



Ontwikkeling van een virussensor

Real-time detectie van komkommerbontvirus (CGMMV) en Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV) in water

Auteurs: Kees Koopal (TNO, Sendot), Arie Draaijer (Sendot), Nikki van Bel, Aleida Hommes (KWR Water), Adriaan Vermunt (SCFF), André van der Wurff (NGAC)

Rapport nr. S20210001 LWV19217 TU-2020-002

KWR

**CONTROL IN
FOOD & FLOWERS**

Dit project werd mogelijk gemaakt door:



Stichting Control in Food & Flowers

Distributieweg 1

2645 EG Delfgauw

T: +31(0) 15-2858124

E: info@stfoodandflowers.nl

KvK: 61916471

Auteurs: Kees Koopal (TNO, Sendot), Arie Draaijer (Sendot), Nikki van Bel, Aleida Hommes (KWR Water), Adriaan Vermunt (SCFF), Andre van der Wurff (NGAC)
Projectnummer: T&U LWV19217; SCFF S20210001; TKI TU-2020-002
Datum: 19-9-2023
Titel Rapport: Ontwikkeling van een virussensor
Opdrachtgever: Topsectoren Landbouw, water en voedsel en Watertechnologie
Contactpersoon opdrachtgever: Margreet Schoenmakers
Kernwoorden: virus, sensor, PIAMV, CGMMV, komkommer, lelie

De Stichting Control in Food & Flowers aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van dit onderzoek of de toepassing van de adviezen.

Niets uit deze uitgave mag worden veelevoudigd en/of openbaar gemaakt worden door middel van druk, fotokopie, microfilm, elektronisch of op geluidsband of op welke andere wijze ook en evenmin in een retrieval systeem worden opgeslagen zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de opdrachtgever.

Inhoud	pagina
Samenvatting.....	4
Populaire samenvatting.....	6
1 Inleiding.....	8
1.1 Aanleiding en urgentie.....	8
1.2 Detectie van virussen in water in de kas.....	8
1.2.1 Nieuwe detectiemethoden.....	9
1.3 Doel en opzet.....	9
2 Detectiemethoden en virussen.....	11
2.1 Huidige detectiemethoden om virus in kaswater aan te tonen.....	11
2.1.1 Test strips.....	11
2.1.2 qPCR.....	11
2.1.3 ELISA: serologische detectie met antilichamen.....	12
2.1.4 Biotoetsen.....	12
2.2 Virussen.....	13
2.2.1 Bacteriofaag MS2.....	13
2.2.2 Komkommerbontvirus (CGMMV).....	13
2.2.3 PIAMV.....	14
3 Uitgevoerde werkzaamheden en resultaten.....	16
3.1 Onderscheid infectieuze en niet-infectieuze CGMMV met ci-qPCR.....	16
3.1.1 Ci-qPCR methoden.....	17
3.1.2 Watermonsters.....	18
3.1.3 Hitte behandeling.....	18
3.1.4 Resultaten ci-qPCR testen.....	19
3.1.5 Conclusies en aanbevelingen.....	22
3.2 Detectie van infectieuze en niet-infectieuze MS2.....	23
3.2.1 Chloordesinfectie.....	23
3.2.2 UV desinfectie.....	25
3.3 Biacore experimenten MS2, CGMMV en PIAMV.....	27
3.3.1 Experimenten inactivatie MS2 virus.....	27
3.3.2 Antilichaam-MS2 virusmodel in de aanwezigheid van plantenmateriaal.....	30
3.3.3 Bindingsexperimenten op basis van PIAMV en CGMMV.....	30
3.4 Bio-assay CGMMV.....	33
3.5 Experimenten Tecan.....	34
3.5.1 Algemeen Tecan Spark 10.....	34
3.5.2 Tecan metingen van verdunningsreeksen CGMMV en PIAMV.....	34
3.5.3 Tecan metingen van temperatuur behandelde monsters.....	35
3.6 Experimenten fluorescente probe naar optische fiber systeem.....	38
4 Conclusies en aanbevelingen.....	41
5 Referenties.....	43
Bijlage 1. Materiaal en methoden – gedetailleerd.....	45
Bijlage 2. Meetwaarden chloor- en uv-desinfectie experimenten met MS2.....	52

Samenvatting

Het is belangrijk om een plantenvirusinfectie in de kas snel te detecteren, zodat met behulp van hygiënemaatregelen en preventieve ruiming een grote(re) uitbraak kan worden voorkomen. Telers geven aan dat het risico op een virusinfectie in de kas een belangrijke reden is om water niet te hergebruiken. Dit is dus een belangrijk obstakel voor de realisatie van de emissieloze kas in 2027. Op dit moment is er in de tuinbouw geen betrouwbare manier om continu en snel de aanwezigheid van virussen in het water aan te tonen. Dit gaat ten koste van de reactietijd waardoor een virusinfectie zich verder door de kas kan verspreiden voordat maatregelen getroffen kunnen worden.

Dankzij voortschrijdende ontwikkelingen in de sleuteltechnologieën optiek (fotonica), elektronica, sensortechnologie en biotechnologie is nu mogelijk voor onderzoeksdoeleinden om snel en real-time virussen aan te tonen. Op dit moment zijn er echter nog geen sensoren beschikbaar voor virussen. Daarom is er binnen dit project gezocht naar een real-time detectietechniek voor plantenvirussen in water. Hiervoor zijn verschillende methoden geïnventariseerd op basis van criteria als snelheid, kosten, *technology readiness level* en onderscheid kunnen maken tussen infectieuze en niet-infectieuze plantenvirussen. Deze laatste is aangegeven door de glastuinbouw en bollensector, omdat er anders mogelijk onterecht actie wordt ondernomen terwijl het virusdeeltje door ontsmetting geïnactiveerd kan zijn. Gekozen is voor een SPR fluorescentie methode en daarnaast is kort een methode onderzocht gebaseerd op Polymerase Ketting Reactie (PCR), namelijk de *capsid integrity* qPCR (ci-qPCR) methode.

Binnen dit project is kort onderzocht of PCR technieken perspectief bieden bij het onderscheid maken tussen infectieus en niet-infectieus virus. De ci-qPCR methode die gebruik maakt van het intercalerende stofje PMAxx is op basis van deze eerste testen het meest effectief gebleken om onderscheid te kunnen maken tussen virussen met en zonder kapselschade als gevolg van een hittebehandeling. Of de PMAxx ci-qPCR methode met afdoende zekerheid kan worden gebruikt om te bepalen of er na een hittebehandeling nog voldoende intacte (infectieuze) virussen in het water aanwezig om een plantinfectie teweeg te brengen moet nader worden bepaald. Ook moet bepaald worden of de methode bruikbaar is voor waterbehandelingen met chloor- en/of UV-desinfectie. Met name voor UV-behandeling zou deze methode minder geschikt kunnen zijn doordat schade aan het RNA en niet zozeer aan het kapsel wordt veroorzaakt. Wanneer de ci-qPCR methode na verdere testen geschikt blijkt om in voldoende mate onderscheid te kunnen maken in infectieuze en niet-infectieuze virussen, dan is een toepassing in de praktijk goed haalbaar. De reguliere qPCR methode wordt al routinematig toepast voor analyses van bacteriën, schimmels en virussen in verschillende watermonsters binnen de (glas)tuinbouw en mobiele versies zijn beschikbaar voor gebruik op locatie.

Onderzocht is of er door een fluorescentiesensor (Biacore; Surface Plasmon Resonantie techniek; SPR) onderscheid gemaakt kan worden tussen infectieuze en niet-infectieuze virusdeeltjes. Hiervoor is gebruik gemaakt van het modelvirus (bacteriofaag) MS2. Met de *plaque-assay* wordt bepaald of MS2 nog infectieus is. MS2 werd behandeld met een reeks aan UV- en chloor ontsmettingsbehandelingen. Een vergelijking tussen de Biacore-detectie en *plaque-assay* laat een redelijk tot goede correlatie zien voor UV desinfectie en chloordesinfectie. Echter, het aantal punten waarop deze correlatie is gebaseerd is beperkt.

Vervolgens is er, met behulp van een tweede fluorescentiesensor (Tecan) instrument, een verband aangetoond tussen de virusverdunding van CGMMV en van PIAMV en de gemeten fluorescentie. Hierbij was het verloop van de fluorescentieafname bij CGMMV duidelijker dan dat bij PIAMV. Dit correspondeerde met de resultaten verkregen met behulp van een routine ELISA-assay.

In de laatste fase van het project is een derde fluorescentie systeem, namelijk de fluorescente probe, gekoppeld aan een handzaam fiber-optisch systeem, gemaakt voor toepassing in de praktijk. Een CGMMV verdunningsreeks werd geanalyseerd en vergeleken met de Tecan fluorescentieassay. De verkregen resultaten toonden aan dat het mogelijk is om met deze eenvoudige prototype CGMMV aan te tonen in drainage water van een kas.

Verdere ontwikkeling en optimalisatie van de ontwikkelde prototype is nodig om het in de praktijk te kunnen gebruiken. Dit houdt in dat de sensor moet worden getest en gevalideerd met meerdere monsters en desinfectiemaatregelen om de betrouwbaarheid te bepalen. Daarbij steeds de vergelijking makende met een laboratorium referentiemethode. Praktijkmetingen moeten vervolgens worden uitgevoerd door tuinders, KWR en Normec Groen Agro Control om te beoordelen of de sensor in de praktijk ook goed bruikbaar is om vroegtijdig een plantenvirus te detecteren en om de effectiviteit van beheersmaatregelen te bepalen.

Populaire samenvatting

Het is belangrijk om een plantenvirusinfectie in de kas snel te detecteren, zodat met behulp van hygiënemaatregelen en preventieve ruiming een grote(re) uitbraak kan worden voorkomen. Telers geven aan dat het risico op een virusinfectie in de kas een belangrijke reden is om water niet te hergebruiken. Dit is dus een belangrijk obstakel voor de realisatie van de emissieloze kas in 2027. Op dit moment is er in de tuinbouw geen betrouwbare manier om continu en snel de aanwezigheid van virussen in het water aan te tonen. Dit gaat ten koste van de reactietijd waardoor een virusinfectie zich verder door de kas kan verspreiden voordat maatregelen getroffen kunnen worden.

In de teelt van komkommer is het risico op een (her)besmetting van komkommerbontvirus een reden om het gebruikte voedings-, en irrigatiewater uit de teelt niet te recirculeren. Ook bij de teelt van Lelie wordt water niet hergebruikt als er een risico is op een besmetting van PlamV virus. Een snelle detectiemethode kan dus helpen om het risico in te schatten en draagt bij aan het vertrouwen om water te hergebruiken.

Bij aanvang van het project gaf de glastuinbouw sector aan dat het belangrijk is om een sensor te ontwikkelen die alleen actief virus detecteert. Bij gebruik van bepaalde ontsmettingstechnieken in de teelt (zoals UV of chloor) worden virussen geïnactiveerd en zijn ze dus niet meer gevaarlijk voor de teelt. Omdat de virusdeeltjes wel in het water aanwezig blijven kan het toch zijn dat ze worden gedetecteerd, terwijl er in feite geen risico is. Daarom is het belangrijk dat een detectiemethode hierin onderscheid kan maken. Ook om te kunnen beoordelen hoe effectief een ontsmettingstechniek is.

Er is binnen dit project onderzoek uitgevoerd naar twee methoden voor een snelle detectie: 1.) het ontwikkelen van een real-time sensor, en 2.) het ontwikkelen van een verbeterde detectiemethode op basis van qPCR.

Voor de ontwikkeling van de sensor is in eerste instantie gekeken naar de mogelijkheden. Op basis van haalbaarheid is gekozen voor een detectietechnologie met behulp van antilichamen. Op dit moment wordt namelijk routinematig gebruik gemaakt van antilichamen voor de detectie van virus in het laboratorium (ELISA techniek). Antilichamen zijn heel specifiek voor een bepaalde stof (meestal een eiwit). Door antilichamen te gebruiken die specifiek zijn voor een bepaalde virus, wordt het mogelijk deze te detecteren. Hiervoor is het nodig de antilichamen zichtbaar te maken door bijvoorbeeld een kleurstof. In de beoogde sensortechniek wordt een antilichaam gebruikt dat specifiek is voor komkommerbontvirus een andere voor PlamV.

Binnen het onderzoek is eerst gebruik gemaakt van een bestaande laboratoriumopstelling (Biacore). Hiermee kan gedetailleerd onderzoek uitgevoerd worden naar het gebruik van antilichamen voor de detectie van een virus. Deze opstelling is voorzien van allerlei handigheden, zodat ook de mate van binding van het antilichaam aan het virus zichtbaar kan worden gemaakt (de sterkte van de binding). Deze mate van binding kan gebruikt worden voor het onderscheid maken tussen actief en inactief virus. Immers, het inactief virus is beschadigd en zal een minder goede binding laten zien met het antilichaam. Vervolgens is gebruikt gemaakt van een meer hanteerbare laboratoriumopstelling (TECAN). Deze opstelling is minder uitvoerig in mogelijkheden voor onderzoek, maar hiermee kun je sneller en in grotere aantallen testen uitvoeren. Uiteindelijk is het systeem met antilichaam overgezet naar een standaard Sendot-detectiesysteem met *fibre-optics*. Dit systeem is handzaam en heeft de potentie om op termijn in de praktijk in een kas te worden gebruikt.

In dit onderzoek is het gelukt om een eerste prototype sensor te ontwikkelen met het handzame detectiesysteem. Deze sensor is in staat om virus te detecteren, maar nog niet real-time (d.i. continu). Vervolg onderzoek zou gericht moeten zijn op mogelijkheden om de sensor geschikt te maken voor real-time detectie door een aanpassing waarbij het virus wordt losgemaakt van het antilichaam zodat

deze opnieuw beschikbaar komt voor detectie van een volgende virus. Verder moet de eerste prototype uitgebreid worden getest en gevalideerd voordat het in de praktijk kan worden toegepast.

Daarnaast, is in het onderzoek gekeken naar een detectie techniek op basis van erfelijk materiaal, namelijk het RNA of DNA van de plantvirussen. In het laboratorium wordt routinematig gebruik gemaakt van DNA-detectietechnieken op basis van een techniek dat qPCR heet (bijvoorbeeld ook voor detectie van het coronavirus). Voordeel van de qPCR techniek is dat het heel gevoelig is, breed inzetbaar voor verschillende plantenvirussen en routinematig wordt ingezet. Voornaamste nadeel is dat het ook het genetisch materiaal detecteert van geïnactiveerde virusdeeltjes Dit systeem kan niet realtime worden ingezet voor een continue monitoring. De analyse vindt plaats in het laboratorium.

Om toch onderscheid te kunnen maken tussen actief en inactief virus is een aangepaste qPCR methode opgezet en getest. Deze methode heet *Capsid Integrity-PCR* (ci-qPCR). Binnen dit project is kort onderzocht of deze methode een goede aanvulling kan zijn op een sensor. Uit het onderzoek is gebleken dat ci-qPCR onderscheid kan maken tussen actief-, en inactief virus. Of dit onderscheid voldoende betrouwbaar is om in de kas in te kunnen zetten moet in een vervolgonderzoek nader worden onderzocht. Ook zouden opties verkend moeten worden waarmee de methode in de kas kan worden gebruikt zodat voldoende snel resultaat wordt verkregen om – indien nodig – actie te kunnen ondernemen.

1 Inleiding

1.1 Aanleiding en urgentie

Virussen zijn verantwoordelijk voor een indrukwekkende lijst aan ziektes bij planten, dieren en mensen. Er is vaak weinig aan te doen als, met name planten, eenmaal besmet is een infectie niet meer te stoppen, aangezien er geen adequate antivirale middelen beschikbaar zijn. Daarom is het belangrijk om een virusinfectie in de kas snel te detecteren om met behulp van hygiënemaatregelen en preventieve ruiming een grote(re) uitbraak te voorkomen. Telers geven aan dat het risico op een virusinfectie in de kas, en daardoor ruiming en derving van inkomsten, nog één van de belangrijkste redenen is om water niet te hergebruiken. Dit is daarom een belangrijk obstakel voor de realisatie van de emissieloze kas in 2027.

De meeste stabiele virussen in de tuinbouw zoals tobamovirussen, potexvirussen en viroïdes kunnen via water verspreid worden. Het risico van verspreiding van een virusinfectie door de hele kas vormt een belemmering voor de kringlooplandbouw, en meer specifiek het hergebruik van water. Behandeling van besmet water is zeer kostbaar en vaak niet mogelijk. Een belangrijk voorbeeld hiervan is het komkommerbontvirus (cucumber green mottle mosaic virus, CGMMV, Tobamovirus). Dit virus is zeer stabiel en kan alleen geïnactiveerd worden door een blootstelling aan hoge dosis UV-C (250 mJ/cm²), ontsmettingsmiddel (bijv. actief chloor of waterstofperoxide) of hoge temperatuur (95°C). Komkommertelers benoemen dit virus als een van de belangrijkste oorzaken waardoor recirculatie van water in de kas bemoeilijkt wordt. Virussen uit de Tobamovirus-groep kunnen meer dan 800 plantsoorten infecteren en zijn verantwoordelijk voor economische schade aan diverse tuinbouwgewassen. Ook *Plantago asiatica* mosaic virus (PIAMV), uit de Potexvirus-groep, is een stabiel virus en moeilijk te inactiveren.

Virussen worden op verschillende manieren overgedragen, via de waterstromen zoals oppervlaktewater, via zaad, mechanisch en door middel van vectoren zoals insecten. Binnen dit project ligt de focus op waterstromen in de tuinbouw en wordt er een proof-of-principle onderzocht wat tevens valide is voor de drinkwatersector. De meeste stabiele virussen zoals tobamovirussen, potexvirussen en viroïdes kunnen via water verspreid worden. Een andere vraag is of de virussen dan ook via het recirculatiewater de wortels kunnen besmetten. Soms is het niet duidelijk of het dan een mechanische besmetting is of dat het echt door de wortels actief wordt opgenomen. Komkommerbontvirus kan ieder geval wel wortels besmetten. Van andere virussen is het niet bekend.

1.2 Detectie van virussen in water in de kas

Op dit moment is er in de tuinbouw geen betrouwbare manier om continu en snel de aanwezigheid van virussen in het water aan te tonen. Veel bestaande methodes om virus in kaswater aan te tonen zijn vaak complex, te kostbaar of te langzaam (analysetijd van enkele dagen). De meest gebruikte technieken (PCR en ELISA) worden onnauwkeurig bij lage virusconcentraties wat juist het geval is bij aanvang van een virusbesmetting. Dit gaat ten koste van de reactietijd waardoor een virusinfectie zich verder door de kas kan verspreiden voordat maatregelen getroffen kunnen worden.

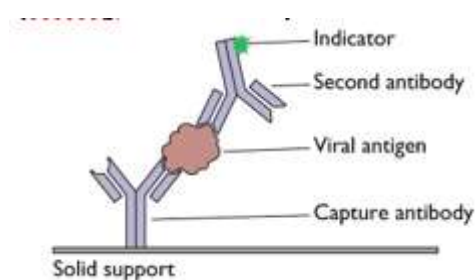
Dankzij voortschrijdende ontwikkelingen in de sleuteltechnologieën optiek (fotonica), elektronica, sensortechnologie en biotechnologie is het nu in theorie mogelijk om snel en real-time virussen aan te tonen. De ontwikkeling van biosensoren voor snelle en kosteneffectieve real-time detectie van virussen in water gaat snel. Op dit moment bestaan er nog geen biosensoren voor virussen, maar sensoren op basis van fluorescentie liggen wel bijna binnen handbereik. Beschikbaarheid van een sensor waarmee real-time de aanwezigheid van virussen in water kan worden bepaald, en zo vroeg kan waarschuwen, leidt uiteindelijk tot een beperking van de verspreiding van virussen en daardoor minder inzet van ontsmettingsmiddelen, minder economische schade en een groter vertrouwen in het hergebruik van water.

1.2.1 Nieuwe detectiemethoden

Naast de gevestigde detectiemethoden zoals ELISA en RT-PCR, zijn er meerdere andere detectiemethoden, bijvoorbeeld gebaseerd op een elektrochemische-, thermometrische-, piezo-elektrische- of magnetische detectietechniek. Deze methoden zijn echter vaak nog in een fundamenteel stadium van onderzoek of hebben moeilijk op te lossen inherente nadelen en staan nog ver van toepassing in de praktijk. Optische sensoren zijn doorgaans verder ontwikkeld, al in diverse varianten commercieel verkrijgbaar, relatief goedkoop en liggen daarom binnen bereik van een praktische toepassing.

