

DWA-Report

Leitlinien zur Entwicklung und Durchführung eines Abwasserüberwachungsprogramms für SARS-CoV-2

Juni 2023



GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

COROMONI

„Das diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben „Abwassermonitoring zur Bestimmung des SARS-CoV-2-Infektionsgrades der Bevölkerung und Aufbau eines flächendeckenden Frühwarnsystems – Koordination der Forschungsaktivitäten in Deutschland durch die DWA (CoroMoni)“ wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 02WRS1559 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der DWA.“

Die Deutsche Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall e. V. (DWA) setzt sich intensiv für die Entwicklung einer sicheren und nachhaltigen Wasser- und Abfallwirtschaft ein. Als politisch und wirtschaftlich unabhängige Organisation arbeitet sie fachlich auf den Gebieten Wasserwirtschaft, Abwasser, Abfall und Bodenschutz.

In Europa ist die DWA die mitgliederstärkste Vereinigung auf diesem Gebiet und nimmt durch ihre fachliche Kompetenz bezüglich Regelsetzung, Bildung und Information sowohl der Fachleute als auch der Öffentlichkeit eine besondere Stellung ein. Die rund 14 000 Mitglieder repräsentieren die Fachleute und Führungskräfte aus Kommunen, Hochschulen, Ingenieurbüros, Behörden und Unternehmen.

Impressum

Deutsche Vereinigung für
Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall e. V. (DWA)
Theodor-Heuss-Allee 17
53773 Hennef, Deutschland
Tel.: +49 2242 872-333
Fax: +49 2242 872-100
E-Mail: info@dwa.de
Internet: www.dwa.de

Verfasser:

Dr. Ann-Kristin de Regt
Sabine Thaler

Satz:

Christiane Krieg, DWA

Druck:

druckhaus köthen GmbH & Co KG
Gedruckt auf 100 % Recyclingpapier

© DWA, 1. Auflage, Hennef 2023

Alle Rechte, insbesondere die der Übersetzung in andere Sprachen, vorbehalten. Kein Teil dieser Publikation darf vorbehaltlich der gesetzlich erlaubten Nutzungen ohne schriftliche Genehmigung der Herausgeberin in irgendeiner Form – durch Fotokopie, Digitalisierung oder irgendein anderes Verfahren – reproduziert oder in eine von Maschinen, insbesondere von Datenverarbeitungsmaschinen, verwendbare Sprache übertragen werden.

Inhalt

Bilderverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	4
1 Zielsetzung	5
2 Abkürzungen	5
3 Einführung in das Abwassermonitoring	8
3.1 Abwassermonitoring.....	8
3.2 Wie funktioniert das Abwassermonitoring?	8
3.3 Was sind die Vorteile des Abwassermonitorings?	9
3.4 Welche Informationen liefert das Abwassermonitoring?	10
3.5 Grundlegende Voraussetzungen für ein effizientes Abwassermonitoringprogramm	11
4 Arbeitsschritte des Abwassermonitorings	13
5 Probenahme	14
5.1 Durchführung der Probenahme	14
5.2 Arbeitssicherheit	19
6 Auswahl eines Analyselabors	20
7 Probenvorbereitung und Analytik	21
7.1 Anreicherung der Probe	22
7.2 Schritte der Molekularen Analyse	24
7.3 Nachweis von SARS-CoV-2 Varianten	29
7.4 Qualitätskontrolle	31
8 Datenauswertung und Normalisierungsberechnung	35
9 Laborvergleich/Ringversuch	37
9.1 Unbehandelte Abwasserprobe ohne zusätzlichen Spike	37
9.2 Unbehandelte Abwasserprobe + Spike	37
10 Dateninfrastruktur und Datenflussmodelle	38
11 Exkurs in die Virologie SARS-CoV-2	42
12 Anhang	45
12.1 Häufig gestellte Fragen zum Abwassermonitoring	45
12.2 Übersicht und Beschreibung hilfreicher Links	49
12.3 Checkliste vor Beginn des Abwasserüberwachungsprogramms	52
12.4 Probenbegleitschein für jede Einzelprobe	53
12.5 Stammdatenblatt	54
12.6 Begleitparameter	55
12.7 Muster-Leistungsverzeichnisses zur Ausschreibung für Analyselabore.....	56
13 Weiterführende Literatur	60

Bilderverzeichnis

Abbildung 1: Vorteile des Abwassermonitorings in den verschiedenen Phasen einer Infektionswelle.....	10
Abbildung 2: Arbeitsschritte des Abwassermonitorings	13
Abbildung 3: Darstellung der Analytik-Arbeitsschritte im Kontext des gesamten Workflows.....	21
Abbildung 4: Darstellung der gängigen Aufkonzentrierungsmethoden. Modifiziert nach Ahmed et al. 2020.....	23
Abbildung 5: Schematischer Absorptionsverlauf einer Nukleinsäure-Messung und Darstellung möglicher Kontaminationen	25
Abbildung 6: Schematische Darstellung einer PCR	27
Abbildung 7: Verschiedenen Phasen einer PCR	27
Abbildung 8: qPCR mit Darstellung des Ct-Wertes.....	28
Abbildung 9: Schematisches Prinzip eine ddPCR.....	29
Abbildung 10: Übersicht der möglichen Qualitätskontrollen. Dargestellt im Verlauf des Analytik-Workflows.	32
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Datenflusses.....	40
Abbildung 12: Vergleich von unbehüllten und behüllten Viren	42
Abbildung 13: Schematische Übersicht von SARS-CoV-2 und seinem Genom.....	43

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich der verschiedenen Aufkonzentrierungsmethoden.....	24
--	----

1 Zielsetzung

Dieses Dokument soll eine Übersicht über den Arbeitsablauf des SARS-CoV-2-Abwassermonitorings liefern. Zu den behandelten Themen zählt der gesamte Workflow des Abwassermonitorings, über Probenahme, Analytik, Qualitätssicherung bis hin zum Datenfluss, zur Dateninterpretation und -kommunikation. Des Weiteren werden hilfreiche Dokumente bereitgestellt, die Kläranlagenbetreibern, den Gesundheitsämtern und Krisenstäben einen einfachen Einstieg ins Abwassermonitoring ermöglichen sollen. Hintergrundinformationen liefern das nötige Wissen für ein umfassendes Verständnis des Abwassermonitorings und eine zielgerichtete Umsetzung. Insgesamt soll sichergestellt werden, dass sich qualitativ hochwertige und robuste Daten generieren lassen, die den Gesundheitsbehörden und Krisenstäben ergänzende, nützliche Informationen liefern, um eine evidenzbasierte Entscheidungsfindung zu fördern und so das Pandemiemanagement zu erleichtern. Da sich die Methoden rasch weiterentwickeln und die Anwendbarkeit abhängig von den individuellen lokalen Begebenheiten ist, werden keine Standardmethoden für das Abwassermonitoring vorgeschrieben, sondern eine Übersicht über die verschiedenen Möglichkeiten gegeben.

Die Leitlinien richten sich hauptsächlich an Beschäftigte der Abwasserwirtschaft. Sie liefern aber auch nützliche Informationen für Labormitarbeitende und Beschäftigte im öffentlichen Gesundheitswesen.

2 Abkürzungen

ABAS	Ausschuss für Biologische Arbeitsstoffe
BAuA	Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin
BioStoffV	Biostoffverordnung
BMG	Bundesministerium für Gesundheit
BMUV	Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, nukleare Sicherheit und Verbraucherschutz
CASUS	Center for Advanced Systems Understanding
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cDNA	Complementary DNA/komplementäre DNA
COVID-19	Coronavirus Disease 2019
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
C _t	Cycle threshold
d(d)PCR	Digital (droplet) PCR
d. h.	Das heißt
Da	Dalton
DAkkS	Nationale Akkreditierungsbehörde der Bundesrepublik Deutschland
DEEP	Digital European Exchange Platform

DEMIS	Deutsches Elektronisches Melde- und Informationssystem für den Infektionsschutz
DIN	Deutsches Institut für Normung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
ECDC	European Center for Disease Control and Prevention
E-Gen	Envelope(Hüll)Protein-Gen
ESI-CorA	Emergency Support Instrument-Corona
etc.	Et cetera
EU	Europäische Union
EW	Einwohnerwert
FAQ	Frequently Asked Questions
Fwd	Forward
ggf.	Gegebenenfalls
h	Hour/Stunde
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
ISO	International Organization for Standardization
KA	Kläranlage
l	Liter
LOESS	Locally weighted scatterplot smoothing
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
m ³	Kubikmeter
MERS-CoV	Middle East respiratory syndrome-related coronavirus
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
M-Gen	Membran-Gen
min	Minute
MIQE	Minimum Information for publication of Quantitative PCR Experiments
N-Gen	Nucleoprotein-Gen
NGS	Next Generation Sequencing (Hochdurchsatzsequenziertechnik)
ORF	open reading frame

PCR	polymerase chain reaction. Deutsch: Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PMMoV	Pepper mild mottle Virus
qPCR	quantitative PCR
RdRP-Gen	RNA-abhängige RNA-Polymerase-Gen
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
S-Gen	Spike-Protein-Gen
SARS-CoV-2	severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. Deutsch: schweres akutes respiratorisches Syndrom Coronavirus-2
TRBA	Technische Regel für Biologische Arbeitsstoffe
VOC	Variants of Concern
VOI	Variants of Interest
WEF	Water Environment Federation
WHO	World Health Organization

3 Einführung in das Abwassermonitoring

3.1 Abwassermonitoring

Als Abwassermonitoring wird die strategische Entnahme von Proben aus dem Kanalnetz oder der Kläranlage und deren Untersuchung bezeichnet. Sie hat zum Ziel das Abwasser auf Schadstoffe und Krankheitserreger zu überprüfen und ermöglicht es, Rückschlüsse auf den Gesundheitszustand der Menschen, die an die Kläranlage angeschlossen sind, zu ziehen. Über den Nachweis von chemischen Stoffen oder Biomarkern können beispielsweise Informationen über den Konsum von Drogen, Coffein, Arzneimitteln oder die Verbreitung von Krankheitserregern gewonnen werden. Im Unterschied zu klinischen Tests oder Individualproben geben die erhaltenen Daten Auskunft auf Bevölkerungsebene und erlauben keine Rückschlüsse auf die Einzelpersonen.

Eine Anwendungsmöglichkeit des Abwassermonitorings zeigte sich in der COVID-19-Pandemie. SARS-CoV-2, das Virus, das die COVID-19-Krankheit verursacht, und dessen Fragmente werden über den Stuhl ausgeschieden und gelangen so beim Toilettengang in das Abwassersystem. Dort verliert das Virus jedoch schnell seine Infektiosität, d.h. die Fähigkeit, seinen Wirt anzustecken. Bestimmte Bestandteile des Virus, die einen Aufschluss über die Verbreitung der Krankheit in der Bevölkerung geben, können aber nachgewiesen werden. Neben dem Nachweis der Viruspräsenz kann die Abwasserüberwachung, je nach gewählter Teststrategie und Analytikmethode, auch Aufschluss über Trends in den Viruskonzentrationen sowie das Auftreten und die prozentuale Verteilung von Virusvarianten und damit über die Infektionslage geben. Das Abwassermonitoring kann so wertvolle, zu den Individualtests (PCR- und Antigen-Schnelltests von Proben der oberen Atemwege) ergänzende, Informationen liefern, die zur Bewältigung der Pandemie beitragen. Deshalb ist eine Verknüpfung des Abwassermonitoringprogramms mit den weiteren Gesundheitsdaten unerlässlich und erfordert die Einbeziehung der Gesundheitsbehörden und politischen Entscheidungsträger.

3.2 Wie funktioniert das Abwassermonitoring?

Für das Abwassermonitoring werden Proben, meist aus dem Zulauf der Kläranlage, entnommen. Diese werden dann molekularbiologisch auf die Anwesenheit von Virusfragmenten untersucht. Der Nachweis erfolgt ähnlich wie bei den klinischen Individualtests über eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Da das Virusmaterial im Abwasser jedoch deutlich verdünnter ist als das Material aus einem Nasen- oder Rachenabstrich, werden die Abwasserproben vorher gewöhnlich noch aufkonzentriert. Der Workflow und detailliertere Angaben zur Probenahme und Analytik sind in den Abschnitten 5 und 7 dargestellt. Derzeit ist es noch nicht möglich, die Inzidenz exakt aus den Daten zu berechnen, allerdings lässt sich bei einer kontinuierlichen Beprobung zuverlässig ein ansteigender oder abfallender Trend der SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser abbilden. Bei der Analyse und Interpretation der Daten müssen verschiedene Umstände bzw. Parameter und die Art des Entwässerungsnetzes Beachtung finden. Sie sollte daher von erfahrenem und geschultem Personal durchgeführt werden. Damit die Daten von der Gesundheitsseite effizient genutzt und in die Entscheidungsfindung miteinbezogen werden können, müssen sie aufbereitet und einfach zu überblicken sein. Die Abwasserdaten sind immer in Ergänzung zu den weiteren Gesundheitsdaten zu betrachten und können diese nicht ersetzen.

3.3 Was sind die Vorteile des Abwassermonitorings?

In Deutschland sind über 95 % der Bevölkerung an das Kanalisationsnetz angeschlossen (siehe <https://www.bmu.de/download/statistik-abwasserentsorgung>), daher kann das Abwassermonitoring über den Gesundheitszustand der annähernd gesamten Bevölkerung Auskunft geben. Im Durchschnitt scheiden 40 % bis 80 % der mit COVID-19 infizierten Personen Virusmaterial mit ihren Fäkalien aus (Parasa et al. 2020, Cheung et al. 2020, WHO). Dies geschieht mitunter schon vor den ersten Anzeichen einer Infektion und auch bei symptomlos Infizierten. Außerdem ist das Abwassermonitoring unabhängig davon, ob Menschen Zugang zur Gesundheitsversorgung haben bzw. diese nutzen. Bei einem Engpass an Testkapazitäten liefert das Abwassermonitoring wichtige Informationen und einen Aufschluss über die Dunkelziffer der Infizierten. Wenn bei niedrigen Inzidenzen die Testrate gering ist, kann das Abwassermonitoring bei wieder ansteigenden Werten ein wichtiges Warnsignal sein. Ein großer Vorteil des Abwassermonitorings ist also, dass die Messwerte Aufschluss über den Gesundheitszustand der gesamten Bevölkerung geben, unabhängig von Testkapazität und -bereitschaft. Eine einzige Probe liefert kostengünstig einen hohen Informationsgehalt, der für zielgerichtete Entscheidungen und Maßnahmen genutzt werden kann.

Die meisten Menschen lassen sich erst nach dem Auftreten von Symptomen auf SARS-CoV-2 testen. Da das Virus schon vor Einsetzen erster Symptome und auch bei subklinischen Fällen ausgeschieden wird und sich somit im Abwasser nachweisen lässt, kann durch das Abwassermonitoring ebenfalls wertvolle Zeit gewonnen werden – bis zu 7 Tage im Vergleich zu Daten aus klinischen Tests. Dieser Zeitgewinn ist im Falle eines ansteigenden Trends von großem Nutzen, um die Bevölkerung aufzuklären, die Testkapazitäten zu erhöhen und die Krankenhäuser vorzubereiten oder weitergehende Maßnahmen zu ergreifen. Durch eine gute Kommunikation kann die Bevölkerung so frühzeitig für eine höhere Testfrequenz, Kontaktbeschränkungen und allgemeine Hygienemaßnahmen sensibilisiert werden. Das Überwachungssystem bietet außerdem die Möglichkeit, zeitnah den Effekt von Maßnahmen zur Eindämmung der Krankheitsausbreitung zu evaluieren und ggf. nachzusteuern. Da sich auch ein absinkender Trend frühzeitig abbilden lässt, können Lockerungen unmittelbar erfolgen. Das SARS-CoV-2-Abwassermonitoring eignet sich daher nicht nur als Frühwarn- sondern auch als Entwarnsystem. Der Zeitvorsprung, den das Abwassermonitoring bietet, ist abhängig von einigen Faktoren wie der SARS-CoV-2-Variante, der Teststrategie und der Schnelligkeit der Probenanalyse (Laborkapazitäten) und Dateninterpretation und -kommunikation sowie der Überlastung des Gesundheitssystems (Meldeverzögerung, Verzögerung bei klinischen Tests). Das Abwassermonitoring kann einen wichtigen Beitrag zu einem effizienten Pandemiemanagement leisten, die Gesundheitsseite unterstützen und zum Gesamtbild der pandemischen Lage beitragen. Allerdings sollten die Abwasserdaten nicht isoliert, sondern im Kontext mit anderen Daten (z. B. klinische Tests, Belegung der Intensivbetten, Todesfälle, Impfquote) betrachtet werden. Zudem muss beachtet werden, dass die Virusmenge im Abwasser über einer bestimmten Nachweisgrenze liegen muss, die abhängig von der Größe des Einzugsgebietes, der Zusammensetzung des Abwassers aber auch der SARS-CoV-2-Variante ist, um die Präsenz eindeutig nachzuweisen. Ein negatives Ergebnis im Abwassertest bedeutet also nicht zwangsläufig, dass keine Person im Einzugsgebiet infiziert ist.

Das Abwassermonitoring ist im Prinzip als Pooltest zu bewerten. Dadurch erhält man relativ kostengünstig einen hohen Informationsgehalt über die Verbreitung von SARS-CoV-2 in der Bevölkerung. Über Sequenzierung und spezifische PCRs lässt sich außerdem die Verbreitung bestimmter SARS-CoV-2-Varianten nachweisen und verfolgen. In der Abbildung 1 sind die Vorteile des Abwassermonitorings in verschiedenen Phasen einer Infektionswelle dargestellt und den ableitbaren Informationen bzw. Maßnahmen gegenübergestellt.



Abbildung 1: Vorteile des Abwassermonitorings in den verschiedenen Phasen einer Infektionswelle

3.4 Welche Informationen liefert das Abwassermonitoring?

Informationen, die aus einem Abwassermonitoringprogramm gewonnen werden können, sind abhängig von der Teststrategie und lassen sich wie folgt unterteilen:

- Präsenz von infizierten Personen im Einzugsgebiet
- Trendverlauf (Zu- oder Abnahme) im Einzugsgebiet
- Nachweis und Ausbreitung von Varianten
- Identifikation von Hotspots

a) Präsenz von infizierten Personen im Einzugsgebiet

Für den Nachweis der Präsenz des Virus im Einzugsgebiet ist ein Vergleich mit historischen Daten nicht notwendig und daher eine Quantifizierung der SARS-CoV-2-Menge nicht zwingend erforderlich. Bei dieser Strategie wird lediglich analysiert, ob sich SARS-CoV-2-infizierte Personen im Einzugsgebiet befinden, deshalb können die Daten auch isoliert betrachtet werden. Allerdings kann dann auch keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Verbreitung des Virus zu- oder abnimmt. Es muss unbedingt beachtet werden, dass ein negativer Befund der Abwasserprobe bedeuten kann, dass das Virus im Einzugsgebiet nicht zirkuliert, es ist jedoch auch möglich, dass das Vorkommen unter der Nachweisgrenze liegt oder infizierte Personen kein Virusmaterial über den Stuhl ausscheiden. Wenn der Befund der Abwasserprobe positiv ist, bedeutet dies, dass sich mindestens eine infizierte Person im Einzugsgebiet befindet. Es kann allerdings keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Person symptomatisch oder infektiös ist. Diese Teststrategie wird hauptsächlich gewählt, wenn die Viruszirkulation in der Bevölkerung sehr gering ist. Bei einem Überschreiten der Nachweisgrenze, also dem eindeutigen Nachweis der Präsenz des Virus, sollte die Testfrequenz erhöht werden, um die weitere Entwicklung zu beobachten.

b) Trendverlauf (Zu- oder Abnahme) im Einzugsgebiet

Um Trends nachzuweisen, müssen Proben über einen längeren Zeitraum analysiert und quantifiziert werden – mindestens aber 3 Proben in einem kürzeren Zeitraum. Die Trendaussagen sind umso zuverlässiger je häufiger ein Standort beprobt wird. Die EU empfiehlt mindestens zwei Proben pro Woche. Daten zeigen jedoch, dass eine häufigere Testung empfehlenswert ist, um Ausreißer eindeutig identifizieren zu können und somit die Zuverlässigkeit des Frühwarnsystems zu steigern. Ein Trend sollte durch eine statistische Analyse von Veränderungen der Viruskonzentration bestimmt werden. Es ist zu beachten, dass Tourismusvorkommen, Pendlerverkehr oder andere Parameter, die von Probenahmetag zu Probenahmetag schwanken können, die Zusammensetzung des Abwassers verändern und die Ergebnisse der Analyse beeinflussen. Auch das Ausscheidungsverhalten unterscheidet sich individuell, abhängig vom Krankheitsverlauf und von der Virusvariante. Aus diesen Gründen lässt sich derzeit auch noch nicht von den Abwasserdaten auf die Inzidenz schließen und eine exakte Korrelation zu den klinischen Fällen im Einzugsgebiet herstellen. Um diese Unsicherheiten auszugleichen, können einige dieser Faktoren in Normalisierungsrechnungen mit Hilfe mathematischer Algorithmen berücksichtigt werden.

Die beschriebene Teststrategie wird vorrangig bei einem aktiven Pandemiegeschehen angewendet. Sie ermöglicht es, den Erfolg von steuernden Maßnahmen, z. B. Maskenpflicht und Lockdown-Maßnahmen, zeitnah zu beurteilen und ggf. nachzukorrigieren.

c) Nachweis und Ausbreitung von Varianten

Der Nachweis und die Analyse der Ausbreitung von Virusvarianten kann entweder über eine variantenspezifische PCR, über herkömmliche Sequenzierung (Sanger-Sequenzierung) oder Next-Generation-Sequencing (NGS) erfolgen. Bei der PCR kommen Primer zum Einsatz, die für eine bestimmte SARS-CoV-2-Variante spezifisch sind. Dafür ist es notwendig, dass die Sequenz der Variante und deren spezifische Mutationen bereits bekannt sind. Neu auftretende Varianten lassen sich nur über eine Sequenzierung detektieren. Bei der Sanger-Sequenzierung werden für gewöhnlich nur kurze Abschnitte des Virus-Genoms sequenziert. Dagegen ist es bei der NGS möglich, annähernd das gesamte Genom zu bestimmen (siehe Abschnitt 7.3).

d) Identifikation von Hotspots

Durch Beprobung ausgewählter Stellen des Kanalnetzes in einem Kläranlageneinzugsgebiet lassen sich die durch das Virus ausgelösten Signale bis in einzelne Stadtviertel oder Straßenzüge zurückverfolgen und so mögliche Hotspots identifizieren. Der technische, zeitliche und personelle Aufwand ist jedoch oft beträchtlich.

