



联合国
粮食及
农业组织

Food and Agriculture
Organization of the
United Nations

Organisation des Nations
Unies pour l'alimentation
et l'agriculture

Продовольственная и
сельскохозяйственная организация
Объединенных Наций

Organización de las
Naciones Unidas para la
Alimentación y la Agricultura

منظمة
الأغذية والزراعة
للأمم المتحدة

S

COMISIÓN DE MEDIDAS FITOSANITARIAS

13.^a reunión

Roma, 16-20 de abril de 2018

**Recomendaciones de la CMF: Aplicación de las tecnologías de
secuenciación de nueva generación para el diagnóstico de plagas de plantas
en un contexto fitosanitario**

Tema 8.6 del programa

Preparado por Australia, la OEPP y Nueva Zelandia.

I. Antecedentes

1. En diciembre de 2017, la Mesa examinó un informe preparado por el Comité de Normas que recogía el debate del Grupo técnico sobre protocolos de diagnóstico de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF) acerca de las oportunidades y los desafíos relacionados con el uso de tecnologías de secuenciación de nueva generación como instrumento de diagnóstico con fines fitosanitarios. Se solicitó a la Mesa que aprobara la presentación del documento de antecedentes a la Comisión de Medidas Fitosanitarias (CMF) en su 13.^a reunión, con la petición a la CMF de que tomara nota de las dificultades asociadas al uso de las tecnologías de secuenciación de nueva generación y de la necesidad de continuar trabajando en estas tecnologías antes de que puedan considerarse como el único método de detección e identificación de plagas.

2. La Mesa 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 para la CMF sobre el uso de las tecnologías de secuenciación de nueva generación como instrumento de diagnóstico para fines fitosanitarios.

Para minimizar los efectos de los métodos de trabajo de la FAO en el medio ambiente y contribuir a la neutralidad respecto del clima, se ha publicado un número limitado de ejemplares de este documento. Se ruega a los delegados y observadores que lleven sus copias a las reuniones y se abstengan de pedir copias adicionales. La mayoría de los documentos de reunión de la FAO está disponible en Internet, en el sitio www.fao.org.

II. ¿Qué es la secuenciación de nueva generación y en qué se diferencia de otros métodos de análisis?

3. Las tecnologías de secuenciación de nueva generación permiten secuenciar el genoma completo y pueden utilizarse para todos los tipos de organismos. Pueden utilizarse para detectar plagas reglamentadas específicas y para detectar organismos desconocidos (es decir, sin conocimiento *a priori*). De hecho, recientemente la aplicación de estas tecnologías ha permitido descubrir microorganismos que no se habían detectado antes, 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). Teniendo en cuenta el elevado número de organismos que todavía no se han descubierto, los investigadores y los especialistas en diagnóstico que utilizan las tecnologías de secuenciación de nueva generación continuarán identificando y describiendo taxones nuevos. Por consiguiente, estas tecnologías permiten adoptar un enfoque nuevo y global para la detección y caracterización de las plagas en una muestra biológica.

4. Actualmente el análisis fitosanitario para detectar virus y viroides en plantas y productos vegetales sujetos a movimientos por todo el mundo se basa en una combinación de enfoques específicos (molecular y serológico) y genéricos (visual, microscopía electrónica e indicadores biológicos o bioensayos). Aunque estos métodos son los más adecuados hoy en día, presentan varias limitaciones inherentes. Los análisis específicos suelen requerir un conocimiento previo de los patógenos víricos objetivo y todas las pruebas deben ser desarrolladas y validadas (incluida la validación de la prueba para diferentes combinaciones de plaga y huésped), lo que impone limitaciones de recursos para las organizaciones nacionales de protección fitosanitaria (ONPF). No se ha definido correctamente la gama de huéspedes de muchos patógenos y los virus y viroides exóticos que infectan especies vegetales nuevas pueden pasar desapercibidos en las combinaciones de plaga y huésped de reciente aparición.

5. 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. 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. 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.

6. Los estudios realizados hasta la fecha han mostrado que la secuenciación de nueva generación 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.* 2015; Mackie *et al.* 2017; Barrero *et al.* 2017). Es más, los estudios están demostrando que la secuenciación de nueva generación es capaz de producir resultados en mucho menos tiempo que los bioensayos.

III. Desafíos regulatorios y científicos

7. Los resultados de las investigaciones basadas en tecnologías de secuenciación de nueva generación pueden tener 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 (por ejemplo, un virus) que puede no ser patógeno para su huésped. No todos los organismos asociados a las plantas se consideran plagas; algunos pueden ser mutualistas y resultar beneficiosos para la planta huésped o los agentes comensales. Además, existe el riesgo, como sucede con otros métodos indirectos, de que las tecnologías de secuenciación de nueva generación detecten organismos no viables.