Een van de mogelijke optische technologieën is de Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). Dit is een gevoelige detectietechniek en kansrijk voor toepassing. Het is een oppervlaktegevoelige techniek detectie van enkele moleculen (b.v. een virusdeeltje) mogelijk is. Een nadeel is dat de benodigde Raman laser- en detectieapparatuur erg kostbaar is. Een andere optische methode is de Surface Plasmon Resonantie techniek (SPR) waarmee kleine massaveranderingen aan het directe oppervlak van een goudlaagje gemeten kan worden. B.v. adsorptie van moleculen op een oppervlak. De techniek leent zich bij uitstek voor het zeer gevoelig detecteren van interacties een virus (antigenen) en de sensor (antilichamen). SPR-technologie wordt momenteel echter alleen in het laboratorium gebruikt en de apparatuur is relatief kostbaar.

Een derde en meer kosteneffectieve technologie is fluorescentie detectie (zie figuur 1). Fluorescentietechnieken zijn meestal erg gevoeligheid en er zijn praktische en voordelige sensorsystemen te ontwikkelen (Koopal, 2016). De SPR en SERS- methoden, zoals hierboven omschreven, kunnen eenvoudig worden omgezet naar fluorescentiesensoren door op de juiste plek een fluorescente molecuul (probe) toe te voegen aan de analyse. Net als bij ELISA, kan deze probe worden aangebracht op het detectie-antilichaam, zie het groene 'indicatordeeltje' op het secundaire antilichaam getoond in figuur 1 hieronder. Het sensoroppervlak en de detectieapparatuur zijn bij een fluorescentiemethode veel goedkoper dan bij SPR of SERS. Bovendien zijn glazen of kunststof substraten die geschikt zijn voor fluorescentiedetectie en met vergelijkbare specificaties als SPR commercieel verkrijgbaar (b.v. Schott Nexterion of PolyAn). Een belangrijk voordeel, naast de kosten, is dat net als bij SPR en SERS, sensoren op basis van fluorescentie geen ontwikkeltijd van de probe nodig hebben zoals bij ELISA, maar direct kunnen worden gemeten.



Figuur 1. Voorbeeld van detectie van virussen met fluorescente probes ('indicator' in dit figuur) waarbij een antilichaam specifiek voor een bepaald virus gebonden is aan een oppervlakte ('capture antibody'), zoals glas ('solid support').

1.3 Doel en opzet

Het doel van dit project is om een prototype optische biosensor (proof-of-principle/demonstrator) te ontwikkelen waarmee plantenvirussen in waterstromen op glastuinbouwbedrijven kunnen worden gedetecteerd. De virusdetectie wordt op laboratoriumschaal onderzocht aan de hand van drie (model)virussen; komkommerbontvirus (CGMMV), Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV) en de modelbacteriofaag MS2. Aan de hand van criteria zoals gevoeligheid,

kostprijs en (verwacht) traject naar commercialisatie wordt de meest kansrijke toepassing verder worden ontwikkeld voor toetsing in de praktijk.

Met behulp van de immobilisatie van antilichamen in combinatie met fluorescentiedetectie, wordt een prototype biosensor ontwikkeld voor de real time detectie van CGMMV, PIAMV en MS2 in (recirculatie)water. De randvoorwaarden voor werking worden onderzocht met standaard water met daarin organische stof in een standaard labopstelling. Vervolgens wordt de labopstelling nageemaakt met behulp van fibre-optic technologie. Het prototype sensor wordt gevalideerd en getoetst in de praktijk.

2 Detectiemethoden en virussen

2.1 Huidige detectiemethoden om virus in kaswater aan te tonen

Op dit moment worden virussen in de waterstromen gedetecteerd door gespecialiseerde laboratoria voor de tuinbouw. Dit wordt gedaan met behulp van ELISA antilichaam detectie, (q)PCR technieken (detectie van RNA en DNA) en test strips (antilichamen). Om onderscheid te maken tussen infectieuze (levende) en niet-infectieuze (dode) virussen worden biotoetsen met levende planten gebruikt (figuur 2). Soms wordt ook gebruik gemaakt van gevoelige waardplanten in de teelt. Deze worden op strategische plekken in de teelt gezet. Maar het gebruik van waardplanten brengen extra risico met zich mee, zoals introductie met de plant van ziekten en plagen. Er is op dit moment geen real-time analyse mogelijk.



Figuur 2. Opstelling met *toets planten (bio-assay)* om *levend virus* aan te tonen.

2.1.1 Test strips

Met test strips zitten er antilichamen op de strips en hiermee kan water getest op de aanwezigheid van virussen. Deze methode is echter zeer indicatief en geeft soms valse positieven.

2.1.2 qPCR

De quantitative PCR (qPCR) is een veelgebruikte techniek waarmee organismen gedetecteerd en gekwantificeerd worden op basis van hun genetisch materiaal (DNA of RNA). Het is een amplificatietechniek waarbij de toename van het DNA real-time wordt gevolgd. Deze techniek is gebaseerd op een Polymerase Ketting Reactie (PCR) waarbij een kleurstof wordt vrij gemaakt bij elke vermenigvuldiging van het DNA. De snelheid van de toename in kleurstof is afhankelijk van de hoeveelheid DNA dat oorspronkelijk in het monster zat. Met behulp van speciale fluorescente labels kan de kleurontwikkeling gemeten worden en de oorspronkelijke hoeveelheid van het op te sporen DNA bepaald worden.

De qPCR heeft als voornaamste voordelen dat het zeer nauwkeurig en gevoelig is. Er is ondertussen jarenlange ervaring met de techniek (bv. tijdens COVID-19 pandemie) en het is toegepast op veel verschillende type monsters, waaronder water. Een qPCR analyse is relatief snel uit te voeren (binnen 24 uur), er zijn methoden beschikbaar die het mogelijk maken on-site analyses uit te voeren waarmee de analysetijd wordt verkort tot 1,5-2 uur. Ook is het relatief eenvoudig om analyses

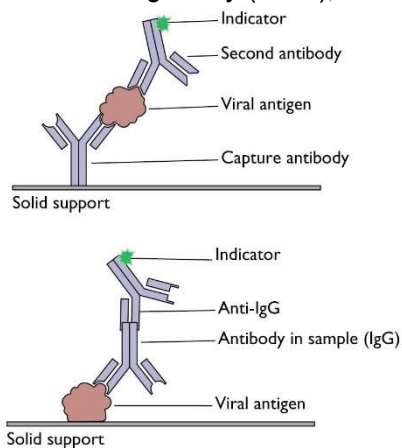
te ontwikkelen voor nieuwe organismen en analyses gelijktijdig uit te voeren voor meerdere organismen.

Voornaamste nadeel van de techniek is dat het ook het genetisch materiaal kan detecteren van organismen die zijn afgestorven en/of niet meer besmettelijk zijn. Daarmee kunnen vals positieven worden gemeten, dit is met name een risico vlak na een desinfectiestap. Een aantal ontwikkelingen zijn omschreven in de literatuur die het mogelijk maken om met qPCR enkel het genetisch materiaal te detecteren van intacte/levende en dus mogelijk nog infectieuze virussen. Dit wordt een *capsid integrity* (ci)qPCR genoemd. Omdat de qPCR binnen de tuinbouw een veel toegepast methode is, is besloten om binnen het project ook testen uit te voeren met verschillende ci-qPCR methoden om te beoordelen of deze mogelijk van meerwaarde kunnen zijn.

Voor sommige reacties kan qPCR gevoeliger zijn dan een ELISA techniek (Chen et al. 2010). Maar door recente ontwikkelingen in een versterking van het ELISA signaal zijn beide methoden vergelijkbaar qua gevoeligheid, al blijft de qPCR gevoeliger voor detectie van virussen in water.

2.1.3 ELISA: serologische detectie met antilichamen

De *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) is een gevoelige detectietechniek (Engvall & Perlmann, 1972; figuur 3). Het heeft een detectiegrens van 10^{-12} tot 10^{-9} mol per liter (Racaniello 2010). De detectie vindt plaats door binding van de eiwitten met antilichamen die gelabeld zijn. Dit wil zeggen dat ze chemisch gekoppeld worden aan een enzym zoals peroxidase dat via een of meer tussenstappen een kleurstof doet ontstaan. Hoe meer van de te detecteren stof aanwezig was, hoe meer enzymwerking gebonden wordt en hoe meer kleurstof er uiteindelijk ontstaat. Er zijn verschillende varianten zoals *antigen-coated plate enzyme-linked immunosorbent assay* (ACP-ELISA), *triple antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay* (TAS-ELISA), *Dot-immunobinding assay* (DBIA), en *direct tissue blot immunoassay* (DTBIA) (Shang et al. 2011).



Figuur 3. ELISA technologie varianten met antilichamen (Uit: Racaniello 2010).

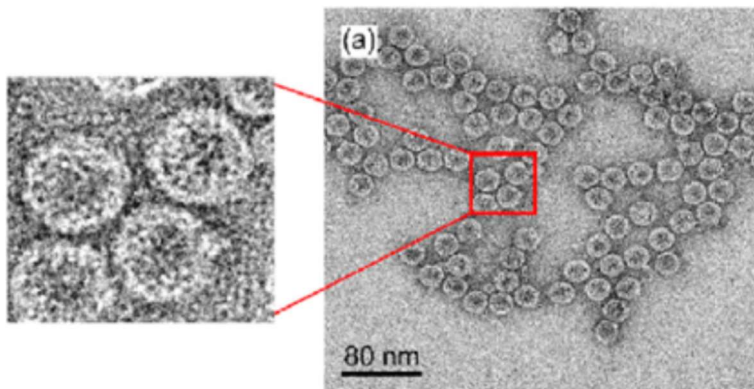
2.1.4 Biotoetsen

Voor een biotoets worden de te testen monsters van plantensap of water ingebracht op jonge waardplanten voor een virus. Na een paar weken wordt getoetst of de planten geïnfecteerd zijn geraakt met het virus. Deze toetsing kan met ELISA of (RT)-PCR uitgevoerd worden. Het aantal planten dat positief is gescoord op het totaal aantal planten is een maat voor de hoeveelheid infectieus virus in het monster.

2.2 Virussen

2.2.1 Bacteriofaag MS2

Bacteriofaag MS2 is een *positive-sense single-stranded RNA virus* en een groep IG-specifieke bacteriofaag. Het infecteert *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* en andere vertegenwoordigers van de Enterobacteriaceae. MS2 is icosahedraal van vorm met een diameter van 26 nm en een isoelektrisch punt van 3,5, wat aangeeft dat het onder de meeste omstandigheden een negatieve oppervlaktelading heeft. Een voorbeeld van MS2 is gegeven in Figuur 4.



Figuur 4. *Transmission Scanning Electronenmicroscopie foto van MS2 bacteriofagen (Uit: Soliman, et al, 2020).*

Er is voor MS2 als modelvirus gekozen in dit project omdat er i) veel bekend is over het gedrag van MS2 bij desinfectie met o.a. chloor en UV, ii) omdat de methode waarmee het aantal levende MS2 bacteriofagen wordt bepaald (plaque assay) makkelijk is om uit te voeren, en iii) er monoclonale antilichamen beschikbaar zijn om de methode op prototype virussensor mee op te zetten en uit te voeren.

2.2.2 Komkommerbontvirus (CGMMV)

CGMMV is een staafvormig virus van ongeveer 300 nm lang en 18 nm in diameter. Een foto van CGMMV-deeltjes is gegeven in Figuur 5. Het virus behoort tot de Tobamovirussen en kan naast komkommers ook (water)meloen en pompoen infecteren. Er zijn geen bestrijdingsmiddelen bekend tegen CGMMV als het in de plant aanwezig is, daarnaast zijn de Tobamovirussen veel persistenter (lastiger te verwijderen) dan andere virussen.



Figuur 5. *Electronen microscopische foto van komkommerbontvirus (Uit: Shang, et al. 2011).*

Op dit moment wordt de introductie van die productiesystemen verhinderd doordat planten gevoelig zijn voor de virusaanvallen. Dit geldt met name voor de komkommerteelt, waar de introductie van hoge draadteelten en belichting, verhinderd wordt door het komkommerbontvirus (CGMMV). Door het virus ontstaat jaarlijks een grote schade bij komkommertelers door een veel lagere omzet. CGMMV wordt overgebracht via waterstromen, insecten, via het zaad en mechanisch door gewaswerkzaamheden.

CGMMV is feitelijk de reden dat jaarrond telen en zgn. “hogedraadteelt” met komkommer niet mogelijk is. Bij een “hogedraadteelt” worden de stengels veel langer dan in een gangbare teelt. In een hogedraadteelt is er meestal sprake van één teeltcyclus, terwijl bij een gangbare teelt uitgaat van drie teeltcycli. Bij de gangbare teelt gaat men van stamvruchten over naar rankvruchten als de stengel bij de gewasdraden komen. Bij een hogedraadteelt, laat men de stengel zakken, zodat met continu stamvruchten kan oogsten, die beter van kwaliteit zijn dan de rankvruchten. Het kasareaal komkommers is 570 ha in Nederland waarvan 80 ha belicht met 212 telers. De symptomen zijn dat planten niet meer groeien dus de teelt opnieuw gestart moeten worden. Symptomen (Figuur 6.) treden voornamelijk op tijdens de zomer. De schade kan oplopen tot 10% opbrengstverlies.



Figuur 6. Komkommerbladeren en -vruchten met symptomen van CGMMV.

2.2.3 PIAMV

Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV) is een virus uit de potexvirus groep. Het zijn staafvormige virussen van 490-530 nm lang en 10-15 nm breed. Een microscopische foto van PIAMV is gegeven in Figuur 7. Virussen uit deze groep worden voornamelijk mechanisch verspreid van plant naar plant. Dit virus kan vlekken op de bladeren en uitval veroorzaken in de lelieteelt (Figuur 7). Als in dompelwater, om bollen te spoelen, PIAMV aanwezig is, kunnen de bollen besmet raken, zeker als de bollen beschadigd zijn door snijhandelingen. Als een groot percentage van een partij bollen besmet zijn, wordt een partij afgekeurd.



Figuur 7. Lelieplanten die aangetast zijn door PIAMV (bron links: *Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, Wageningen UR*; bron midden: *USDA ARS*) en rechts een elektronen microscopische foto van PIAMV (bron: *Komatsu, K., Hammond, J.*).

3 Uitgevoerde werkzaamheden en resultaten

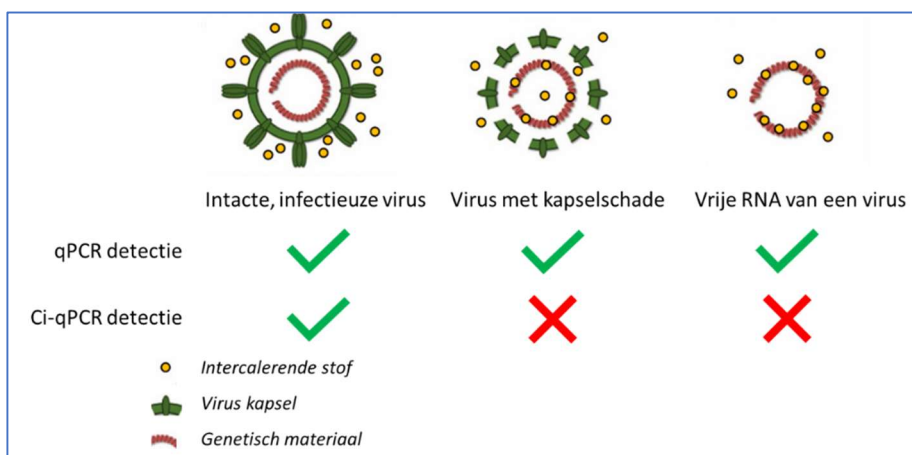
In dit hoofdstuk wordt kort besproken welke experimenten zijn uitgevoerd en hoe deze zijn uitgevoerd, gevolgd door het resultaat. Gedetailleerde informatie over de experimentele opzet en gekozen parameters staat vermeld in bijlage 1 en bijlage 2.

3.1 Onderscheid infectieuze en niet-infectieuze CGMMV met ci-qPCR

Het doel van deze testen was om te beoordelen of een *capsid integrity* qPCR (ci-qPCR) methode kansrijk is om onderscheid te kunnen maken tussen intacte (geen kapselschade) en beschadigde (met kapselschade) virussen na een desinfectiestap. De aanname was dat wanneer een virus kapselschade heeft, deze niet meer infectieus is. In dit rapport zijn de eerste verkennende testen met ci-qPCR uitgevoerd, de methode is niet vergaand gevalideerd of geoptimaliseerd binnen dit project.

Een qPCR analyse detecteert en kwantificeert het genetisch materiaal (DNA of RNA) van een virus. De qPCR methode kan echter geen onderscheid maken tussen genetisch materiaal dat afkomstig is van infectieuze of niet-infectieuze virussen (Figuur 8). Een reguliere qPCR is daarom niet geschikt om te beoordelen of een waterbehandelingstechniek (UV, hitte, chloor) effectief is in het inactiveren van virussen (wel als het een fysieke verwijdering betreft uit het water door middel van filtratie).

De ci-qPCR methode bestaat uit een voorbehandeling van het te analyseren monster waarna een reguliere qPCR wordt uitgevoerd. Tijdens de voorbehandeling wordt een stofje toegevoegd dat sterk aan genetisch materiaal (DNA/RNA) bindt, dit wordt een intercalerend stofje genoemd. Indien het kapsel (omhulsel) van een virusdeeltje beschadigd is, bijvoorbeeld als gevolg van een desinfectiestap, kan het intercalerende stofje het virus binnendringen en zal het aan het DNA/RNA binden. DNA/RNA dat is gebonden aan dit intercalerende stofje is niet meer detecteerbaar met een qPCR analyse. In theorie zal de qPCR analyse dan enkel het DNA/RNA van intacte virusdeeltjes detecteren. De aanname bij een ci-qPCR analyse is dat virussen met kapselschade niet-infectieus zijn. Intacte virusdeeltjes hoeven niet infectieus te zijn, bv door schade aan de receptor waarmee het virus aan de gastheercel bindt. Daarom wordt er hier gesproken van kapselschade.



Figuur 8. Het verschil tussen een reguliere qPCR en de ci-qPCR methode in het al dan niet kunnen detecteren van virusdeeltjes.

De effectiviteit van de ci-qPCR methode is afhankelijk van verschillende factoren, met name:

- Het intercalerende stofje moet het beschadigde virusdeeltje binnen kunnen dringen, dit is afhankelijk van o.a. de lading en grootte van het stofje.
- De mate van en type schade aan het virusdeeltje is ook van belang. Desinfectie met UV-straling beschadigt het genetisch materiaal van virussen waardoor ze niet meer infectieus zijn, maar UV zal in mindere mate de kapsel van virusdeeltjes beschadigen. Dit zou betekenen dat

het intercalerende stofje het virusdeeltje niet binnen kan dringen en het genetisch materiaal alsnog kan worden gedetecteerd met de qPCR analyse.

Verskillende ci-qPCR methoden zijn in de literatuur omschreven waarvan vijf zijn getest binnen dit project op CGMMV in een drinkwatermonster. Hierbij is een hittebehandeling (verschillende temperaturen en incubatietijden) als desinfectiemethode gebruikt. De aanpak en resultaten worden hieronder beknopt beschreven, een beschrijving van de methode is te vinden in bijlage 1.

3.1.1 Ci-qPCR methoden

Op basis van een deskstudie is een selectie gemaakt van te testen ci-qPCR methoden. De te gebruiken concentraties en incubatietijden/-temperaturen zijn gebaseerd op de beschikbare informatie uit wetenschappelijke literatuur (Canh et al., 2022; Canh et al., 2021; Leifels et al., 2021).