3.5 Grundlegende Voraussetzungen für ein effizientes Abwassermonitoringprogramm

Um die Daten aus dem Abwassermonitoring sinnvoll für den Bereich der öffentlichen Gesundheit zu nutzen, ist eine multidisziplinäre Zusammenarbeit unerlässlich. Es gilt zunächst, die notwendigen Partner und Ansprechpartner zu ermitteln. Dazu zählen die lokalen politischen Entscheidungsträger, Mitarbeiter des Gesundheitsamtes und der Krisenstäbe, Betreiber und Mitarbeiter der Kläranlagen und Analyselabore. Um eine geeignete Teststrategie zu entwickeln, sollten sich alle Beteiligten über die Möglichkeiten und Ziele, aber auch die Limitationen des Abwassermonitorings bewusst sein, die sich je nach Teststrategie, Phase der Pandemie und Analyse-methode unterscheiden können.

Bei allen Teststrategien gilt, dass man sich vor Beginn mit den spezifischen Eigenschaften und Randbedingungen von Kläranlage und Einzugsgebiet beschäftigen sollte. Pendlerverkehr, Tourismusaußenkommen, Fremdwasseranteil, Starkregen, einfließendes Schmelzwasser sowie die Art des Entwässerungssystems (Misch- oder Trennkana-lisation) beeinflussen die Ergebnisse des Abwassermonitorings und können beispielsweise entscheidend für die Wahl der Probenahmetage sein.

Bei Korrelation und Abgleich der Erkenntnisse des Abwassermonitorings mit den Gesundheitsdaten, stellt sich häufig das Problem, dass das Einzugsgebiet der Kläranlage nicht mit dem Zuständigkeitsbereich der Gesundheitsbehörde übereinstimmt. Die fehlende Deckungsgleichheit ist bei der Dateninterpretation zu berücksichtigen.

Je länger das Abwassermonitoring andauert, desto besser gelingt die Interpretation der Daten, da alle Beteiligten mit der Vorgehensweise vertraut sind. Generell ist es sinnvoll, zunächst einige Messreihen mit geeigneten Kontrollen (siehe Abschnitt 7.4) durchzuführen, bevor die Daten für das Pandemiemanagement genutzt oder an die Öffentlichkeit kommuniziert werden.

Ressourcen, die für den Workflow des Abwasserüberwachungsprogramms erforderlich sind, teilen sich auf folgende Arbeitsschritte auf:

- Probenahme und Versand
- Molekulare Analyse
- Qualitätskontrolle und Interpretation der Daten
- Nutzung der Daten für das Pandemiemanagement

Vor dem Start des Abwasserüberwachungsprogrammes sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Wer ist verantwortlich und trägt die Kosten?
- Wer sind die zu beteiligenden Personen?
- Welche Ziele stehen im Fokus des Abwassermonitorings?
- Was ist bei der Entwicklung der Teststrategie zu beachten (Probenahmeart, Begleitparameter, Beprobungshäufigkeit, Probenahmetage, Analysemethoden)?
- Wie ist der zeitliche Rahmen der Abwasserüberwachung geplant?
- Welches Personal wird federführend sein und sollte an einer Schulung teilnehmen (Kläranlage, Labor, Krisenstab)?
- Welches Material ist zu beschaffen (ggf. automatischer Probenehmer, Transportmaterial etc.)?
- Welches Analyselabor kommt in Frage?
- Wie kann der Probentransport sichergestellt werden?
- Welche besonderen Randbedingungen sind bei der Qualitätskontrolle der Daten zu beachten?
- Wer ist für die zentrale Datenhaltung, -auswertung und -normalisierung verantwortlich?
- Wie kann der Datenfluss (Kläranlage -> Labor -> Gesundheitsbehörde) digital ausgeführt werden?
- Wer muss an einem lokalen Krisenstab beteiligt werden, der sich mit der Dateninterpretation und den daraus abzuleitenden Handlungsstrategien befasst?
- Welches ist die geeignete Kommunikationsstrategie (interne Daten, öffentliche Daten)?

Da die Daten der öffentlichen Gesundheit dienen, sollten die Kosten für das Abwasserüberwachungsprogramm von der Gesundheitsseite getragen werden. Durch die Nutzung der Ergebnisse eines Abwasserüberwachungsprogramms lassen sich Einsparungen in anderen Bereichen der Pandemieüberwachung erzielen. Dazu ist es hilfreich, die Daten für die Gesundheitsbehörden so aufzubereiten, dass sie gut verständlich sind und eine schnelle Interpretation erlauben, z. B. durch farbliche Markierung in Anlehnung an ein Ampelsystem oder Pfeile, die den aktuellen Trend angeben. Optimal sind ein digitales Datenflussmodell und die Nutzung einer Cloud-Lösung. Ziel muss es sein, die Zeit zwischen Probenahme und Übermittlung der Daten an die zuständigen Gesundheitsbehörden und Krisenstäbe zu minimieren. Nur so lassen sich die Vorteile des Abwasserüberwachungsprogramms optimal nutzen. Die Einrichtung einer zentralen Datenbank und der Einsatz eines mobil nutzbaren Eingabetools

für die Kläranlagenstandorte und Labore ermöglicht die sichere und rasche Weitergabe der Daten, sowie deren Verknüpfung mit relevanten Begleitparametern und anderen Gesundheitsdaten.

Die Ziele des Programms können, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, der Nachweis der Virus-Präsenz, die Beobachtung von Trendverläufen der Viruskonzentration, der Nachweis und die Verbreitung von Virusvarianten und die Identifikation von Hotspots sein. Alle Beteiligten sollten sich über das Ziel und die Aussagekraft der erhobenen Daten bewusst sein. Zudem ist zu unterscheiden, ob Aussagen auf Bundes-, Landes- oder lokaler Ebene gewünscht sind.

Um robuste Daten zu produzieren und diese fachlich korrekt zu interpretieren, ist die qualifizierte Schulung des Personals unerlässlich. Dazu gehören die Mitarbeiter auf der Kläranlage, die die Proben entnehmen, die Labormitarbeiter, die die Analyse durchführen wie auch die Mitglieder der Krisenstäbe, die die Daten interpretieren und bewerten.

4 Arbeitsschritte des Abwassermonitorings

Im Folgenden wird als Übersicht kurz der Workflow eines langfristig angelegten Abwasserüberwachungsprogramms unter Einbeziehung der Gesundheitspolitik und der politischen Entscheidungsträger dargestellt.



Abbildung 2: Arbeitsschritte des Abwassermonitorings

Die verschiedenen Akteure, die in die Konzeption, Planung und Durchführung des Abwasserüberwachungsprogramms einbezogen werden sollten, sind die Kläranlage, das Analyselabor, die Gesundheitsbehörden und die politischen Entscheidungsträger. Am sinnvollsten ist es, wenn sich der Krisenstab zumindest aus Mitarbeitern der Kläranlage und der Gesundheitsbehörde, im Idealfall auch aus Ansprechpartnern der Labore und der Politik, zusammensetzt. Die Politik und öffentliche Gesundheitsseite müssen unter Betrachtung der Kosten-Nutzen-Aspekte ermitteln, welche Daten für die öffentliche Gesundheit einen Nutzen zur Bewältigung der Pandemie bieten. Die genaue Teststrategie sollte dann gemeinsam mit den Mitarbeitern der Kläranlage und den Laboren erarbeitet werden. Es gilt sicherzustellen, dass die Kläranlage die Beprobung leisten kann (z. B. wenn Wochenendprobenahmen geplant sind). Es ist festzulegen, welche Begleitparameter erhoben werden müssen (z. B. Volumenstrom, Temperatur). Anschließend muss ein Analyselabor, das die gewünschten Messungen durchführen kann (z. B. Biomarker, Surrogativiren, Sequenzierung), ausgewählt und der Transport zum Labor sichergestellt werden. Für die Übermittlung der Daten an die Gesundheitsbehörden stehen bereits digitale Lösungen zur Verfügung, z. B. in Form einer mobil nutzbaren Datenmaske, die sowohl der Eingabe der auf der Kläranlage erhobenen Daten und Rahmenparameter als auch der Labormesswerte dienen. Es sollten möglichst Experten zwischengeschaltet werden, die die Daten auf Richtigkeit

und Konsistenz prüfen und möglicherweise erforderliche Normalisierungsschritte durchführen (z. B. bei Regenereignissen). Plausibilitätskontrollen und Normalisierungsrechnungen können auch automatisch mit Hilfe programmierter mathematischer Algorithmen erfolgen. Wesentlich ist auch die Darstellungsart der Daten. Diese sollte für die Gesundheitsbehörden leicht interpretierbar sein. Hierfür eignen sich z. B. Trendkurven oder Ampelsysteme, die durch eindeutige Farbgebung Handlungsbedarf signalisieren. Für die Gesundheitsbehörden dienen die Daten aus dem Abwassermonitoring als ergänzende Information zur Einschätzung der pandemischen Lage. Beim Gesundheitsamt findet die Zusammenführung verschiedener Daten zur Pandemieentwicklung statt (z. B. klinische Tests, Hospitalisierungsrate, Daten aus der Abwasserüberwachung), die zusammen ein möglichst präzises Bild der pandemischen Lage liefern. Die Daten können dann über ein Dashboard dem lokalen Krisenstab und ausgewählte Daten auch der Öffentlichkeit zur Verfügung gestellt werden. Ob zur Bekämpfung der Pandemie Maßnahmen zu ergreifen sind und ab welchen Schwellenwerten diese greifen, ist von der Politik zu entscheiden. Beispielsweise kann die Politik auf Basis der Abwassermesswerte Schlussfolgerungen zur Frequenz humaner PCR- und Schnelltests ziehen und diese je nach Pandemiephase steigern oder verringern.

5 Probenahme

Die Probenahme ist der erste Schritt für den zuverlässigen Nachweis von SARS-CoV-2 im Abwasser. Vor Beginn des Überwachungsprogramms sollte unter Beachtung der lokalen Gegebenheiten und Kosten-Nutzen-Aspekte sorgfältig und detailliert eine Probenahmestrategie entwickelt werden. Dabei sind die finanziellen Mittel sowie die Größe und Art der Kläranlage und besondere Bedingungen des Einzugsgebietes zu beachten.

5.1 Durchführung der Probenahme

Um eine repräsentative Probenahme zu gewährleisten, sind zur Entwicklung der geeigneten Probenahmestrategie zunächst Detailinformationen über das lokale Abwassersystem und dessen Nutzung erforderlich. Dazu zählen die Kläranlagengröße, die Art des Entwässerungssystems (Misch- oder Trennkanalisation), der Anteil des Industrie- und Gewerbeabwassers (Indirekteinleiteranteil), Fremdwasserzufluss, Niederschläge und der Anteil der Regenwasserversickerung. Diese Informationen gilt es zusammenzutragen und zu dokumentieren. Die Tages- und Wochenganglinien geben Aufschluss über geeignete Zeiten der Probenahme. So gehen die meisten Menschen morgens zur Toilette, weshalb dann die Fäkalfracht einen Maximalwert erreicht. Es kann durchaus Sinn machen, an Stelle der 24 h-Mischprobe ein kürzeres Zeitfenster zu wählen, in dem die Hauptlast zu erwarten ist.

Wie in Abschnitt 3.4 erläutert, kommt das Abwassermonitoring hauptsächlich für die Bewertung von Trends im Zeitverlauf zur Anwendung. Unter dieser Voraussetzung ist es essenziell, die Teststrategie und Analyse im Verlauf des Überwachungsprogrammes nicht zu verändern, um Werte von verschiedenen Tagen zuverlässig vergleichen zu können.

Bei der Entwicklung der Probenahmestrategie sind folgende Aspekte wichtig:

- a) Probenahmeort
- b) Häufigkeit, Dauer und Zeitpunkt der Probenahme
- c) Probenart (unbehandeltes Abwasser - Primärschlamm)
- d) Probentyp (Mischprobe – Stichprobe, automatischer Probenehmer – Schöpfprobe)
- e) Probenvolumen

a) Probenahmeort

Der Probenahmeort sollte mit Bedacht gewählt werden und hängt von der Probenart sowie den lokalen Begebenheiten ab. Üblicherweise erfolgt die Probenahme im Zulauf der Kläranlage nach dem Sandfang, aber vor den Behandlungsstufen. Um die Verbreitung des Virus besser einschätzen zu können und Hotspots zu identifizieren, kann es sinnvoll sein, Proben im Kanalnetz zu nehmen, das der Kläranlage vorgeschaltet ist. Hierbei gilt es, den Probenahmeort so zu wählen, dass mit den vorhandenen Mitteln ein größtmöglicher Nutzen, d.h. die aussagekräftigsten Informationen für die öffentliche Gesundheit, erzielt werden kann. Die Kanalbeprobung erfordert jedoch meist einen höheren technischen, personellen, finanziellen und organisatorischen Aufwand. Es bietet sich ebenfalls an, Gebiete mit einem hohen Verkehrsaufkommen wie Flughäfen gezielt zu beproben, um die Verbreitung des Virus und seiner Varianten verfolgen zu können und eine mögliche Einschleusung neuer Varianten frühzeitig zu identifizieren. Auch Abwassermonitoringprogramme, die Gebäude oder Gebiete mit einer erhöhten Anzahl an vulnerablen Gruppen im Visier haben, z. B. Schulen oder Pflegeheime, können von Nutzen sein. Wenn kleinere Gebiete, z. B. einzelne Straßenzüge, überwacht werden, müssen ethische Erwägungen wie der Schutz der Privatsphäre und Datenschutz Beachtung finden.

Der Probenahmeort sollte mit folgenden Informationen dokumentiert werden:

- Eindeutige Beschreibung des Standortes (z. B. GPS)
- Kläranlageneinzugsgebiet
- Anzahl der an eine Kläranlage angeschlossenen Einwohner und Gesamtausbaugröße der Kläranlage in Einwohnerwerten (EW)
- Art des Entwässerungssystems (Misch- oder Trennkanalisation)
- Abwasserzusammensetzung (Anteil industriellen und gewerblichen Abwassers und Fremdwasseranteil)

b) Häufigkeit, Dauer und Zeitpunkt der Probenahme

Die Häufigkeit der Probenahme hängt davon ab, wie die Daten für die öffentliche Gesundheit genutzt werden sollen, außerdem kann die Prävalenz von COVID-19 im Einzugsgebiet eine Rolle spielen. Bei einer einmaligen oder seltenen (z. B. monatlichen) Probenahme kann die Analyse nur Auskunft über das Vorhandensein von SARS-CoV-2 im Einzugsgebiet geben. Um einen Trend statistisch berechnen zu können, sind mindestens 3 Datenpunkte notwendig. Die EU empfiehlt mindestens 2 Proben pro Woche zu entnehmen. Dementsprechend wäre eine Trendberechnung frühestens nach 8 Tagen möglich. Um Trends noch frühzeitiger und zuverlässiger zu identifizieren, macht ggf. eine höhere Probenfrequenz Sinn. Die Durchführbarkeit ist jedoch sowohl von den finanziellen Mitteln als auch von den lokalen Gegebenheiten (z. B. personelle Besetzung der Kläranlage) abhängig.

Das Abwasser kann täglichen Schwankungen unterliegen, die z. B. durch Pendlerverkehr, Tourismus oder die Einleitung von Industrieabwasser verursacht werden. Um eine konsistente und möglichst vergleichbare Analyse über den Zeitverlauf zu ermöglichen, ist es empfehlenswert, die Probenahmetage innerhalb einer Kampagne nicht zu variieren (z. B. Probenahme immer Montag und Mittwoch). Zusätzlich zu den Wochentagen ist zu prüfen, ob die Beprobung auch an einem Wochenendtag sinnvoll sein kann, um ein abgerundetes Gesamtbild zu erhalten.

Üblicherweise beträgt die Dauer der Probenahme 24 h. Dies kann jedoch je nach lokalen Gegebenheiten auch verkürzt werden. Bei einem verkürzten Zeitfenster ist jedoch zu beachten, dass die SARS-CoV-2-Konzentration im Abwasser im Tagesverlauf stark schwankt. Der Probenahmezeitraum sollte deshalb die höchste Fäkalfracht (Morgentoilette) beinhalten. Der Tagesverlauf der SARS-CoV-2-Konzentration kann deshalb vor Beginn des Überwachungsprogramms durch Erstellung einer Zeitreihe (z. B. stündliche Entnahme von Proben) bestimmt werden. Es empfiehlt sich, die Dauer der Probenahme ebenso wie die Probenahmetage und den Probenahmeort, über die Laufzeit des Überwachungsprogrammes nicht zu variieren.

c) Probenart

Für gewöhnlich lassen sich zwei Arten von Probemedien für die Abwasserüberwachung unterscheiden: Primärschlamm und unbehandeltes Abwasser.

Primärschlamm

In der Vorklärung der Kläranlage werden durch mechanische, physikalische Verfahren die festen Bestandteile des Abwassers abgetrennt und sedimentiert, die man als Primärschlamm bezeichnet. Die Weiterbehandlung des Primärschlammes kann die empfindlichen Fragmente von SARS-CoV-2 zerstören, daher sollten Proben für die Abwasserüberwachung vor dem Schritt der Klärschlammbehandlung entnommen und analysiert werden. Ein Vorteil der Analyse von Primärschlamm besteht darin, dass sich SARS-CoV-2 im Primärschlamm anreichert und somit besser nachgewiesen werden kann. Daher kann die Analyse von Primärschlamm bei geringen Inzidenzen sinnvoll sein.

Unbehandeltes Abwasser

Unbehandeltes Abwasser setzt sich, abhängig vom Entwässerungssystem und den angeschlossenen Indirekteinleitern, aus verschiedenen Komponenten zusammen, deren Anteil standortspezifisch ausfällt. Die Komponenten sind:

- Häusliches Schmutzwasser
- Industrie- und Gewerbeabwasser
- Niederschlagswasser (Mischsystem)
- Ggf. Fremdwasser

Abhängig von der Überwachungsstrategie erfolgt die Probenahme im Zulauf der Kläranlage oder an ausgewählten Überwachungspunkten im vorgeschalteten Kanalnetz. Um Störungen bei der weiteren Analyse zu vermeiden, hat es sich als sinnvoll erwiesen, die Proben aus dem Zulauf der Kläranlage nach dem Sandfang zu entnehmen. Wegen der starken Verdünnung des Virus-Materials im Abwasser ist zunächst eine Aufkonzentrierung der Probe (siehe Abschnitt 7.1) notwendig.

Die im Weiteren folgenden Angaben beziehen sich auf Proben von unbehandeltem Abwasser, da dies die üblichste Probenart ist.

d) Probentyp

Um Proben aus unbehandeltem Abwasser zu gewinnen, gibt es zwei Methoden: Stichproben oder Mischproben. Bei beiden Methoden sollte darauf geachtet werden, dass die Probenahme an einem gut durchmischten, repräsentativen Ort erfolgt. Detaillierte Informationen zur korrekten Probenahme finden sich in der ISO 5667-10:2020-11 Wasserbeschaffenheit - Probenahme - Teil 10: Anleitung zur Probenahme von Abwasser.

Stichproben

Stichproben werden zu einem bestimmten Zeitpunkt am Tag entnommen. Von Vorteil ist, dass kein automatischer Probenehmer vorhanden sein muss und der Aufwand verhältnismäßig gering ist. Ein Nachteil von Stichproben besteht jedoch darin, dass sich Tagesschwankungen in der Abwasserzusammensetzung und der SARS-CoV-2-Konzentration wegen des kurzen Zeitfensters möglicherweise nicht erfassen lassen und die Probe dadurch weniger repräsentativ ist. Stichproben sollten immer zum gleichen Zeitpunkt, am gleichen Ort und möglichst zur Spitzenzeit des Virenaufkommens im Abwasser (für gewöhnlich der Zeitpunkt der Morgentoilette) entnommen werden. Da dieser Spitzenwert jedoch schwanken kann und schwer vorherzusagen ist, sind Mischproben zu bevorzugen. Die Entnahme von Schöpfproben ist in der ISO 5667-10 detailliert erklärt. Es sollte darauf geachtet werden, dass sorgfältig gereinigte Materialien Verwendung finden. Die Schöpfkelle ist in Fließrichtung des Abwassers zu verwenden und darf den Boden oder die Begrenzung des Beckens nicht berühren. Eine qualifizierte Stichprobe besteht aus mindestens fünf Stichproben, die im Abstand von nicht weniger als zwei Minuten innerhalb eines Zeitraumes von nicht mehr als zwei Stunden entnommen und in ein Probengefäß abgefüllt werden.

Mischproben

Mischproben setzen sich aus mehreren Stichproben in einem definierten Zeitraum zusammen. Die Entnahme der Probe kann entweder volumenproportional (z. B. 10 ml/1000 m³) oder zeitproportional (z. B. 50 ml/h) erfolgen. Bei schwankenden Durchflussbedingungen weisen volumenproportionale Proben eine höhere Repräsentativität auf. Die Proben lassen sich entweder manuell entnehmen (z. B. mit einer Schöpfkelle) oder mit Hilfe eines automatischen Probenehmers. Die Proben sollten direkt nach der Probenahme gekühlt werden (4 °C, Kühltank oder automatischer Probenehmer mit Kühlkapazität). Für gewöhnlich kommt eine 24 h-Mischprobe zum Einsatz. Start und Ende der Probenahme sollten möglichst nicht variieren.

Bei anschließender Verteilung der Probe auf mehrere Gefäße ist vorher eine Homogenisierung durchzuführen. Es dürfen nur gereinigte Probengefäße, besser sogar neue, Verwendung finden. Sie sind nach Befüllen von außen zu desinfizieren, da es beim Befüllen zu einer Kontamination der Außenseite kommen kann.

e) Probenvolumen

Das geeignete Probenvolumen hängt von Faktoren wie der Probenart, dem Probentyp und vor allem der verwendeten Analyseverfahren ab. Meist werden nicht mehr als 100 ml Abwasser für die Aufkonzentration eingesetzt, ein Probenvolumen von 500 ml reicht sicher für die Analyse und eventuelle Rückstellproben aus.

Ein hohes Probenvolumen ermöglicht es, bei geeigneter Aufkonzentration auch geringere SARS-CoV-2-Konzentrationen nachzuweisen. Allerdings kann ein höheres Probenvolumen auch zu einer verstärkten Anreicherung von Inhibitoren führen, die die RT-PCR stören können. Das Probenvolumen sollte daher zwischen den Mitarbeitern der Kläranlage und dem Analyzelabor abgestimmt werden.