8. La interpretación correcta de los resultados es uno de los desafíos principales del uso de las tecnologías de secuenciación de nueva generación. Se necesitan bases de datos muy grandes y bien gestionadas sobre las secuencias de plagas y microorganismos conocidos para utilizarlas como referencia en la comparación con datos de secuencias generadas mediante secuenciación de nueva generación. Las ONPF tendrán que tomar las decisiones basándose en el análisis de datos, no en la información sobre la importancia biológica y la capacidad infecciosa. De esta manera, el resultado diagnóstico se aleja del análisis de la patogenicidad y se generan dudas para decidir si los datos representan una entidad biológica que es una plaga cuarentenaria. Sin embargo, los métodos de secuenciación molecular actuales también se enfrentan a este mismo desafío, en especial en el caso de los virus “nuevos para la ciencia”, por lo que el problema en sí no es desconocido. Massart *et al.* (2017) y Martín *et al.* (2016) señalan otras dificultades a la hora de utilizar la secuenciación de nueva generación con fines regulatorios.

9. Con objeto de inspirar confianza a las ONPF y conseguir que adopten las tecnologías de secuenciación de nueva generación para el diagnóstico de plagas, se requieren enfoques armonizados que incorporen la elaboración de directrices operacionales para ejecutar de forma fiable y repetida la secuenciación de nueva generación, 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.

IV. Colaboración mundial

10. Hay varias iniciativas en curso en todo el mundo que se ocupan de explorar el uso de las tecnologías de secuenciación de nueva generación como instrumento de diagnóstico con fines fitosanitarios (por ejemplo, en Australasia, Europa y América del Norte) y que incluyen debates sobre las políticas conexas que pueden formularse. 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 nueva generación en un contexto regulatorio.

11. La recomendación de la CMF (Apéndice 1) sobre “La aplicación de las tecnologías de secuenciación de nueva generación como instrumento de diagnóstico con fines fitosanitarios” servirá como orientación para esta actividad y se presenta a la CMF para su examen.

V. Recomendaciones

12. Se invita a la CMF a:

- 1) *tomar nota* de los desafíos asociados al uso de tecnologías de secuenciación de nueva generación y de la necesidad de continuar trabajando en estas tecnologías antes de que puedan considerarse como el único método de detección de plagas;
- 2) *adoptar* la recomendación de la CMF sobre “La aplicación de las tecnologías de secuenciación de nueva generación como instrumento de diagnóstico con fines fitosanitarios” (Apéndice 1);
- 3) *establecer* un grupo de trabajo internacional compuesto por expertos en la materia, las autoridades reguladoras en materia de políticas y miembros del Grupo técnico sobre protocolos de diagnóstico, con el mandato de determinar las ventajas y las limitaciones o impedimentos asociados a la adopción de esta tecnología desde una perspectiva regulatoria.

Referencias

Barrero RA, Napier KR, Cunnington J, Liefting L, Keenan S, Frampton RA, Szabo T, Bulman S, Hunter A, Ward L, Whattam, M y Bellgard, M (2017) An internet-based bioinformatics toolkit for plant biosecurity diagnosis and surveillance of viruses and viroids. *BMC Bioinformatics*, 18:26. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5225587/>

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 Res.* 24 186:20-31. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24361981>

Mackie J., Liefting L., Barrero, R.A., Dinsdale, A., Napier, K.R., Blouin, A.G., Woodward, L., Khan S., Bellgard, M.I., Ward L. y Whattam, M. (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 2017 del PBCRC <http://apps-2017.p.yrd.currinda.com/days/2017-09-26/abstract/4017>

Martin, R.R, Constable, F. y Tzanetakis, I.E. (2016) Quarantine Regulations and the Impact of Modern Detection Methods. *Ann. Rev. Phytopath.* Vol. 54:189-205 <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-phyto-080615-100105>

Massart S, Candresse T, Gil J, Lacomme C, Predajna L, Ravnikar M, Reynard JS, Rumbou A, Saldarelli P, Škorić D, Vainio EJ, Valkonen JP, Vanderschuren H, Varveri C, Wetzel T. (2017) A framework for the evaluation of biosecurity, commercial, regulatory and scientific impacts of plant viruses and viroids identified by NGS technologies. *Front Microbiol.* 24 de enero de 2017; 8:45 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28174561>

