20-31.
- Hadidi, A., Flores, R., Candresse, T. y Barba, M.** 2016. Next-generation sequencing and genome editing in plant virology. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1325.
- Mackie, J., Liefting, L., Barrero, R.A., Dinsdale, A., Napier, K.R., Blouin, A.G., Woodward, L. et al.** 2017. Comparative diagnosis of viral pathogens using side-by-side trials of existing post entry quarantine and small RNA next generation sequencing methods. Resumen de la Conferencia Science Protecting Plant Health del Centro de Investigación Cooperativa para la Bioseguridad Vegetal, 23-28 de septiembre de 2017, Brisbane (Australia). Disponible en <http://apps-2017.p.yrd.currinda.com/days/2017-09-26/abstract/4017> (último acceso el 21 de octubre de 2018).
- Martin, R.R., Constable, F. y Tzanetakis, I.E.** 2016. Quarantine regulations and the impact of modern detection methods. *Annual Review of Phytopathology*, 54: 189–205.
- Massart, S., Candresse, T., Gil, J., Lacomme, C., Predajna, L., Ravnikar, M., Reynard, J.-S. et al.** 2017. A framework for the evaluation of biosecurity, commercial, regulatory and scientific impacts of plant viruses and viroids identified by NGS technologies. *Frontiers in Microbiology*, 8: 45.
- Olmos, A., Boonham, N., Candresse, T., Gentit, P., Giovani, B., Kutnjak, D., Liefting, L., et al.** 2018. High-throughput sequencing technologies for plant pest diagnosis: challenges and opportunities. *EPPO Bulletin*, 48: 219–224.
- Rott, M., Xiang, Y., Boyes, I., Belton, M., Saeed, H., Kesanakurti, P., Hayes, S., et al.** 2017. Application of next generation sequencing for diagnostic testing of tree fruit viruses and viroids. *Plant Disease*, 101: 1489-1499.