Durchführung der Probenahme

Die Probenahme, Lagerung, Homogenisierung und der Transport sollten in Übereinstimmung mit folgenden Vorschriften und Normen erfolgen:

- DIN EN ISO 5667-1:2007-04
Wasserbeschaffenheit - Probenahme - Teil 1: Anleitung zur Erstellung von Probenahmeprogrammen und Probenahmetechniken (ISO 5667-1:2006); Deutsche Fassung EN ISO 5667-1:2006
- DIN EN ISO 5667-3:2019-07
Wasserbeschaffenheit - Probenahme - Teil 3: Konservierung und Handhabung von Wasserproben (ISO 5667-3:2018); Deutsche Fassung EN ISO 5667-3:2018
- ISO 5667-10:2020-11
Wasserbeschaffenheit - Probenahme - Teil 10: Anleitung zur Probenahme von Abwasser
- DIN EN ISO 5667-16:2019-03
Wasserbeschaffenheit - Probenahme - Teil 16: Anleitung zur Probenahme und Durchführung biologischer Testverfahren (ISO 5667-16:2017); Deutsche Fassung EN ISO 5667-16:2017
- DIN EN ISO 19458:2006-12
Wasserbeschaffenheit - Probenahme für mikrobiologische Untersuchungen (ISO 19458:2006); Deutsche Fassung EN ISO 19458:2006
- DIN 38402-11:2009-02
Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Allgemeine Angaben (Gruppe A) - Teil 11: Probenahme von Abwasser (A 11)
- DIN 38402-30:1998-07
Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Allgemeine Angaben (Gruppe A) - Teil 30: Vorbehandlung, Homogenisierung und Teilung heterogener Wasserproben (A 30)

■ DIN EN 16479:2014-09

Wasserbeschaffenheit - Leistungsanforderungen und Konformitätsprüfungen für Geräte zum Wassermonitoring - Automatische Probenahmegeräte für Wasser und Abwasser; Deutsche Fassung EN 16479:2014

Es empfiehlt sich das gesamte Personal, das die Probenahme durchführt, vor dem Start des Abwassermonitoringprogrammes zu schulen, um eine einheitliche Durchführung der Probenahme zu gewährleisten und Fehler auszuschließen.

Es ist ratsam, die notwendige Ausrüstung vor dem tatsächlichen Start der Probenahme vorzubereiten und griffbereit zu halten. Die Probenflaschen sollten möglichst neu oder zumindest autoklaviert sein. Nach Möglichkeit sollten nur luftdicht verschließbare, bruchsichere und frostsichere Probengefäße zum Einsatz kommen. Ist beabsichtigt, die Proben auf verschiedene Gefäße aufzuteilen oder vom Probenahmegefäß in ein Transportgefäß umzufüllen, ist eine vorausgehende Homogenisierung der Probe unerlässlich.

Die Homogenisierung kann abhängig vom Volumen der Probe durch mehrmaliges umdrehen oder durch mechanisches Mischen erfolgen. Alternativ kann ein Dispergierer, Schüttler oder ein Sonicator-Gerät verwendet werden. Da dies das Ergebnis der Analyse beeinflussen kann, sollte ein entsprechender Vermerk auf dem Probenahmeschein erfolgen. Um Beschädigungen beim Transport (z. B. durch Einfrieren) zu vermeiden, ist es ratsam, das Probengefäß nicht vollständig zu füllen.

Die Proben sollten gekühlt (4 °C) gelagert werden. Einfrieren ist in jedem Fall zu vermeiden, da dies zu einem hohen Signalverlust und höherer Variabilität der Ergebnisse führen kann. Aus dem gleichen Grund ist auch eine Überhitzung der Proben zu verhindern. Die Proben sollten nach der Probenahme möglichst ohne Zeitverzögerung in gekühlten Boxen (z. B. mit Kühlakkus) zum Labor transportiert werden. Hierdurch lässt sich zum einen eine Degradation der SARS-CoV-2-Fragmente vermeiden und zum anderen ist eine rasche Analyse anzustreben, um einen Frühwarneffekt zu erzielen. Die übliche Vorgabe lautet, dass die Probe spätestens 24 h nach Probenahme im Labor angekommen sein sollte. Die Bedingungen für die Probenahme sind nach Möglichkeit während der Überwachungsphase nicht zu verändern.

Dokumentation der Probenahme

Die Probenbehälter sind sorgfältig zu beschriften. Folgende Informationen sind gut lesbar anzuführen:

- Probenahmeort
- Datum und Uhrzeit der Probenahme
- Name oder Initialen des Probennehmers
- Probenidentifikationsnummer

Die Bedingungen bei der Probenahme müssen immer auf einem Probenbegleitschein oder digital erfasst werden (Probenbegleitschein, siehe Abschnitt 12.4). Darauf werden auch Abweichungen vom üblichen Probenahmeprotokoll notiert, die die Analyse beeinflussen können.

Für die Normalisierung der ermittelten Genkopienzahl und Einschätzung der Ergebnisse benötigt man weitere Parameter, s.g. Begleitparameter, die üblicherweise auf Kläranlagen routinemäßig erfasst werden. Diese sind im Formular Begleitparameter (siehe Abschnitt 12.6) aufgeführt (z. B. hydraulische Fracht, Volumenstrom, CSB, N_{ges} , P_{ges}) und sind ebenfalls im vorgegebenen Formular oder digital zu dokumentieren.

5.2 Arbeitssicherheit

Bislang gibt es keine Hinweise darauf, dass jemand durch den Kontakt mit Abwasser an COVID-19 erkrankt ist. Die Standardpraktiken im Zusammenhang mit dem Betrieb von Kläranlagen sollten ausreichen, um das Betriebspersonal vor SARS-CoV-2 zu schützen. Diese Standardpraktiken umfassen technische und administrative Kontrollen, regelmäßiges Händewaschen, spezielle sichere Arbeitsverfahren und eine persönliche Schutzausrüstung, die beim Umgang mit unbehandeltem Abwasser erforderlich sind.

Die folgenden Hinweise beziehen sich auf den Umgang mit der Gefährdung durch das Coronavirus SARS-CoV-2 und das Risiko, bei Arbeiten in abwassertechnischen Anlagen an COVID-19 zu erkranken.

Biostoffverordnung/TRBA 220

Der Umgang mit biologischen Arbeitsstoffen in abwassertechnischen Anlagen ist auf Grundlage der Biostoffverordnung (BioStoffV) durch die Technische Regel für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA) 220 „Sicherheit und Gesundheit bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen in abwassertechnischen Anlagen“ geregelt.

Gefährdungsbeurteilung bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen in abwassertechnischen Anlagen

Der Arbeitgeber hat entsprechend § 7 BioStoffV eine Gefährdungsbeurteilung bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen durchzuführen. Dazu hat er sich vor der Aufnahme von Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen ausreichende Informationen zu beschaffen, die eine Gefährdungsbeurteilung hinsichtlich biologischer Gefährdungen ermöglichen (§ 5 BioStoffV). Aus der Bewertung der Informationen hat die Ableitung von Schutzmaßnahmen zu erfolgen.

Das Coronavirus (SARS-CoV-2) ist von Mensch zu Mensch übertragbar. Hauptübertragungsweg ist die Tröpfcheninfektion. Dies kann direkt von Mensch zu Mensch über die Schleimhäute der Atemwege geschehen oder auch indirekt über Hände, die mit Mund- oder Nasenschleimhaut sowie der Augenbindehaut in Kontakt kommen.

In Abwasserbetrieben treten in der Regel biologische Arbeitsstoffe der Risikogruppen 1 und 2 auf. Das Coronavirus SARS-CoV-2 wurde vom Ausschuss für Biologische Arbeitsstoffe (ABAS) aus präventiver Sicht vorläufig in die Risikogruppe 3 nach Biostoffverordnung eingestuft.

Die für den Arbeits- und Gesundheitsschutz übergeordnet zuständige Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA) hat am 09.04.2020 eine neue Gefährdungsbeurteilung veröffentlicht:

„Nach derzeitigem Stand des Wissens ist eine Übertragung von SARS-CoV-2 über den Weg des Abwassers sehr unwahrscheinlich. Eine Gefährdung durch SARS-CoV-2 für Beschäftigte an und in abwassertechnischen Anlagen außerhalb medizinischer Bereiche ist nach Stand des Wissens nicht gegeben. Der molekularbiologische Nachweis der Erbsubstanz des Virus im Abwasser ist nicht gleichbedeutend mit seiner Infektiosität. Die Krankheit wird im direkten Kontakt mit Erkrankten durch Tröpfchen- oder Schmierinfektion übertragen. Dessen ungeachtet sind Schutzmaßnahmen, wie in der TRBA 220 „Sicherheit und Gesundheit bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen in abwassertechnischen Anlagen“ formuliert, zu beachten.“

(s. <https://www.baua.de/DE/Themen/Arbeitsgestaltung-im-Betrieb/Coronavirus/FAQ/FAQ-07.html>)

Abwasserbetriebe können auch weiterhin davon ausgehen, dass sie den Anforderungen der BioStoffV Folge leisten, sofern die Technische Regel für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA) 220 „Sicherheit und Gesundheit bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen in abwassertechnischen Anlagen“ konsequent umgesetzt wird.

Siehe hierzu auch die DWA-Veröffentlichung:

„Schutzmaßnahmen gegen die Gefährdung durch Coronavirus SARS-CoV-2/COVID-19 bei Arbeiten in abwassertechnischen Anlagen – Information des DWA-Fachausschusses BIZ-4 „Arbeits- und Gesundheitsschutz“

(https://de.dwa.de/files/_media/content/03_THEMEN/Arbeits-%20und%20Gesundheitsschutz/Schutzma%C3%9Fnahmen_Gefaehrdung_durch_Coronavirus.pdf).

Vorschriften zum sicheren Umgang und Transport von Abwasserproben sind in folgenden Normen genauer erläutert:

- DIN EN ISO 5667-3:2019-07
Wasserbeschaffenheit - Probenahme - Teil 3: Konservierung und Handhabung von Wasserproben (ISO 5667-3:2018); Deutsche Fassung EN ISO 5667-3:2018
- ISO 5667-10:2020-11
Wasserbeschaffenheit - Probenahme - Teil 10: Anleitung zur Probenahme von Abwasser
- DIN EN ISO 19458:2006-12
Wasserbeschaffenheit - Probenahme für mikrobiologische Untersuchungen (ISO 19458:2006); Deutsche Fassung EN ISO 19458:2006

6 Auswahl eines Analyzelabors

Für die Durchführung zuverlässiger Virusnachweis-Assays im Rahmen eines SARS-CoV-2-Abwasserüberwachungsprogramms sind häufig Anpassungen der klinischen Molekulantests erforderlich. Bei der Auswahl eines Analyzelabors ist darauf zu achten, dass ein Labor, das die molekulardiagnostische Analyse von klinischen Proben anbietet, sich nicht automatisch für die Analyse von Umweltproben eignet.

Ein Labor, das bereits Erfahrung mit Umweltproben oder sogar dem Nachweis von Viren oder SARS-CoV-2 aus Abwasserproben hat, ist zu bevorzugen. Zur Überprüfung der Leistung kann das Labor anonymisiert Ergebnisse aus früheren SARS-CoV-2-Untersuchungen vorlegen.

Folgende Faktoren beeinflussen die Auswahl eines Analyzelabors:

- Kosten
- Analysedauer
- Vorerfahrung
- Entsprechende Akkreditierungen
- Öffnungszeiten des Labors

Die Labore sollten nach DIN EN ISO/IEC 17025:2018-03 sowie DIN EN ISO 15189:2014-11 (Medizinische Laboratorien - Anforderungen an die Qualität und Kompetenz) inklusive Durchführung von Real-Time quantitativen Polymerasekettenreaktionen (RT-qPCR) nach DIN EN ISO 15189 akkreditiert sein. Die DIN EN ISO 17025 legt allgemeine Anforderungen an die Kompetenz, an die Unparteilichkeit und für die einheitliche Arbeitsweise von Laboratorien fest und ist auf alle Organisationen anwendbar, die Labortätigkeiten durchführen. Zudem muss die Transportsicherheit und die Einhaltung der Kühlkette gemäß DIN 38402-11, DIN EN ISO 5667-3 und DIN EN ISO 5667-16 ununterbrochen bis zur Bearbeitung der Proben nachweisbar sichergestellt sein.

Auf den Internetseiten der Deutschen Akkreditierungsstelle (DAkkS) lassen sich Labore, die nach den entsprechenden Normen akkreditiert sind, über einen Suchfilter identifizieren (<https://www.dakks.de/de/akkreditierte-stellen-suche.html>). Zudem haben Labore die Möglichkeit,

ihre Eignung durch die Teilnahme an Ringversuchen oder Laborvergleichsuntersuchungen mit guter Nachweisgrenze unter Beweis zu stellen (siehe Abschnitt 9).

Es ist üblich, dass kommerzielle Labore Probengefäße bereitstellen und den Transport zum Labor übernehmen. Dies sind Fragen, die es bei der Auftragsvergabe zu klären gilt. Des Weiteren ist die Frage zu beantworten, ob auch am Wochenende und an Feiertagen Proben bearbeitet oder zumindest entgegengenommen und gekühlt werden können. Um den Frühwarneffekt des Überwachungssystems effizient auszuschöpfen, muss die Analyse und Ergebnisübermittlung so schnell wie möglich erfolgen. Für gewöhnlich wird ein Zeitraum von 24 h von Probenahme bis Ankunft der Proben im Labor angestrebt, sowie weitere 24 h bis zur Übermittlung der Ergebnisse. Für die Qualitätssicherung in der molekularen Diagnostik ist es wesentlich, bei allen Tests fortlaufend Qualitätskontrollen wie Positiv- und Negativkontrollen mitzuführen (siehe Abschnitt 7.4). Die mit den Kontrollen generierten Messwerte erlauben es, die Reproduzierbarkeit der Tests und relevante Kenngrößen, z. B. die Nachweisgrenze und ggf. Abweichungen von der erwarteten Leistungsfähigkeit der Tests, zu erkennen. Außerdem sollte das Labor einen Ansprechpartner für Rückfragen, z. B. zu Unregelmäßigkeiten in den Ergebnissen, festlegen.

Ein Musterleistungsverzeichnis zur Ausschreibung für die Analytik im Abwassermonitoring findet sich in Abschnitt 12.7.

7 Probenvorbereitung und Analytik

Die molekulare Analyse der Abwasserproben umfasst die Probenvorbereitung, die Aufkonzentrierung der Probe, die RNA-Extraktion sowie die RT-PCR. Die letzten beiden genannten Schritte sind in ihrer Durchführung fast identisch zur Analyse von klinischen Proben mittels PCR. In Abbildung 3 sind die Arbeitsschritte der Analytik für das Abwassermonitoring im Kontext des gesamten Workflows von Probenahme bis zur Visualisierung und Kommunikation dargestellt.

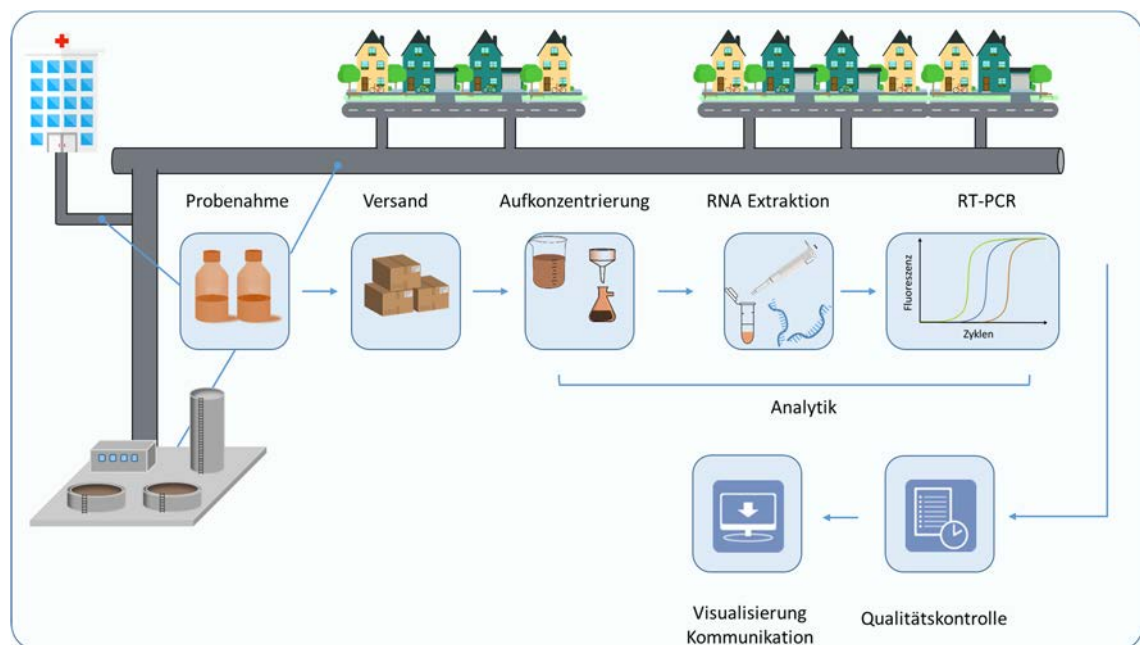


Abbildung 3: Darstellung der Analytik-Arbeitsschritte im Kontext des gesamten Workflows

7.1 Anreicherung der Probe

Bei der Ankunft im Labor sollte überprüft werden, ob die Proben unbeschädigt sind und die Kühlung während des Transports sichergestellt war (Messung der Probentemperatur). Abwasserproben sind so schnell wie möglich zu verarbeiten - am besten noch am Tag des Eingangs. Andernfalls müssen die Proben bis zur Verarbeitung bei 4°C gelagert (nicht länger als vier Tage) und möglichst mit einer Gesamtprozesskontrolle versehen werden, um die Degradation während der Lagerung nachvollziehen zu können (siehe Abschnitt 7.4). Allgemein ist die Übermittlung der Analyseergebnisse 24 Stunden nach Probeneingang anzustreben.

Probenvorbereitung

Es empfiehlt sich, die Proben vor der Analyse zu homogenisieren, um die bei der Lagerung und Transport abgesetzten Partikel zu resuspendieren. Das Mischen kann durch einfaches Umdrehen und mechanisches Mischen oder mit einem Schüttler, Dispergierer oder Sonicator-Gerät erfolgen.

Je nach Zusammensetzung des Abwassers und Art der gewählten Anreicherungs-methode macht eine Abtrennung von den im Abwasser vorhandenen großen Feststoffen (z. B. durch Zentrifugation oder Filtration) vor der Aufkonzentrierung Sinn. Die Feststoffabtrennung erleichtert meist die nachfolgende Aufkonzentrierung und verringert den Grad der Inhibition in der PCR, allerdings führt sie u.U. zu einem Verlust von Virusmaterial.

Eine Pasteurisierung der Proben zur Laborsicherheit hat sich als unnötig herausgestellt, weil das Virusmaterial nicht mehr infektiös ist. Zudem verursacht die Pasteurisierung, je nach Durchführung (Dauer und Temperatur), eine Verringerung des Signals.

Aufkonzentrierung

Da die SARS-Cov-2-RNA, die in der Analyse nachgewiesen werden soll, im Abwasser stark verdünnt vorliegt, ist eine Aufkonzentrierung der Abwasserprobe empfehlenswert. Es können verschiedene Methoden, die eine angemessene Wiederfindung für den Nachweis von SARS-CoV-2 in Abwasser ermöglichen, verwendet werden. Die Wahl der Methode wird von vielen Faktoren bestimmt:

- Kosten
- Laborausstattung
- Verfügbarkeit der Reagenzien
- Zeit
- Ausbildung/Präferenz des Laborpersonals
- Probendurchsatz
- Effizienz der Methode (Grad der Aufkonzentrierung)
- Art der Probe (z. B. Anteil Feststoffe)
- Probenvolumen

Methoden, die häufig zur Aufkonzentrierung verwendet werden, sind:

- Polyethylenglykol (PEG)-Fällung
- Ultrafiltration
- Membranfiltration (elektronegative Membran)
- Ultrazentrifugation
(Protokoll, z. B. Zheng et al. 2022, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8816846/>)
- Milchflockung
(Protokoll z. B. Philo et al. 2020, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7832770/>)

I Nanotrap

Die wichtigsten Methoden werden im Folgenden kurz erläutert und Verlinkungen zu Beispiel-Protokollen gegeben. Da sich die Methoden rasch weiterentwickeln und neue Produkte auf den Markt kommen, ist es schwer, eine Methode oder ein Protokoll vorzuschreiben. Es ist wichtig, sich regelmäßig über Neuerungen zu informieren.

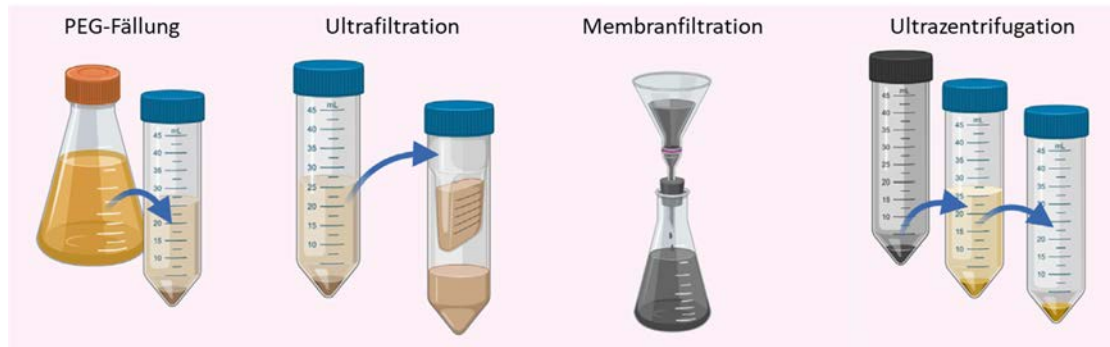


Abbildung 4: Darstellung der gängigen Aufkonzentrierungsmethoden. Modifiziert nach Ahmed et al. 2020.

PEG -Fällung

Polyethylenglykol-Fällung: Virale RNA kann aus einer Wassermatrix durch Polyethylenglykol (PEG)-Fällung konzentriert werden. Der Abwasserprobe wird PEG hinzugefügt, das Gemisch wird inkubiert (wenige Minuten bis mehrere Stunden) und anschließend zentrifugiert. Das Pellet enthält das Virusmaterial und kann entweder durch Resuspendierung mit einem Lysepuffer oder Trizol auf die RNA-Extraktion vorbereitet werden.

Bei dieser Methode ist ein längerer Zentrifugationsschritt erforderlich, daher ist sie im Vergleich zu anderen Aufkonzentrierungsmethoden eher zeitaufwändig. Sie ist aber auch kostengünstig, weil keine speziellen Filter oder teuren Geräte benötigt werden.

Beispiel-Protokolle:

https://www.norman-network.com/nds/sars_cov_2/SOP.pdf

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7917696/>

Ultrafiltration

Ultrafiltration beruht auf dem Prinzip des Größenausschlusses. Dabei leitet man die Abwasserprobe durch Kapillaren, Hohlfasern oder durch flache Blätter mit tangentialem Fluss, die gewöhnlich eine Molekulargewichtsgrenze von 30-100 kDa haben. Aufgrund der Porengröße können Wasser und Substanzen mit niedrigem Molekulargewicht die Filter passieren und in das Filtrat gelangen, während größere Substanzen wie Viren und andere Mikroorganismen im Retentat zurückbleiben. Das Startvolumen hängt von der Größe der Filter ab, gewöhnlich werden 30-100 ml verwendet. Durch Zentrifugation der Filter lässt sich die Filtration beschleunigen. Die Flüssigkeit (für gewöhnlich weniger als 2 ml), die vom Filter zurückgehalten wird, enthält die Viren. Da die Filter verstopfen können, ist bei dieser Methode eine Vorbehandlung zur Entfernung der größeren Feststoffe empfehlenswert.