1. PMAxx: is een merknaam voor een gemodificeerde versie van propidium monoazide (PMA) van de leverancier Biotium. PMAxx wordt aan een monster toegevoegd waarna het bij incubatie in het donker zwak bindt aan het beschikbare DNA en RNA. Door het monster vervolgens in sterk licht te incuberen bindt het covalent aan het DNA/RNA waardoor deze niet meer kan worden gedetecteerd met qPCR (Chai et al., 2022; Leifels et al., 2021; Shirasaki et al., 2020).
2. CDDP: Cis-dichlorodiammine platinum (II) is één van meerdere bekende platinaverbindingen die binden aan DNA en RNA waardoor het niet meer kan worden gedetecteerd met qPCR. Voordelen van dergelijke stoffen is dat ze relatief goedkoop zijn en geen incubatie in licht nodig hebben. Voornaamste nadeel is dat ze toxisch zijn en daarom mogelijk niet op grote schaal buiten een laboratorium kunnen worden gebruikt (Cechova et al., 2021; Fraise et al., 2018; Leifels et al., 2021).
3. PMAxx-SD: In sommige gevallen is gebleken dat een extra behandeling met sodium deoxycholate (SD) de resultaten met PMAxx kan verbeteren. SD is een detergent dat kan helpen het intercalerende stofje de virus binnen te komen zodat het bij het genetisch materiaal kan komen (Canh et al., 2019; Hong et al., 2021; Leifels et al., 2021).
4. ProtK + RNaseA: Deze methode is niet gebaseerd op het gebruik van intercalerende stoffen (die binden aan genetisch materiaal), maar van een enzym dat specifiek RNA afbreekt (RNase A) en een enzym dat eiwitten afbreekt (Proteinase K). Door monsters eerst te behandelen met deze twee enzymen wordt het DNA/RNA dat bereikbaar is voor deze enzymen afgebroken en is het derhalve niet meer beschikbaar voor de qPCR analyse (Pecson et al., 2009).
5. PtCl₄: Platinum(IV) chloride is, net als CDDP (zie nummer 2 hierboven), een platinaverbinding dat in staat is te binden aan DNA/RNA waardoor het niet meer kan worden gedetecteerd met qPCR.

De vijf methoden zijn in twee ronden getest. In ronde 1 zijn testen uitgevoerd met methode 1 en 2. De resultaten zijn vergeleken met de reguliere qPCR-methode, met de biotoets op jonge tabakspplanten en met de Biacore. Ronde 2 was gericht op het optimaliseren van de ci-qPCR methodes en is daarom alleen vergeleken met de reguliere qPCR.

De qPCR analyse die gebruikt is door KWR om CGMMV te detecteren, is gebaseerd op de analyse zoals deze routinematig gebruikt wordt door Normec Groen Agro Control. Omdat de qPCR-methode niet volledig is gevalideerd binnen dit project, worden de qPCR resultaten niet kwantitatief weergegeven in dit rapport (aantal virussen per milliliter), maar als Ct-waarden (het resultaat verkregen met qPCR). Het is van belang om te beseffen dat een lage(re) Ct-waarden overeenkomt met een hoge(re) concentratie CGMMV. En andersom dan dat een hoge(re) Ct-waarde overeenkomt met een lage(re) concentratie CGMMV. Een verschil in Ct-waarde van 3.3 komt ongeveer overeen met een factor 10 toe- of afname in concentratie.

De biotoets die als referentiemethode is gebruikt om te bepalen of het monster voldoende infectieuze CGMMV bevat wordt in paragraaf 3.5 in meer detail omschreven.

3.1.2 Watermonsters

Tabaksplant geïnfecteerd met CGMMV is geleverd door Normec Groen Agro Control aan KWR en is als bron van virus gebruikt voor de uit te voeren testen. CGMMV is uit de tabaksplant geëxtraheerd en de concentratie hiervan is bepaald met qPCR. Vervolgens is CGMMV aan drinkwater toegevoegd in een concentratie waarbij het in staat is planten te infecteren, dit ligt bij een concentratie van het virus dat in theorie rondom de Ct 25 ligt zoals bepaald met qPCR. Dit betekent dat een monster nog vrij hoge concentraties CGMMV kan bevatten, maar dat een plantinfectie dan vrij onwaarschijnlijk is. Voor deze testen is CGMMV gedoseerd aan drinkwater met een qPCR resultaat van ongeveer 21 Ct, dit is dus een hogere concentratie dan de minimale concentratie waarbij plantinfectie optreedt.



Figuur 9. Plantenextract met CGMMV verkregen uit geïnfecteerde tabaksplant. Het plantenextract is gebruikt om CGMMV te doseren aan een drinkwatermonster voor gebruik in de testen.

3.1.3 Hitte behandeling

De temperaturen voor hittebehandeling van de met CGMMV besmette watermonsters zijn gekozen op basis van praktijkervaringen met behandeling van CGMMV in water (persoonlijke communicatie met Normec Groen Agro Control). De testen zijn steeds in tweevoud uitgevoerd.

Tabel 1. Beschrijving van condities van ronde 1 van de *ci-qPCR* methoden in tweevoud ingezet (8 monsters in totaal).

Temperatuur (°C)	Incubatietijd (sec)	Verwachte effect op CGMMV	Opmerkingen
21	600	Geen inactivatie	
70	600	Geen inactivatie	
85	180	Volledige inactivatie	
93	30	Volledige inactivatie	Streef temperatuur was 95°C, maximaal 93°C kon worden behaald

Tabel 2. Beschrijving van condities van ronde 2 van de *ci-qPCR* methoden in tweevoud ingezet (n=12).

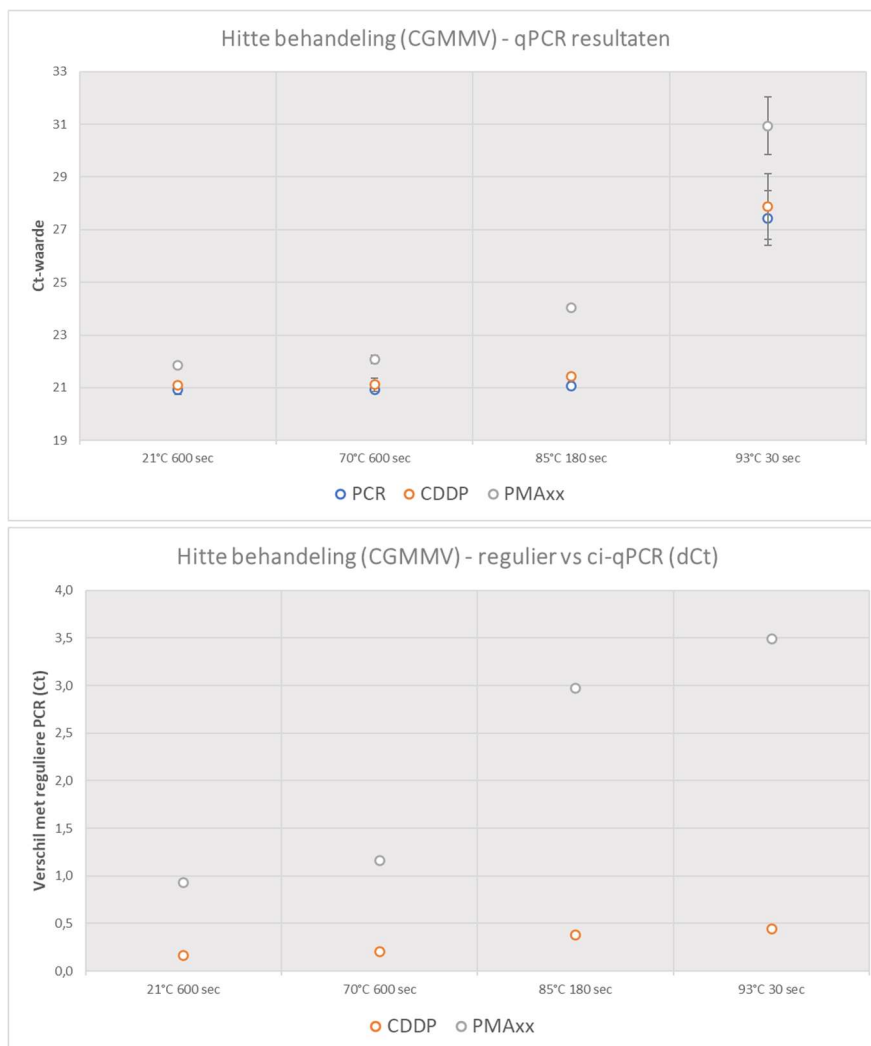
Temperatuur (°C)	Incubatietijd (sec)	Verwachte effect op CGMMV
21	600	Geen inactivatie
85	60	Onbekend
85	180	Gedeeltelijke inactivatie
85	360	Onbekend
85	600	Onbekend

3.1.4 Resultaten ci-qPCR testen

De hitte-behandelde drinkwatermonsters (en een onbehandelde referentie) zijn vervolgens opgesplitst en behandeld met één van de ci-qPCR methoden zoals hierboven omschreven. De reguliere qPCR is als referentie meegenomen.

De verwachting was dat de reguliere qPCR voor alle hittebehandelingen een nagenoeg constant geeft, omdat de hittebehandeling niet het DNA of RNA aantast. Indien effectief, zouden de ci-qPCR methoden hogere Ct-waarden moeten geven (wat overeenkomt met een lagere concentratie CGMMV) aangezien zij enkel de infectieuze CGMMV detecteren.

Resultaten testronde 1



Figuur 10. qPCR resultaten voor CGMMV verkregen in de eerste testronde met de reguliere qPCR (PCR) en met de ci-qPCR methoden CDDP en PMAxx. Boven: Ct-waarden verkregen met de verschillende PCR-methoden. Onder: Verschil in Ct-waarden gemeten tussen de reguliere qPCR en de ci-PCR (CDDP of PMAxx).

Tabel 3. Beschrijving van ronde 1 met PMAxx, CDDP in vergelijking met de biotoets resultaten.

	PMAxx, verschil met reguliere qPCR (dCt)	CDDP, verschil met reguliere qPCR (dCt)	Biotoets (referentie), aantal geïnfecteerde planten uit 5	
			a	b
21°C 600 sec	0,9	0,2	5	5
70°C 600 sec	1,2	0,2	5	5
85°C 180 sec	3,0	0,4	1	2
95°C 30 sec	3,5	0,4	0	0

De voornaamste bevindingen zijn hieronder beknopt omschreven:

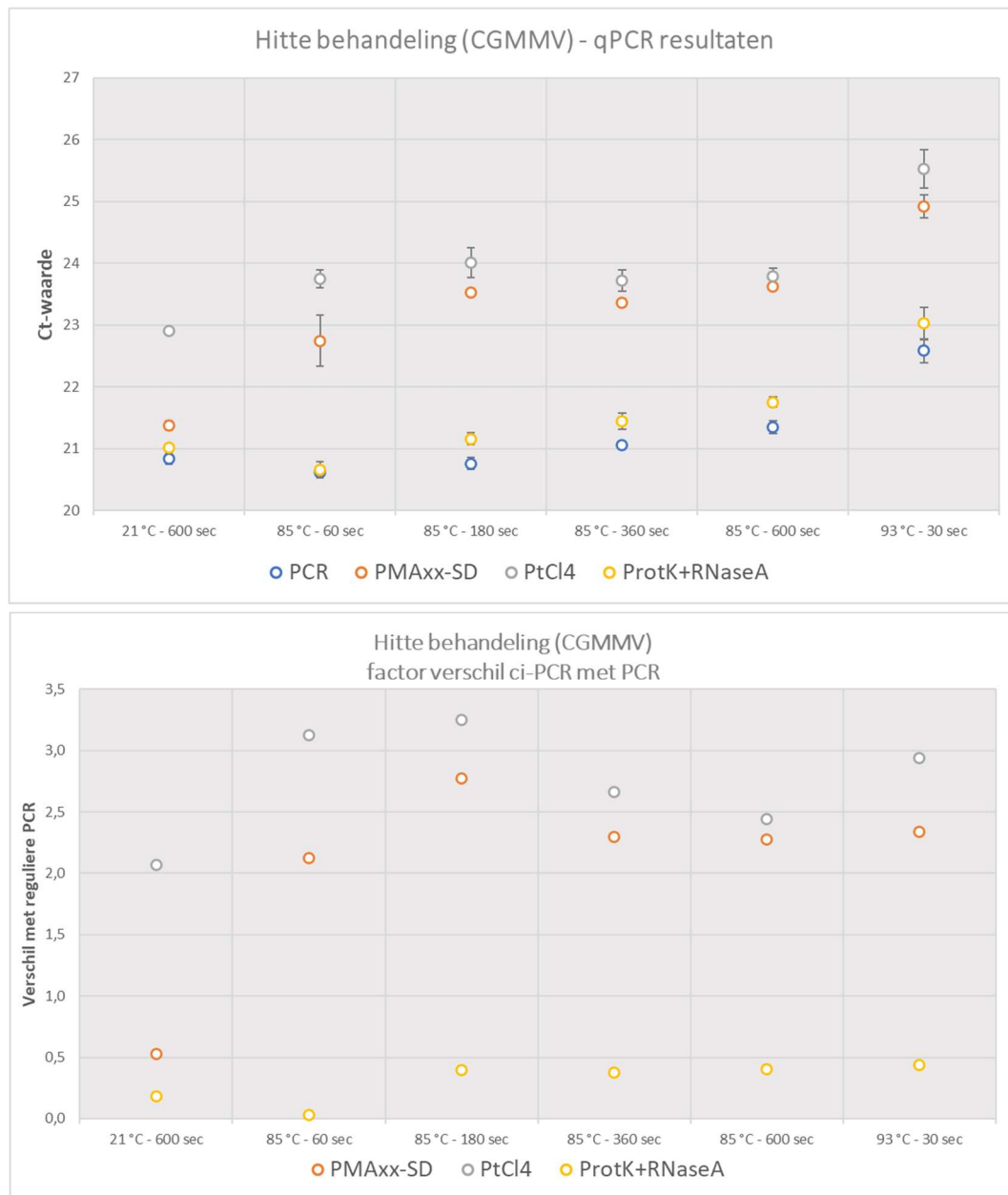
- De biotoets liet zien dat bij de eerste twee behandelingen (21°C en 70°C) nog voldoende infectieuze CGMMV in de watermonsters aanwezig was om alle planten te infecteren. Bij 95°C is duidelijk dat voldoende CGMMV is geïnactiveerd en zijn geen van de planten meer geïnfecteerd. Theoretisch als de Ct-waarde gemeten voor CGMMV met qPCR dan groter geweest dan 25 Ct. Bij 85°C als er sprake van een kantelpunt, een deel van de planten is geïnfecteerd (30%). In theorie zou de Ct-waarde zoals bepaald met qPCR dan rond de 25 Ct moeten liggen.
- Bij de behandeling van 95°C werd de Ct-waarde van de reguliere qPCR hoger, deze nam toe van Ct 21 naar Ct 27,4 (6,4 Ct hoger). Dit komt ongeveer overeen met een factor 100 afname in concentratie van de virus en geeft aan dat het RNA van CGMMV bij deze behandeling begon te degraderen en derhalve niet meer werd gedetecteerd met qPCR. Bij de overige behandelingen bleef de Ct-waarde van de reguliere qPCR, zoals verwacht, rond de 21 Ct.
- CDDP methode: De biotoets liet zien dat bij de behandeling bij 85°C minder infectieuze CGMMV aanwezig waren. De reguliere qPCR liet, zoals verwacht, echter geen verschil zien omdat ook het RNA van niet-infectieuze CGMMV werd gedetecteerd. De resultaten met CDDP verschilden echter weinig met die van de reguliere qPCR (minder dan 0,5 Ct-waarde). Dit geeft aan dat met de CDDP methode geen onderscheid is gemaakt tussen infectieuze en niet-infectieuze virussen.
- PMAxx methode: de resultaten lieten zien dat voor de behandeling bij 20°C en 70°C de Ct-waarden van de PMAxx methode en de reguliere methode ongeveer 1 Ct verschilden. Dit verschil kan komen doordat een deel van de aanwezige virussen al kapselschade had (bv. als gevolg van het invriezen en ontdooien van het plantenmateriaal).
De behandelingen bij 85°C en 95°C lieten een groter verschil zien met de reguliere qPCR van 3,0 respectievelijk 3,5 Ct. Dit geeft aan dat er meer kapselschade was bij de hogere temperaturen waardoor PMAxx kon binden aan het RNA van CGMMV.
Bij 85°C werd ongeveer 24 Ct gemeten met de PMAxx methode, dit ligt in de buurt van de theoretische grens van 25 Ct waarbij de kans dat er voldoende CGMMV aanwezig was om een infectie te veroorzaken klein was. Dit komt ook overeen met de resultaten verkregen met de biotoets (3/10 geïnfecteerde planten).
De gemeten Ct-waarde bij 95°C was ongeveer 31 Ct, deze waarde was veel hoger (ongeveer 9 Ct) dan de onbehandelde monster. Dit ligt ver boven de theoretische grenswaarde van 25 Ct en kwam ook goed overeen met de resultaten van de biotoets (0/5 geïnfecteerde planten).

Op basis van deze resultaten is besloten om nog een tweede testronde uit te voeren met de volgende doelen:

- Optimalisatie van de PMAxx methode, hiervoor is het hulpstofje SD (zie boven) toegevoegd. Indien effectief zou het verschil met de reguliere qPCR groter worden dan de ci-qPCR methode met alleen PMAxx.
- Om nog twee additionele ci-qPCR methoden te testen: de methode met enzymen en met PtCl4 (zie boven voor een toelichting).

Voor de tweede ronde testen zijn geen biotoetsen uitgevoerd. De resultaten zijn steeds vergeleken met de reguliere qPCR.

Resultaten testronde 2



Figuur 11. qPCR resultaten voor CGMMV verkregen in de tweede testronde met de reguliere qPCR (PCR) en de ci-qPCR methoden PMAxx-SD, PtCl4 en ProtK+RNaseA. Boven: Ct-waarden verkregen met de verschillende PCR-methoden. Onder: Verschil in Ct-waarden gemeten tussen de reguliere PCR en de ci-PCR (PMAxx-SD, PtCl4 of ProtK + RNaseA).

De voornaamste bevindingen zijn hieronder beknopt omschreven:

- Net als bij de eerste testronde was te zien dat bij de behandeling van 93°C de Ct-waarde van de reguliere qPCR toenam. In de tweede testronde was er een toename van 20,8 Ct in het onbehandelde monster tot 22,5 Ct (verschil van 1,7 Ct). Dit was minder dan in de eerste testronde waar de toename 6,4 Ct was. Bij de overige behandelingen bleef de Ct-waarde van de reguliere qPCR, zoals verwacht, rond de 21 Ct (tussen 20,6 en 21,4).
- ProtK+RNaseA: het verschil met de reguliere qPCR was met deze methode klein voor elk van de behandelingen (0 tot 0,4 Ct). Dit geeft aan dat deze methode niet geschikt was om onderscheid te maken tussen virussen met kapselschade en die zonder kapselschade.

- PtCl4: Het verschil tussen de reguliere qPCR en deze methode was voor alle behandelingen vrij groot (tussen 2,1 en 3,3 Ct). Dit geldt echter ook voor de onbehandelde CGMMV waarbij de verwachting was dat geen/weinig kapselschade zou optreden. Dit lijkt aan te geven dat PtCl4 ook intacte virussen binnen kon dringen en aan het RNA bindt waardoor deze ook niet meer werden gedetecteerd met qPCR. Dit is onwenselijk omdat het verschil tussen intact en beschadigd wordt vertroebeld. Het verschil tussen het onbehandelde monster (voldoende CGMMV om alle testplanten te infecteren) en de behandeling bij 93°C was 2,6 Ct wat nog geen factor 10 verschil is in concentratie CGMMV. Dit geeft aan de geteste methode met PtCl4 minder geschikt was om onderscheid te maken tussen virussen met kapselschade en die zonder kapselschade.
- PMAxx-SD: Het verschil tussen deze methode en de reguliere qPCR was voor het onbehandelde monster, zoals verwacht, relatief klein (0,5 Ct). Zoals verwacht werd dit verschil groter voor de behandelingen bij 85°C en 93°C (2,1 tot 2,8 Ct). De Ct-waarden van de drie behandelingen bij 85°C waren hoger dan het onbehandelde monster (tussen 22,8 en 23,6 Ct) en die van de behandeling bij 93°C was het hoogst (24,9 Ct). Dit was conform de verwachtingen, al viel op dat ook bij deze methode de Ct-waarde bij de 95°C behandeling minder hoog was dan voor PMAxx bij de eerste testronde (24,9 Ct respectievelijk 30,9 Ct). Al komt de trend van deze methode redelijk overeen met de verwachtingen, is het verschil tussen de PMAxx-SD methode en de reguliere qPCR minder groot en zijn de trends vergelijkbaar. Er lijkt daarmee geen toegevoegde waarde te zijn in het gebruiken van het hulpstofje SD.

