



Inactivatie van ToBRFV door hittebehandeling

NVWA, 2 juni 2020

Vraagstelling

Bij welke temperaturen wordt ToBRFV geïnactiveerd? (vraag gesteld met betrekking tot het ontsmetten van substraat).

Aanpak

Er is nog weinig informatie over ToBRFV beschikbaar. De verwachting is dat ToBRFV vergelijkbaar hittedolerant zal zijn als andere tobamovirussen. Over de verwante virussen tabaksmozaïekvirus (TMV) en tomatenmozaïekvirus (ToMV) is relatief veel gepubliceerd. Daarom is ook naar informatie gezocht over deze twee virussen. Er is gezocht in CABabstracts en op internet. In CABabstracts is gezocht op 'ToBRFV OR TMV OR ToMV' AND 'heat' NOT (stress OR resistant OR resistance OR shock)). Op internet is via Google gezocht op Tomato brown rugose fruit virus in combinatie met de termen 'hitte', 'heat' en 'disinfection'. Tevens is gezocht naar relevante informatie over TMV en ToMV op DPVweb (2020). Rapporten/publicaties over ontsmetten van zaden middels droge verhitting zijn niet meegenomen. Onzeker is namelijk of virusconcentraties in/op zaden vergelijkbaar zijn met die in/op andere materialen zoals wortels in substraatmatten (die hoge virusconcentraties kunnen bevatten) en of resultaten met zaden geëxtrapoleerd kunnen worden naar andere materialen.

Resultaten

De zoektocht op internet en in CABabstracts leverde respectievelijk twee relevante rapporten (Fera, 2020; Luijendijk et al., 2020) en drie relevante publicaties op (Broadbent et al., 1965; Steinberg et al., 1994; Runia & Amsing, 2001). De resultaten uit deze rapporten en publicaties en de datasheets op (DPVweb, 2020) worden hieronder kort besproken.

Behandeling in water en plantensap

Broadbent et al. (1965) verhitte plantensap besmet met TMV in een waterbad tot 82, 85 en 88°C gedurende 5, 10 en 20 min(uten). Het duurde 50 en 90 seconden voordat de temperatuur van het plantensap respectievelijk 82 en 88°C had bereikt. Het experiment werd herhaald. In beide experimenten kon bij 82°C geen infectieus virus meer worden aangetoond na 20 min, maar nog wel na 5 en 10 min. In één experiment kon bij 85 en 88°C na 5, 10 en 20 min geen infectieus meer virus worden aangetoond. In het andere experiment werd bij 85 en 88°C alleen volledige inactivatie verkregen na 20 min.

Steinberg et al. (1994) kon geen infectieus TMV meer aantonen in water na verhitting tot 73,8°C gedurende 2 min in een apparaat ontworpen om drainwater te ontsmetten.

Runia & Amsing (2001) konden geen infectieus ToMV meer aantonen in water na de volgende behandelingen: 84°C – 75 sec en 95°C -15 sec(onden) (commerciële verhitster; opwarmtijd niet vermeld).

Zaitlin (2000) meldt dat TMV niet volledig wordt geïnactiveerd in plantensap na 10 min bij 90°C. Een beschrijving van het onderliggende onderzoek of een referentie ontbreekt.

Hollings & Huttinga (1976) melden dat ToMV werd geïnactiveerd in besmet plantensap van tomaat na 10 min bij 85-90°C. Een beschrijving van het onderliggende onderzoek of een referentie ontbreekt.

Voorlopige resultaten van Engels onderzoek met ToBRFV laten zien dat dompelen van besmet fust in een waterbad van 90°C gedurende 5 min voldoende is voor inactivatie van het virus, maar dat 70°C – 5 min onvoldoende is (Fera, 2020).

Behandeling met calciumoxide

In onderzoek met ToBRFV kon na behandeling van besmet plantmateriaal met calciumoxide en water, waarbij temperaturen van 86°C werden bereikt geen infectieus virus meer worden aangetoond (Luijendijk et al., 2020).

Droge en vochtige verhitting

Broadbent et al. (1965) heeft het effect van verhitting op de overleving van TMV in geïnfecteerde plantendelen van tomaat bestudeerd onder droge en vochtige omstandigheden (80, 85, 90, 95, 98 en 100°C gedurende 5, 10 en 20 min). Onder droge omstandigheden (oven) werd na 100°C – 20 min nog infectieus virus aangetoond. Onder vochtige omstandigheden (plantendelen in een dichte Petri-schaal met nat filtreerpapier) kon geen infectieus virus meer worden aangetoond na 20 min - 90°C (en hoger). In een ander experiment werden verse en oude wortels met respectievelijk hoge en lage virusconcentraties geplaatst onder vochtige omstandigheden bij 82, 85 en 88°C. In de oude wortels kon geen infectieus virus meer worden aangetoond na 10 min - 85/88°C, maar bij de verse wortels werd na 20 min – 88°C nog wel infectieus virus aangetoond.