Beispiel-Protokolle:

<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.estlett.0c00357>

https://www.norman-network.com/nds/sars_cov_2/SOP.pdf

Membranfiltration (elektronegative Membran)

Für die Aufreinigung von Viren mittels elektronegativer Membranen ist eine vorherige Ansäuerung der Proben erforderlich. Der pH-Wert der Abwasserprobe wird auf ca. 3.5 eingestellt. Dadurch erhalten

die Viruspartikel eine positive elektrische Nettoladung. Die pH-angepasste Abwasserprobe leitet man nun durch einen 0.45 µm Filter. Die positiv geladenen Viruspartikel binden an den negativ geladenen Filtern und können im Anschluss direkt isoliert werden. Für eine gesteigerte Effizienz ist eine Bead-basierte, mechanische Lyse zu empfehlen. Dabei wird der Filter zusammen mit einem Puffer in ein Gefäß mit Beads, z. B. aus Glas, gegeben und homogenisiert. Anschließend folgt eine Zentrifugation, bei der die Beads und die Filter-Reste pelletiert werden. Im Überstand befindet sich die Flüssigkeit mit den Viren und der Viren-RNA.

Beispiel-Protokoll: Ahmed

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7165106/>

Die nachfolgende Tabelle vergleicht die vorgestellten Methoden der Aufkonzentrierung von Virus-RNA.

Tabelle 1: Vergleich der verschiedenen Aufkonzentrierungsmethoden

	PEG-Fällung	Ultrafiltration	Membranfiltration	Ultrazentrifugation
Zeitaufwand	Hoch	Gering	Gering	Hoch
Kosten	Günstig	Eher hoch	Eher hoch	Eher günstig
Eingesetztes Volumen	Bis ca. 1 l	Bis ca. 70 ml	Bis ca. 200 ml	Bis ca. 50 ml
Besondere Ausstattung		Ultrafilter (Centrifugal Unit)	Evtl. Bead-Beating System	Ultrazentrifuge
Mögliche Probleme	Evtl. Verwendung von Trizol	Verstopfen der Membran	Verstopfen der Membran	Wenige Proben gleichzeitig prozessierbar
Besonderheiten			Vorbehandlung nötig (pH/MgCl ₂)	
Vorteil		Konstante Ergebnisse		

7.2 Schritte der Molekularen Analyse

Die Analyseschritte nach Aufkonzentration der Abwasserprobe sind von der Funktionsweise identisch mit der PCR-Analyse von klinischen Proben. Die aufkonzentrierten Proben können jedoch je nach Zusammensetzung der Abwasserprobe und abhängig von der gewählten Aufkonzentrierungsmethode Inhibitoren enthalten, die die Reverse Transkription und die PCR hemmen. Daher sind unbedingt Kontrollen zur Qualitätssicherung durchzuführen (siehe Abschnitt 7.4). Außerdem können manche Reagenzien, die bei klinischen Proben gut funktionieren, für Abwasserproben ungeeignet sein. Eine einfache Übertragung des Analyseprotokolls von klinischen Proben auf Abwasserproben ist daher meist nicht möglich.

RNA-Extraktion

Für den Nachweis der SARS-CoV-2-Zirkulation in der Bevölkerung ist nicht das komplette Virus erforderlich, sondern das Virus-Genom bzw. spezifische Fragmente des Genoms. Bei Coronaviren besteht das Genom aus RNA. Nach der Aufkonzentrierung der Abwasserprobe wird deshalb in einem ersten Schritt die gesamte RNA, die sich in der Probe befindet, in möglichst guter Qualität extrahiert. RNA ist empfindlich und anfällig für Degradation, beispielsweise befinden sich auf der Haut RNA-degradierende RNasen (Enzyme, die RNA abbauen). Außerdem können Aerosole und Staub kontaminierende RNA und

DNA enthalten. Daher ist bei der Laborarbeit auf Sauberkeit zu achten und es sollten möglichst neue, sterile Materialien verwendet und regelmäßig adäquate Kontrollen durchgeführt werden.

Bei der RNA-Aufreinigung kommen gewöhnlich entweder Silika-Membranen zum Einsatz, magnetische Beads oder die Extraktion geschieht mit Phenolen und Alkohol. Viele Firmen bieten für die RNA-Extraktion Kits an, die speziell auf Umweltproben ausgelegt sind und alle benötigten Reagenzien und Materialien enthalten. Die Wahl eines geeigneten Kits kann von den Kosten, der Verfügbarkeit, der benötigten Laborausrüstung und der Abwassermatrix abhängen.

Falls zum Zweck der Normalisierung Viren, die ein DNA-Genom besitzen, ebenfalls mittels PCR quantifiziert werden sollen, sollte eine Methode gewählt werden, die sowohl DNA als auch RNA extrahiert. Die RNA wird meist in einem Volumen von 20 – 100 µl eluiert. Die Reinheit und Quantität kann anschließend photometrisch bestimmt werden. Für RNA sollte das Verhältnis des Adsorptionsspektrums bei 260 nm zu dem bei 280 nm zwischen 1,8 und 2 liegen. Ein geringerer Quotient (verursacht durch einen hohen 280 nm-Wert) weist auf Verunreinigungen mit Proteinen hin. Ein Peak im Adsorptionsspektrum bei 230 nm deutet dagegen auf Verunreinigungen mit Phenolen hin (z. B. verursacht durch Reste bei der Trizol-Aufreinigung).

Die RNA sollte dauerhaft bei -80 °C gelagert werden. Um mehrmaliges Auftauen und Einfrieren der Proben zu vermeiden, sollten die Proben aliquotiert werden.

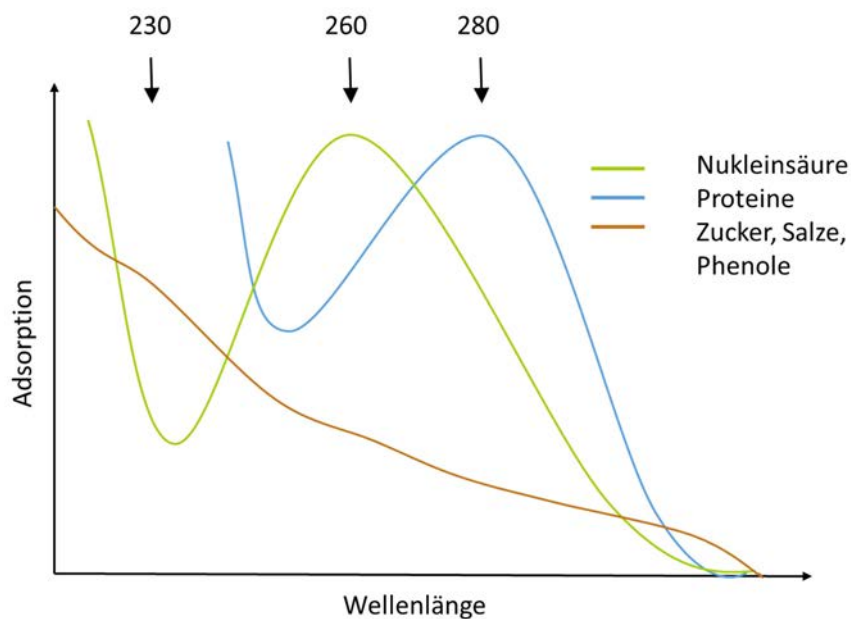


Abbildung 5: Schematischer Absorptionsverlauf einer Nukleinsäure-Messung und Darstellung möglicher Kontaminationen

Reverse Transkription

Mit der PCR wird die Menge des genetischen SARS-CoV-2-Materials in der Probe nachgewiesen. Allerdings kann in einer PCR nur DNA als Startmaterial eingesetzt werden. Deshalb muss zuvor die aufgereinigte RNA mittels Reverser Transkription (RT) in komplementäre DNA (cDNA, engl. complementary DNA) umgewandelt werden. Dies erfolgt unter Verwendung von Enzymen, den sogenannten Reversen Transkriptasen. Oft finden die PCR und die RT gekoppelt in einem Schritt statt (One-Step RT-PCR, einstufig). Dies hat den Vorteil, dass weniger Arbeitsschritte notwendig sind und sich so Zeit- und Personalaufwand einsparen lassen. Außerdem reduzieren sich hierdurch die Kontaminationswahrscheinlichkeit und die Häufigkeit von Pipettierfehlern. Falls es in der PCR zu Problemen beispielsweise aufgrund von Inhibitoren kommt, kann es jedoch sinnvoll sein, die RT und PCR getrennt voneinander durchzuführen (Two-Step RT-PCR, zweistufig). Dies ermöglicht eine einfachere Fehler-

dentifikation und Protokolloptimierung. So lässt sich z. B. die eingesetzte Reverse Transkriptase einfacher variieren und ein möglicherweise zusätzlich erforderlicher Schritt zur Entfernung von Inhibitoren ergänzen. Zusammenfassend betrachtet ist die One-Step RT-PCR bequemer und schneller, die Two-Step RT-PCR ermöglicht dagegen Optimierungen und eine einfachere Anpassung des Protokolls.

PCR

Bei einer PCR wird eine spezifische, genau definierte DNA-Region (Zielsequenz) in mehreren Zyklen vervielfältigt. Man spricht von einer Kettenreaktion, da für jeden neuen Zyklus die Produkte der vorherigen Zyklen als Ausgangsstoff dienen und bei optimalen Bedingungen verdoppelt werden, sodass eine exponentielle Vervielfältigung stattfindet. Für eine gewöhnliche PCR werden verschiedene Komponenten und Reagenzien benötigt:

1. Das Ausgangsmaterial (doppelsträngige DNA; im Fall des Corona-Nachweises, die im vorherigen Schritt hergestellte cDNA)
2. Die DNA-Polymerase: das Enzym, das neue DNA-Stränge herstellt
3. Das Primerpaar: kurze DNA-Stücke, die komplementär zu den Enden der zu vervielfältigenden DNA-Region sind. Man benötigt immer einen Forward (fwd) und einen Reverse (rev) Primer.
4. dNTPs (Desoxynukleosidtriphosphate): die Grundbausteine der DNA
5. Eine Pufferlösung, die eine optimale Aktivität und Stabilität der Reaktion und der Produkte ermöglicht

Die PCR wird in sogenannten Thermocyclern durchgeführt, die die für die verschiedenen Reaktionsschritte optimale Temperatur einstellen. Für gewöhnlich werden 30-40 Zyklen durchgeführt und jeder Zyklus besteht aus mehreren Schritten, die im Folgenden erläutert und in Abbildung 6 dargestellt sind.

Denaturierung: Die doppelsträngige DNA wird in zwei Einzelstränge aufgetrennt (meist bei ca. 95 °C)

Annealing: Die Primer lagern sich spezifisch an die komplementäre Region der DNA-Einzelstränge an. Die gewählte Temperatur ist bei diesem Schritt entscheidend (Temperatur ist abhängig von der Primer-Sequenz, meist 55 – 65 °C). Zum einen muss die Temperatur hoch genug sein, um eine spezifische Bindung an die komplementäre DNA zu ermöglichen, andererseits auch niedrig genug, um die Bindung des Primers überhaupt zu ermöglichen. Eine zu hohe Annealing-Temperatur kann dementsprechend dazu führen, dass die Primer überhaupt nicht binden und zu einem falsch negativen Ergebnis führen. Eine zu niedrige Temperatur kann dagegen eine Bindung an unspezifische DNA-Regionen bedingen und zu unspezifischen Produkten führen, was falsch-positiven Ergebnisse zur Folge hat.

Elongation: Die DNA-Polymerase bindet an das Primer-Zielsequenz-Hybrid und bildet (synthetisiert) mit dNTPs einen neuen DNA-Doppelstrang (Temperatur 70 - 80 °C).

Schematische Darstellung einer PCR

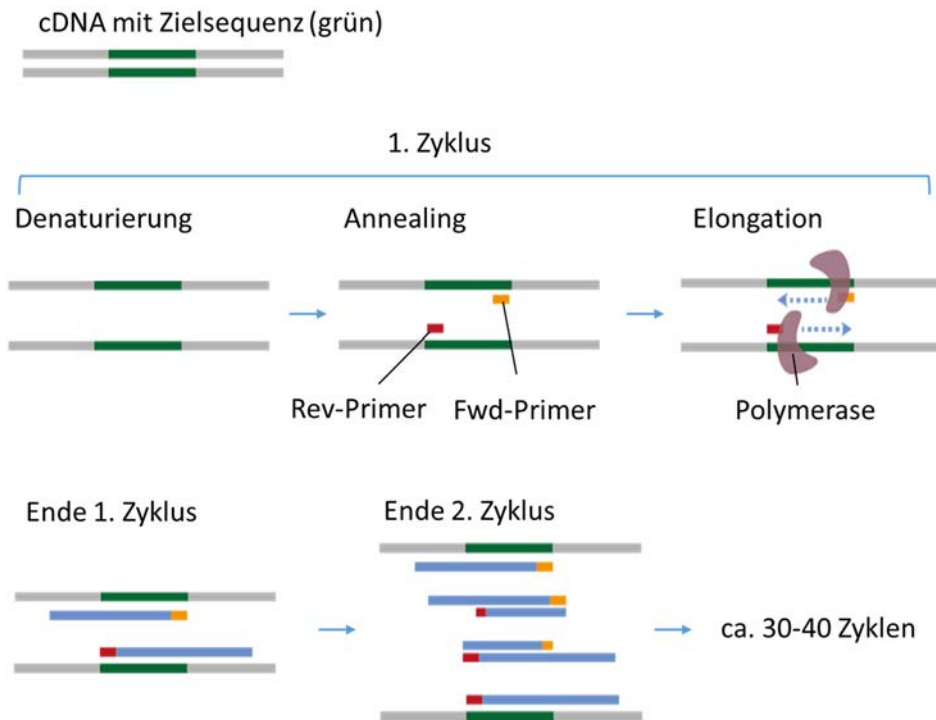


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer PCR

Im Laufe der 30-40 Zyklen durchläuft die PCR verschiedene Stadien. In der Anfangsphase, wenn genügend Reagenzien vorhanden sind, findet in jedem PCR-Zyklus eine Verdoppelung der DNA statt (exponentielles Stadium). Wenn die Reagenzien (z. B. dNTPs) nicht mehr in unbegrenzter Menge zur Verfügung stehen, verlangsamt sich die Reaktion und das PCR-Produkt wird nicht mehr bei jedem Zyklus verdoppelt (lineares Stadium). Wenn die Reagenzien aufgebraucht sind und kein neues Produkt mehr entsteht, erreicht die PCR schließlich ein Plateau (siehe Abbildung 7). Nur das exponentielle Stadium eignet sich für eine Quantifizierung des Ausgangsmaterials.

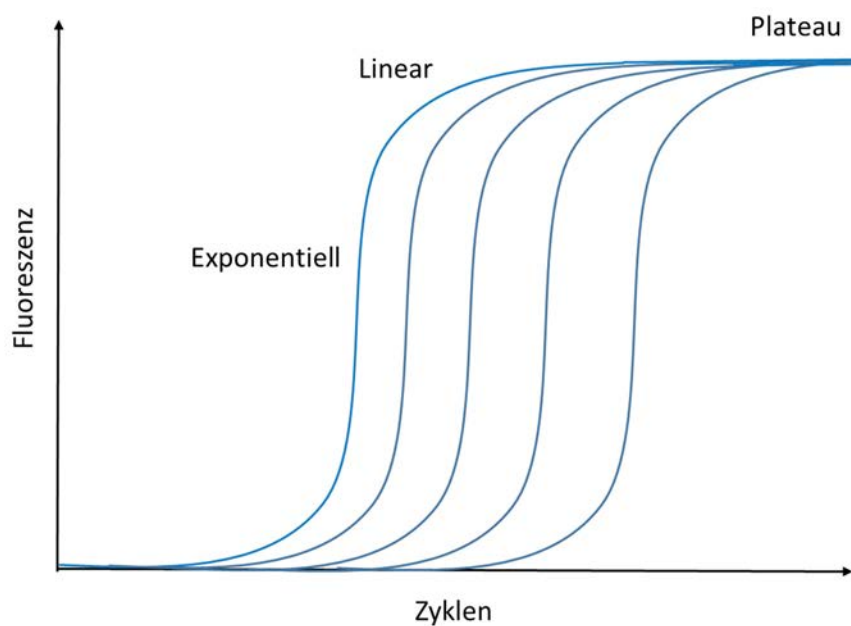


Abbildung 7: Verschiedenen Phasen einer PCR

qPCR

Im Unterschied zur gewöhnlichen PCR wird bei der qPCR die vervielfältigte DNA zusätzlich in Echtzeit quantifiziert. Dazu setzt man Fluoreszenzmarker ein, die entweder sequenzunspezifisch (z. B. mit SYBR Green, EvaGreen) oder sequenzspezifisch an die DNA binden. Im letzteren Fall nutzt man Sonden, deren Sequenz komplementär zu einem kurzen Abschnitt der zu analysierenden DNA ist. Die Visualisierung der DNA-Menge erfolgt mittels Intensitätsmessung der Fluoreszenz für gewöhnlich am Ende jeden PCR-Zyklusses (nach dem Elongationsschritt). Die Zunahme des Fluoreszenzsignals im Laufe der PCR ist proportional zur Zunahme der DNA.

Die Real-Time PCR konzentriert sich auf das exponentielle Stadium, da dieses die präzisesten und genauesten Daten zur Quantifizierung liefert. Der C_t -Wert (cycle threshold) gibt die Zykluszahl an, bei der die PCR-Amplifikationskurve (der Fluoreszenzwert) einen vordefinierten Schwellenwert überschreitet (siehe Abbildung 8). Je mehr Zyklen notwendig sind, um diesen Schwellenwert zu erreichen, um so weniger Virusmaterial enthält die Probe. In den Kurven der Abbildung 8 enthält die Probe mit der grünen Kurve am meisten Ursprungsmaterial, die Probe der braunen Kurve am wenigsten. Da im Optimalfall je Zyklus die DNA verdoppelt wird, enthält also z. B. eine Probe, die einen C_t -Wert von 28 aufweist, doppelt so viel Ursprungs-Zielmaterial wie eine Probe mit dem C_t -Wert von 29. Der C_t -Wert wird also für den Anwesenheitsnachweis von Virusmaterial in der Probe verwendet, dient aber auch der Quantifizierung. Der C_t -Wert alleine erlaubt nur eine relative Quantifizierung. Durch den Vergleich der C_t -Werte mit einer Reihe von Standards lässt sich die Menge der Template-DNA in einer unbekannten Reaktion allerdings genau bestimmen.

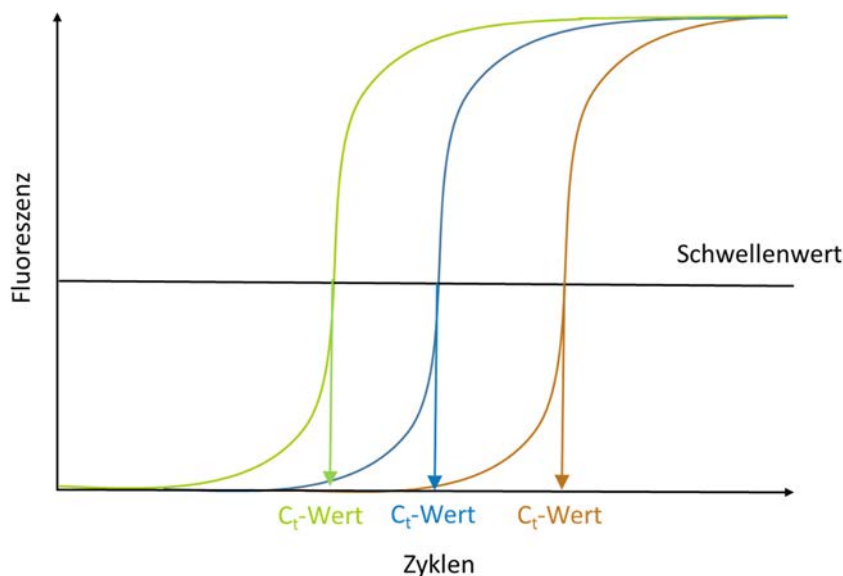


Abbildung 8: qPCR mit Darstellung des C_t -Wertes

Digital droplet PCR (ddPCR)

Eine weitere PCR-Methode zur Quantifizierung ist die digital droplet PCR. Es gibt noch andere Formen der digital PCR. Da diese jedoch nicht sehr weit verbreitet sind, liegt der Fokus in diesem Abschnitt auf der ddPCR. Im Gegensatz zur qPCR, bei der die Reaktion in einem Ansatz stattfindet, wird bei der ddPCR die Probe in tausende Ansätze (Tröpfchen) aufgeteilt. In jedem Tröpfchen findet eine separate PCR statt. Falls das Tröpfchen das Zielmolekül enthält, wird man am Ende der PCR ein Fluoreszenzsignal messen können, d.h. die ddPCR misst die tatsächliche Anzahl der Zielmoleküle. Aus diesem Grund ist bei der ddPCR keine Standardkurve zur Quantifizierung erforderlich. Da die ddPCR eine Endpunktmessung durchführt, ist sie weniger anfällig für Beeinträchtigungen durch Inhibitoren, die die Reaktionseffizienz stören. Zudem scheint die ddPCR eine höhere Sensitivität zu ermöglichen und ist daher besonders für geringe Viruskonzentrationen geeignet.

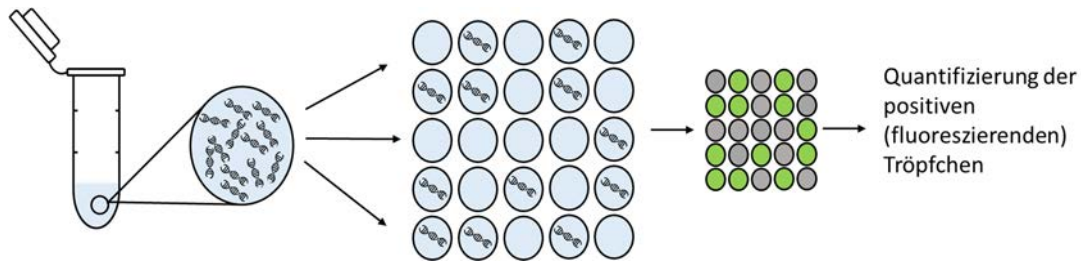


Abbildung 9: Schematisches Prinzip einer ddPCR

Vorteile ddPCR

- Keine Standardreihe erforderlich
- Hohe Sensitivität
- Weniger anfällig für Inhibitoren
- Kann kleinere Unterschiede darstellen

Vorteile qPCR

- Weit verbreitet (Protokolle, PCR-Geräte)
- Großer dynamische Bereich (großer Bereich, in dem eine Quantifizierung möglich ist)

Biomarker

Die Wahl der genetischen Ziele ist ein entscheidender Faktor für eine erfolgreiche Analyse. Wenn ein kommerzielles Kit für die molekulare Analyse verwendet wird, sind die Zielsequenzen und die dazugehörigen Primer meist vorgegeben.