Rott, M., Xiang, Y., Boyes, I., Belton, M., Saeed, H., Kesanakurti, P., Hayes, S., Lawrence, T., Birch, C., Bhagwat, B. y Rast, H. (2017) Application of Next Generation Sequencing for Diagnostic Testing of Tree Fruit Viruses and Viroids. *Plant Disease* 101:1489-1499

<https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-03-17-0306-RE>

Rwahnih M. A., 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 <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PHYTO-06-14-0165-R>

Apéndice 1**TEXTO DE LA RECOMENDACIÓN*****Recomendación sobre:******La aplicación de las tecnologías de secuenciación de nueva generación como instrumento de diagnóstico con fines fitosanitarios*****ANTECEDENTES**

La Comisión de Medidas Fitosanitarias (CMF) reconoce que el diagnóstico de plagas preciso y oportuno es la base de la certificación de las exportaciones, la inspección de las importaciones y la aplicación de medidas fitosanitarias adecuadas¹. En general, se considera que la capacidad para detectar e identificar una plaga de plantas varía en función de la calidad y especificidad de los instrumentos de detección.

Las tecnologías de secuenciación de nueva generación, denominadas también secuenciación de alto rendimiento, han proporcionado una alternativa sólida para la detección e identificación de organismos con conocimiento *a priori*. Sin embargo, cabe la posibilidad de que los resultados de este diagnóstico no se relacionen con la evidencia de plagas vivas o daños en las plantas o los productos vegetales ocasionados por estos organismos. Por ello, el uso de tecnologías muy sensibles, como la secuenciación de nueva generación, para detectar e identificar plagas de plantas se debe introducir con cuidado y teniendo debidamente en cuenta los riesgos y las consecuencias de aplicar los resultados del diagnóstico para regular los riesgos fitosanitarios.

DIRIGIDA A

Las partes contratantes y las organizaciones regionales de protección fitosanitaria.

RECOMENDACIONES

La Comisión hace notar que se deben continuar investigando las detecciones de un microorganismo desconocido basadas en las tecnologías de secuenciación de nueva generación con miras a demostrar el potencial de ese microorganismo para actuar como plaga de planta y para ser calificado como plaga reglamentada. La Comisión reconoce la existencia de desafíos y señala que es necesario continuar trabajando en las tecnologías de secuenciación de nueva generación antes de que puedan considerarse como el único método de detección de plagas.

Con objeto de aumentar la capacidad y el potencial de las partes contratantes para adoptar las tecnologías de secuenciación de nueva generación, la Comisión *alienta* a las partes contratantes y las organizaciones regionales de protección fitosanitaria a:

- a) *considerar y acordar* el establecimiento de un grupo de trabajo internacional compuesto por expertos en la materia, las autoridades reguladoras en materia de políticas y miembros del Grupo técnico sobre protocolos de diagnóstico, con el mandato de determinar las ventajas y las limitaciones o impedimentos asociados a la adopción de esta tecnología desde una perspectiva regulatoria;
- b) *considerar y acordar* el establecimiento de plazos concretos, determinados por el grupo de trabajo, con hitos claros y con el objetivo de alcanzar la adopción internacional de la secuenciación de nueva generación para la detección fitosanitaria rutinaria de virus y viroides;

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

- c) *participar activamente* en los esfuerzos internacionales por formular y finalizar directrices operacionales normalizadas de secuenciación de nueva generación, incluida la interpretación correcta de los resultados y las medidas de control de calidad convenidas para garantizar que los productos de los datos de secuenciación de nueva generación sean sólidos y precisos, y *respaldar* dichos esfuerzos;
- d) *apoyar* los esfuerzos internacionales por obtener más pruebas científicas sobre la fiabilidad y exactitud de la secuenciación de nueva generación, mediante la ejecución de ensayos de comparación de la secuenciación de nueva generación con las plataformas de diagnóstico existentes;
- e) *intercambiar* conocimientos y competencias con otros países siempre que sea posible y contribuir a la elaboración de programas de capacitación sobre secuenciación de nueva generación, entre otras cosas mediante la impartición de cursos en línea sobre mejores prácticas de laboratorio y la coordinación de las pruebas de competencia internacionales para evaluar de forma independiente las capacidades de laboratorio;
- f) *compartir* los protocolos internacionales acordados sobre secuenciación de nueva generación y el material de capacitación en la página de recursos fitosanitarios de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF) tras su finalización.

RECOMENDACIÓN(ES) SUSTITUIDA(S) POR LA ANTERIOR

Ninguna.