Stomen van grond

Broadbent et al. (1965) heeft diverse experimenten uitgevoerd met TMV in grond. Besmette wortelstukjes werden ingegraven waarna de grond werd gestoomd bij verschillende temperaturen gedurende verschillende perioden (Tabel). In een experiment waarbij grond was gestoomd bij 100°C gedurende 5 minuten kon geen infectieus virus worden aangetoond in de ingegraven wortelstukjes.

Tabel. Effectiviteit van stomen van grond: overzicht van experimenten met tabaksmozaïekvirus (TMV) beschreven door (Broadbent et al., 1965)

Inoculum van tomatenplanten	Temperatuur (°C)	Behandelingsduur (minuten)	Resultaten (behandelingen met 100% effect)
Dode wortelstukjes, 2 mm doorsnee, 2 cm lang	100	0,5-1-2-4-8-15	1, 2, 4, 8 en 15 min
Stukjes afstervende wortels (" <i>moribund roots with a moderate concentration</i> ")	76,7-79,5-82	7,5-15-30	79,5°C-30 min 82°C-7,5-15-30 min
Stukjes oude en afstervende wortels (" <i>root material after it had been stored for 4 months and TMV concentration had fallen to a low level...moribund roots with a high concentration</i> ")	82-85-88	5-10-20	Oude wortels: alle behandelingen Afstervende wortels: 88°C – 20 min

Discussie

De benodigde temperatuur en tijd die nodig is voor eliminatie van ToBRFV zal afhankelijk zijn van de virusconcentratie en de beschikbaarheid van water. Over het algemeen zijn onder droge omstandigheden hogere temperaturen en/of langere behandelingsperioden nodig om pathogenen te inactiveren dan onder vochtige omstandigheden. Dit geldt ook voor tobamovirussen en onderzoek laat zien dat droge verhitting bij 100°C gedurende 20 minuten onvoldoende is voor inactivatie. Er zijn geen experimentele gegevens gevonden met TMV, ToMV of ToBRFV waarbij

inactivatie werd verkregen met droge verhitting (publicaties over zaadbehandeling zijn niet meegenomen om redenen zoals eerder genoemd).

Verhitting is het meest effectief bij waterige suspensies van virusdeeltjes. Onderzoekresultaten met ToBRFV van Fera (2020) geven aan dat ToBRFV binnen 5 min kan worden geïnactiveerd in water van 90°C. Dit was een experiment waarbij besmette kistjes werden gedompeld in een waterbad van 90°C en mogelijk is daarbij een deel van de virusdeeltjes afgespoeld. Ook daarom valt niet uit te sluiten dat bij (zeer) hoge virusconcentraties niet alle virusdeeltjes worden geïnactiveerd binnen 5 min. In onderzoek van (Broadbent et al., 1965) met besmet plantensap werd in één experiment met TMV al na 5 min bij 85° en 88°C geen infectieus virus meer aangetoond, terwijl in een ander experiment na 10 min nog steeds infectieus virus kon worden aangetoond bij beide temperaturen. Zaitlin (2000) geeft zelfs aan dat 90°C – 10 min onvoldoende is voor volledige inactivatie van TMV in plantensap. De meest voor de hand liggende verklaring voor verschillen tussen experimenten binnen dezelfde studie en verschillen tussen studies zijn verschillen in virusconcentraties. Daarnaast zouden verschillen tussen studies mogelijk ook kunnen komen door eventuele verschillen in temperatuurtolerantie tussen virusstammen binnen een soort.