Da im Genom von SARS-CoV-2 häufig neue Mutationen auftreten, wird empfohlen, mindestens zwei verschiedene Zielsequenzen zu bestimmen (z. B. N-Gen und M-Gen, siehe Abschnitt 11), sodass der Ausfall einer Zielsequenz abgefangen werden kann. Da besonders im S-Gen gehäuft neue Mutationen auftreten, eignet sich das S-Gen nicht für die Analyse zur Trendbestimmung. Allerdings lassen sich mit dem S-Gen gut Varianten spezifisch nachweisen. Bei den Primern, die in der PCR Verwendung finden, um die Zielsequenz zu detektieren, handelt es sich um kurze DNA-Stücke, die komplementär zu den Enden der nachzuweisenden Gen-Region sind. Es ist darauf zu achten, dass diese Primer spezifisch für SARS-CoV-2 sind und nicht auch an Genommaterial von anderen Coronaviren binden. Beim Auftreten von neuen Virusmutationen- und -varianten muss überprüft werden, ob die Primer noch funktional sind oder aufgrund neu aufgetretener Mutationen nicht mehr binden können.

7.3 Nachweis von SARS-CoV-2 Varianten

Der Nachweis von SARS-CoV-2-Varianten und die Verfolgung ihrer Ausbreitung im Abwasser hat sich als sinnvoll erwiesen, da sich auch hier ein Frühwarnereffekt im Vergleich zur Sequenzierung von klinischen Proben gezeigt hat. Außerdem lässt sich, je nach Methode, die prozentuale Verteilung der zirkulierenden Varianten bzw. Mutationen bestimmen. Im Vergleich zur Sequenzierung vieler klinischer Proben bedeutet dies eine enorme Ersparnis an Zeit und Kosten. Allerdings erschwert das Vorliegen einer Art Pool-Probe die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse. Eine besondere Herausforderung ist die Identifizierung und Zuordnung völlig neuer Varianten.

Der Nachweis von SARS-CoV-2-Varianten kann für folgende Zwecke eingesetzt werden:

- Frühzeitige Erkennung und Charakterisierung neu auftretender Virusvarianten
- Bewertung der Auswirkungen von Virusvarianten auf die Pandemie und deren Überwachung im Laufe der Zeit

- Untersuchung der Dynamik der Virusübertragung und der Einschleppung neuer genetischer Varianten
- Modellierung der antigenen Eigenschaften des Virus zur Bewertung des Risikos
- Bewertung der Auswirkungen von Mutationen auf die Leistungsfähigkeit von molekulardiagnostischen, antigencharakterisierenden und serologischen Methoden
- Überwachung neu auftretender Linien innerhalb von Wild-, Haus- und Nutztierpopulationen, die sich auf die menschliche Gesundheit auswirken können

Besonders entscheidend ist der Variantennachweis für die Identifizierung und Überwachung von Virusvarianten, die möglicherweise eine höhere Krankheitsschwere verursachen und leichter übertragbar sind. Sinnvoll kann die Überwachung von s.g. Transportation-Hubs wie Flughäfen und Bahnhöfe sein, um die Einschleppung neuer, in Deutschland bisher nicht zirkulierender Varianten, frühzeitig zu identifizieren.

Der Nachweis von Virusvarianten kann mit verschiedenen molekularbiologischen Methoden erfolgen, die je nach Zielstellung und gewünschter Aussagekraft, eingesetzt werden sollten. Generell werden die Proben bis zur RNA-Extraktion genauso behandelt wie bei der Analyse durch qPCR oder ddPCR.

Folgende Nachweismethoden gibt es:

- PCR
- Sanger-Sequenzierung
- Gesamtgenom-Sequenzierung mittels NGS (Next-Generation-Sequenzierung)

PCR

Mittels variantenspezifischer PCR können nur Virusvarianten nachgewiesen werden, deren Sequenz bereits definiert ist. In der qPCR oder ddPCR werden Primer verwendet, die spezifisch für eine Variante sind, d.h. aufgrund von einzelnen Mutationen kann der Primer an die cDNA einer Variante binden, aber nicht an die einer anderen. Meist werden dafür Bereiche im S-Gen ausgewählt, da sich dort besonders häufig variantenspezifische, charakteristische Mutationen befinden. Wenn ein Mehrkanal-RT-PCR-Gerät verwendet wird, können auch mehrere Varianten gleichzeitig in einem Lauf nachgewiesen werden und so deren Anteil an der gesamten Virusmenge bestimmt werden. Etablierte Protokolle für den Variantennachweis finden sich z. B. bei der WHO, der CDC, ECDC oder auf gängigen Publikationsforen (z. B. Pubmed). Bei der Assay-Etablierung wie auch in regelmäßigen Abständen sollte zur Validierung der spezifischen Amplifikation das PCR-Produkt unbedingt Sanger-sequenziert werden.

Besonders bei der Unterscheidung zwischen Sublinien z. B. Omikron BA.4 und BA.5 kann es schwierig sein charakteristische Mutationen zu identifizieren, die eine Unterscheidung ermöglichen und sich daher für den Nachweis eignen. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass sie deutlich schneller, weniger aufwändig und kostengünstiger ist als ein Variantennachweis über Sequenzierung. Allerdings ist sie kein gleichwertiger Ersatz für die Teil- oder Gesamtgenom-Sequenzierung, da sich mit dieser Methode beispielsweise keine neuen Varianten identifizieren lassen.

Eine tabellarische Übersicht über Mutationen im S-Gen findet sich unter www.rki.de/covid-19-varianten-nomenklatur

Eine Hilfestellung für das Design variantenspezifischer PCRs findet sich unter www.rki.de/covid-19-voc-pcr

Sanger-Sequenzierung

Bei dieser Methode wird für gewöhnlich ein kleiner Teil des Virus-Genoms mittels PCR amplifiziert und anschließend Sanger-sequenziert. Ein Vorteil gegenüber dem Variantennachweis mittels PCR ist, dass auch bisher unbekannte Mutationen im sequenzierten Bereich identifiziert werden können. Wenn die Sanger-Sequenzierung die bevorzugte Methode darstellt, wird die Sequenzierung der gesamten Länge des S-Gens empfohlen. Da sich dort die meisten charakteristischen Mutationen befinden, kann

so auf das Vorliegen einer Variante geschlossen werden. Generell kann aber jeder Bereich verwendet werden, der variantenspezifische Mutationen enthält. Da es sich beim Abwasser um eine Pool-Probe handelt, in der mehrere Virus-Varianten vorhanden sein können, kann es bei der Sequenzierung zu Problemen kommen. Deshalb kann es sinnvoll sein, vorher eine variantenspezifische PCR durchzuführen und dessen Amplikon zu sequenzieren.

Gesamtgenom-Sequenzierung

Hierbei wird das annähernd gesamte Genom des Virus sequenziert. So können neue Varianten eindeutig und unvoreingenommen identifiziert und deren Evolution verfolgt werden. Für die Sequenzierung des Abwassers zur Wiederherstellung des gesamten Virusgenoms wird hochkonservierte RNA benötigt. Dies gestaltet sich im Vergleich zur Sequenzierung aus klinischen Proben als schwierig. Daher ist die Optimierung und Schaffung eines idealen, zügigen Arbeitsablaufs von entscheidender Bedeutung für den Prozess. Die Verwendung eines gekühlten Probenentnahmesystems für Mischproben und die Aufbewahrung einer Probe auf Eis bis zur Analyse sind hierbei von entscheidender Bedeutung.

Abhängig von der gewählten Methode sind nicht zwingend Vorkenntnisse über die Virussequenz erforderlich. Für eine NGS ist eine hohe fachliche Qualifikation und Expertise notwendig, insbesondere für die fachgerechte Auswertung der Daten. Wichtige Parameter, die es zu beachten gilt, sind der Ansatz für die Bibliotheksrekonstruktion, die erzeugte Leselänge, die Fehlerrate, die Sequenzierungstiefe und die Einheitlichkeit der Abdeckung des Genoms. Das ARTIC-Protokoll und die kommerziellen Kits für Illumina- und Thermo-Fischer-Plattformen werden mit empfohlenen Bioinformatik-Analysepipelines geliefert. Die Funktionalität der Pipeline sollte vom Labor überprüft werden, bevor die Daten gemeldet werden. Bei hauseigenen Pipelines ist es wichtig, dass die verwendete Bioinformatik-Pipeline vom Labor vollständig auf ihre Eignung für den Zweck validiert wird. Der Nachweis von SARS-CoV-2 in Abwässern hat im Vergleich zu klinischen Probenahmen seine Grenzen. Das größte Hindernis besteht darin, dass die Amplikons aus einem gemischten Pool von Individuen stammen und es daher unwahrscheinlich ist, dass Mutationen in verschiedenen Amplikons oder sogar im selben Amplikon mit einem einzigen Genom oder einer einzigen Variante in Verbindung gebracht werden können. Sequenzen sollten in der GISAID-EpiCov-Datenbank (www.gisaid.org) veröffentlicht werden, um globale phylogenetische Analysen zu ermöglichen. Rohdaten können im COVID-19-Datenportal (www.covid19dataportal.org) hinterlegt werden, um sie für die weltweite Gemeinschaft verfügbar zu machen.

Die Gesamtgenom-Sequenzierung ist sowohl ressourcen- als auch zeitaufwändig. Die Auswertung kann mehrere Tage in Anspruch nehmen. Da bei der NGS große Datenmengen anfallen, müssen auch Fragen der Datenspeicherung und der bioinformatischen Unterstützung berücksichtigt werden.

Technische Leitlinien zur Sequenzierung von SARS-CoV-2 finden sich im WHO-Leitfaden "Genomic sequencing of SARS-CoV-2: a guide to implementation for maximum impact on public health" und im WHO-Leitfaden "SARS-CoV-2 genomic sequencing for public health goals: Interim guidance". Die ECDC hat einen Leitfaden „Methods for the detection and characterisation of SARS-CoV-2 variants - second update“ veröffentlicht, der weitere Informationen zur Probenahme- und Sequenzierungsstrategie enthält.

7.4 Qualitätskontrolle

Um eine möglichst hohe Aussagekraft, Zuverlässigkeit und Vergleichbarkeit der Abwasseranalysen zu gewährleisten, sind Qualitätskontrollen unerlässlich. Das ist insbesondere der Fall, wenn Abwasseranalysen im Zeitverlauf dargestellt und Daten von verschiedenen Standorten verglichen werden. Zu Beginn des Abwasserüberwachungsprogrammes ist es daher notwendig, alle Methoden auf ihre Eignung zu überprüfen, zu validieren und gegebenenfalls anzupassen. Je nachdem welche Aussagekraft und welchen Nutzungszweck die Daten haben sollen, sind verschiedene Qualitätssicherungsmaßnahmen empfehlenswert. Derzeit gibt es keinen Konsens über die Mindestanforderungen an die Qualitätssicherung für das Abwassermonitoring. Allerdings bestehen Regelungen für die quantitative

PCR-Analyse, die zu beachten sind (DIN/ISO). In der Abwasseranalyse sind sie bisher aber nicht zwingend vorgeschrieben. Zudem sollten die MIQE (Minimum Information for publication of Quantitative PCR Experiments) Guidelines für qPCR oder dPCR Berücksichtigung finden. Im Folgenden werden die verschiedenen Kontrollen erläutert sowie dargestellt, in welchem Schritt der Analyse sie durchzuführen sind. Bei manchen Kontrollen ist es ausreichend, sie zu Beginn des Überwachungsprogramms und in regelmäßigen Abständen mitzuführen, andere Kontrollen sollten bei jeder Analyse mitlaufen. Um die eigene Methode im Vergleich mit anderen Laboren einschätzen zu können, ist die Teilnahme an Ringversuchen oder Laborvergleichen empfehlenswert.

Folgende Qualitätskontrollen sind zu unterscheiden:

1. Gesamtprozesskontrolle/Wiederfindungskontrolle
2. RNA-Extraktionskontrolle
3. Quantitative Messkontrollen
4. Inhibitionskontrolle
5. Negativkontrollen
6. Nachweis- und Quantifizierungsgrenze

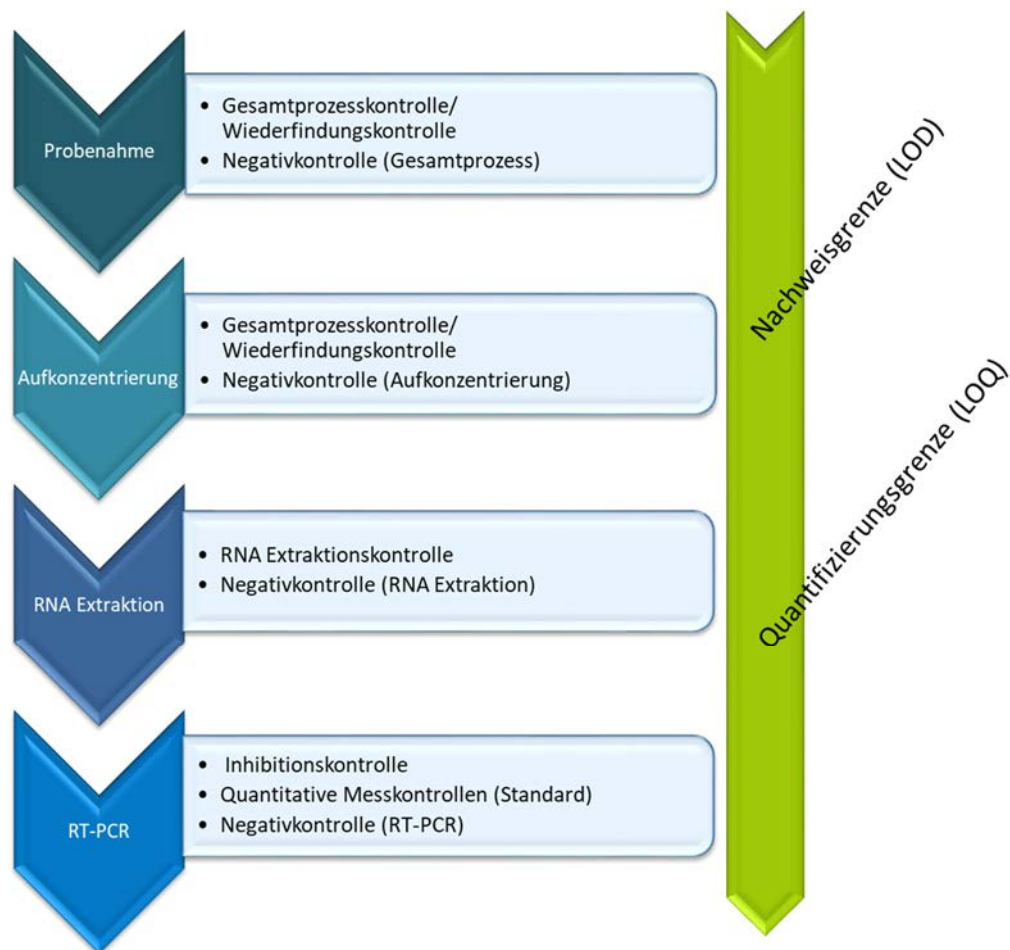


Abbildung 10: Übersicht der möglichen Qualitätskontrollen. Dargestellt im Verlauf des Analytik-Workflows.

Gesamtprozesskontrolle (Wiederfindungskontrolle)

Die Gesamtprozesskontrolle wird in einer exakt definierten Konzentration der Abwasserprobe hinzugefügt. Diese Kontrolle dient der quantitativen Einschätzung, wieviel Virus während der Probenverarbeitung verloren geht.

Da Abwasser eine chemisch und biologisch komplexe Matrix ist und Bestandteile enthalten kann, die die Aufreinigung und Analyse stören, ist das Mitführen einer Gesamtprozesskontrolle und die Bestimmung der Wiederfindungsrate besonders bei der Validierung der Methode wichtig.

Die Zusammensetzung des Abwassers ändert sich kontinuierlich (z. B. Anteil an Feststoffen, Regenwassereinfluss), daher kann es bei entsprechenden Kapazitäten sinnvoll sein, jeder Probe oder zumindest in regelmäßigen Abständen eine Gesamtprozesskontrolle zuzufügen. Für den Vergleich von RNA-Konzentrationen, deren Aufreinigung mit unterschiedlichen Methoden erfolgte, oder auch im Fall einer vergleichenden Betrachtung über einen Zeitverlauf, ist die Verwendung einer Gesamtprozesskontrolle ratsam.

Wenn sich die Labormethoden im Laufe der Messkampagne ändern, ist die Durchführung einer Gesamtprozesskontrolle zum Vergleich der Methoden, unerlässlich. Auch wenn Proben länger gelagert oder gar eingefroren waren, ist das Hinzufügen einer Gesamtprozesskontrolle zu empfehlen.

Um die Wiederfindungsrate möglichst genau darzustellen, wird empfohlen eine Kontrolle zu wählen, die ähnliche Eigenschaften besitzt wie SARS-CoV-2. Dazu eignen sich behüllte Viren mit einem einzelsträngigen RNA-Genom, z. B. das Murine Coronavirus (auch Murines Hepatitisvirus genannt), das Bovine Coronavirus und das Bovine Respiratorische Syncytialvirus. Weitere Viren, die als Prozesskontrolle Verwendung finden, sind MS2-Phagen (ϕ 6), umhüllte Bakteriophagen und die Coronaviren 229E, OC43 und NL63. Zur Etablierung einer Methode kann auch SARS-CoV-2-freies Abwasser mit hitzeinaktiviertem oder gamma-bestrahltem SARS-CoV-2 gespikt werden, um die Sensitivität der Methode zu prüfen.

Die Gesamtprozesskontrolle wird idealerweise direkt nach der Probennahme zugefügt, um den Virusverlust beim Transport mitzuberücksichtigen. Alternativ ist es möglich, die Kontrolle bei der Probenankunft im Analyselabor hinzuzufügen. Die regelmäßige Mitführung einer Gesamtprozesskontrolle liefert ebenfalls eine Aussage über die Reproduzierbarkeit der Methode. Es gibt bisher keine Grenzwerte für akzeptable Wiederfindungsraten. Als üblich gelten Wiederfindungsraten zwischen 0,1 und 10 %.

RNA-Extraktionskontrolle

Die Effizienz der RNA-Extraktion kann durch das Zufügen einer definierten Menge aufgereinigter RNA eines RNA-Virus (z. B. Murines Coronavirus) zur aufkonzentrierten Probe bestimmt werden. Im Unterschied zur Gesamtprozesskontrolle lässt sich hierdurch nur die Effizienz der RNA-Extraktion und -Quantifizierung bestimmen und nicht des gesamten Aufreinigungs- und Analyseprozesses.

Quantitative Messkontrollen (Standard)

Bei der RT-qPCR erhält man als Ergebnis einen Ct-Wert, der jedoch nur eine semi-quantitative Aussage liefert und es nicht ermöglicht, Daten verschiedener Labore zu vergleichen. Ein exakt quantifizierter Standard eignet sich, um die erhaltenen Ct-Werte in eine RNA-Kopienzahl pro Reaktion und ggf. pro Probenvolumen umzurechnen. Deshalb ist bei jedem PCR-Durchlauf unbedingt eine quantitative Messkontrolle mitzuführen. Bei der RT-qPCR ist als Kontrolle eine Standardkurve mit bekannter Konzentration erforderlich (Verdünnungsreihe mit mindestens 4 verschiedenen Konzentrationen). Bei der RT-d(d)PCR muss bei jeder Durchführung dagegen nur eine Probe mit bekannter Konzentration mitgeführt werden, aber keine ganze Standardreihe. RNA-Kontrollen eignen sich für die genaue Quantifizierung besser als DNA-Kontrollen. Als RNA-Kontrolle kommen Sequenzen des Zielgenes (synthetische SARS-CoV-2-RNA) zum Einsatz. Falls dennoch DNA-Kontrollen Verwendung finden, müssen diese unbedingt linearisiert vorliegen. Die Kontrollen sollten bei -80 °C oder niedrigeren Temperaturen und aliquotiert gelagert werden, um Auftau- und Einfrierzyklen zu vermeiden. Der Standard für die Quantifizierung ist eine häufige Fehlerquelle, weshalb besondere Sorgfalt angezeigt ist.

Für die Diagnostik stehen verschiedene Referenzmaterialien (Standards) zur Verfügung (kein Anspruch auf Vollständigkeit):

EC JRC Referenzmaterial:

<https://crm.jrc.ec.europa.eu/p/q/covid-19/EURM-019-single-stranded-RNA-ssRNA-fragments-of-SARS-CoV-2/EURM-019>

NIST Referenzmaterial:

<https://www.nist.gov/programs-projects/sars-cov-2-research-grade-test-material>

Inhibitionskontrolle

Abwasser ist eine komplexe und variable Matrix und kann Komponenten beinhalten, die die Reverse Transkription und PCR stören. Manche Aufreinigungsmethoden führen zu einer Akkumulation dieser Inhibitoren. Um zu bestimmen, ob die Quantifizierungsverfahren (RT-PCR) dennoch wie erwartet funktionieren, ist eine Inhibitionskontrolle bei jedem PCR-Lauf ratsam, zumindest aber unbedingt bei der Validierung der Methode.

Ob Inhibitoren die Quantifizierung beeinträchtigen, kann mit folgenden Ansätzen bestimmt werden:

- Bei ausreichend hohen SARS-CoV-2-RNA-Konzentrationen: Die extrahierte RNA wird in mehreren Schritten verdünnt (Verdünnungsreihe mit z. B. 10-fach Verdünnungen). Dann erfolgt die Bestimmung, ob sich die Verdünnungen wie erwartet verhalten. Falls eine Inhibition vorliegt, liefern unverdünnte Proben im Verhältnis geringere Werte als verdünnte Proben.
- Bei niedrigen SARS-CoV-2-RNA-Konzentrationen: Wenn die Konzentration der extrahierten RNA zu niedrig ist, um nach der Verdünnung noch eine Quantifizierung zu erlauben, lässt sich die Inhibition bestimmen, indem virale RNA (z. B. synthetische SARS-CoV-2-RNA oder aufgereinigte RNA aus einem nicht-menschlichen Coronavirus (siehe Gesamtprozesskontrolle)) in die RNA-Extrakte gespikt werden. Die Ergebnisse der Quantifizierung sind dann entweder mit den Ergebnissen von RNA, die in RT-PCR-Ansätze mit reinem Wasser gespikt wurde, oder mit einer Verdünnung des gespikten Extrakts, vergleichend zu betrachten.

Wenn eine Inhibition festgestellt wird, besteht die Möglichkeit, dies durch eine Verdünnung der Extrakte zu beheben – sofern die RNA-Konzentration der Extrakte ausreichend hoch liegt. Durch die Verdünnung lässt sich die Inhibition reduzieren. Es verringert sich aber gleichzeitig auch das Probensignal. Bei häufig auftretender Inhibition ist es nötig, die Probenaufbereitungs- oder die Analysesmethode anzupassen bzw. zu optimieren.

Negativkontrollen

Negativkontrollen dienen der Identifikation von Kontaminationen. Zu einer Verunreinigung kann es in jedem Prozessschritt kommen. Auch Kreuzkontaminationen der Proben oder Verunreinigungen der Reagenzien sind denkbar. Durch das Mitführen von Negativkontrollen lässt sich feststellen, in welchem Schritt die Verunreinigung stattgefunden hat. Falls eine Kontamination identifiziert wurde, ist es am einfachsten alle Reagenzien zu verwerfen und neu herzustellen sowie alle verwendeten Materialien und Laborflächen gründlich zu reinigen.