3.1.5 Conclusies en aanbevelingen

De ci-qPCR methode die gebruik maakte van het intercalerende stofje PMAxx is op basis van deze eerste testen het meest effectief gebleken om onderscheid te kunnen maken tussen virussen met en zonder kapselschade als gevolg van een hittebehandeling. De toevoeging van SD aan de PMAxx methode had geen toegevoegde waarde. De methoden met CDDP en RNaseA+ProtK waren niet geschikt omdat ze, net als de reguliere qPCR, geen onderscheid konden maken tussen virussen met en zonder kapselschade. De methode met PtCl4 liet hierin wel een verschil zien, maar deze was kleiner dan die met PMAxx, met name omdat het er op lijkt dat PtCl4 ook deels in intacte CGMMV kan binnendringen.

Of de PMAxx ci-qPCR methode met afdoende zekerheid kan worden gebruikt om te bepalen of er na een hittebehandeling nog voldoende intacte (infectieuze) virussen in het water aanwezig om een plantinfectie teweeg te brengen moet echter nog worden bepaald. De drempelwaarde van 25 Ct - waarboven de kans klein is dat er voldoende CGMMV in het water aanwezig is om een plantinfectie te veroorzaken - zou in combinatie met de PMAxx methode ook nader moeten worden gevalideerd.

Verder is het aan te raden om de PMAxx methode verder te optimaliseren (bijvoorbeeld variaties in toegevoegde concentraties en incubatietijden) en te valideren. Bepaald moet worden of de methode ook bruikbaar is voor waterbehandelingen met chloor- en/of UV-desinfectie. Met name voor UV-behandeling zou deze methode minder geschikt kunnen zijn doordat schade aan het RNA en niet zozeer aan het kapsel wordt veroorzaakt.

Wanneer de ci-qPCR methode na verdere testen geschikt blijkt om in voldoende mate onderscheid te kunnen maken in beschadigde en niet-beschadigde virussen, dan is een toepassing in de praktijk goed haalbaar. De reguliere qPCR methode wordt al routinematig toepast voor analyses van bacteriën, schimmels en virussen in verschillende watermonsters binnen de (glas)tuinbouw. Al is de qPCR methode geen online analyse, het is wel mogelijk om resultaten binnen 24 uur te verkrijgen middels een labanalyse en er zijn methoden beschikbaar die een on-site analyse mogelijk maken waarmee resultaten binnen 1,5 tot 3 uur worden verkregen.

3.2 Detectie van infectieuze en niet-infectieuze MS2

Om te testen of de Biacore in staat is om virussen te detecteren en hierbij het onderscheid te maken tussen 'levend' (infectieus) en 'dood' (niet-infectieus) virus, zijn eerst experimenten uitgevoerd met het modelvirus MS2. Er is voor een modelvirus gekozen omdat de conventionele referentiemethode (plaque assay) makkelijk en goedkoop uit te voeren is en daarmee makkelijk te vergelijken met het prototype van de virussensor (Biacore).

Hiervoor is eerst MS2 tot grote aantallen opgekweekt (1×10^8 plaque vormende eenheden/ml [pve/ml]) en vervolgens blootgesteld aan desinfectie met chloor of aan UV om de virussen af te doden en daarmee niet-infectieus te maken. Het effect van deze behandeling op MS2 is bepaald met de plaque assay om onderscheid te maken tussen 'levend' en 'dood' virus, met de qPCR waarmee dit onderscheid minder goed kan worden gemaakt (zie ook paragraaf 3.1) en met de Biacore (besproken in paragraaf 3.3).

3.2.1 Chloordesinfectie

Voor chloordesinfectie zijn contacttijden van 1 en 5 minuten gebruikt en een vrij chloorconcentratie van 0,01 mg/l; 0,1 mg/l; 0,5 mg/l; 1 mg/l; 10 mg/l en 100 mg/l. Hiermee kan de CT-waarde (contacttijd * concentratie = mg*min/l; Tabel) berekend worden om zo de verschillende condities met elkaar te vergelijken. Een uitgebreidere beschrijving van de methode is opgenomen in Bijlage 2.

Tabel 4. Concentratie, contacttijd en CT-waarden voor de chloordesinfectie-experimenten met MS2.

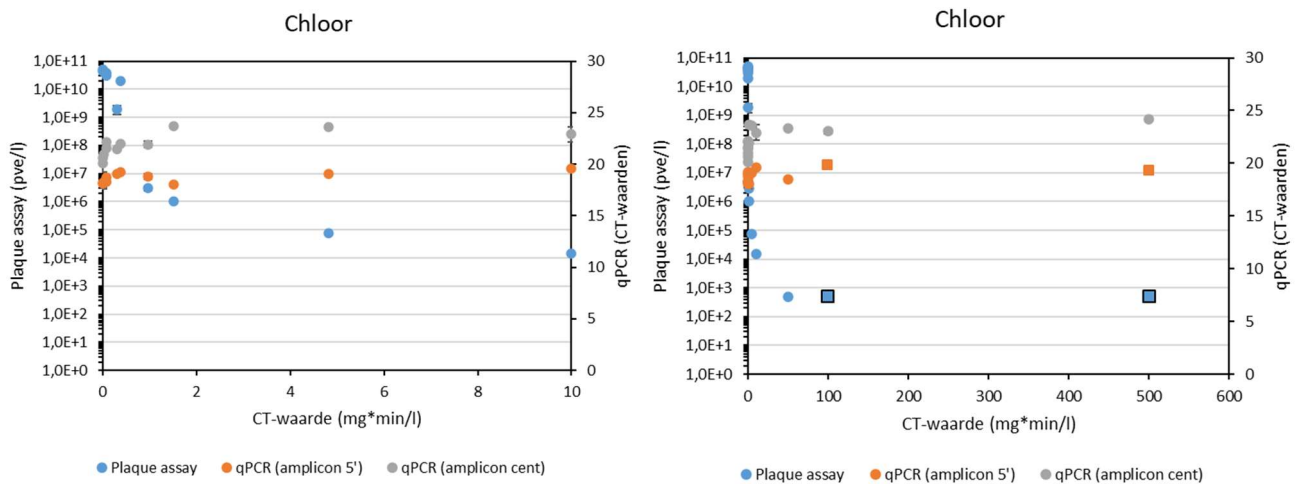
Contacttijd (min)	Concentratie (mg/l)	CT-waarde (mg*min/l)
1	0	0
1	0,014	0,014
1	0,077	0,077
1	0,303	0,303
1	0,965	0,965
1	10	10
1	100	100
5	0	0
5	0,014	0,07
5	0,077	0,385
5	0,303	1,515
5	0,965	4,825
5	10	50
5	100	500

Afdoden van MS2 met chloor is duidelijk zichtbaar met de plaque assay (Figuur 12). Bij korte contacttijden wordt al een deel van MS2 afgedood. Bij het experiment met 1 minuut contacttijd was de afdoden van MS2 effectiever dan bij 5 minuten contacttijd, zelfs als de CT-waarde min of meer vergelijkbaar is. Zo is bij 0,303 mg*min/l (1 minuut, 0,303 mg vrij chloor/l) de log inactivatie 1,41, terwijl bij 0,385 mg*min/l (5 minuten, 0,077 mg vrij chloor/l) de inactivatie slechts 0,36 log is. Vanaf 100 mg*min/l worden er geen levende MS2 meer gemeten en is de log inactivatie >7,95 log (Figuur 13 en Bijlage 2).

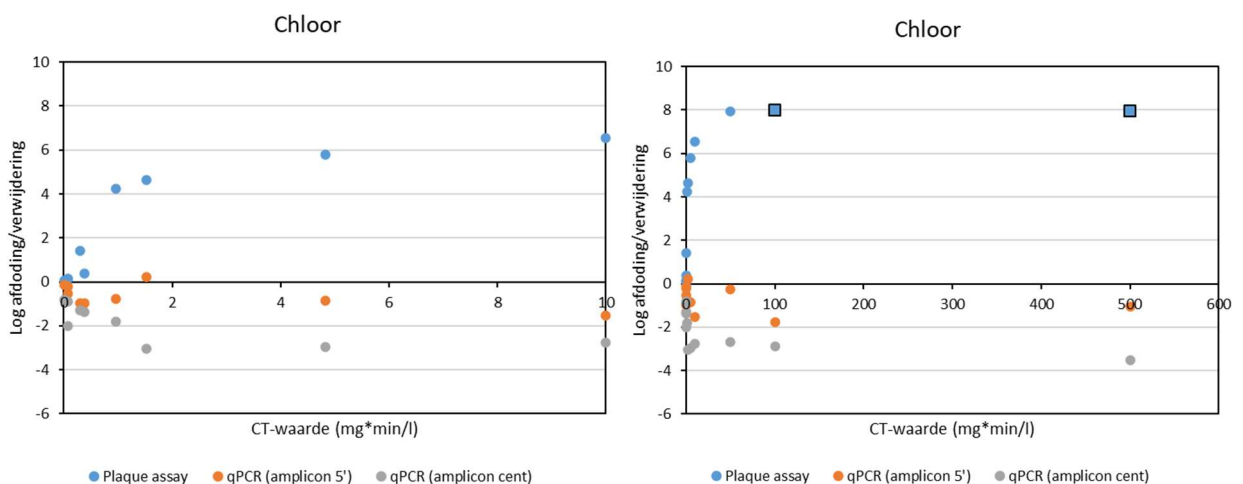
Met de qPCR wordt slechts een beperkte inactivatie van MS2 gemeten (Figuur 12). Waar b.v. met de plaque assay een inactivatie van meer dan 8 log wordt gemeten met de plaque assay bij 100 mg*min/l, is dit slechts 0,54 log (amplicon 5') en 0,88 log (amplicon cent) met de qPCR. De lagere inactivatie die met de qPCR wordt aangetoond, komt overeen met de resultaten uit paragraaf 3.1.

Hierin wordt getoond dat de qPCR niet altijd geschikt is om virus inactivatie aan te tonen zolang het DNA of RNA genoom niet voldoende wordt beschadigd. Met chloordesinfectie wordt niet alleen het genoom beschadigd, maar wordt het hele virus dusdanig beschadigd dat er nauwelijks tot geen DNA of RNA over is om de qPCR op uit te voeren. Dat verklaart het verschil tussen qPCR en plaque assay in de figuren hieronder.

Het effect van inactivatie met chloordesinfectie op de virus bindingsassay op de Biacore wordt getoond in paragraaf 3.3. In deze vergelijking wordt eveneens beschreven wat deze resultaten betekenen voor de levend/dood bepaling van de MS2-virusdeeltjes.



Figuur 12. Chloordesinfectie van MS2 bacteriofagen. Gegeven is de concentratie MS2 per behandeling. Alle metingen zijn in tweevoud uitgevoerd, het gemiddelde inclusief SD (meestal erg klein en niet zichtbaar) is gegeven. Zwart omliggende vierkanten: waarde is onder de detectielimiet, hier is de detectielimiet gegeven. Links: alleen de resultaten met CT-waarde van 0 – 10 mg*min/l weergegeven. Rechts: alle resultaten zijn weergegeven. In Bijlage 2 zijn de absolute waarden gegeven.

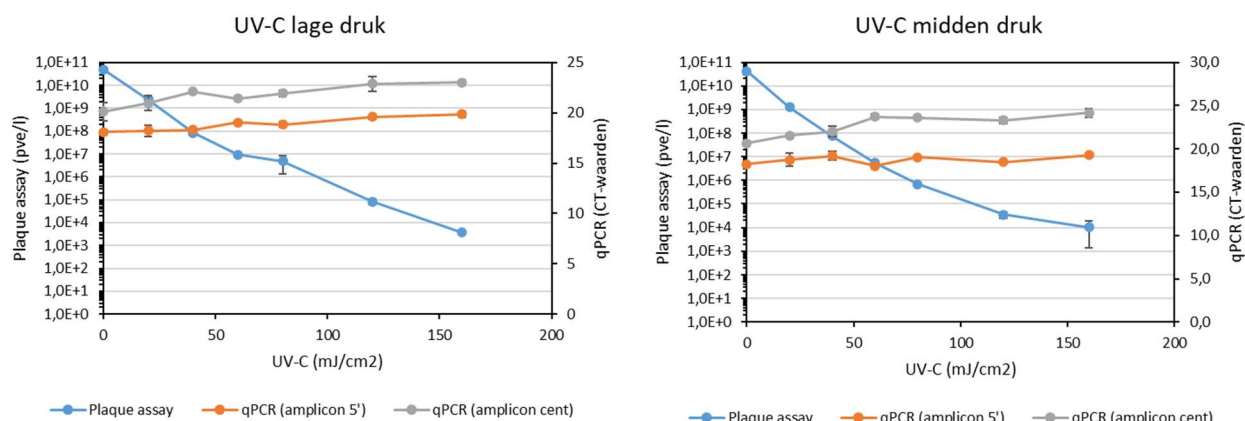


Figuur 13. Afdoding van MS2 door chloordesinfectie, gegeven in log afdding (plaque assay) of in log verandering in CT-waarden (qPCR). Voor het berekenen van de log afdding en verandering in CT-waarden is de gemiddelde waarde uit Figuur gebruikt. Zwart omliggende vierkanten: gemeten waarde is onder de detectielimiet waardoor alleen een minimale logafdding gegeven kan worden. Links: alleen de resultaten met CT-waarde van 0 – 10 mg*min/l zijn weergegeven. Rechts: alle resultaten zijn weergegeven. In Bijlage 2 zijn de absolute waarden gegeven.

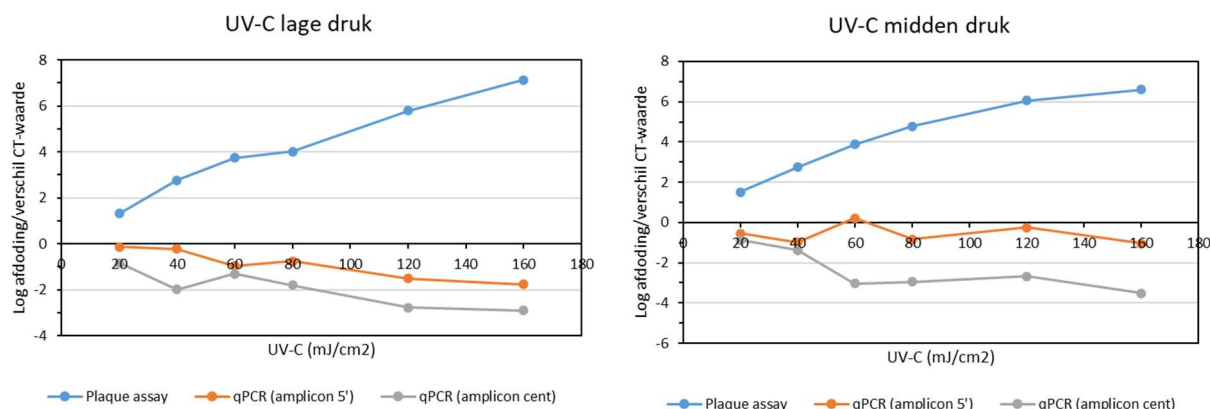
3.2.2 UV desinfectie

Voor UV-desinfectie zijn doses van 0, 20, 40, 60, 80, 120 en 160 mJ/cm² toegepast, met een lagedruk (LD) en een middendruk (MD) lamp. Vervolgens is met qPCR en de plaque assay (beschreven in Bijlage 1) het totale aantal MS2 (qPCR) en het aantal infectieuze MS2 (plaque assay) bepaald. Dit laat zien dat UV-desinfectie MS2 inactieveert en de inactivatie toeneemt bij een hogere UV-dosis. Zo is bij 80 mJ/cm² de inactivatie bijvoorbeeld 4 log bij lagedruk UV-C en 4,78 log bij middendruk UV-C (Figuur 14.). Dit komt niet helemaal overeen met de informatie die beschikbaar is uit de wetenschappelijke literatuur. Hierbij vindt bij deze doses namelijk meer afdoding plaats met middendruk UV-C dan hier gemeten (lagedruk: 4 log bij 80 mJ/cm², middendruk: 7 log bij 80 mJ/cm²).

Inactivatie van MS2 door UV is niet detecteerbaar met qPCR. Zoals beschreven in de vorige paragraaf, kan een effect van een desinfectiemethode alleen aangetoond worden met qPCR als het genoom dusdanig beschadigd is dat het de qPCR remt. UV-desinfectie inactieveert virussen wel door het genoom te beschadigen, maar deze beschadigingen zijn niet of nauwelijks voldoende om gemeten te worden met qPCR. Het effect van inactivatie met UV-desinfectie op de virus bindingsassay op de Biacore wordt getoond in paragraaf 3.3. In deze vergelijking wordt eveneens beschreven wat deze resultaten betekenen voor de levend/dood bepaling van de MS2-virusdeeltjes met de Biacore.



Figuur 14. UV desinfectie van MS2 bacteriofagen. Gegeven is de concentratie MS2 per behandeling. Alle metingen zijn in tweevoud uitgevoerd, het gemiddelde inclusief SD (meestal erg klein en niet zichtbaar) is gegeven. Links: alleen de resultaten met CT-waarde van 0 – 10 mg*min/l zijn weergegeven. Rechts: alle resultaten zijn weergegeven. In Bijlage 2 zijn de absolute waarden gegeven.



Figuur 15. Afdoding van MS2 door UV-desinfectie met lagedruk en middendruk lamp, gegeven in log afdoding (plaque assay) of in verandering in CT-waarden (qPCR). Voor het berekenen van de log afdoding en verandering in CT-waarden is de gemiddelde waarde gebruikt. Links: alleen de resultaten met CT-waarde van 0 – 10 mg*min/l zijn weergegeven. Rechts: alle resultaten zijn weergegeven. In Bijlage 2 zijn de absolute waarden gegeven.

3.3 Biacore experimenten MS2, CGMMV en PIAMV

In overeenstemming met de projectplanning worden hieronder eerst de experimenten en resultaten weergegeven van de zogenaamde levend/dood bepaling met behulp van het modelvirus MS2. Vervolgens worden de experimenten en resultaten weergegeven van achtereenvolgens de bindingsassay voor de doelvirussen CGMMV en voor PIAMV.

3.3.1 Experimenten inactivatie MS2 virus

De levend/dood-test betreft de immobilisatie van een polyclonaal anti-MS2-antilichaam op het Biacore C1-sensoroppervlak, gevolgd door binding van MS2-virusdeeltjes aan het polyclonaal antilichaam. De virusdeeltjes zijn ofwel infectieus ("levend") of behandeld met een van de vier verschillende onsmettingsmethoden (waardoor in meer of mindere mate niet-infectieuze of 'dode' virusdeeltjes ontstaan, zie hieronder).

De gebonden MS2-deeltjes worden achtereenvolgens gekarakteriseerd door een tweede, monoclonaal, anti-MS2-antilichaam. Dit antilichaam zal naar verwachting optimaal binden aan de levende MS2-virusdeeltjes en in mindere mate aan de kreupele MS2-virusdeeltjes.

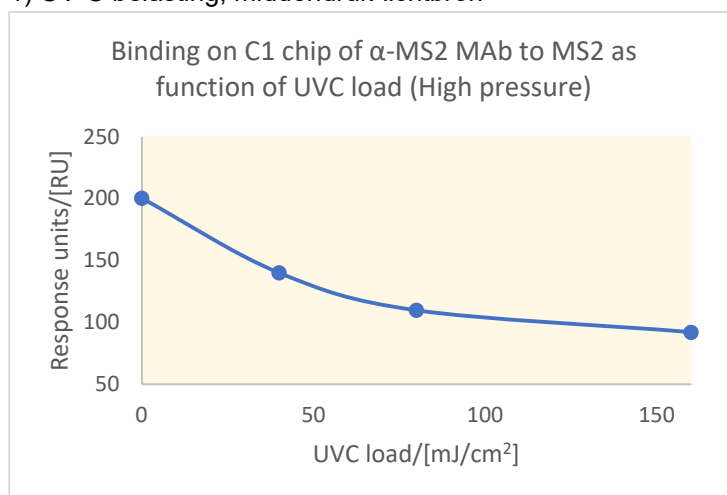
Onsmettingsmethoden (zoals uitgevoerd door KWR):

- 1) UVC-belasting, middendruk-lichtbron;
- 2) UVC-belasting, lagedruk-lichtbron;
- 3) Chloorbehandeling 1 minuut;
- 4) Chloorbehandeling 5 minuten.