Voor inactivatie van ToBRFV in plantendelen en substraat met hete vochtige lucht (stomen) zijn waarschijnlijk hogere temperaturen of langere behandelingstijden nodig. Onderzoek heeft aangetoond dat de minimaal benodigde temperatuur – behandelingsduur afhankelijk is van het te behandelen materiaal (verse/afstervende wortels met hoge virusconcentraties versus oude wortels met lagere virusconcentraties). De resultaten van het onderzoek van Broadbent et al. (1965) geven aan dat een temperatuur van ca. 90°C gedurende minimaal 20 min nodig is om alle aanwezige TMV-deeltjes te inactiveren. Ook stomen bij 100°C gedurende 5 min was effectief, maar dit betrof slechts één experiment. Runia (2000) adviseert om steenwol, waarin wortels zitten die besmet zijn met een tobamovirus, te stomen bij 100°C gedurende ten minste 10 min. Naar verwachting zal bij deze temperaturen en behandelingstijden (90°C – 20 min en 100°C – 10 min) ToBRFV worden geïnactiveerd. Omdat er geen experimentele gegevens zijn met ToBRFV en condities in de praktijk kunnen verschillen met die in de gepubliceerde experimenten (bijvoorbeeld verschillen in virusconcentraties en temperatuurverloop voordat het materiaal op de gewenste temperatuur is gebracht) is het advies om de effectiviteit van stomen te toetsen. In de praktijk zouden ruimtelijke verschillen kunnen optreden in temperaturen in het te behandelen materiaal. Het is daarom belangrijk de temperatuur op verschillende plaatsen te meten en in ieder geval op de plaatsen waar de laagste temperaturen worden verwacht. De vereiste temperatuur - behandelingsduur zal aantoonbaar in al het te stomen materiaal moeten worden gehaald. Door besmette materialen, bijvoorbeeld steenwolmatten met wortels, te drogen en enkele maanden op te slaan, zullen virusconcentraties afnemen en zal de benodigde minimale temperatuur en behandelingsduur voor virusinactivatie naar verwachting afnemen zoals aangetoond voor TMV in stukjes tomatenwortels (ook dat kan experimenteel worden getoetst).

Conclusies

- ToBRFV wordt naar verwachting geïnactiveerd in water van 90°C; de behandelingsduur voor volledige inactivatie hangt waarschijnlijk af van de concentratie aan virusdeeltjes. Experimenteel onderzoek is nodig om de minimale temperatuur – behandelingsduur te bepalen die nodig is voor inactivatie van ToBRFV.
- Stomen bij 90°C gedurende 20 min of bij 100°C gedurende 10 min is naar verwachting voldoende om ToBRFV te inactiveren. Aanbevolen wordt om de effectiviteit van stomen experimenteel te testen en daarbij rekening te houden met het effect van virusconcentratie en het temperatuurverloop in het te ontsmetten materiaal.
- Droge verhitting is minder effectief dan natte verhitting. Er is geen indicatie gevonden van de benodigde temperatuur en behandelingsduur voor inactivatie onder droge omstandigheden.

Referenties

- Broadbent L, Read W & Last F, 1965. The epidemiology of tomato mosaic X. Persistence of TMV-infected debris in soil, and the effects of soil partial sterilization. *Annals of Applied Biology*, 55, 471-483.
- DPVweb, 2020. Descriptions of plant viruses [online database] [webpagina]. Beschikbaar online: <http://www.dpvweb.net/index.php>
- Fera, 2020. AHDB Research Project: PE 033 (Fera Science Ltd) Interim results - May 2020 Tomato brown rugose fruit virus: survival and disinfection. Fera Science Ltd. Beschikbaar online: https://projectblue.blob.core.windows.net/media/Default/Imported%20Publication%20Docs/AHDB%20Horticulture%20/PE%20033_%20Results%20update_March%202020.pdf
- Hollings M & Huttinga H, 1976. Tomato mosaic virus [webpagina]. Descriptions of plant viruses. Beschikbaar online: <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=156>
- Luijendijk T, Hollander P & Vermunt A, 2020. Experimenten afdoden ToBRFV in reststromen d.m.v. hydrolyse. Stichting Control in Food & Flowers. Beschikbaar online: https://www.innovatieglastuinbouw.nl/media/registered_downloads/s/scff-rapport-hydrolyse-reststroom-met-tobrfv-sign-10-april-2020.pdf
- Runia W, 2000. Steaming methods for soils and substrates. *Proceedings of the International Symposium on Chemical and Non-Chemical Soil and Substrate Disinfection* 532, 115-124 pp.
- Runia WT & Amsing JJ, 2001. Disinfection of recirculation water from closed cultivation systems by heat treatment. *Acta Horticulturae*, 548, 215-222.
- Steinberg C, Moulin F, Gaillard P, Gautheron N, Stawiecki K, Bremeersch P & Alabouvette C, 1994. Disinfection of drain water in greenhouses using a wet condensation heater. *Agronomie*, 14, 627-635. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1051/agro:19940906>
- Zaitlin M, 2000. Tobacco mosaic virus [webpagina]. Descriptions of plant viruses. Beschikbaar online: <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=370>

De NVWA heeft dit document op zorgvuldige wijze en naar beste weten samengesteld. Evenwel kan niet worden ingestaan voor de juistheid en volledigheid van de verstrekte informatie. De NVWA aanvaardt derhalve geen aansprakelijkheid voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij of als gevolg van het gebruik van de verstrekte informatie. Ook kunt u aan deze informatie geen enkel recht ontleen.