Negativkontrolle (Gesamtprozess): Bei der Probenahme wird eine Probenflasche mit reinem Wasser (Wasser mit Molekularqualität) befüllt. So lässt sich kontrollieren, ob es während der Aufreinigung zu Kontaminationen kommt. Diese Kontrolle ist nicht zwingend bei jeder Analyse durchzuführen. Es ist jedoch sinnvoll, bei der Validierung und in größeren regelmäßigen Abständen eine solche Kontrolle mitzuführen. Je nach Prozessablauf ist es auch möglich, die Gesamtprozesskontrolle bei der Ankunft im Labor schon vor der Aufkonzentrierung zu starten (Negativkontrolle Aufkonzentrierung).

Negativkontrolle (RNA-Extraktion): Die RNA-Extraktion wird ohne das Hinzufügen einer Abwasserprobe durchgeführt, um so eine Verunreinigung bei der RNA-Extraktion zu bestimmen (z. B. durch verunreinigte Extraktionsreagenzien). Es empfiehlt sich, sie bei jeder RNA-Extraktion mitzuführen.

Negativkontrolle (RT-PCR): Dem Reaktionsansatz der RT-qPCR oder RT-d(d)PCR wird keine aufgereinigte RNA hinzugefügt. Diese Kontrolle kommt zum Einsatz, um eine Verunreinigung der Reagenzien für die RT-PCR festzustellen. Sie sollte bei jeder PCR in mehrfacher Ausführung mitgeführt werden.

Nachweis- und Quantifizierungsgrenze

Die *Nachweisgrenze* (auch LOD, limit of detection) hängt von der Testmethode und der Leistung des Labors ab und sollte vor dem Start des Abwasserüberwachungsprogramms bestimmt werden. Der LOD stellt die Sensitivität der gesamten Testmethode dar und legt einen Schwellenwert von Zielkopien/ml Abwasser fest, unterhalb dessen ein Signal nicht genau zu erkennen ist. Ein negativer Wert in der Analyse bedeutet also nicht automatisch, dass kein SARS-CoV-2 zirkuliert, sondern nur, dass die Virusmenge unterhalb der Nachweisgrenze liegt.

Die *Quantifizierungsgrenze* (auch LOQ, limit of quantification) ist hingegen als die geringste Virusmenge in einer Probe definiert, die unter den verwendeten Testmethoden, mit einer bestimmten Präzision quantitativ bestimmbar ist. Werte, die unterhalb der LOQ liegen, sollten nur qualitativ in die Bewertung eingehen (d.h. als Positiv- oder Negativ-Aussage).

8 Datenauswertung und Normalisierungsberechnung

Um SARS-CoV-2-Abwassermessungen zu interpretieren, müssen die auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basierenden Messungen in Probenkonzentrationen umgewandelt und gegebenenfalls normalisiert werden. Die Ergebnisse der RT-qPCR oder der RT-ddPCR sind möglichst im Zusammenhang mit dem äquivalenten Volumen der analysierten Probe anzugeben, also z. B. in der Einheit Kopienzahl/ml oder Kopienzahl/l. Das vereinfacht den Vergleich von Messwerten verschiedener Standorte und Zeitpunkte. Bei der Umrechnung müssen die verschiedenen Verdünnungs- und Konzentrationsschritte der Probenaufbereitung Berücksichtigung finden. Allgemein gilt eine Probe als positiv (Vorhandensein von SARS-CoV-2), wenn bei der qPCR der Ct-Wert kleiner als 40 ist und bei der ddPCR mindestens 3 positive Tröpfchen auftreten.

Es empfiehlt sich, grundsätzlich alle Daten zu überprüfen, um Fehler und Unregelmäßigkeiten zu identifizieren. Dabei ist der Kontext der Daten zu beachten (z. B. Wetterlage).

Folgende Leitfragen sollten überprüft werden:

- Ist die Größenordnung des Ergebnisses realistisch?
- Wie verhalten sich die Daten zu den vorangegangenen Messungen?
- Stimmen die verschiedenen Biomarker in ihrer Tendenz überein?

Bei Unregelmäßigkeiten oder Auffälligkeiten muss entweder die Aufreinigung oder Analytik wiederholt werden oder die Ergebnisse dieser Messung sind zu verwerfen.

Trendberechnung

Trends lassen sich ermitteln, wenn mindestens 3 Datenpunkte vorliegen und werden gewöhnlich mit einer linearen Regression berechnet, wobei deren Steigung den Trend beschreibt. Bei der Berechnung der Regression sollte die Zeit, nicht jedoch die Anzahl der Messungen die unabhängige Variable bilden. Trends können grob nach Dauer (kurzfristig oder anhaltend) und Richtung (Anstieg, Rückgang oder Plateau) klassifiziert werden. Für die Trendanalyse zur Darstellung, ob die SARS-CoV-2-Abwasserwerte zu- oder abnehmen, werden für gewöhnlich die letzten 3 oder 5 Messtage verwendet. Die Werte werden als gleitender Mittelwert dargestellt. Vor Beginn sollte ein Schwellenwert definiert werden, ab wann ein Trend als steigend, gleichbleibend oder sinkend gilt (z. B. ab 10 oder 20 % Änderung zur Vorwoche). Es wird empfohlen nicht nur die Trendanalyse darzustellen, sondern auch die absoluten Werte, da der Trendverlauf alleine nichts über das Infektionsniveau aussagt (hoch, niedrig usw.).

Ein weiteres Regressionsverfahren stellt die *LOESS*-Regression dar, die auch dem Pandemie-Radar des RKI (https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Situationsberichte/COVID-19-Trends/COVID-19-Trends.html?__blob=publicationFile#/home) zu Grunde liegt. Hierauf fußt zudem die Heat-Map im RKI-Wochenbericht (https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Situationsberichte/Wochenbericht/Wochenberichte_Tab.html) zu den einzelnen Beprobungsstandorten. Bei *LOESS* (*locally weighted scatterplot smoothing*), der lokal linearen Kernregression, handelt es sich um ein Verfahren zur Glättung von Daten mittels einer lokal gewichteten Regressionsfunktion. Bei der Gewichtungsfunktion nimmt der Einfluss benachbarter Werte auf die Glättung an einer Position mit der Entfernung zu dieser Position ab. Ausreißer erhalten dadurch ein geringes Gewicht als bei anderen Verfahren.

Normalisierung

Die Ergebnisse der SARS-CoV-2-Abwasserbestimmung können durch bestimmte Rahmenbedingungen beeinflusst werden und unabhängig von der Inzidenz zu Schwankungen der Ergebnisse führen. Zu Einflussfaktoren zählen z. B. Fremdwasser, Niederschlag und Schmelzwasser (bei Mischkanalisation), Pendlerverkehr, wochenend- oder jahreszeitenabhängiger Tourismus sowie die Einleitung von Industrie- und Gewerbeabwässern zu bestimmten Tages- oder Nachtzeiten. Die Auswirkungen der Verdünnung durch Niederschlag und Fremdwasser sind schwer von Veränderungen der COVID-19-Fallzahlen zu unterscheiden. Korreliert man einen quantitativen Trend für einen definierten Zeitraum mit den Daten der öffentlichen Gesundheitsüberwachung, können sich dann unerwünschte Abweichungen zeigen. Um die Variabilität der Abwassermatrix zu berücksichtigen, können die Abwasserdaten unter Einbeziehung bestimmter Faktoren normalisiert werden.

Im ersten Schritt erfolgt für die Normalisierung die Frachtberechnung auf Basis der realen Abflussdaten (Volumenstrom). Die Fracht ist in RNA-Kopien pro Tag anzugeben. Optional kann sich die Normalisierung auf mitgemessene Surrogatviren stützen, die als Fäkalindikatoren zum Einsatz kommen. Auch chemische Parameter (z. B. Ammonium, Coffein) sind schon für Normalisierungsberechnungen zum Einsatz gekommen.

Eine Normalisierung auf Basis der Menge menschlicher Fäkalien im Abwasser kann besonders dann sinnvoll sein, wenn zu erwarten ist, dass sich die Zahl der Personen im Abwassereinzugsgebiet im Laufe des Überwachungszeitraums ändert (z. B. aufgrund von Tourismus und Berufspendlern). Normalisierungskontrollen für menschliche Fäkalien sind Organismen oder Verbindungen, die spezifisch für menschliche Fäkalien sind und sich im Abwasser nachweisen lassen. Dazu zählen z. B. das pflanzliche Virus *Pepper mild mottle Virus* (PMMoV) oder der Bakteriophage (Virus, das nur Bakterien infiziert) *CrAssphage*. Die Abundanzen beider Viren sind deutlich höher als die von SARS-CoV-2.

Sie lassen sich auch über RT-PCR nachweisen und eignen sich deshalb besonders für die Normalisierung. Surrogatviren lassen sich auch zur Normalisierung bei Verdünnungseffekten (z. B. durch Regenereignisse, Schmelzwasser) heranziehen.

Ob Surrogatviren oder der Volumenstrom verlässlichere Ergebnisse liefern, ist abhängig von den Eigenschaften der Kläranlage und des Einzugsgebietes in jedem Einzelfall zu klären. Bei kleinen Kläranlagen oder Kläranlagen mit einer schwierigen Topographie (z. B. Gebirgsregionen) scheint eine Normalisierung mit Surrogatviren bessere Ergebnisse zu liefern, wohingegen bei größeren Kläranlagen eine Normalisierung auf den Volumenstrom geeigneter scheint.

9 Laborvergleich/Ringversuch

Die Teilnahme an einem Laborvergleich oder Ringversuch dient der Evaluierung der eigenen Methode und gibt Aufschluss über die Sensitivität im Vergleich zu anderen Laboren. Bisher gibt es keine Firma oder staatliche Behörde die Laborvergleichsuntersuchungen für das SARS-CoV-2-Abwassermonitoring durchführen. Bisherige Ringversuche und Laborvergleiche wurden von BMBF-geförderten Projekten eigeninitiativ durchgeführt und finanziert. In welchem Rahmen Laborvergleichsuntersuchungen zukünftig durchgeführt werden, ist noch nicht geklärt.

Abhängig davon welche Aussagen mit dem Laborvergleich getroffen werden sollen und welche Mittel zur Verfügung stehen, gibt es verschiedene Möglichkeiten der Durchführung. Ein Hauptunterschied liegt darin ob eine unbehandelte Abwasserprobe verwendet wird, die SARS-CoV-2 enthält oder ob eine Abwasserprobe ohne SARS-CoV-2 verwendet wird, der dann eine definierte Menge Virus zugefügt wird. Die Zielsetzung, der Umfang sowie die Bedingungen zur Teilnahme sollten den beteiligten Laboren von der federführenden Organisation vor der Durchführung erläutert werden. Es ist sinnvoll, begleitend eine Abfrage zum verwendeten Protokoll und möglichen Besonderheiten bei den teilnehmenden Laboren durchzuführen (z. B. Anreicherungsmethode, verwendete Primer, RNA-Extraktionskit). Ein Laborvergleich sollte ein bis zweimal pro Jahr durchgeführt werden.

9.1 Unbehandelte Abwasserprobe ohne zusätzlichen Spike

Bei diesem Versuchsaufbau ist die Voraussetzung der Zugang zu Abwasserproben mit hohen SARS-CoV-2-Konzentrationen. Im Folgenden wird eine Möglichkeit für einen Laborvergleich erläutert, es gibt jedoch viele Variationsmöglichkeiten.

Ein im Abwassermonitoring erfahrendes Labor bestimmt die Konzentration von SARS-CoV-2 in der Abwasserprobe und stellt die Konzentration auf eine vorher festgelegte Größe ein (z. B. 1000 Genkopien/ml Abwasser). Idealerweise wird eine Verdünnungsreihe hergestellt (z. B. 100 und 10 Genkopien/ml), um einen Konzentrationstrend zu ermitteln. Die Proben werden an die teilnehmenden Labore versandt, die dann ihr Standardprotokolle für die Analyse durchführen. Eine zentrale Stelle sammelt die Ergebnisse, wertet diese aus und stellt die Daten den Teilnehmern anonymisiert zur Verfügung.

Der Vorteil dieses Versuchsaufbaus ist der relativ geringe Aufwand. Ein Nachteil besteht darin, dass die Methode des Labors, das die Proben vorbereitet, als Referenz dient und keine unabhängige Probe zur Verfügung steht.

9.2 Unbehandelte Abwasserprobe + Spike

Bei diesem Versuchsaufbau verwendet man eine Abwasserprobe, die kein SARS-CoV-2 enthält. Der Probe wird dann eine exakt definierte Menge eines Virus, z. B. hitzeinaktiviertes oder gamma-bestrahltes SARS-CoV-2, zugefügt. Das weitere Vorgehen erfolgt analog wie im Laborvergleich mit Abwasserproben ohne Spike. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass sich die Virusmenge unabhängig quantifizieren lässt und so auch die Ergebnisse der Laborvergleiche (z. B. in aufeinanderfolgenden Jahren) besser vergleichbar sind. Außerdem ist es möglich, verschiedene Virusvarianten nachzuweisen, wenn diese in einem definierten Verhältnis hinzugefügt werden. Nachteilig sind jedoch der höhere Aufwand und die Notwendigkeit zur Herstellung oder Beschaffung der exakt quantifizierten Viren.

Auswertung:

Je nach Design des Laborvergleichs können verschiedene Rückschlüsse aus den Ergebnissen gezogen werden. Hauptziel eines Laborvergleichs sollte es sein, nachzuweisen, dass alle Labore spezifisch SARS-CoV-2 im Abwasser nachweisen können. Falls mehrere Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen für den Laborvergleich eingesetzt wurden, sollte der Trend (hohe vs. niedrige Konzentrationen) abgebildet werden können. Alternativ kann es auch Ziel des Laborvergleichs sein, festzustellen

ob alle Labore eine vorher festgelegte, niedrige Konzentration nachweisen können. Dies ist insbesondere wichtig, wenn das Abwassermonitoring als Frühwarnsystem eingesetzt wird.

Falls eine Abfrage der Methoden erhoben wurde, können statistisch Untersuchungen auf Korrelationen zwischen bestimmten Methoden und einer hohen oder niedrigen Sensitivität durchgeführt werden. Jedem Labor sollte das eigene Ergebnis zur Verfügung gestellt werden sowie zur Einordnung eine anonymisierte Gesamtübersicht der Ergebnisse aller teilnehmenden Labore.

10 Dateninfrastruktur und Datenflussmodelle

Da bei der Durchführung eines Abwasserüberwachungsprogramms verschiedene Akteure (Entsorgungsbetriebe, Gesundheitsämter, Labore, Politik) bei der Datenerhebung und Dateninterpretation mitwirken, ist die Verwendung einer digitalen Dateninfrastruktur, auf die alle Beteiligten Zugriff haben, sinnvoll. Dies gewährleistet eine hohe Durchgängigkeit, Transparenz, eine zügige Verwendung der Ergebnisse und vereinfacht dadurch die Kommunikation. Der Anspruch, der sich an ein geeignetes Datenflussmodell richtet, betrifft die schnelle und verständliche Bereitstellung von belastbaren Abwasserdaten für die Entscheider in den Gesundheitsbehörden oder die allgemeine Öffentlichkeit.

Dabei liefern die Kläranlagen und Labore die Daten, z. B. Begleitparameter der Probenahme und Ergebnisse der Analyse, während die Gesundheitsseite im Idealfall die Zusammenführung der Abwasserdaten mit den klinischen Daten für ein spezifisches Einzugsgebiet gewährleistet. So kann dem Krisenstab als ergänzende Diagnostik ein möglichst umfassendes Bild der pandemischen Lage an einem Standort oder bei mehreren repräsentativen Standorten für ein Bundesland präsentiert werden.

Die verschiedenen Akteure müssen folgende Informationen bereitstellen und Aufgaben erledigen, um einen effizienten Datenfluss zu ermöglichen:

Entsorgungsbetrieb:

Einmalig vor Beginn oder bei Änderungen:

- Anlegen der Messstelle (Stammdaten, z. B. georeferenzierter Ort der Probenahme)
- Einzugsgebiet der Messstelle definieren, ggf. inklusive des zugrundeliegenden Kanalnetzes
- Parameter des Einzugsgebietes (Misch- oder Trennkanalisation, Fremdwasseranteil, angeschlossene Einwohner, max. Fließdauer, Hinweise auf Indirekteinleiter mit stark schwankenden Einleitungen)

Bei jeder Probenahme:

- Probenahmespezifische Parameter (Datum, Uhrzeit, Probenart etc.)
- Begleitparameter
- Normalisierungsparameter (wie Volumenstrom während der Probenahme)
- Sonstiges (Auffälligkeiten, Abweichungen vom Protokoll)

Labor für die Biomarkerbefunde und Surrogatparameter:

Einmalig vor Beginn oder bei Änderungen:

- Bestimmungsgrenze für jedes Gen
- Analyse-Protokoll

Bei jeder Analyse:

- Datum
- Temperatur der Probe nach Ankunft

- Ergebnisse PCR SARS-CoV-2-Biomarker
- Umrechnung der Ergebnisse in Genkopien/ml Abwasser
- Ggf. Ergebnisse PCR Surrogatviren oder anderer Normalisierungsparameter
- Ggf. Nachweis Virusvarianten
- Sonstiges (Auffälligkeiten, Abweichungen vom Protokoll)

Automatische Datenverarbeitung im Datenflussmodell:

- Qualitätssicherung durch Korrektur von Fehleinträgen
- Normalisierung der Biomarkerbefunde
- Darstellung der Daten auf einem Dashboard für die unmittelbaren Nutzer

Gesundheitsämter:

Einmalig oder bei Änderungen:

- Indexpersonen im Einzugsgebiet sind mit korrekten Meldedaten zu erfassen

Bei jedem Datenpunkt:

- Ggf. automatische Zusammenführung von Abwasserdaten und aggregierten Inzidenzen für ein Einzugsgebiet

Landesgesundheitsbehörden:

- Zentrale Datenerfassung und -weitergabe
- Darstellung der Daten auf einem Dashboard

Umweltbundesamt:

- Qualitätssicherung
- Datenverarbeitung (z. B. Normalisierung bei Regenereignissen)
- Interpretation der Daten
- Datenpflege/Datenhaltung

Robert-Koch-Institut:

- Trendanalyse
- Darstellung standortspezifischer Trends
- Berechnung eines bundesweiten Indikators
- Veröffentlichung der aggregierten Daten im Pandemie-Radar (https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Situationsberichte/COVID-19-Trends/COVID-19-Trends.html?__blob=publicationFile#/home)
- Veröffentlichung der Trenddaten für einzelne Standorte im RKI-Wochenbericht zu COVID-19 (https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Situationsberichte/Wochenbericht/Wochenberichte_Tab.html)

Krisenstab:

- Entscheidung über Freigabe der Daten für Entscheider oder Öffentlichkeit
- Vorschlag von Handlungsmaßnahmen für die Politik

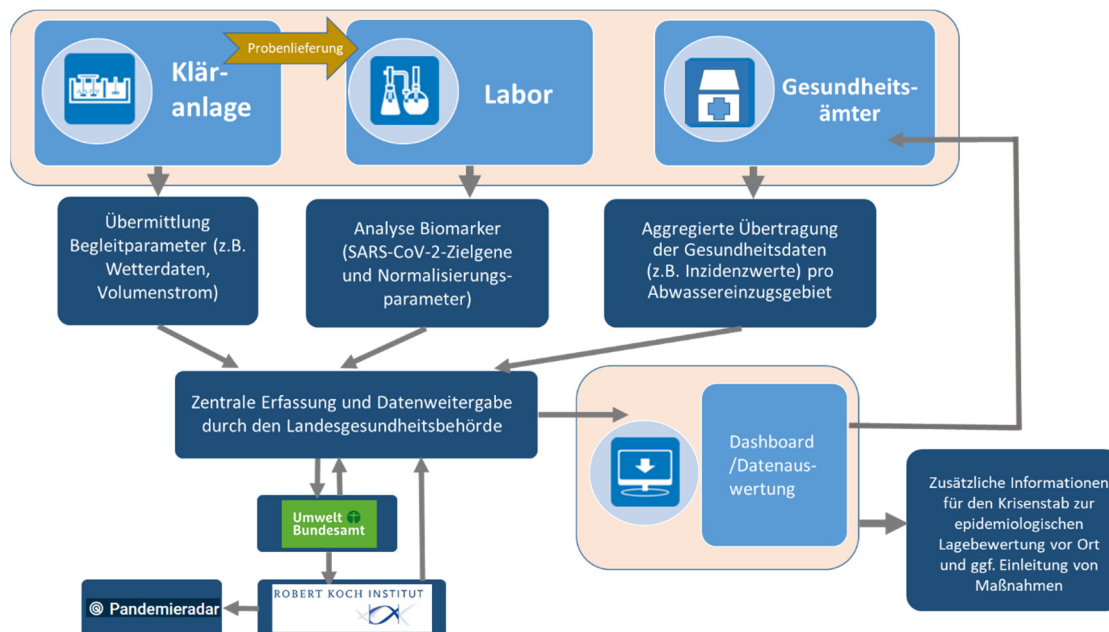


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Datenflusses

Bei der Entscheidung über die digitale Infrastruktur spielen datenschutzrechtliche Belange eine entscheidende Rolle. Die Zugriffsrechte der Beteiligten müssen definiert und regelmäßig überprüft werden. Insbesondere wenn sensible oder personenspezifische Informationen involviert sind, ist die Sicherheit bei der Datenspeicherung und -übertragung essentiell.

In einer bundesweiten Pilotstudie, die vom 01.11.2021 bis zum 31.03.2023, wurde ein Datenflussmodell entwickelt, das die oben genannten Ansprüche erfüllt. Zur digitalen Erfassung und georeferenzierten Darstellung der Kläranlagen- und Labordaten kam die *ArcGIS*-Software der Firma *Esri* zum Einsatz. Darin sind die Stammdaten der Kläranlagen wie Größe der Kläranlage, Ort der Messstelle, Definition der Abwasserzonen einmalig hinterlegt. Die Eingabe der probenahmespezifischen Daten gemäß Probenbegleitschein (siehe Abschnitt 12.4) inklusive der Begleitparameter (siehe Abschnitt 12.5) sowie der Analyseergebnisse des Labors erfolgt über eine App (*Survey123*), worüber für die Datenhaltung die Einspeisung in eine zentrale Cloud oder auf einen lokalen Server gewährleistet ist.

Durch automatische Datenanalyse per Skript werden im Rahmen der Qualitätssicherung alle Messdaten auf Belastbarkeit überprüft und fehlerhafte Eingaben oder Werte unterhalb der Bestimmungsgrenze gekennzeichnet. Sie finden bei der weiteren Datenauswertung keine Berücksichtigung. Falschmessungen können durch Betriebsstörungen, Probleme bei der Probenahme, z. B. durch einen defekten Probenehmer, verursacht sein.