Meetresultaten met gebruik van Biacore T200 instrument en C1-sensor

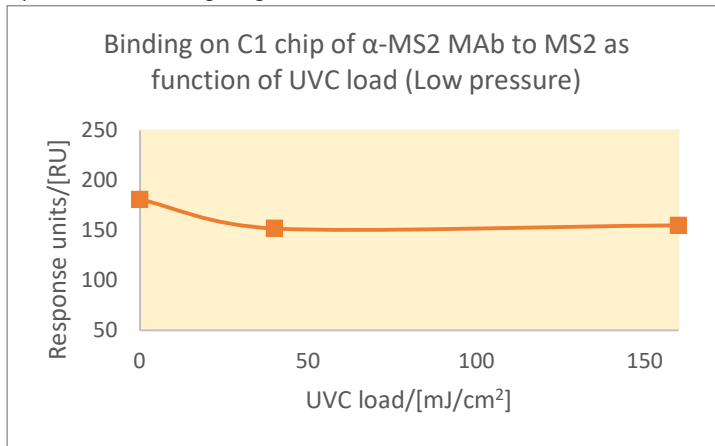
De metingen van de Biacore C1-sensor leverden de volgende resultaten op voor de verschillende behandelingsmethoden voor MS2.

1) UV-C belasting, middendruk-lichtbron



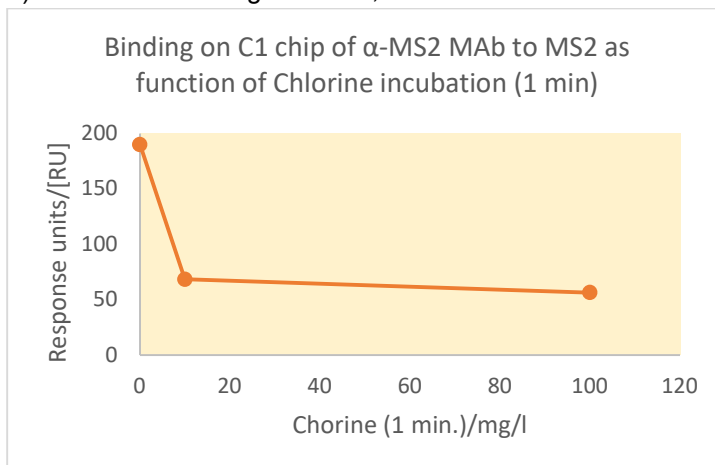
Figuur 16. UV-C desinfectie, middendruk-lichtbron.

2) UV-C belasting, lagedruk-lichtbron;



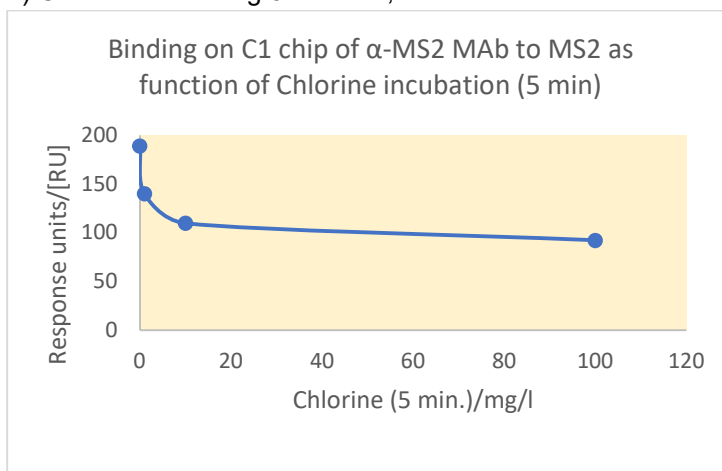
Figuur 17. UV-C desinfectie, lagedruk-lichtbron.

3) Chloorbehandeling 1 minuut;



Figuur 18. Chloorbehandeling 1 minuut.

4) Chloorbehandeling 5 minuten;



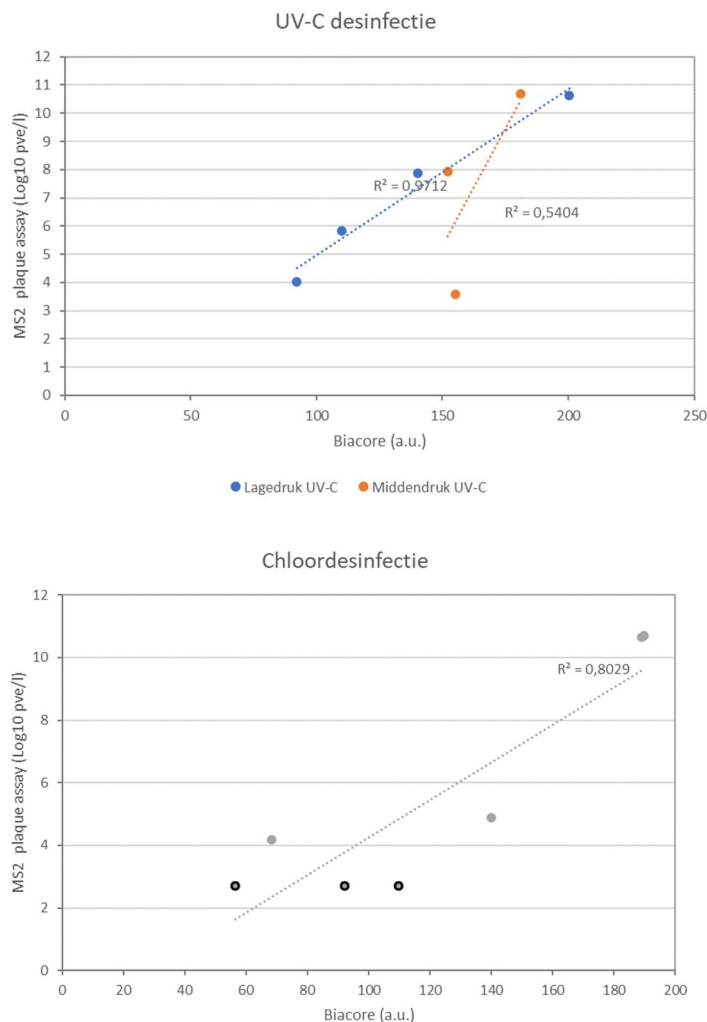
Figuur 19. Chloorbehandeling 5 minuten.

De MS2-resultaten van de Biacore zijn vergeleken met de plaque assay (beschreven in paragraaf 3.2) om zo de resultaten van de nieuwe Biacore methode te vergelijken met de standaardmethode (plaque assay).

Afdoden door bestraling met UV-C licht geeft voor de lagedruk UV-C een goede correlatie tussen de Biacore en de MS2 plaque assay ($r^2 = 0,97$; een r^2 ligt tussen 0 en 1 waarbij 1 een perfecte correlatie weergeeft; Figuur 20). Bij middendruk UV-C is de correlatie lager, maar wel aanwezig ($r^2 = 0,54$).

Bij afdoden van MS2 met chloor is de correlatie goed ($r^2 = 0.80$), maar deze goede correlatie lijkt vooral te zijn veroorzaakt door de hoge concentratie in het onbehandelde monster (rechtsboven in de grafiek van Figuur 20). Doordat in dit figuur resultaten zijn gebruikt waarvan de waarde in de plaque assay onder de detectiegrens lag, wordt de log afdoden onderschat, wat de correlatie mogelijk negatief beïnvloedt. Voor beide correlaties is slechts een beperkt aantal metingen gebruikt, wat ook de correlatie beïnvloedt.

Ondanks het beperkte aantal punten, laat de vergelijking wel zien dat de Biacore een hoog signaal geeft voor onbehandelde MS2-virussen en een lager signaal voor behandelde MS2-virussen waarvan een deel niet meer 'levend' of infectieus is. Dit is een belangrijk vereiste van een virussensor voor toepassing in de tuinbouw.



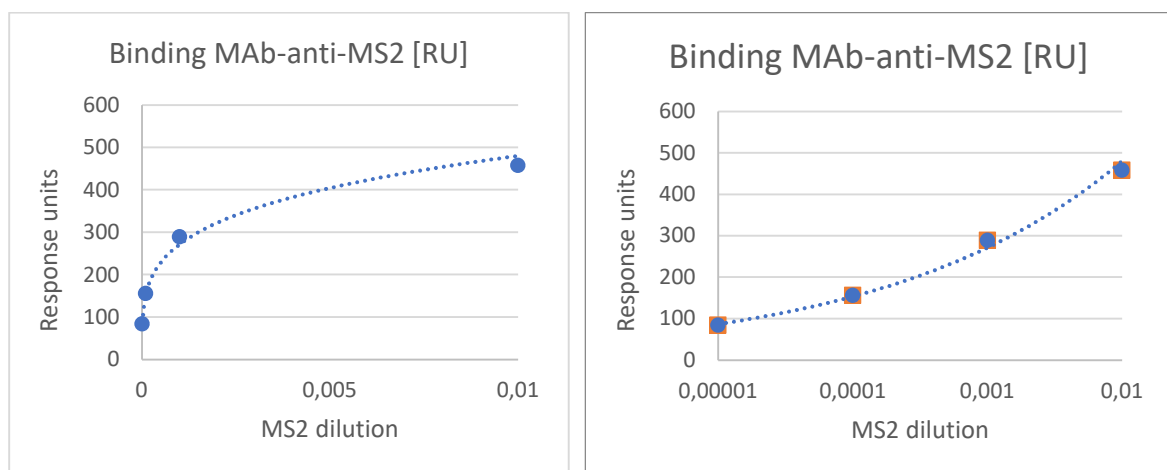
Figuur 20. Correlatie tussen de Biacore en MS2 plaque assay voor MS2 virussen die met UV-C desinfectie of met chloordesinfectie zijn afdood. Voor dit figuur zijn de resultaten uit Figuur 16 t/m Figuur 19 gebruikt. Voor de zwart omrande datapunten is de waarde van de plaque assay onder de detectielimiet, hier is de detectielimiet gegeven.

3.3.2 Antilichaam-MS2 virusmodel in de aanwezigheid van plantenmateriaal

Beginsituatie identiek aan levend/dood experimenten:

Immobilisatie van een polyclonaal anti-MS2-antilichaam op het Biacore C1-sensoroppervlak, gevolgd door binding van MS2-virusdeeltjes aan het polyclonaal antilichaam. De MS2-virusdeeltjes werden echter als volgt behandeld, voordat de virusmonsters aan het sensoroppervlak werden aangeboden:

1. De oplossing met het MS2-virus werd 1:1 gemengd met een 0,22 μm gefilterde oplossing met plantenmateriaal (verkregen door het mengen en homogeniseren van het positieve controlemateriaal voor PIAMV en een ongeveer gelijk gewicht aan plantenmateriaal van de positieve controle van CGMMV in gewone extractiebuffer);
2. De oplossing uit stap 1 werd serieel verdund in HBS-EP+ om monsters te verkrijgen met 1:100, 1:1000, 1:10000 en 1:100000 MS2-virusdeeltjes;
3. De monsterreeks in seriële verdunning werd aangeboden aan het geïmmobiliseerde anti-MS2 antilichaam op individuele flowcellen van de C1 chip (4 metingen mogelijk voor 1 sensor met 4 flowcellen);
4. De gebonden MS2 deeltjes werden achtereenvolgens gekarakteriseerd door het tweede anti-MS2 antilichaam;
5. De netto bindingsrespons van het tweede anti-MS2 antilichaam werd gemeten als functie van de verdunningsreeks.



Figuur 21. Resultaten van bindingsexperimenten monoclaal anti-MS2 aan MS2 virusdeeltjes. De resultaten van de binding worden getoond als functie van de verdunning van het MS2 virus op lineaire schaal (links) en logschaal (rechts).

3.3.3 Bindingsexperimenten op basis van PIAMV en CGMMV

Opzet

Bindingsexperimenten voor de detectie van de plantenvirussen rechtstreeks op de Biacore CM5 en C1 chip bleken niet succesvol. Verwacht werd dat sterische hinder als gevolg van onvoldoende mobiliteit van de vangstantilichamen in/op de sensorchip een belangrijke rol zou kunnen spelen bij de mislukte binding van de virusdeeltjes en de daaropvolgende binding van het secundaire antilichaam. Daarom werd de introductie van zogenaamde *spacermoleculen* onderzocht om de mobiliteit van de primaire antilichammoleculen op de sensorchip te verbeteren. Dit zijn moleculen die ruimte geven voor detectie en om een eventuele blokkade te voorkomen. Om te streven naar maximale gevoeligheid werd de 3D matrix van de CM5 chip gekozen als platform voor de experimenten gebaseerd op immobilisatie via spacer moleculen. De spacermoleculen die in deze experimenten werden gebruikt waren aminoazijnzuur (glycine) en bis(NHS)-PEG5. Dit laatste molecuul is een NHS-geactiveerd dicarbonsuur met een lineaire keten van ethyleenglycol met 5 C-atomen. Dit spacermolecuul heeft een grote flexibiliteit en is bovendien zeer hydrofiel, waardoor het geïmmobiliseerde antilichaam een grote ruimtelijke vrijheid krijgt.

1. Spacer: aminoazijnzuur.

Deze spacer werd covalent gekoppeld aan de NHS/EDC-geactiveerde carboxylzuurgroepen in de CM5-matrix van de Biacore-chip via de aminegroep van het spacermolecuul. Het geïmmobiliseerde spacermolecuul werd achtereenvolgens opnieuw geactiveerd met NHS/EDC en de primaire antilichammoleculen werden vervolgens covalent gekoppeld aan de door NHS geactiveerde spacermoleculen.

2. Spacer: bis(NHS)-PEG5.

Deze spacer werd in twee stappen tussen het primaire antilichaam en de sensormatrix van de Biacore-chip ingebracht. Voor deze spacer moesten de carboxylzuren op het sensoroppervlak eerst worden omgezet in aminegroepen. Dit is bereikt door de covalente koppeling van ethyleendiamine. De gecombineerde spacermolecule en het antilichaam zijn achtereenvolgens blootgesteld aan het aminogemodificeerde sensoroppervlak en dit resulteerde in de koppeling van de antilichammoleculen aan het sensoroppervlak via de PEG5 spacermolecule.

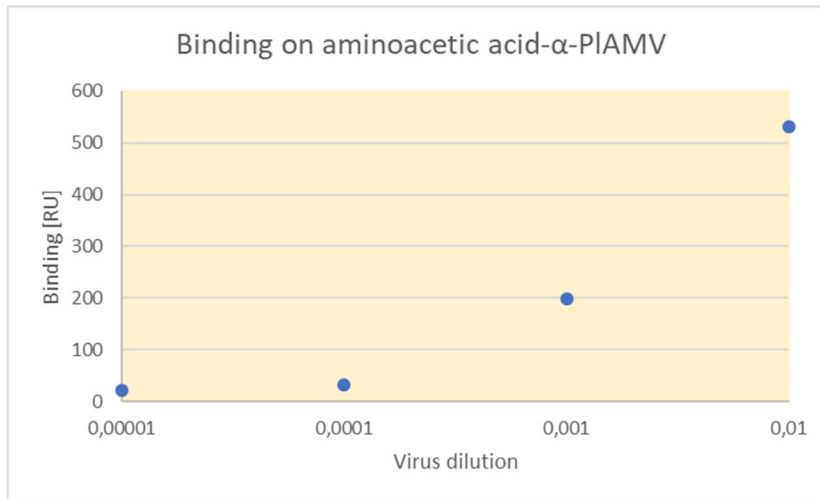
Het sensoroppervlak dat het primaire antilichaam bevatte dat via het spacermolecuul aan het oppervlak was gekoppeld, werd blootgesteld aan een verdunde oplossing van de virusdeeltjes, d.w.z. het positieve controlemateriaal voor PIAMV en het geëxtraheerde plantaardige materiaal voor CGMMV.

De standaardoplossingen van deze twee virusbronnen werden serieel verdund met de lopende buffer om "virusconcentraties" te verkrijgen ten opzichte van deze standaarden (werkelijke virusconcentratie t.b.v.), d.w.z. 1:100, 1:1000, 1:10.000 en 1:100.000. Na de blootstelling van het sensoroppervlak aan de virusmonsters werd het sensoroppervlak blootgesteld aan een vaste verdunning van het secundaire antilichaam voor het desbetreffende virus (1:1000). De binding van dit secundaire antilichaam aan het sensoroppervlak werd bepaald. Ten slotte werd het sensoroppervlak, ongeacht of binding met het secundaire antilichaam werd waargenomen of niet, geregenereerd in een poging de binding van virusdeeltjes en secundaire antilichaamdeeltjes te herhalen.

Resultaten bindingsexperimenten voor PIAMV

Tabel 5. *CM5-aminozijnzuur- α -PIAMV. Weergegeven getallen zijn relatieve RU's, gemeten op een Biacore T200.*

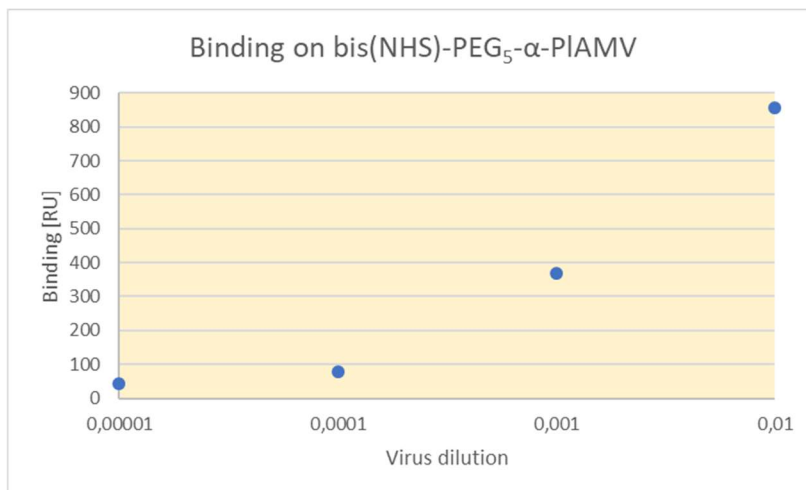
Virus sample	Binding α-PIAMV (1)	Regen. Gly.HCl	Binding α-PIAMV (2)	Regen. Gly.HCl
1:100,000	21	8	19	5
1:10,000	32	7	28	9
1:1000	198	11	167	9
1:100	532	19	496	11



Figuur 22. Binding van virus en secundair antilichaam op aminoazijnzuur- α -PIAMV.

Tabel 6. CM5-bis(NHS)-PEG₅- α -PIAMV. Weergegeven getallen zijn relatieve RU's, gemeten op een Biacore T200.

Virus	Binding α -PIAMV (1)	Regen. Gly.HCl	Binding α -PIAMV (2)	Regen. Gly.HCl
1:100.000	44	4	Niet succesvol	Nvt
1:10.000	78	19	Niet succesvol	Nvt
1:1000	368	17	Niet succesvol	Nvt
1:100	855	29	Niet succesvol	Nvt



Figuur 23. Binding virus en secundair antilichaam op bis(NHS)-PEG₅- α -PIAMV.

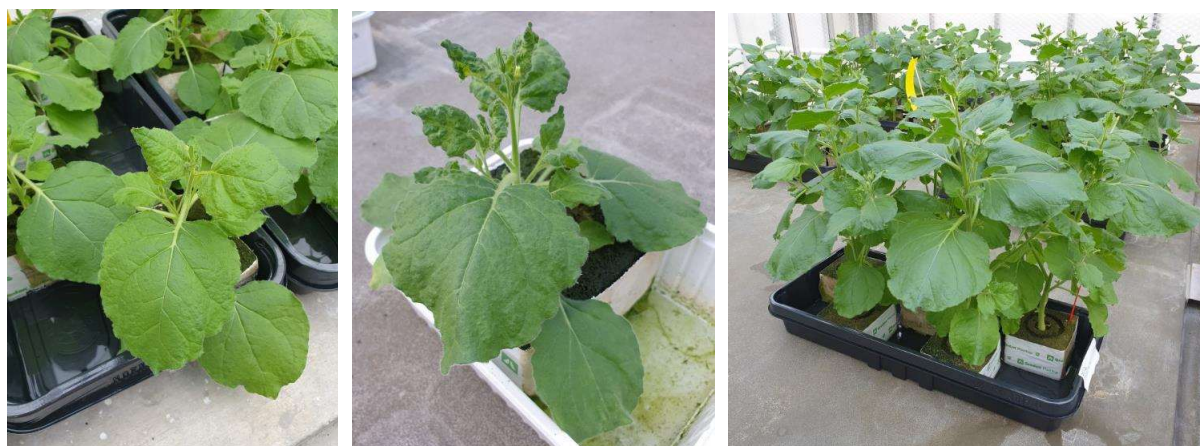
De bindingsassay voor de doelvirussen, zoals ontwikkeld op de Biacore T200, geeft aan dat de virusdeeltjes direct of indirect met deze assay kunnen worden aangetoond. Mede ingegeven door het feit dat een dergelijke assay (op basis van SPR) hoe dan ook ver weg staat van een toekomstig praktisch instrument, werd al snel nagedacht over een alternatieve benadering op basis van fluorescentiedetectie. Deze vorm van detectie staat veel dichterbij een toepassing in de praktijk en het omzetten van de bindingsassay naar deze detectiemethode met gebruik van de opgedane ervaring van de Biacore bindingsassay was daarom een logische vervolgstap die relatief snel kon worden gerealiseerd. De details van deze vervolgentwikkeling worden weergegeven in 3.6.