Auch für die Normalisierung der Daten, die notwendig ist, um die in die Kläranlage geleitete Fäkalienmenge im Messzeitraum bestimmen zu können, sind mathematische Algorithmen implementiert. Für die Normalisierungsberechnung sind die realen Abflussdaten erforderlich. Es erfolgt eine Frachtberechnung, angegeben als RNA-Kopien pro Tag. Optional kann sich die Normalisierung auf mitgemessene Surrogatviren stützen, die als Fäkalindikatoren zum Einsatz kommen. Häufig finden hierfür das *Pepper mild mottle Virus* (PMMoV) oder *CrAssphage* Verwendung (siehe auch Abschnitt 8), die beide immer in menschlichen Ausscheidungen vorkommen. Die Abundanzen sind deutlich höher als die von SARS-CoV-2. Surrogatviren helfen daher, Verdünnungseffekte durch Starkregenereignisse oder Fremdwasser auszugleichen. Auch andere Einflüsse im Kläranlageneinzugsgebiet, z. B. saisonale Veränderungen und durch Berufspendler ausgelöste Verschiebungen, lassen sich so bestimmen.

Im nächsten Schritt folgt die statistische Auswertung der Daten. Es werden stets mehrere Zielgene (mindestens 2) gemessen und als gleitender Mittelwert über 5 Messtage dargestellt, um die Trends abschätzen zu können. Als weitere Regression ist die *LOESS*-Regression implementiert (siehe auch Abschnitt 8), die auch dem Pandemie-Radar des RKI zu Grunde liegt. Hierauf fußt zudem die Heat-

Map im RKI-Wochenbericht zu den einzelnen Beprobungsstandorten. Bei *LOESS* (*locally weighted scatterplot smoothing*), der lokal linearen Kernregression, handelt es sich um Verfahren zur Glättung von Daten mittels einer lokal gewichteten Regressionsfunktion. Bei der Gewichtungsfunktion nimmt der Einfluss benachbarter Werte auf die Glättung an einer Position mit der Entfernung zu dieser Position ab. Ausreißer erhalten dadurch ein geringes Gewicht als bei anderen Verfahren.

Die ermittelten Daten können in Echtzeit in einem Dashboard visualisiert werden. Bei den bisher verwendeten Darstellungen findet sich meist eine Auflistung der Messstandorte, entweder einzelne Städte oder landesbezogen, sowie eine Landkarte, in der die Messstellen im Kläranlagen-Einzugsgebiet markiert sind. In einer Graphik ist die Darstellung der Genkopien pro Tag als Einzelbefunde bzw. als gleitende Mittelwerte zu sehen. Der ansteigende, gleichbleibende oder sinkenden Trend kann durch einen Pfeil, Plus/Minus-Zeichen oder farblich signalisiert werden. Häufig ist es möglich, sich verschiedene voreingestellte Zeiträume oder auch den gesamten Messzeitraum anzeigen zu lassen.

Auch die Entwicklung der im Abwasser nachgewiesenen Virus-Varianten ist teilweise auf den Dashboards dargestellt. Hier das Beispiel des Landes Bayern: <https://www.bay-voc.lmu.de/abwassermonitoring>.

Durch die Verschneidung der Abwasserwerte mit den Indexfällen, also den positiv auf COVID-19 Getesteten, lassen sich analoge Trendentwicklungen beobachten, z.T. mit einem deutlichen zeitlichen Vorlauf der Abwasserwerte. Bei der Meldung der positiven PCR-Befunde aus humanen Tests an das zuständige Gesundheitsamt, erfolgt automatisch durch eine Programm-Routine die Zuordnung der Adresse des Betroffenen zu der jeweiligen Abwasserzone. Das passiert aus Datenschutzgründen über einen dezentralen Rechner im Gesundheitsamt aggregiert für das gesamte Einzugsgebiet, weil es sich um personenbezogene Daten handelt, die nicht einzeln geteilt werden dürfen. Daher kommen nur aufsummierte, aggregierte Indexfälle zum Einsatz, auf deren Basis die Krisenstäbe und Politik über das Vorgehen und notwendige Maßnahmen entscheiden können.

Durch das vorgestellte Datenschutzmodell ist gewährleistet, dass die während der Pandemie schon stark ausgelastete Gesundheitsseite nicht zusätzlich belastet wird. Die automatisierte Datenweitergabe, -verarbeitung und Darstellung auf Dashboards, die eine einfache intuitive Interpretation ermöglichen und sich auf die absolut notwendigen Parameter beschränken, tragen zu einer effizienten Umsetzung und Steigerung der Akzeptanz bei allen Beteiligten bei.

Zur Einordnung der Daten im Dashboard enthält ein Begleitdokument die wichtigsten Informationen, die im Zusammenhang mit der Probenahme und der Analyse stehen:

- Ort der Probenahme und Einzugsgebiet
- Ggf. historische Daten des gleichen Ortes
- Gemessene Biomarker
- Ggf. Normalisierungsparameter
- Nachweisgrenze des Assays
- Ggf. Inzidenz
- Datum und Frequenz der Probenahme

Eine Kommunikation der Daten an die Öffentlichkeit, über die Krisenstäbe hinaus, bietet Vor- und Nachteile. Die Interpretation der Abwasserdaten ist für den Laien schwierig und kann zu Missverständnissen führen. Es ist daher sehr genau abzuwägen, welche Daten in welcher Form für die allgemeine Öffentlichkeit aufbereitet werden. Andererseits kann die breite Kommunikation der Daten dabei helfen, die Akzeptanz von Maßnahmen zur Eindämmung der Pandemie zu erhöhen.

Grundsätzlich gehört die Interpretation von Abwasserdaten in die Hände von geschultem Personal. Das schließt Krisenstäbe, die Entscheidungen zum Pandemiemanagement vorbereiten, ein. Insbesondere der Vergleich von absoluten Zahlen zur RNA-Konzentration an verschiedenen Kläranlagen-

Standorten gestaltet sich schwierig. Bei Abwasser handelt es sich um eine komplexe Matrix, die sich von Standort zu Standort unterscheidet und Einfluss auf den Virus-Nachweis nimmt. Die Messwerte von unterschiedlichen Standorten lassen sich daher nicht miteinander vergleichen. Wenn es in einem Fall zu der Ergreifung von Maßnahmen kommt und in einem anderen nicht, kann dies in der Öffentlichkeit Unverständnis hervorrufen und sollte kommunikativ begleitet werden.

11 Exkurs in die Virologie SARS-CoV-2

Unbehüllte und behüllte Viren

Viren sind Erreger, die für die Vermehrung einen Wirt benötigen, da sie keinen eigenen Stoffwechsel aufweisen. Die meisten Wissenschaftler zählen sie daher nicht zu den Lebewesen. Als Wirt können alle Lebensformen wie Tiere, Pflanzen und Mikroorganismen (z. B. Bakterien) dienen. Viren bestehen aus ihrem Erbmateriale (Genom) und einem Kapsid, das aus Proteinen zusammengesetzt ist. Je nach Art des Genoms – RNA oder DNA, einzelsträngig oder doppelsträngig – lassen sich Viren in Gruppen unterteilen. Einige Viren besitzen zusätzlich eine Virushülle, die aus Lipiden (Fetten) der ursprünglichen Wirtszelle und eingelagerten viralen Proteinen zusammengesetzt ist.

Die Virushülle spielt eine wichtige Rolle für den Infektionsweg, die Aufnahme der Viren in die Zelle, die Stabilität gegenüber Umwelteinflüssen und Desinfektionsmitteln, die Fähigkeit zur Veränderung der Virusoberfläche und die Abwehr durch das Immunsystem.

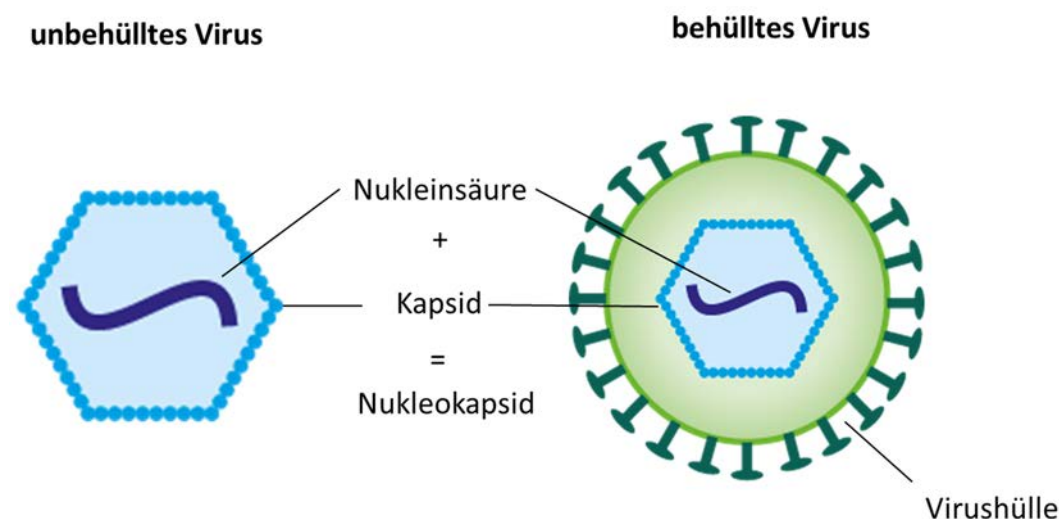


Abbildung 12: Vergleich von unbehüllten und behüllten Viren

Bei unbehüllten Viren bildet das Kapsid die Oberfläche des Virus. Da das Kapsid oft mit dem Genom assoziiert ist und eine wichtige Funktion bei der Vermehrung des Viren-Genoms (Replikation) aufweist, führen Mutationen im Kapsid oft zu defekten Viren, die nicht mehr vermehrungsfähig sind.

Die Oberfläche von behüllten Viren, die Virushülle, spielt für die Replikation kaum eine Rolle. Mutationen in der Virushülle sind daher eher tolerabel. Veränderungen der in die Virushülle eingelagerten Proteine, können hingegen einen vereinfachten Eintritt in die Wirtszelle bedingen oder die Umgehung der Immunabwehr des Wirtes auslösen. Es ist auch möglich, dass sich die Viren dadurch einen neuen Wirt erschließen. Deshalb verwundert es nicht, dass es sich bei den meisten neu auftretenden humanen Viren (new emerging viruses) um behüllte Viren handelt (z. B. HIV, Influenza, SARS-CoV). Die Zerstörung der Virushülle verhindert die Infektion der Wirtszelle. Dieser Umstand lässt sich für die Inaktivierung von behüllten Viren nutzen, um eine Verbreitung zu unterbinden. Detergenzien (z. B. Seife) und Desinfektionsmittel greifen beispielsweise die Lipide als empfindlichsten Teil der Virushülle an und zerstören die Hülle.

Zusammengefasst bedeutet das, dass sich behüllte im Vergleich zu unbehüllten Viren als instabiler erweisen, sich aber häufiger verändern und neue Wirte erobern können. Unbehüllte Viren sind dagegen resistenter gegenüber Umwelteinflüssen und bleiben deshalb im Abwasser länger infektiös. Veränderungen im Erbgut führen jedoch häufig zu nicht replikationsfähigen Viren, was bedeutet, dass es seltener zur Entstehung neuer Virusvarianten kommt.

Da behüllte Viren anfälliger für Degradationen sind und nicht so lange im Abwasser überleben, ist bei deren Nachweis im Abwasser eine Kühlung und schnelle Verarbeitung der Proben besonders wichtig.

Beispiele für behüllte Viren sind Coronaviren, HIV, Influenzaviren (Grippeviren), Ebolaviren und Gelbfiebertviren. Vertreter der Gruppe der unbehüllten Viren sind Polioviren, Noroviren und Rotaviren.

Coronaviren

Coronaviren finden unter Säugetieren und Vögeln weite Verbreitung. Einige dieser Coronaviren-Spezies sind humanpathogen, zirkulieren weltweit und lösen saisonal meist milde Erkältungssymptome aus. In den letzten Jahren verursachten jedoch erst kürzlich aus tierischen Reservoiren auf den Menschen übergetretene (Zoonose) Coronaviren (SARS-CoV, MERS-CoV (Middle-East-respiratory-syn-drome) und SARS-CoV-2) Epidemien bzw. Pandemien. Diese Coronaviren können schwere Erkrankungen mit letalem Verlauf auslösen, im Falle von SARS-CoV-2 die Krankheit COVID-19 (Coronavirus Disease 2019). SARS-CoV-2 gehört zur Gruppe der behüllten Viren und besitzt als Genom eine einzelsträngige RNA.

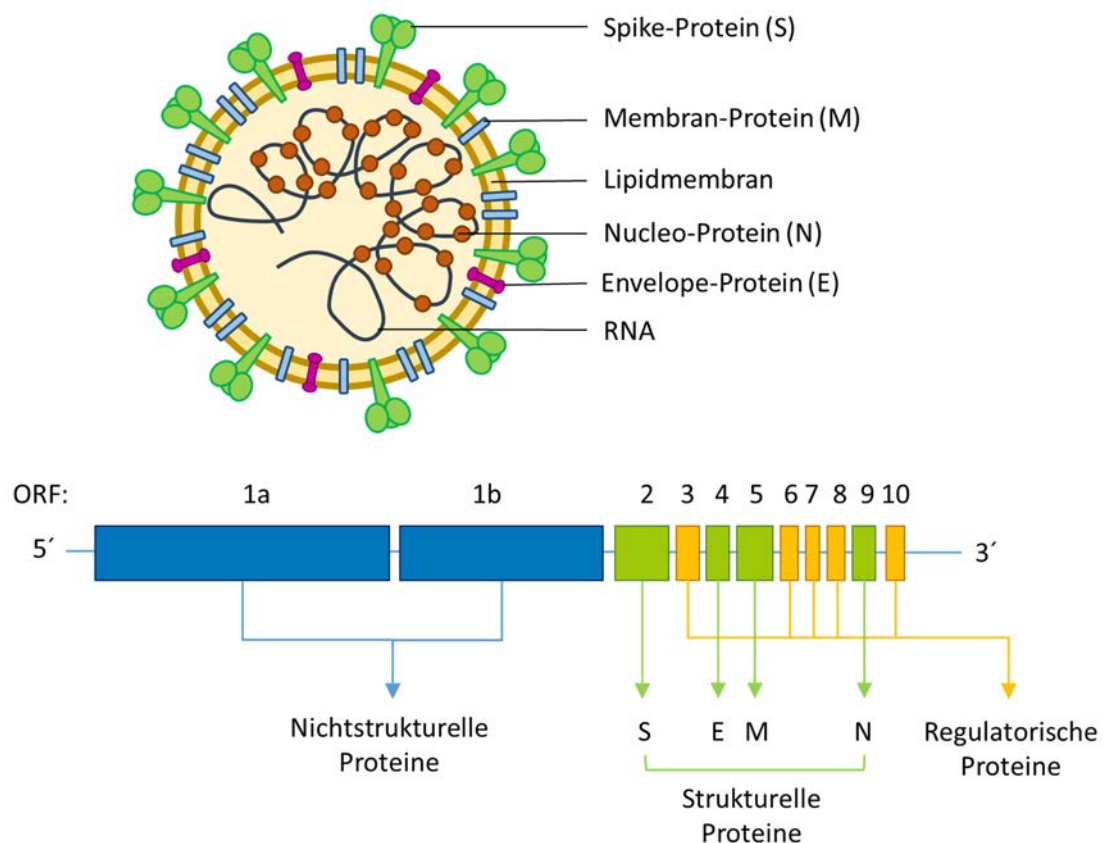


Abbildung 13: Schematische Übersicht von SARS-CoV-2 und seinem Genom

Das RNA-Genom enthält die Informationen, um Proteine herzustellen, die für die Vermehrung (Replikation) der Virus-RNA benötigt werden (nichtstrukturelle Proteine), und Proteine, aus denen sich die neuen Viren aufbauen (strukturelle Proteine). Die Genomregionen ORF1a (open-reading frame 1a) und ORF1b codieren für verschiedene nichtstrukturelle Proteine, die für die Vermehrung des Virus wichtig

sind, z. B. die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP). Das SARS-CoV-2-Virus weist vier Strukturproteine auf, das Spike(S)-Protein, das Hüll(Envelope, E)-Protein, das Membran(M)-Protein und das Nucleoprotein(N)-Protein. S-, E- und M-Proteine bilden zusammen mit Lipiden die Virushülle. Das S-Protein ist für die Andockung an und die Verschmelzung des Virus mit der Wirtszelle essentiell. Es besteht aus zwei Untereinheiten (S1 und S2). In der Wirtszelle wird dann die Virus-RNA freigesetzt und unter Verwendung der Maschinerie der Wirtszelle sowie der viruseigenen nicht-Strukturproteine Kopien des Virus produziert und freigesetzt, die dann weitere Wirtszellen infizieren. Das Kapsid besteht aus dem N-Protein, assoziiert mit dem Virusgenom nennt man es Nukleokapsid.

Die verschiedenen Gene können im Labor mittels PCR spezifisch nachgewiesen werden. Viren, die nah miteinander verwandt sind, z. B. SARS-CoV und SARS-CoV-2, weisen teilweise gleiche oder ähnliche Bereiche in ihren Genen auf. Daher ist es wichtig, für den PCR-Nachweis, insbesondere für die Primer-Bindestellen, Bereiche auszuwählen, die eindeutig spezifisch für SARS-CoV-2 sind.

Bei der Vermehrung der Viren kommt es immer wieder zu Fehlern, die zu Veränderungen (Mutationen) im Genom des Virus führen. Oft haben diese Mutationen keine Folgen oder führen zu defekten, nicht infektiösen Viruspartikeln. Manchmal können diese Mutationen aber auch die Übertragbarkeit, Virulenz oder Immunogenität des Virus verändern. Solche Mutationen betreffen bei SARS-CoV-2 oft das Gen, das für das S-Protein codiert.

Das S-Protein ist für die anfängliche Interaktion zwischen Virus und Wirtszelle verantwortlich. Es verhält sich wie eine Art Schlüssel, mit dem sich nur bestimmte Türen mit dem korrekten Schloss öffnen lassen. Änderungen im S-Protein können dann z. B. dazu führen, dass das Virus keine Fledermaus-Zellen mehr „öffnen“ kann, aber dafür menschliche Zellen oder, dass es noch stärker an die menschlichen Zellen bindet und den Eintritt in die Zelle erleichtert. Da nicht alle Zellen des menschlichen Körpers die gleichen „Schlüssellöcher“ haben, bestimmt das S-Protein auch, in welchen Zellen des menschlichen Körpers zur Infektion kommt.

Bei einer neuen SARS-CoV-2-Variante liegen meist mehrere Mutationen vor. Die WHO klassifiziert neue Varianten als Varianten unter Beobachtung (Variants of Interest, VOI) und besorgniserregende Varianten (Variants of Concerns, VOC). Von VOI spricht man, wenn sich das Erscheinungsbild der neuen Variante gegenüber vorherigen verändert hat. VOC sind hingegen Varianten, deren verändertes Erscheinungsbild nachweislich die Erregereigenschaften des Virus verändert hat. Dies kann eine höhere Übertragbarkeit oder eine erhöhte Resistenz gegenüber Impfstoffen oder Therapeutika bedeuten. Die besorgniserregenden Varianten werden in der Reihenfolge ihres Auftretens mit griechischen Buchstaben bezeichnet (z. B. Alpha-, Beta-, Delta- und Omikron-Variante).

Da sich das S-Protein so häufig verändert, ist es für den Nachweis von SARS-CoV-2 eher ungeeignet. Veränderungen in der Sequenz des S-Gens könnten dazu führen, dass die Primer der PCR nicht mehr in der Lage sind zu binden. Somit würde man ein falsch negatives Ergebnis in der PCR erhalten.

Da das S-Gen aber eine so wichtige Rolle für den Krankheitsverlauf spielt, ist es besonders wichtig diese Region zu sequenzieren, um neue Änderungen frühzeitig identifizieren zu können. Außerdem kann die S-Region für den gezielten Nachweis schon bekannter Varianten Einsatz finden.

Der Nachweis neu auftretender Mutationen und Varianten ist wichtig für die Diagnostik, die Therapie und die Impfstoffentwicklung. Falls sich die Zielregionen der PCR verändern, lässt sich eine Infektion mit dieser Methode nicht mehr nachweisen und die Primer müssen angepasst werden. Außerdem kann die Veränderung des Virus zu einer verminderten Wirksamkeit der nach einer Impfung gebildeten Antikörper führen. Für das Pandemiemanagement ist daher die Überwachung und Bewertung von neu auftretenden Varianten überaus wichtig.

SARS-CoV-2-Rekombinanten

Unter Rekombination versteht man den Austausch von genetischem Material zwischen zwei Genomen. Bei SARS-CoV-2 kann es zu einer Rekombination von verschiedenen Virusvarianten kommen (z. B. der Delta- und Omikron-Variante). Voraussetzung für die Rekombination ist, dass es in der Wirtszelle

gleichzeitig zu einer Infektion mit beiden Varianten kommt. Eine neue rekombinante Variante eindeutig zu identifizieren gestaltet sich methodisch schwierig, da bei der Sequenzierung nur schwer zu unterscheiden ist, ob eine reine Ko-Infektion vorliegt oder tatsächlich eine Infektion mit einer neuen rekombinanten Variante. Besonders im Abwasser, in dem nicht nur das Material einer infizierten Person vorhanden ist, sondern einer Vielzahl von Infizierten stellt der Nachweis von Rekombinanten eine große Herausforderung dar.

12 Anhang

12.1 Häufig gestellte Fragen zum Abwassermonitoring

Wie gelangt das Virus in das Abwasser?

In den Fäkalien von einigen SARS-CoV-2-Infizierten lassen sich Viruspartikel nachweisen. Außerdem werden Fragmente des Virus über den Stuhl ausgeschieden und gelangen so ins Abwasser.

Wie lange überlebt SARS-CoV-2 im Abwasser?

Es ist nicht genau nachgewiesen, wie lange SARS-CoV-2 im Abwasser überleben kann. Dies hängt vermutlich von der Zusammensetzung des Abwassers ab. SARS-CoV-2 gehört zur Gruppe der Viren, die eine empfindliche Lipidhülle besitzen (siehe Abschnitt 11). In der Umwelt und auch im Abwasser sind diese Viren instabiler als unbehüllte Viren, z. B. das Norovirus oder das Poliovirus. Bisher wurde kein infektiöses SARS-CoV-2-Virus aus dem Abwasser isoliert.

Wird SARS-CoV-2 über das Abwasser verbreitet?

Da bisher noch keine infektiösen Viruspartikel im Abwasser nachweisbar waren, ist eine Ansteckung über das Abwasser sehr unwahrscheinlich. Bisher gibt es noch keine Berichte zu Ansteckungen über das Abwasser. Dennoch sollten die gängigen Sicherheitsbestimmungen eingehalten werden (TRBA 220).

Was genau wird beim Abwassermonitoring nachgewiesen?

Beim Abwassermonitoring wird nicht das komplette Virus nachgewiesen, sondern genau definierte Teile des Erbgutes des Virus (siehe Abschnitt 11).

Kann über das Abwassermonitoring die Infektion von Einzelpersonen nachgewiesen werden?