3.4 Bio-assay CGMMV

Plantsapmonsters die besmet zijn met CGMMV zijn verdund in water en blootgesteld aan verschillende temperaturen voor verschillende tijden:

- 21°C voor 10 min.
- 70°C voor 10 min.
- 85°C voor 3 min.
- 95°C voor 0,5 min.

Deze behandelingen zijn in tweevoud uitgevoerd. Vervolgens zijn per behandeling z5 tabakszaailingen geïnoculeerd met de behandelde plantsapmonsters. Na 3 weken is gecontroleerd of de planten besmet zijn geraakt door middel van ELISA-methode. Visueel is dan ook te zien welke planten geïnfecteerd zijn (Figuur 24). De ELISA-uitslagen zijn dan een bevestiging van wat visueel zichtbaar is.



Figuur 24. Bio-assay CGMMV met tabaksplanten. Links: een onbesmette plant, midden: een besmette plant met kleinere, misvormde en bobbelige bladeren in de kop, rechts: overzicht van een teelttafel met bio-assays van een aantal hitte-behandelingen.

In Tabel 7 zijn de uitslagen te zien van de ELISA-metingen. De controlebehandeling (21°C voor 10 min.) geeft in 5 van de 5 planten een positieve besmetting en dat in tweevoud. Ook de behandeling van 70°C voor 10 min. laat bij alle planten een besmetting zien. De behandeling van 85°C voor 3 min. geeft één keer bij 1 van de 5 planten een besmetting en één keer bij 2 van de 5 planten. Bij de behandeling waarbij het virus wordt bloot gesteld aan 95°C voor een halve minuut is er geen infectieus virus na de behandeling meer aanwezig, aangezien geen van de geteste planten positief scoorden met ELISA (2x 0 van de 5 positief)

Tabel 7. ELISA-uitslagen van CGMMV-bioassay met tabaksplanten. Van elke behandeling, in 2-voud, is weergegeven hoeveel planten van 5 geïnoculeerde planten, 3 weken na inoculatie, positief zijn gescoord.

Hittebehandeling	Aantal geïnfecteerde planten / 5 planten	Aantal geïnfecteerde planten / 5 planten
21°C voor 10 min.	5	5
70°C voor 10 min.	5	5
85°C voor 3 min.	1	2
95°C voor 0,5 min.	0	0

3.5 Experimenten Tecan

Zoals hiervoor toegelicht in paragraaf 3.3., is de ontwikkeling van de bindingsassays voor de doelvirussen overgegaan naar fluorescentiedetectie in plaats van de Biacore methode. Het grote voordeel van een methode op basis van fluorescentiedetectie, is de relatieve eenvoud van de meetapparatuur. De assay kan worden ontwikkeld op laboratoriumapparatuur en op basis van de resultaten kan de assay worden overgezet op veldapparatuur die kan worden ingezet in de praktijkomgeving van de kas.

Het nadeel van een assay op basis van fluorescentie is de noodzaak van een gelabeld antilichaam. Omdat echter het meten van een virus in de praktijk van de kas toch met behulp van een assay in twee stappen moet plaatsvinden, is het gebruiken van een gelabeld antilichaam acceptabel. De antilichamen voor zowel de assay van CGMMV als van PIAMV zijn commercieel verkrijgbaar en het is erg eenvoudig om aan dergelijke antilichamen een fluorescente probe te bevestigen.

Met de wens een praktisch robuuste assay te ontwikkelen, werd gekozen voor een zogenaamde *quantum dot-probe*. Dergelijke probes zijn commercieel verkrijgbaar en zeer stabiel, geven veel fluorescentielicht en kunnen eenvoudig worden gedetecteerd met relatief goedkope meetapparatuur.

3.5.1 Algemeen Tecan Spark 10

De bindingsexperimenten die werden gevolgd met gebruik van de Tecan Spark 10 fluorescentie plaatlezer bestonden telkens uit drie stappen:

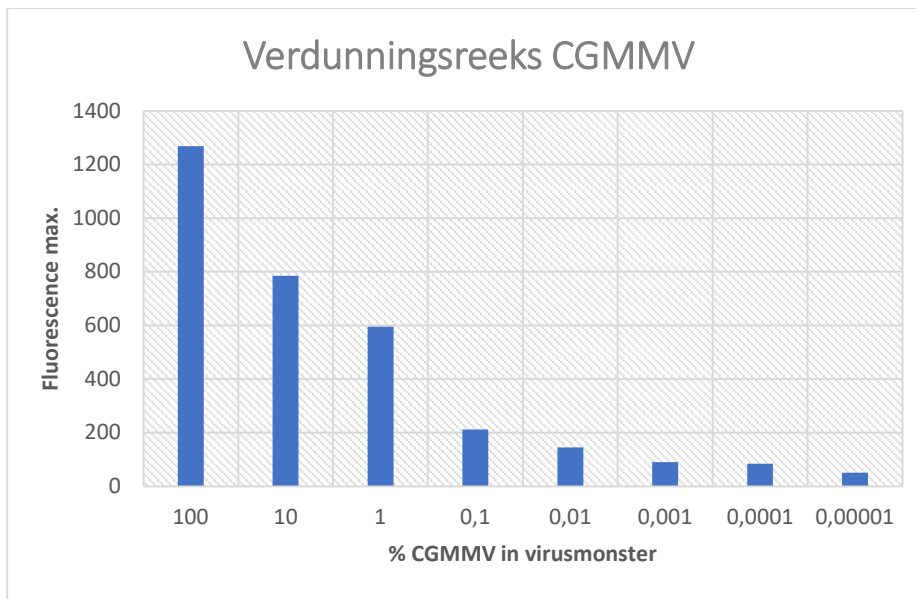
- a. Het koppelen van een primair (capture) antilichaam voor het betreffende virusdeeltje aan zogenaamde 3D-NHS well strips, waarbij het antilichaamdeeltje covalent werd gekoppeld aan de bodem van de welletjes door middel van een chemische binding van aminozuren aan de buitenkant van het antilichaamdeeltje;
- b. Het incuberen van de welletjes met een testvloeistof waarin het virusdeeltje zich bevond;
- c. Ten slotte het incuberen van de met virus gecoate welletjes met een oplossing waarin een speciaal bereid secundair (detection) antilichaam tegen het virusdeeltje aanwezig was. Dit speciale antilichaam bestond uit hetzelfde antilichaam als het capture antilichaam met daaraan gekoppeld een zogenaamde quantum dot-probe. De fluorescentie plaatlezer was in staat om de hoeveelheid van deze probe die via het secundaire antilichaam aan het virusdeeltje werd gebonden, kwantitatief te bepalen.

In deze fase volgend op de Biacore experimenten werd de Tecan gebruikt voor het ontwikkelen van een bindingsassay om plantenvirusconcentraties te bepalen en tevens voor het meten van de resterende virusbinding na de ontsmettingsbehandeling zoals door KWR uitgevoerd.

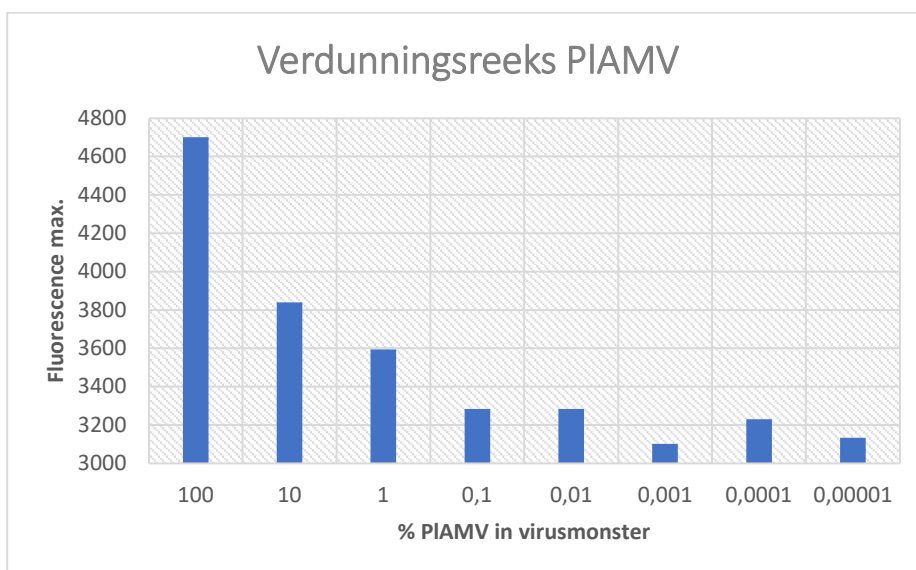
3.5.2 Tecan metingen van verdunningsreeksen CGMMV en PIAMV.

Er werden verdunningsreeksen bereid van virusextracten voor CGMMV en PIAMV in het bereik van 100% (onverdund extract) tot 100 ppb. Deze verdunningsreeks werd gebruikt voor het incuberen van de monster-welletjes (zie stap b. onder 3.5.1). Na incuberen bij 37 °C gedurende ongeveer een half uur, wassen van de welletjes en vervolgens incuberen van de welletjes met het secundaire antilichaam bij 37 °C gedurende ongeveer een half uur (zie stap c. onder 3.5.1), konden de welletjes na een laatste was stap worden gemeten in het Tecan instrument op de aanwezigheid van de quantum dot-probe.

De resulterende fluorescentie van zowel de assays op basis van CGMMV als op basis van PIAMV wordt in de onderstaande staafgrafieken weergegeven. In de grafieken is duidelijk het verband zichtbaar tussen de virusverdunding en de gemeten fluorescentie. Hierbij is het verloop van de fluorescentieafname bij CGMMV duidelijker dan dat bij PIAMV. Op basis van de resultaten van de gebruikte antilichamen in ELISA assays, was dit resultaat naar verwachting.



Figuur 25. Weergave van de CGMMV verdunningsreeks, zoals gemeten met sensor wells, waarbij 100 staat voor onverdund virusextract en de meest rechter bar staat voor tot 100 ppb verdund virusextract.

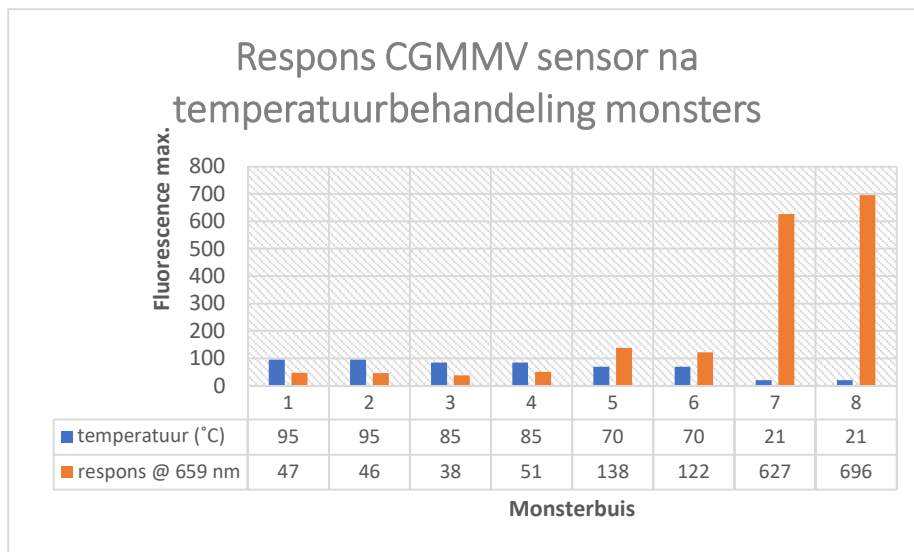


Figuur 26. Weergave van de PIAMV verdunningsreeks, zoals gemeten met sensor wells, waarbij 100 staat voor onverdund virusextract en de meest rechter bar staat voor tot 100 ppb verdund virusextract.

3.5.3 Tecan metingen van temperatuur behandelde monsters

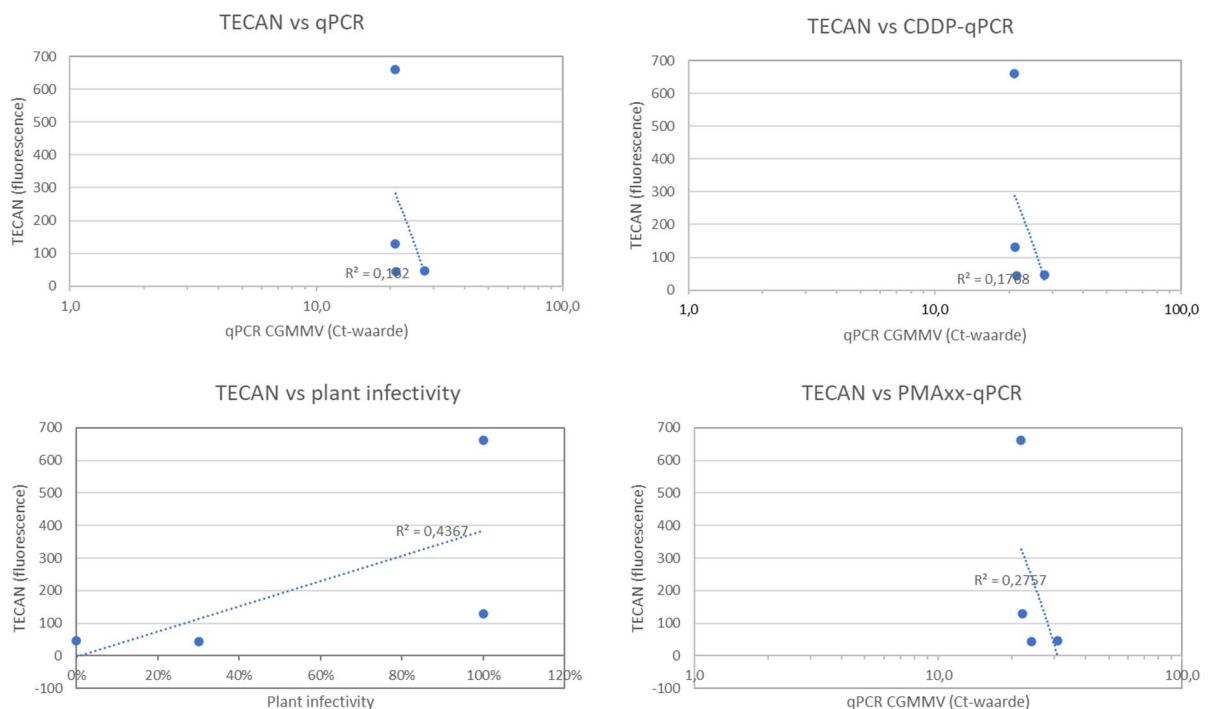
De CGMMV-monsters met verschillende temperatuurbehandelingen, zoals geleverd door KWR, werden op overeenkomstige wijze als in de vorige paragraaf gebruikt voor het incuberen van de betreffende monster-welletjes (zie stap b. onder 3.5.1). Na incuberen bij 37 °C gedurende ongeveer een half uur, wassen van de welletjes en vervolgens incuberen van de welletjes met het secundaire antilichaam bij 37 °C gedurende ongeveer een half uur (zie stap c. onder 3.5.1), konden de welletjes na een laatste was stap worden gemeten in het Tecan instrument op de aanwezigheid van de *quantum dot-probe*. De resulterende fluorescentie van de temperatuur behandelde virusmonsters wordt in de onderstaande staafgrafiek weergegeven. Duidelijk zichtbaar in deze grafiek is dat, in

vergelijking met onbehandeld monster, een afnemende respons werd gemeten bij toenemende temperatuur (tot minder dan 10% vanaf 85 °C).



Figuur 27. Respons van CGMMV sensor welletjes op monsters met verschillende temperatuurbehandelingen. Getoond worden de fluorescentiemaxima bij 659 nm na een temperatuurbehandeling bij respectievelijk 95, 85, 70 en 21 °C (21 °C staat voor onbehandeld monster). Te zien is dat in vergelijking met onbehandeld monster, een afnemende respons wordt gemeten bij toenemende temperatuur (tot minder dan 10% vanaf 85 °C).

De resultaten van hitte behandeld CGMMV gemeten met de TECAN (hierboven beschreven) zijn vergeleken met de resultaten van de planten infectiviteit test (beschreven in paragraaf 3.4), de qPCR en de ci-qPCR (beschreven in paragraaf 3.1; Figuur 26). Dit laat een matige correlatie zien tussen de TECAN en de planten infectiviteit ($r^2 = 0,44$) en een slechte correlatie met de qPCR en ci-qPCR methoden ($r^2 = 0,16 - 0,28$). Voor beide correlaties geldt dat het aantal monsters (4 monsters) laag is, wat zorgt voor een lagere betrouwbaarheid van de correlatie. Om de virussensor in de praktijk toe te kunnen passen moet een groot aantal metingen worden uitgevoerd op verschillende concentraties virus, zowel onbehandeld als behandeld met een desinfectiestap.



Figuur 28. *Vergelijking tussen de resultaten van de TECAN met hittebehandeld CGMMV, de planten infectiviteit assay, de qPCR en de ci-qPCR.*

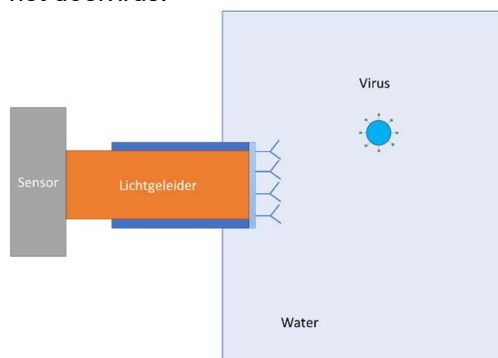
3.6 Experimenten fluorescente probe naar optische fiber systeem

Op basis van de resultaten die werden behaald met het laboratoriuminstrument (Tecan Spark 10), kon een meetopzet worden gerealiseerd die een stap dichterbij de beoogde praktijksituatie betekende. De individuele 'wells' zoals gebruikt in de Tecan, werden in deze meetopzet getest op fluorescentie met gebruik van dezelfde driestaps methode als beschreven in 3.5.

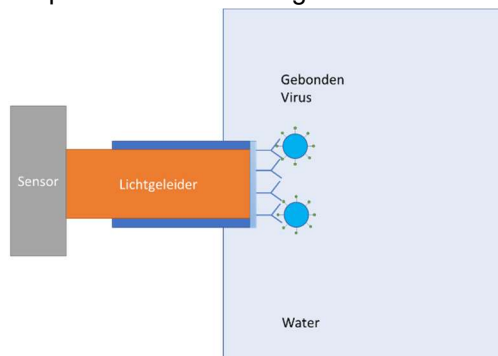
De meetopzet bestond uit een handheld fiber-optic instrument met de mogelijkheid om de excitatiegolflengte van de quantum dots te genereren en het geëmitteerde fluorescentiesignaal van deze quantumdots te meten. Kortom, een opzet die de essentie van de fluorescente bindingsassay voor de plantenvirussen kon registreren en vastleggen.

De drietraps opzet, zoals gezegd essentieel dezelfde als voor het laboratoriuminstrument (zie 3.5.), wordt in de onderstaande drie figuren weergegeven en de praktische meetopzet wordt in de artist impression en de foto's getoond.

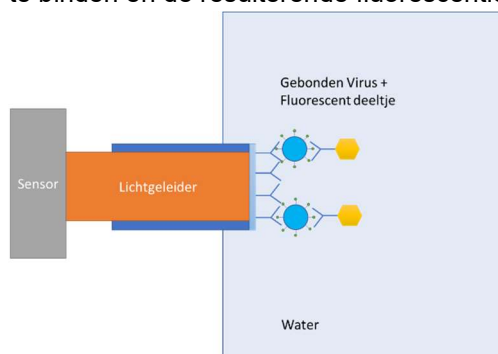
Stap 1. Virus in het water, sensorwell heeft op het oppervlak covalent gebonden antilichamen tegen het doelvirus:

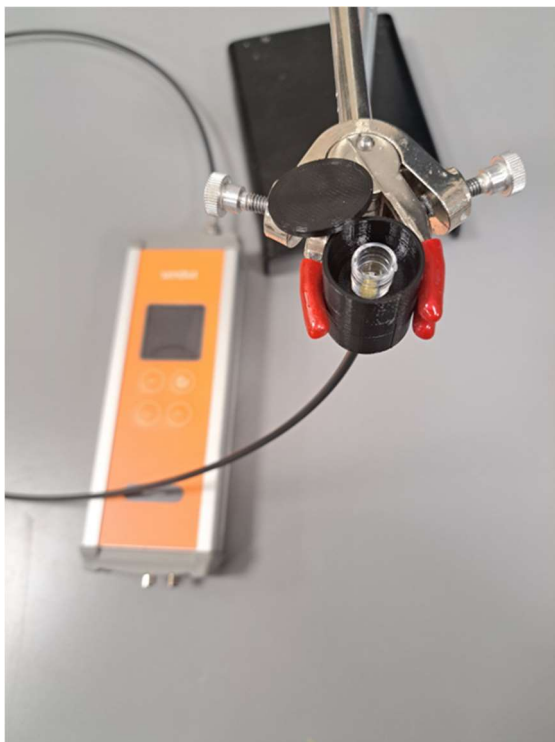
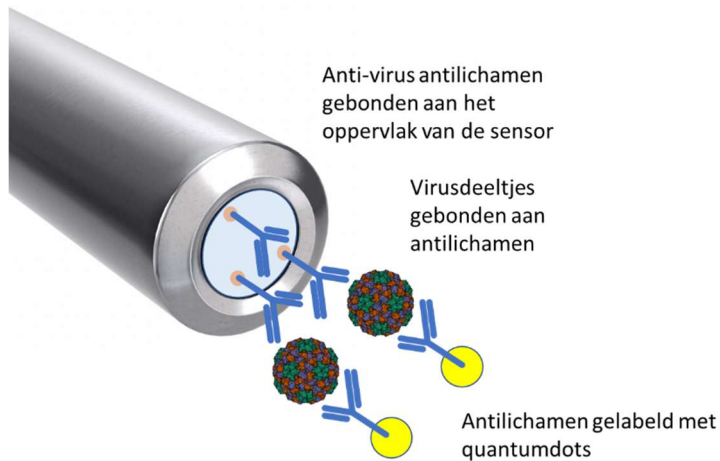


Stap 2. Doelvirus wordt gebonden aan antilichamen op het sensoroppervlak:



Stap 3. Meting van gebonden virus door een Quantum dot-antilichaam aan het eerder gebonden virus te binden en de resulterende fluorescentie te registreren:



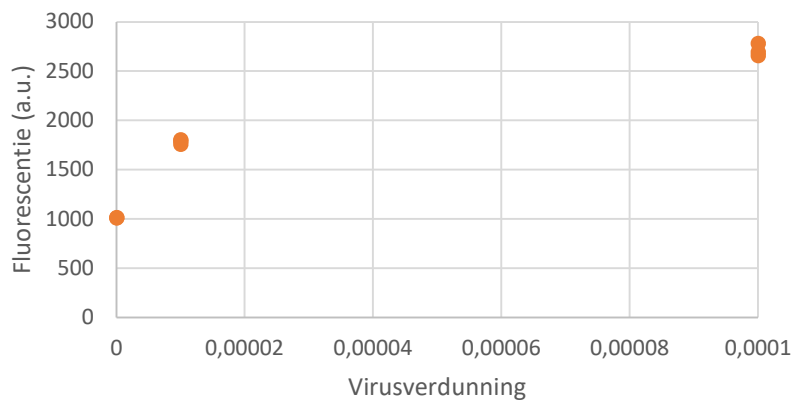


De hierboven beschreven meetopzet werd in het laboratorium gebruikt voor het meten van praktijkmonsters. Deze monsters bestonden uit drainwater dat door middel van spiken was 'besmet' met plantsap dat het CGMMV virus bevatte. Het op dezelfde wijze vermeerderen van PIAMV was helaas niet succesvol, waardoor deze proef werd beperkt tot CGMMV.

De monsters in de 'wells' werden op dezelfde wijze als de monsters voor de Tecan voorbereid en gemeten. De individuele wells werden vervolgens in de speciale meetopzet gebracht, waarna de betreffende fluorescentie werd bepaald als een aantal counts. Calibratie van de meting en van het instrument was in dit vroege stadium niet mogelijk. De verkregen resultaten worden in de onderstaande tabel en grafiek getoond. Hoewel het aantal monsters zeer beperkt was, kon hiermee worden aangetoond dat het mogelijk is om met deze eenvoudige opzet onderscheid te maken tussen blanco metingen en met virus gespikete monsters.

Tabel 8. *Meting van CGMMV-verdunning in drainwater met praktijkopzet (in het laboratorium).*

monster-ID	[Virus]	Fluorescentiemeting (a.u.)
1 op 10000	0,0001	2692
1 op 10000	0,0001	2655
1 op 10000	0,0001	2781
1 op 100000	0,00001	1789
1 op 100000	0,00001	1801
1 op 100000	0,00001	1755
Blanco	0	1008
Blanco	0	1012



Figuur 29. *Fluorescentiemeting van een CGMMV-verdunning in drainwater van een praktijkbedrijf.*

4 Conclusies en aanbevelingen

Op dit moment is er in de tuinbouw geen betrouwbare manier om continu en snel de aanwezigheid van plantenvirussen in het water te monitoren. Dit gaat ten koste van de reactietijd waardoor een virusinfectie zich verder door de kas kan verspreiden voordat maatregelen getroffen kunnen worden. Daarom is er binnen dit project gezocht naar een real-time detectietechniek voor plantenvirussen in water. Hiervoor zijn verschillende methoden geïnventariseerd op basis van criteria als snelheid, kosten, *technology readiness level* en onderscheid kunnen maken tussen infectieuze en niet-infectieuze plantenvirussen. Deze laatste is aangegeven door de glastuinbouw en bollensector, omdat er anders mogelijk onterecht actie wordt ondernomen terwijl het virusdeeltje door ontsmetting geïnactiveerd kan zijn. Naar aanleiding hiervan zijn vier methoden gedurende het project ingezet, één methode op basis van PCR (capsid integrity qPCR) en drie methoden op basis van SPR (de Biacore, Tecan en een probe op een fiber-optisch systeem).

Capsid integrity (ci-)qPCR:

qPCR is een detectietechniek dat al regelmatig wordt toegepast voor monitoring van pathogenen in water. Al is de qPCR methode geen online analyse, is het wel mogelijk om resultaten binnen 24 uur te verkrijgen middels een labanalyse en zijn er mobiele versies beschikbaar die een on-site analyse mogelijk maken en waarmee resultaten binnen 1,5 tot 3 uur worden verkregen. Voor gebruik van deze methode voor de beoordeling van de effectiviteit van desinfectieprocessen is het wel nodig om voldoende onderscheid te kunnen maken tussen plantenvirussen die infectieus of niet-infectieus zijn. Binnen dit project zijn daarom ook initiële testen uitgevoerd met de capsid integrity (ci-)qPCR methode.

De ci-qPCR methode die gebruik maakt van het intercalerende stofje PMAxx is op basis van deze eerste testen het meest effectief gebleken om onderscheid te kunnen maken tussen virussen met en zonder kapselschade als gevolg van een hittebehandeling. Of de PMAxx ci-qPCR methode met afdoende zekerheid kan worden gebruikt om te bepalen of er na een hittebehandeling nog voldoende intacte (infectieuze) virussen in het water aanwezig om een plantinfectie teweeg te brengen moet worden bepaald. De drempelwaarde van 25 Ct - waarboven de kans klein is dat er voldoende CGMMV in het water aanwezig is om een plantinfectie te veroorzaken - moet in combinatie met de PMAxx methode ook nader worden gevalideerd.

Verder is het aan te raden om de PMAxx methode verder te optimaliseren (bijvoorbeeld variaties in toegevoegde concentraties en incubatietijden) en te valideren. Bepaald moet worden of de methode ook bruikbaar is voor waterbehandelingen met chloor- en/of UV-desinfectie. Met name voor UV-behandeling zou deze methode minder geschikt kunnen zijn doordat schade aan het RNA en niet zozeer aan het kapsel wordt veroorzaakt.

Wanneer de ci-qPCR methode na verdere testen geschikt blijkt om in voldoende mate onderscheid te kunnen maken in beschadigde en niet-beschadigde virussen, dan is een toepassing in de praktijk goed haalbaar. De reguliere qPCR methode wordt al routinematig toepast voor analyses van bacteriën, schimmels en virussen in verschillende watermonsters binnen de (glas)tuinbouw.

Biacore/TECAN en bepaling levend/dood:

Vergelijking van de Biacore (SPR-detectie) met de plaque assay van MS2 laat een redelijk tot goede correlatie zien voor UV desinfectie en chloordesinfectie. Echter, het aantal punten waarop deze correlatie is gebaseerd is beperkt (<10 monsters per desinfectiemethode). Analyse van meer monsters met beide methoden is noodzakelijk zodat de correlatie goed kan worden vastgesteld en bepaald kan worden welk signaal van de Biacore of van de TECAN (fluorescentiebepaling) overeenkomt met een bepaald resultaat in de plaque assay. Voor MS2 is dit niet relevant omdat dit geen plantpathogeen is en dit virus vooral gebruikt is om makkelijk aan te tonen of de Biacore-methode in principe het verschil tussen levend en dood virus aan kon tonen. Echter, voor PIAMV en CGMMV zijn uitgebreide vergelijkingen van behandeld en onbehandeld virus, in verschillende concentraties nodig om de prestatiekenmerken van de nieuwe sensor te kunnen bepalen. Op basis

hiervan kan vervolgens bepaald worden hoe de sensormethode (Biacore/SPR en Tecan/fluorescentie) zich verhoudt tot de normale planteninfectiviteit methode of de ELISA.

Meten van verdunningsreeksen CGMMV & PIAMV met fluorescentie (Tecan)

De fluorescentiesensor, zoals gemeten in het Tecan instrument, heeft het verband aangetoond tussen de virusverdunding van CGMMV en van PIAMV en de gemeten fluorescentie. Hierbij was het verloop van de fluorescentieafname bij CGMMV duidelijker dan dat bij PIAMV. Op basis van de resultaten die zijn behaald met de betreffende antilichamen in ELISA-assays, was dit resultaat naar verwachting.

Fluorescentie assay versus temperatuurbehandeling

Er werd een duidelijk verband aangetoond van de gemeten fluorescentie in de assay versus de temperatuurbehandeling van de virusmonsters er werd een afnemende fluorescentierespons gemeten bij toenemende temperatuur van de ontsmettingsbehandeling (van 100% voor monsters bij kamertemperatuur tot minder dan 10% voor een ontsmettingsbehandeling vanaf 85 °C).

Simulatie van praktijk in laboratorium met handheld sensor en CGMMV verdunningsreeks

De CGMMV verdunningsreeks werd gemeten met een handheld sensor en overeenkomstige instellingen als in de Tecan fluorescentieassay. De verkregen resultaten toonden aan dat het mogelijk is om met de eenvoudige prototype die werd gebruikt onderscheid te maken tussen blanco metingen en met virus gespikete monsters.

Verdere ontwikkeling en optimalisatie van de ontwikkelde prototype is nodig om het in de praktijk te kunnen gebruiken. Dit houdt in dat de sensor moet worden getest en gevalideerd met meerdere monsters en desinfectiemaatregelen om de betrouwbaarheid te bepalen. Daarbij steeds de vergelijking makende met een laboratorium referentiemethode. Praktijkmetingen moeten vervolgens worden uitgevoerd door tuinders, KWR en Normec Groen Agro Control om te beoordelen of de sensor in de praktijk ook goed bruikbaar is om vroegtijdig een plantenvirus te detecteren en om de effectiviteit van beheersmaatregelen te bepalen.

5 Referenties

- Arkesteijn, M., Vermunt, A. (2007) Alleen goede hygiëne helpt virussen en viroïden voorkomen. *Onder glas* (8) 11-13.
- Chen, S., Hao Gu, Xiaoming Wang, Jishuang Chen, Weimin Zhu (2011) Multiplex RT-PCR detection of Cucumber mosaic virus subgroups and Tobamoviruses infecting Tomato using 18S rRNA as an internal control, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, Volume 43, Issue 6, Pages 465–471.
- Engvall, E (1972) "Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa". *The Journal of Immunology*. 109 (1): 129–135. ISSN 0022-1767. PMID 4113792.
- Komatsu, K., Hammond, J. (2022). Plantago asiatica mosaic virus: An emerging plant virus causing necrosis in lilies and a new model RNA virus for molecular research. *Molecular Plant Pathology*, Oct; 23(10): 1401-1414.
- Koopal, K., Sjaak van Veen, Anjoeka Pronk, Tim Meijster, Jan Urbanus & Paul Aston, The development of a 'point of care' fluorescent immunosensor for the benzene biomarker S-PMA in human urine, ISES, Utrecht, October 2016 (poster).
- Kumar et al., 2018. Emerging biosensor platforms for the assessment of water-borne pathogens. *Analyst*, 143, 359–373. DOI: 10.1039/c7an00983f
- Mohammed A. Al-Moniee, K. Koopal, N. Akmal, S. van Veen, X. Zhu, P.F. Sanders, F.N. Al-Abeedi, A.M. Amer (2016) Applicability of Dimedone Assays for the Development of Online Aldehyde Sensor in Seawater Flooding Systems, *J. Sensor Technology* Vol.6 No.4, 2016, 101-109.
- Racaniello, V. (2010) <http://www.virology.ws/2010/07/16/detection-of-antigens-or-antibodies-by-elisa/>
- Shang, H., Xie Y., Zhou X., Qian Y., Wu J. (2011) Monoclonal antibody-based serological methods for detection of Cucumber green mottle mosaic virus. *Virology Journal*, 8:228. doi:10.1186/1743-422X-8-228
- Soliman, M. Medema, G., Estrada, B., Brouns SJJ, van Halem D. (2020) Inactivation of RNA and DNA viruses in water by copper and silver ions and their synergistic effect. *Water Research X* 9. DOI: [10.1016/j.wroa.2020.100077](https://doi.org/10.1016/j.wroa.2020.100077)
- Schenk, M. F., Hamelink, R., van der Vlugt, R. A. A., Vermunt, A. M. W., Kaarsenmaker, R. C., and Stijger, I. C. (2010). The use of attenuated isolates of Pepino mosaic virus for cross-protection. *Eur. J. Plant Pathol.* 127, 249–261. doi: 10.1094/PHYTO-01-14-0018-R
- Shang, H., Xie, Y., Zhou, X., Qian, Y., & Wu, J. (2011). Monoclonal antibody-based serological methods for detection of Cucumber green mottle mosaic virus. *Virology journal*, 8, 228. doi:10.1186/1743-422X-8-228
- Van der Gaag, B., S. Spath, H. Dietrich, E. Stigter, G. Boonzaaijer, T. van Osenbruggen, K. Koopal (2003) Biosensors and multiple mycotoxin analysis. *Food Control*: 14, 251-254.
- Vermunt, A. M. W., and Kaarsenmaker, R. C. (2017). Multi-genotype cross-protection against pepino mosaic virus in tomato. *Crop Protect.* 96, 116–122. doi: 10.1016/j.cropro.2017.02.007
- Wolthoorn, J. & K. Koopal (2015) Development of a biosensor-based assay for characterization of anti-drug antibodies in human serum, EBF 8th Open Symposium, Barcelona, December 2015 (poster).
- Bolton, J.R., and Linden, K.G. (2003). Standardization of Methods for Fluence (UV Dose) Determination in Bench-Scale UV Experiments. *Journal of Environmental Engineering* 129, 209-215.
- Canh, V.D., Kasuga, I., Furumai, H., and Katayama, H. (2019). Viability RT-qPCR Combined with Sodium Deoxycholate Pre-treatment for Selective Quantification of Infectious Viruses in Drinking Water Samples. *Food and Environmental Virology* 11, 40-51.
- Canh, V.D., Liu, M., Sangsanont, J., and Katayama, H. (2022). Capsid integrity detection of pathogenic viruses in waters: Recent progress and potential future applications. *Science of The Total Environment* 827, 154258.
- Canh, V.D., Torii, S., Furumai, H., and Katayama, H. (2021). Application of Capsid Integrity (RT-qPCR) to Assessing Occurrence of Intact Viruses in Surface Water and Tap Water in Japan. *Water research* 189, 116674.
- Cechova, M., Beinhauerova, M., Babak, V., Slana, I., and Kralik, P. (2021). A Novel Approach to the Viability Determination of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Using Platinum Compounds in Combination With Quantitative PCR. *Front Microbiol* 12, 748337.

- Chai, A., Wang, Q., Kang, H., Yan, L., Huang, Y., Shi, Y., Xie, X., Li, L., Fan, T., Wang, Y., *et al.* (2022). Rapid Quantification of Infectious Cucumber green mottle mosaic virus in Watermelon Tissues by PMA Coupled with RT-qPCR. *Viruses* 14, 2046.
- Fraisse, A., Niveau, F., Hennechart-Collette, C., Coudray-Meunier, C., Martin-Latil, S., and Perelle, S. (2018). Discrimination of infectious and heat-treated norovirus by combining platinum compounds and real-time RT-PCR. *International Journal of Food Microbiology* 269, 64-74.
- Hong, W., Xiong, J., Nyaruaba, R., Li, J., Muturi, E., Liu, H., Yu, J., Yang, H., and Wei, H. (2021). Rapid determination of infectious SARS-CoV-2 in PCR-positive samples by SDS-PMA assisted RT-qPCR. *Science of The Total Environment* 797, 149085.
- Leifels, M., Cheng, D., Sozzi, E., Shoults, D.C., Wuertz, S., Mongkolsuk, S., and Sirikanchna, K. (2021). Capsid integrity quantitative PCR to determine virus infectivity in environmental and food applications – A systematic review. *Water Research X* 11, 100080.
- Pecson, B.M., Martin, L.V., and Kohn, T. (2009). Quantitative PCR for Determining the Infectivity of Bacteriophage MS2 upon Inactivation by Heat, UV-B Radiation, and Singlet Oxygen: Advantages and Limitations of an Enzymatic Treatment To Reduce False-Positive Results. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 5544-5554.
- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., and Koriki, S. (2020). Suitability of pepper mild mottle virus as a human enteric virus surrogate for assessing the efficacy of thermal or free-chlorine disinfection processes by using infectivity assays and enhanced viability PCR. *Water research* 186, 116409.

Bijlage 1. Materiaal en methoden – gedetailleerd

UV desinfectie

De UV desinfectie is uitgevoerd in een collimated beam opstelling (LP lamp: PLL 90W; MP lamp: 2kW HOK; sensor: sed 240W) waarin de UV dosis is bepaald volgens de berekeningen van Bolton en Linden (Bolton and Linden, 2003). Hierbij is gebruik gemaakt van een excel-rekentool geprogrammeerd door de auteurs en wordt rekening gehouden met verschillende factoren: water absorptie, gevoeligheid van de sensor, sensorfactor, divergentie, petrifactor en 'germicidal effect'.

Een oplossing van drinkwater met daaraan 1×10^8 pfu/ml MS2 gedoseerd is, is verdeeld in fracties van 50 ml en met verschillende doses UV-straling behandeld. Voor zowel lagedruk als middendruk is het water behandeld met 0, 20, 40, 60, 80, 120, 160 mJ/cm². Elke UV-bestraling is in duplo uitgevoerd. Na bestraling zijn de watermengsel gesplitst in 10 ml aliquots en ingevroren bij -80°C tot verdere analyse.

Hiervoor is het water met gedoseerde MS2 overgebracht naar petrischaaltjes (waterdiepte: 2,03 – 2,05 cm) voor zowel het lagedruk als middendruk experiment. Afstand van de petrischaaltjes tot de UV lamp was 30 cm (lagedruk) of 80 cm (middendruk). Tijdens de UV bestraling is het water continu geroerd zodat het water gelijkmatig is bestraald.

Bestralingstijden met MP-UV waren 24,8 sec (20 mJ/cm²), 49,7 sec (40 mJ/cm²), 74,5 sec (60 mJ/cm²), 99,4 sec (80 mJ/cm²), 149,1 sec (120 mJ/cm²), 198,8 sec (160 mJ/cm²). Met de LP-UV waren de bestralingstijden 54,4 sec (20 mJ/cm²), 108,8 sec (40 mJ/cm²), 163,2 sec (60 mJ/cm²), 217,6 sec (80 mJ/cm²), 326,4 sec (120 mJ/cm²), 435,2 sec (160 mJ/cm²).

UV absorptie bij 254 nm ($0,05260 \text{ cm}^{-1}$) is bepaald net als de gemiddelde 'germicidal fluence': 0,368 mW/cm² (lagedruk) en 0,805 mW/cm² (middendruk).

Chloordesinfectie

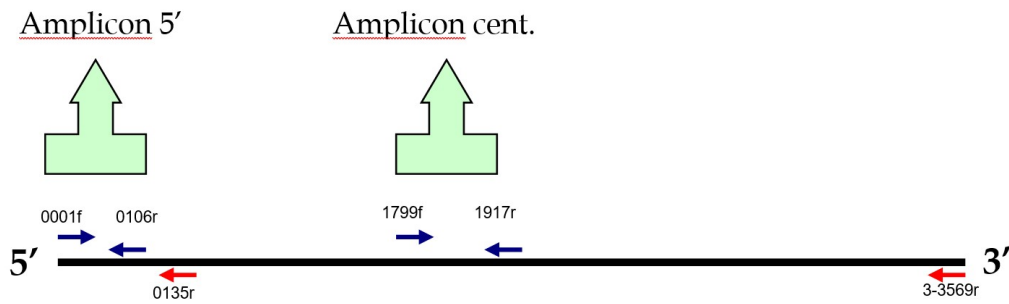
Voor de chloordesinfectie is natriumhypochloriet (NaOCl) in verschillende doelconcentraties (0,01 mg/l; 0,1 mg/l; 0,5 mg/l; 1 mg/l; 10 mg/l; 100 mg/l) toegevoegd aan 20 tot 50 ml water met 1×10^8 pve/ml MS2 bacteriofagen en geïncubeerd voor 1 en 5 minuten. De vrijchloorconcentratie is bepaald met een kuvettentest, de LCK410 kit van Hach. Door het verbruik van vrij chloor door het watermonster komt de gemeten vrij chloor concentratie niet helemaal overeen met de doelconcentraties. Na incubatie is natriumthiosulfaat toegevoegd om het vrij chloor weg te vangen en om te zetten in het inactieve totaal chloor.

Met deze gegevens is de contacttijd (CT-waarde) berekend: 0 – 0,014 – 0,07 – 0,077 – 0,30 – 0,39 – 0,97 – 1,5 – 4,8 – 10 – 50 – 100 – 500 mg*min/l.

MS2 bacteriofagen

MS2 bacteriofagen zijn aangetoond met de plaque assay volgens LMB-037, conform NEN-ISO 10705-1. Hiervoor zijn de watermonsters eerst geconcentreerd met behulp van Centricon. Het concentraat is in een verdunningsreeks uitgespateld op Tryptone-gist extract-glucose agar (TYGA)-platen met *Salmonella typhimurium* (WG49) en gedurende 18 uur geïncubeerd bij 36°C. Dezelfde procedure is herhaald met RNase in de TYG agar, waardoor groei van MS2 bacteriofagen wordt geremd. Het verschil tussen beiden is het werkelijke aantal F-specifieke RNA bacteriofagen

Bacteriofaag MS2 is ook gekwantificeerd door middel van qPCR. Omdat MS2 een RNA genoom heeft is van het RNA eerst cDNA gemaakt, waarna het is vermeerderd met qPCR (Figuur 2, Tabel).



Figuur 2. Een schematische weergave van het RNA van bacteriofaag MS2 met daarop weergegeven de positie van de primers voor de cDNA synthese (rood) en voor de qPCR (blauw).

Tabel 1. Primers gebruikt voor de detectie van MS2 RNA met qPCR.

	Forward primer	Reverse primer	cDNA primer
Amplicon 5'	GGGTGGGACCCCTTTCGG (0001f)	ATTCCGGCTACCTACAGCG (0106r)	
Amplicon cent	TGATCTTCCTCGCGATCTTTC (1799f)	GCAATTCGTCCCTTAAGTAAGC (1917r)	
RT pr 5-0135r			TCGCACAGGTCAAACCTCCTAG
RT pr 3-3569r			TGGGTGGTAACTAGCCAAGC

Ci-qPCR experimenten met hittebehandeling

Extractie virus uit plantenmateriaal

Ingevroren tabaksplant dat is geïnfecteerd met CGMMV is door Normec Groen Agro Control aangeleverd. Dit diende als bron van CGMMV om de testen mee uit te voeren. CGMMV is als volgt uit de tabaksplanten geëxtraheerd en toegevoegd aan drinkwater om ci-qPCR testen mee uit te voeren.

- 4,19 gram bevroren tabaksblad is in een schoon ziplock zakje overgebracht (met handschoenen aan en steriele lepel).



- Het bevroren tabaksblad in het zakje gekneed om plantensap vrij te maken
- Het plantensap is in een hoekje verzameld en overgepipetteerd in een greiner tube (15 ml)



- 1 ml PBS met 0,1% sulfiet is in het zakje gepipetteerd het tabaksplant is weer gekneed. Het plantensap met buffer is in een hoekje verzameld en over gepipetteerd in de greiner tube.
- Om plantenresten uit het vloeistof te verwijderen is de in totaal 4,2 ml plantensap met buffer afgedraaid bij 13.000xg voor 1 minuut. Het supernatant is over gepipetteerd naar een nieuwe greiner tube (15 ml). Het plantensap is 1:1 verdund met PBS + 0,1% sulfiet



- Deze mengsel is verdeeld over 8 epjes van 1 ml en is ingevroren bij -20°C (10⁰ verdunning). Het verkregen mengsel blijft 1 week stabiel bij 4°C. Voor lange termijn opslag bewaren bij -20°C.
- 100 µl plantensap + buffer is gebruikt voor RNA isolatie en qPCR analyse (zie verderop) om de ct-waarde te bepalen. Op basis hiervan is bepaald hoeveel plantensap aan het watermonster moet worden toegevoegd om tot een ct-waarde van tussen 20-25 te komen.
- 3 ml van het plantensap (verdunning 10⁰) is toegevoegd aan 150 ml drinkwater.
- Het water met plantensap is na menging verdeeld in 10 porties van 15 ml deze zijn gebruikt om de hittebehandeling uit te voeren.

Hitte behandeling

De volgende hittebehandelingen zijn uitgevoerd gebruikmakende van een waterbad voor incubatie van de 15 ml Greiner tubes met monster. Er is steeds ook een Greiner tube meegenomen met 15 ml water met een thermometer er in om de temperatuur in de monsters te monitoren.

Eerste serie testen (met PMAxx en CDDP)		
Monster nummer	Tempratuur (°C)	tijd (sec)
1	93*	30
2	93*	30
3	85	180
4	85	180
5	70	600
6	70	600
7	21	600
8	21	600

* Het waterbad kwam niet hoger dan 93°C, daarom is dit als maximale temperatuur meegenomen in plaats van 95°C.

Na hittebehandeling is elke monster verdeeld over 3 buizen:

- 7 ml voor uitvoer van de ci-qPCR testen door KWR (koel bewaard bij 4°C)
- 4 ml voor uitvoer van de biotesten door Groen Agrocontrol (bewaard op ijs voor transport)
- 4 ml voor uitvoer van de testen op de Biocore door Sendot (bij -20°C bewaard totdat experimenten konden worden uitgevoerd)

Tweede serie testen (met PMAxx-SD, PtCl ₄ en ProtK/RNaseA)		
Monster nummer	Tempratuur (°C)	tijd (min)
1	21°C	10
2	21°C	10
3	85°C	1
4	85°C	1
5	85°C	3
6	85°C	3
7	85°C	6
8	85°C	6
9	85°C	10
10	85°C	10
11	93°C*	0,5
12	93°C*	0,5

* Het waterbad kwam niet hoger dan 93°C, daarom is dit als maximale temperatuur meegenomen in plaats van 95°C.

De monsters zijn gebruikt voor ci-qPCR experimenten.

Ci-qPCR behandelingen

PMAxx (Biotium, 20 mM in H₂O, catalog nr. #40069)

- In het donker (PMAxx is gevoelig voor licht): 5 µl PMAxx (20 mM) is toegevoegd aan 500 µl monster (eindconcentratie PMAxx 200 µM)
- In het donker: 10 minuten bij kamertemperatuur, af en toe vortexen
- 15 minuten bij kamertemperatuur incuberen onder de een speciale lamp (GenIUL Phast blue – PhotoActivation System for tubes) om PMAxx covalent te laten binden aan DNA/RNA en niet-gebonden PMAxx te inactiveren.
- Hele volume (505 µl) geconserveerd in lysisbuffer voor RNA extractie (zie verderop).

PMAxx-SD

- Een stockoplossing van 10% SD is gemaakt in milliq water
- 5 µl 10% SD is toegevoegd aan het monster
- Het monster is geïncubeerd bij 37°C voor 30 minuten
- Daarna procedure zoals hierboven voor PMAxx uitgevoerd (totale volume 510 µl)

CDDP (250 mg)

Product Specification		
Product Name:	cis-Diammineplatinum(II) dichloride - crystalline	
Product Number:	P4394	Pt(NH ₃) ₂ Cl ₂
CAS Number:	15663-27-1	
MDL:	MFC00011623	
Formula:	H6Cl2N2Pt	
Formula Weight:	300.05 g/mol	

- Een stockoplossing van 100 mM CDDP is gemaakt in DMSO
- 5 µl stockoplossing is toegevoegd aan 500 µl monster (eindconcentratie CDDP 1000 µM)
- Dit is gedurende 30 minuten geïncubeerd bij 30°C
- Hele volume (505 µl) geconserveerd in lysisbuffer voor RNA extractie (zie verderop).

PtCl₄

Product Specification		
Product Name:	Platinum(IV) chloride - ≥99.99% trace metals basis	
Product Number:	379840	PtCl ₄
CAS Number:	13454-96-1	
MDL:	MFC00011182	
Formula:	Cl ₄ Pt	
Formula Weight:	336.89 g/mol	

- Een stockoplossing van 250mM PtCl₄ is gemaakt in DMSO
- 500 µl PBS is aan 500 µl monster toegevoegd om de pH rond 7,5 te houden
- 10 µl stockoplossing PtCl₄ is aan 1000 µl monster+PBS toegevoegd (eindconcentratie PtCl₄ 2,5 mM)
- Het monster is vervolgens 30 minuten bij 5°C geïncubeerd
- Hele volume (1010 µl) geconserveerd in lysisbuffer voor RNA extractie

ProteinaseK + RNaseA

AM2548	Proteinase K Solution (20 mg/mL)		
Packaging Lot:	2606265		
Manufacturing Date:	08.12.2022 (DD.MM.YYYY)		
Storage:	at -20±5°C		
Note:	Proteinase K is a non-specific serine protease that is useful for general digestion of proteins.		
Filling lots for components in package:			
Lot	Quantity	Description	
01311037	5 x 1.25 mL	Proteinase K Solution (20 mg/mL)	
QUALITY CONTROL			
Parameter	Method	Requirement	Result
Physical Appearance	Visual Inspection.	Clear to slightly cloudy, colorless, particulate-free liquid	Conforms
Endodeoxyribonucleases (nicking activity)	Incubation of supercoiled plasmid DNA with Proteinase K.	Not detectable	Conforms
Ribonucleases	Incubation of RNA transcript with Proteinase K.	Not detectable	Conforms
Endonucleases	Incubation of DNA standard with Proteinase K.	Not detectable	Conforms
Unit Assay	The unit activity of Proteinase K is determined at 37°C.	≥ 600 U/mL	891 U/mL

AM2270	Ambion™ RNase A (Affinity Purified), 1 mg/mL		
Packaging Lot:	2612486		
Manufacturing Date:	22.12.2022 (DD.MM.YYYY)		
Storage:	at -20±5°C		
Filling lots for components in package:			
Lot	Quantity	Description	
2612486	200 µg	RNase A, Affinity-purified	
QUALITY CONTROL			
Parameter	Method	Requirement	Result
Specific Activity	One unit is the amount of RNase A required to give an increase of absorption at 286 nm per min.	>600 U/mg	Conforms
Nonspecific Endonuclease Activity	A sample is incubated with supercoiled plasmid DNA and analyzed by agarose gel electrophoresis.	≤ 30% change in probe relative to control	Conforms
Exonuclease Activity	A sample is incubated with labeled double-stranded DNA, followed by PAGE analysis.	≤ 30% change in probe relative to control	Conforms
Protease Activity	A sample is incubated with protease substrate and analyzed by fluorescence.	≤ 30% change in probe relative to control	Conforms

- Stockoplossing ProtK was 891 U/ml
- RNaseA zoals aangeleverd was > 600 U/mg, aangenomen is dat het 600 U/ml was. Hiervan is een stockoplossing van 60 U/ml gemaakt in water
- 298 µl stockoplossing ProtK is toegevoegd aan 500 µl monster (eindconcentratie 333 U/ml) en 3 µl stockoplossing RNase A (eindconcentratie 230 mU/ml)
- De monsters zijn gedurende 30 minuten geïncubeerd bij 37°C.
- 500 µl monster geconserveerd in lysisbuffer voor RNA extractie

RNA isolatie

- Het KWR protocol (KingFisher methode met BioMerieux Nuclisens buffers) is gebruikt.
- MHV (Murine Hepatitis Virus) is gebruikt om het rendement van de extracties te bepalen.
- Extracten zijn geëluëerd in 100 µl.
- Extracten zijn bewaard bij -80°C.

RT-qPCR analyse

- 5 µl RNA extract is steeds toegevoegd aan de reacties
- De primers en qPCR programma zijn gebruikt zoals omschreven door Normec Groen Agro Control (niet openbaar). Naamgeving primers binnen KWR: CGMMV-F2 (Agrolab) en CGMMV-R2 (Agrolab)
- Eén-staps RT-qPCR is uitgevoerd met iTaq™ Universal SYBR® Green One-Step Kit (#1725151; Bio-Rad)

ELISA

ELISA-toetsen zijn uitgevoerd volgens instructies van de leveranciers (Prime Diagnostics en DSMZ).

Biotoetsen

Voor een biotoets worden de te testen monsters van plantsap of water ingebracht op jonge waardplanten voor een virus, bijvoorbeeld tabaksplanten. Na een paar weken wordt getoetst of de planten geïnfecteerd zijn geraakt met het virus. Deze toetsing kan met ELISA of (RT)-PCR uitgevoerd worden. Het aantal planten dat positief is gescoord op het totaal aantal planten is een maat voor de hoeveelheid infectieus virus in het monster.

Bijlage 2. Meetwaarden chloor- en uv-desinfectie experimenten met MS2

Chloordesinfectie MS2 (paragraaf 3.2.1)

Chloordesinfectie			Plaque assay			
CT-waarde (mg*min/l)	Contacttijd (min)	Concentratie (mg/l)	Gemiddelde (pve/ml)	SD (pve/ml)	Log ₁₀ afdoding	
0	1	0	4,98E+10	1,77E+09		
0,014	1	0,014	4,25E+10	6,36E+09	0,07	
0,077	1	0,077	3,65E+10	7,78E+09	0,13	
0,303	1	0,303	1,93E+09	6,72E+08	1,41	
0,965	1	0,965	2,95E+06	4,95E+05	4,23	
10	1	10	1,48E+04	3,54E+02	6,53	
100	1	100	500	0,00E+00	8,00	
0	5	0	4,43E+10	1,24E+10		
0,07	5	0,014	3,08E+10	6,72E+09	0,16	
0,385	5	0,077	1,93E+10	4,60E+09	0,36	
1,515	5	0,303	1,05E+06	2,83E+05	4,62	
4,825	5	0,965	7,48E+04	3,71E+04	5,77	
50	5	10	5,00E+02	0,00E+00	7,95	
500	5	100	500	0,00E+00	7,95	

Chloordesinfectie			qPCR (amplicon 5')			qPCR (amplicon cent)		
CT-waarde (mg*min/l)	Contacttijd (min)	Concentratie (mg/l)	Gemiddelde (CT-waarde)	SD	Vershil in CT-waarde	Gemiddelde (CT-waarde)	SD	Vershil in CT-waarde
0	1	0	18,1	0,3		20,1	0,9	
0,014	1	0,014	18,2	0,6	-0,135	21,0	0,7	-0,83
0,077	1	0,077	18,3	0,1	-0,225	22,1	0,1	-1,99
0,303	1	0,303	19,0	0,1	-0,96	21,4	0,1	-1,305
0,965	1	0,965	18,8	0,3	-0,755	21,9	0,3	-1,8
10	1	10	19,6	0,2	-1,51	22,9	0,7	-2,775
100	1	100	19,8	0,3	-1,77	23,0	0,2	-2,9
0	5	0	18,2	0,2		20,6	0,3	
0,07	5	0,014	18,8	0,8	-0,535	21,5	0,2	-0,88
0,385	5	0,077	19,2	0,5	-0,975	22,0	0,6	-1,375
1,515	5	0,303	18,0	0,0	0,21	23,7	0,3	-3,04
4,825	5	0,965	19,1	0,1	-0,835	23,6	0,0	-2,95
50	5	10	18,5	0,2	-0,25	23,3	0,4	-2,68
500	5	100	19,3	0,2	-1,04	24,2	0,5	-3,515

UV desinfectie MS2 (paragraaf 3.2.2)

UV desinfectie		Plaque assay			
Druk	Dosis (mJ/cm ²)	Gemiddelde (pve/l)	SD	Log	Log afdoding
LD	0	5,0E+10	9,9E+09	10,70	
LD	20	2,4E+09	9,5E+08	9,38	1,31
LD	40	8,4E+07	1,2E+07	7,93	2,77
LD	60	9,3E+06	6,4E+05	6,97	3,73
LD	80	5,0E+06	3,6E+06	6,69	4,00
LD	120	8,2E+04	2,1E+04	4,91	5,79
LD	160	3,8E+03	3,5E+02	3,57	7,12
MD	0	4,1E+10	3,5E+08	10,62	
MD	20	1,3E+09	7,1E+06	9,10	1,51
MD	40	7,5E+07	0,0E+00	7,88	2,74
MD	60	5,5E+06	4,2E+05	6,74	3,88
MD	80	6,8E+05	2,5E+04	5,83	4,78
MD	120	3,6E+04	1,0E+04	4,55	6,06
MD	160	1,0E+04	8,8E+03	4,01	6,60

UV desinfectie		qPCR (amplicon 5')			qPCR (amplicon cent)		
Druk	Dosis (mJ/cm ²)	Gemiddelde (CT-waarde)	SD	CT verschil	Gemiddelde (CT-waarde)	SD	CT verschil
LD	0	18,1	0,3		20,1	0,9	
LD	20	18,2	0,6	-0,14	21,0	0,7	-0,83
LD	40	18,3	0,1	-0,23	22,1	0,1	-1,99
LD	60	19,0	0,1	-0,96	21,4	0,1	-1,31
LD	80	18,8	0,3	-0,76	21,9	0,3	-1,8
LD	120	19,6	0,2	-1,51	22,9	0,7	-2,78
LD	160	19,8	0,3	-1,77	23,0	0,2	-2,9
MD	0	18,2	0,2		20,6	0,3	
MD	20	18,8	0,8	-0,54	21,5	0,2	-0,88
MD	40	19,2	0,5	-0,98	22,0	0,6	-1,38
MD	60	18,0	0,0	0,21	23,7	0,3	-3,04
MD	80	19,1	0,1	-0,84	23,6	0,0	-2,95
MD	120	18,5	0,2	-0,25	23,3	0,4	-2,68
MD	160	19,3	0,2	-1,04	24,2	0,5	-3,52



uw partner voor teeltzekerheid!

De Stichting Control in Food & Flowers voert onderzoek uit op het gebied van agrarische productie, voeding en hieraan gerelateerde biotechnologie. De Stichting heeft als doel het bevorderen van innovatieve technologische kennis op het gebied van productie en kwaliteit van levensmiddelen en agrarische producten in de sector. Dit vindt plaats door het uitvoeren van onderzoek en ontwikkeling, samenwerken met andere organisaties, bevorderen van technologische kennis, kennisoverdracht, voorlichting en wetenschappelijke publicaties.

Stichting Control in Food & Flowers

Distributieweg 1

2645 EG Delfgauw

T: +31(0) 15-2858124

E: info@stfoodandflowers.nl

www.stfoodandflowers.nl

KvK: 61916471