Das Abwassermonitoring gibt nur Aufschluss über den Gesamtzustand der an die jeweilige Kläranlage angeschlossenen Einwohner. Es wird also nur nachgewiesen, ob Personen im Einzugsgebiet infiziert sind. Personifizierte Aussagen und quantitative Angaben zur Zahl der Infizierten sind nicht möglich. Es können auch Proben im Kanalsystem oder gezielt im Abwasser von vulnerablen Einrichtungen wie Pflegeheimen oder Schulen entnommen werden, was Rückschlüsse auf einen definierten Personenkreis erlaubt. In diesen Fällen sind datenschutzrechtliche Vorgaben zu berücksichtigen.

Kann man von den Abwasseranalysen auf die Inzidenzen schließen?

Derzeit ist es noch nicht möglich, aus den Abwasserdaten die exakte Inzidenz zu berechnen. Infizierte scheiden unterschiedliche Mengen an Virus aus, z. B. abhängig von der Phase der Infektion und von der Schwere der Erkrankung. Es gibt Ansätze über mathematische Modelle die Inzidenz aus den Abwasserdaten zu berechnen, die teilweise gute Ergebnisse erzielen. Meistens finden die Abwasserdaten aber als Trendanalyse Anwendung, um steigende oder fallende Infektionszahlen zu identifizieren.

Wofür wurde Abwassermonitoring schon verwendet?

In anderen Ländern hat das Abwassermonitoring schon vielfältige Anwendung gefunden. In Indien diente das Abwasser beispielsweise dazu, das Poliovirus nachzuweisen. Mit Hilfe dieser Information war es möglich, rechtzeitig Maßnahmen zu treffen, um die Verbreitung einzudämmen. Die Niederlande nutzen das Abwasser, um z. B. der Konsum von illegalen Drogen zu ermitteln, aber auch um die

Verbreitung von Noro- und Polioviren zu bestimmen. Die aus dem Abwasser generierten Informationen lassen sich gezielt bei Informations- und Aufklärungskampagnen einsetzen. Ein einmal etabliertes Abwasserüberwachungssystem mit den zugehörigen Strukturen lässt sich vielfältig einsetzen und im Bedarfsfall leicht reaktivieren und an spezifische Erreger anpassen. So konnte in den Niederlanden, in denen das Abwassermonitoring bereits vor Corona für andere Zwecke etabliert war, das SARS-CoV-2-Virus schon zu Beginn der Pandemie Anfang 2020 im Abwasser nachgewiesen werden.

Was sind zukünftige Anwendungsgebiete des Abwassermonitorings? Und was passiert „nach“ SARS-CoV-2?

Auch wenn SARS-CoV-2 irgendwann endemisch verbreitet ist, bleibt es wichtig, rechtzeitig das Auftreten neuer Varianten im Blick zu behalten, die potentiell infektiöser sind oder gar den Impfschutz umgehen können. Das Abwassermonitoring bietet nicht nur für SARS-CoV-2 Anwendungsmöglichkeiten, auch perspektivisch ist die Etablierung eines bundesweiten Abwassermonitoringsystems sinnvoll. Im Abwasser lassen sich auch andere Viren wie das Noro- und Rotavirus, die Magen-Darm-Infekte auslösen, oder das Masernvirus nachweisen. Auch der Nachweis von antibiotikaresistenten Bakterien ist über ein Abwassermonitoring möglich. In der Revision der EU-Kommunalabwasser-Richtlinie ist mit Artikel 17 die Einführung abwasserbasierter Surveillance von Public-Health-Parametern vorgesehen. Dazu zählen neben SARS-CoV-2 auch Polio- und Influenza-Viren sowie new emerging pathogens und AMR (antimicrobial resistance). Ebenso lässt sich die Verbreitung bestimmter Pilzen wie *Candida auris* überwachen. Es ist zudem möglich, dass es zu weiteren Epidemien und Pandemien kommen kann, die durch neu entstehende Viren oder Zoonosen ausgelöst werden. Ein schon etabliertes Abwassermonitoringsystem würde in einer solchen Situation einen wertvollen Zeitgewinn darstellen.

Wo werden Abwasserproben genommen?

Für gewöhnlich werden unbehandelte Abwasserproben im Zulauf der Kläranlage, möglichst nach dem Sandfang, entnommen. Durch zusätzliche Probenahme im Kanalnetz lassen sich z. B. Hotspots identifizieren oder bestimmte Einrichtungen wie Schulen oder Seniorenheime gezielt überwachen.

Wie wird üblicherweise beprobt?

Am Besten eignen sind automatische Probenehmer, die regelmäßig über einen definierten Zeitraum (z. B. 24 h) eine Probe nehmen (zeit- oder volumenproportional). Bei kleinen Kläranlagen ohne automatischen Probenehmer kann man auch eine Schöpfprobe entnehmen. Ausführliche Informationen zur Probenahme finden sich in Abschnitt 5.

Wie wird die Probe verpackt und verschickt?

Die Probe sollte in einem neuen oder gründlich gereinigten, bruchsicheren Probengefäß transportiert werden. Für die Lagerung nach der Probenahme bis zum Transport als auch für den Transport selbst empfiehlt es sich, 4 °C einzuhalten, da es andernfalls (bei zu hohen Temperaturen aber auch beim Einfrieren) zu einer erhöhten Degradation des Virusmaterials kommen kann. Die Probe sollte zudem luftdicht verschlossen werden.

Wie schnell sollte die Probe im Labor ankommen?

Je schneller desto besser. Es hat sich zwar gezeigt, dass die Virus-RNA bei 4 °C ca. 3 Tage stabil ist, allerdings kann dies auch von der jeweiligen Zusammensetzung des Abwassers abhängen. Außerdem ist eine möglichst schnelle Analyse wünschenswert, um die Ergebnisse zügig an die zuständigen Gesundheitsbehörden oder Krisenstäbe zu übermitteln und zeitnah über Maßnahmen entscheiden zu können. Nur so lässt sich der Zeitvorsprung, den man durch das Abwassermonitoring gewinnt, auch optimal nutzen. Im Idealfall liegen die Ergebnisse 48 Stunden nach der Probenahme vor.

Wer sollte am Abwassermonitoring teilnehmen?

Laut EU-Empfehlung sollten alle Städte mit mehr als 150.000 Einwohnern überwacht werden. In Deutschland gibt es 235 Kläranlagen der Größenklasse 5 gemäß Abwasserverordnung, an die jeweils mehr als 100.000 Einwohnerwerte (EW) angeschlossenen sind. Die Gesamtausbaugröße in Deutschland liegt bei 152 Millionen EW, wovon ca. 50 % (75 Millionen EW) von den 235 Kläranlagen abgedeckt

werden. Bei der Auswahl geeigneter Kläranlagenstandorte für das Abwassermonitoring spielen jedoch neben der Größe viele andere Aspekte eine Rolle. Dazu gehört z. B., dass der Datenfluss zu den zuständigen Gesundheitsbehörden gewährleistet ist und eine Verknüpfung der Abwasserdaten mit den Gesundheitsdaten erfolgt. Außerdem ist die zugrundeliegende Fragestellung, die mit den Abwasserdaten beantwortet werden sollte, entscheidend. Ist eine bessere Einschätzung der Pandemielage auf Bundesebene gewünscht oder sollen regionale Hotspots identifiziert und vulnerable Einrichtungen geschützt werden? Jeder Ansatz erfordert eine spezifische Überwachungsstrategie. Ein flächendeckender Ansatz mit allen 9.100 Kläranlagen in Deutschland ist unrealistisch.

Was kostet das Abwassermonitoring?

Die Kosten für das Abwassermonitoring sind abhängig vom Umfang des Überwachungsprogrammes. Gewöhnlich fallen Kosten für Personal, Ausrüstung, Verbrauchsmaterial, Versand und Analyse an.

Die Personalkosten entstehen im Zusammenhang mit der Projektverwaltung und der Probenahme (falls die Analyse am Standort durchgeführt wird, fallen auch hierfür Personalkosten an). Personalzeit im Zusammenhang mit der Probenahme wird unter anderem benötigt, um Begleitparameter zu erfassen, zu dokumentieren, die Probe zu entnehmen, zu konfektionieren und zu versenden. Je nach Häufigkeit und Ort der Probenahme variieren die Kosten. Dazu kommen Kosten für das Datenmanagement. Hierzu gehören die digitale Erfassung der Probenahmedaten und Weiterleitung an Labor und Krisenstab.

Optimal für die Probenahme ist ein automatischer Probenehmer, um eine Mischprobe (volumen- oder zeitproportional) entnehmen zu können. Zudem wird ein Kühlschrank zur Lagerung der Proben bis zum Versand benötigt sowie Versandmaterial (Probenflaschen, Kühlakkus etc., falls diese nicht vom Analyselabor gestellt wird). Die meisten kommerziellen Labore stellen Probenflaschen, Versandboxen und Kühlakkus zur Verfügung.

Die Analysekosten hängen vom Umfang und der Art des Abwassermonitorings ab. Pro Probe fallen Kosten für die Vorbereitung der Probe und die PCR an. Die Kosten können je nach verwendeter Probenaufbereitungsart variieren. Die Kosten der PCR variieren abhängig von der Anzahl der analysierten SARS-CoV-2-Biomarker. Zudem sind verwendete Surrogatviren, die zur Kontrolle oder Normalisierung gemessen werden, zu berücksichtigen. Zusätzliche Kosten entstehen, wenn weitere Variantenspezifische Biomarker gemessen werden oder eine Sequenzierung der Proben erfolgen sollen.

Außerdem können Kosten für die Bereitstellung einer Dateninfrastruktur anfallen (Dateneingabe, Dashboard). Die EU nennt pro Kläranlagen-Standort und Jahr einen Betrag von 25.000,-- €. In Deutschland wurden in der ESI-CorA-Pilotstudie des Bundes 60.000,-- € pro Kläranlagen-Standort und Jahr zugrunde gelegt.

Welche Begleitparameter werden für die Auswertung benötigt?

Die Erfassung der Begleitparameter ist nötig, um die Ergebnisse der PCR in ihrem Kontext zu betrachten und Einflüsse, die das Ergebnis verfälschen, zu identifizieren. Einige dieser Daten sind für die Normalisierung erforderlich. Welche Begleitparameter erfasst werden sollten, ist im Anhang im Dokument „Begleitparameter“ (siehe Abschnitt 12.6) aufgeführt.

Wie wird die Probe im Labor analysiert?

Der genaue Workflow wird in (siehe Abschnitt 7) beschrieben. Kurz zusammengefasst: Wenn die Probe im Labor ankommt, wird sie zuerst aufkonzentriert, da das Virus im Abwasser stark verdünnt vorliegt und sonst bei niedrigen Inzidenzen kaum nachweisbar wäre. Die folgenden Schritte sind fast identisch mit dem PCR-Nachweis bei klinischen Proben.

Dabei extrahiert man zunächst das genetische Material des Virus, die RNA. Um diese zu quantifizieren zu können, muss sie zuerst mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben werden. In einer PCR lässt sich nun das vorhandene Virusmaterial durch Verwendung spezifischer Primer nachweisen.

Warum muss die Probe konzentriert werden?

Je früher man SARS-CoV-2 im Abwasser nachweisen kann, desto geeigneter ist die Abwasserüberwachung als Frühindikator. Da SARS-CoV-2 im Abwasser deutlich verdünnter vorliegt als beispielsweise bei einer klinischen Probe, ist eine Aufkonzentrierung der Abwasserprobe notwendig. So ist es möglich, auch bei niedrigen Inzidenzen die Präsenz und Trendverläufe von SARS-CoV-2 im Abwasser abzubilden.

Was ist eine PCR?

PCR ist die Abkürzung für Polymerase-Chain-Reaction, auf Deutsch: Polymerase-Kettenreaktion. Bei der PCR wird eine bestimmte DNA-Sequenz vervielfältigt. Eine besondere Art der PCR ist die quantitative PCR (qPCR), die die vervielfältigte DNA zusätzlich quantifiziert. Je mehr dieser definierten DNA bzw. RNA im Ursprungsmaterial vorhanden war, desto geringer ist der sogenannte Ct-Wert. Dieser bezeichnet die erforderlichen PCR-Zyklen, um das Virusmaterial nachzuweisen und lässt so eine Quantifizierung zu. Detailliertere Informationen und Erläuterungen finden sich in Abschnitt 7.

Was sind die häufigsten Probleme bei der Analytik?

Die Aufkonzentrierung der Proben kann sich je nach Methode schwierig gestalten, da Abwasser eine veränderliche und sehr komplexe Matrix darstellt. Das erschwert es, reproduzierbare Ergebnisse mit geringer Variabilität und hoher Wiederfindungsrate zu generieren. Bei manchen Aufkonzentrierungsmethoden kann es zur Anreicherung von Inhibitoren kommen, die die PCR potentiell stören. Für präzise Aussagen und eine realistische Einschätzung der Daten ist es zudem wichtig, die Nachweisgrenze zu bestimmen. Bei neu auftretenden Varianten muss überprüft werden, ob die verwendeten Primer noch zuverlässige Ergebnisse liefern.

Was ist Normalisierung und wann/warum ist sie notwendig?

Abwasser ist eine variable Matrix, die sich im Tages- und Wochenverlauf unterschiedlich zusammensetzen kann. Dies kann beispielsweise durch den Zufluss von Regen- bzw. Schmelzwasser oder zeitlich variierenden Zufluss von Industrieabwasser bedingt sein. Außerdem ist es aufgrund von Pendler- und Tourismusaufkommen schwer, die tatsächlich von der Kläranlage erfasste Personenzahl exakt zu bestimmen.

Mit Hilfe verschiedener chemischer und biologischer Parameter ist es möglich, diese Unsicherheiten zu berücksichtigen und die Viruskonzentration im Abwasser rechnerisch zu normalisieren. Dies ermöglicht es, Messwerte verschiedener Probenahmetage miteinander zu vergleichen. Als Parameter für die Normalisierung eignen sich z. B. Surrogatviren wie CrAssphage oder PMMoV, der Volumenstrom oder chemische Parameter wie Coffein oder Ammonium. Die Tauglichkeit der verschiedenen Parameter zur Normalisierung sollte zu Beginn der Messkampagne überprüft werden und kann an unterschiedlichen Standorten variieren.

Ist es nötig, dass die Analytik nach einem standardisierten Verfahren von allen Laboren identisch durchgeführt wird?

Nein. Das ist auch schwer möglich, da die Analytik von verschiedenen Faktoren abhängt wie Probandendurchsatz und Ausstattung des Labors. Es ist vor allem wichtig, dass eine möglichst niedrige Nachweisgrenze mit der gewählten Methode erreicht wird.

Ist es wichtig die Messwerte, die an unterschiedlichen Standorten generiert werden, miteinander zu vergleichen?

Nein. Die absoluten Werte, die mit unterschiedlicher Verfahren ermittelt werden, sollten nicht verglichen werden. Allerdings kann natürlich gegenübergestellt werden, an welchen Standorten ein abfallender oder ansteigender Trend zu beobachten ist.

12.2 Übersicht und Beschreibung hilfreicher Links

DWA – Deutsche Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall e.V.

CoroMoni-Homepage

Auf der *CoroMoni*-Homepage finden Sie Informationen über das Projekt „Abwassermonitoring zur Bestimmung des SARS-CoV-2-Infektionsgrades der Bevölkerung und Aufbau eines flächendeckenden Frühwarnsystems – Koordination der Forschungsaktivitäten in Deutschland durch die DWA“, Kontaktdaten der Ansprechpartnerinnen und erarbeitete Ergebnisse. Das Projekt endete am 31.03.2023. Außerdem werden Neuigkeiten, die das Abwassermonitoring betreffen veröffentlicht und Hintergrundinformationen verlinkt.

<https://de.dwa.de/de/coromoni.html>

E-Learning Plattform DWA

Log-in erforderlich (alle am Abwassermonitoring beteiligten Akteure), für die Log in-Daten melden Sie sich bei der DWA.

Das Schulungsportal der DWA mit Zugang zu der E-Learning-Plattform „Wissen kompakt – Corona-Monitoring über den Abwasserpfad“ richtet sich an die Zielgruppen Betriebspersonal von Kläranlagen, Mitarbeitende in Laboren sowie bei den Gesundheitsämtern und Krisenstäben.

<https://e-learning.dwa.de/login/index.php>

Kläranlagenstandorte Abwassermonitoring

In dieser Karte sind alle Kläranlagenstandorte eingetragen, die mit Stand 31.03.2023 Abwassermonitoring durchführen oder es zeitlich begrenzt betrieben haben. Das Farbschema spiegelt die Art der Finanzierung wider.

Rot = BMBF-Förderung (abgeschlossen)

Blau = EU-Förderung (abgeschlossen)

Gelb = Sonstige Förderung (z. B. eigene Mittel, Landesmittel)

<https://padlet.com/diepelt1/3p7ffip4jrezolc5>

Informationen zum SARS-CoV-2-Abwassermonitoring

BMBF-Projekte zum SARS-CoV-2-Abwassermonitoring (meist in 2023 oder früher abgeschlossen)

Biomarker – Abwasser Biomarker CoV2: Abwasserepidemiologie am Beispiel eines SARS-CoV-2 Biomarkers für die Abschätzung von COVID-19-Infektionen auf der Populationsskala

www.cee.ed.tum.de/sww/forschung/mikrobielle-systeme/biomarker/

Sars-GenASeq – SARS-CoV-2 Genom im Abwasser – Monitoring der Pandemieentwicklung mittels Sequenzierung

<https://www.iwar.tu-darmstadt.de/abwasser/>

COVIDready – Dezentrales SARS-CoV-2 Monitoring im Abwasser: Entwicklung einer validierten Analyse-methode für abwassertechnische Labore auf Kläranlagen

www.covidready.de

COVIDPoops19-Dashboard (engl.)

Eine globale Karte über Abwassermonitoring-Standorte.

<https://www.covid19wbec.org/covidpoops19>

Über ein Formular kann der eigene Standort und Informationen zur Darstellung in der Karte eingereicht werden.

https://docs.google.com/forms/d/e/1FAIpQLSffxa955MlgZS3iD15vXfrv8vCs2_InGTC3NGsmQoh0-aQGig/viewform

DEEP-Digital European Exchange Platform (engl.)

Diese Seite der Europäischen Kommission sammelt Informationen über Abwassermonitoring in der EU und soll den Austausch der Akteure fördern. Es gibt Informationen über bevorstehende Veranstaltungen, die Dashboards der Länder, Neuigkeiten und Poster zum Abwassermonitoring.

<https://wastewater-observatory.jrc.ec.europa.eu/>

Network of wastewater-based epidemiology (engl.)

Eine Homepage der WEF (Water Environment Federation) mit Informationen zum nationalen Abwassermonitoringprogramm der USA. Die Seite stellt aber auch allgemeine nützliche Informationen zum Abwassermonitoring bereit.

<https://nwbe.org/>

Allgemeine Informationen SARS-CoV-2

WHO COVID-19 (engl.)

Alle Informationen der WHO, die COVID-19 betreffen:

<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>

Guidelines zum Abwassermonitoring, die von der WHO am 15. April 2022 veröffentlicht wurden.

<https://www.who.int/publications/i/item/WHO-HEP-ECH-WSH-2022.1>

Coronainformationen des RKI: Pandemie-Radar, RKI-Wochenbericht

Pandemieradar des Robert-Koch-Institutes zu SARS-CoV-2:

https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Situationsberichte/COVID-19-Trends/COVID-19-Trends.html?__blob=publicationFile#/home

Wochenberichte des Robert-Koch-Institutes zu COVID-19:

https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Situationsberichte/Wochenbericht/Wochenberichte_Tab.html

Coronainformationen der ECDC

Informationen zum Coronavirus des Europäischen Zentrums für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten (Agentur der Europäischen Union).

<https://www.ecdc.europa.eu/en/cases-2019-ncov-eueea>

Coronainformationen des BMG

Informationen des Bundesgesundheitsministeriums, die das Coronavirus betreffen.

<https://www.bundesgesundheitsministerium.de/coronavirus.html>

SARS-CoV-2 Informationen (engl.)

Informationen zu SARS-CoV-2 Fallzahlen und Varianten.

<https://www.outbreak.info/>

Hier können Varianten, Linien und zugehörige Mutationen verglichen und grafisch dargestellt werden.

<https://www.outbreak.info/compare-lineages?threshold=75&nthresh=1&sub=false&dark=false>

Informationen zu SARS-CoV-2 Sequenzen/Vergleichstools

GISAID Initiative (engl.)

Bei GISAID finden sich globale SARS-CoV-2-Sequenzierdaten. Die Daten stehen kostenlos zur Verfügung, allerdings ist für die Nutzung und zum Hochladen von Daten eine Registrierung notwendig. Die Datenbank soll es ermöglichen, die Verbreitung und Entwicklung des Virus besser zu verstehen. Es finden sich auch Visualisierungen der Daten und Neuigkeiten auf der Homepage.

<https://www.gisaid.org/>

SARS-CoV-Varianten nach der PANGO-Nomenklatur (engl.)

Diese Website dokumentiert alle aktuellen Pango-Linien und ihre Verbreitung sowie verschiedene Software-Tools, die von Forschern zur Analyse von SARS-CoV-2-Sequenzdaten verwendet werden können.

<https://cov-lineages.org/index.html>

Auch hier finden sich Informationen zu den verschiedenen SARS-CoV-2-Varianten und Untervarianten sowie zur PANGO Nomenklatur.

<https://www.pango.network/>

COVID CG (engl.)

Unter Verwendung der veröffentlichten Sequenzierdaten auf der GISAID-Datenbank können auf dieser Seite verschiedene SARS-CoV-2-Varianten und Linien und deren Mutationen und örtliche Verbreitung verglichen werden.

<https://covidcg.org/>

PCR-Primer Evaluierung (engl.)

Mit diesem Tool können Primer-Sequenzen mit bekannten SARS-CoV-2-Varianten aus der GISAID-Datenbank abgeglichen werden. So kann die potenzielle Auswirkung von Mutationen auf die Effizienz und Funktionalität der Primer evaluiert werden.

<https://primer-monitor.neb.com/>

Sonstiges

Nationale Akkreditierungsbehörde der Bundesrepublik Deutschland (DAkKS) – Datenbank der akkreditierten Stellen

Die DAkKS ist die nationale Akkreditierungsbehörde der Bundesrepublik Deutschland. In der Datenbank befinden sich alle bei der DAkKS akkreditierten Stellen, z. B. Labore. Über einen Suchbegriff (z. B. eine DIN-Norm) oder die Filtermöglichkeiten lässt sich die Suche einschränken um geeignete Labore für die Analyse zu finden.

<https://www.dakks.de/de/akkreditierte-stellen-suche.html>

Europäische Kommission: Seite mit allen Kläranlagen Deutschlands (engl.)

Auf dieser Seite befindet sich eine Karte, auf der alle Kläranlagenstandorte Deutschlands eingetragen sind.

<https://uwatd.eu/Germany/>

12.3 Checkliste vor Beginn des Abwasserüberwachungsprogramms

- ☐ Krisenstab zusammensetzen (Wer ist zu beteiligen?)
- ☐ Aufgaben festlegen (Kostenübernahme, Probenahme, Kommunikation etc.)
- ☐ Ziel festlegen und dokumentieren
- ☐ Teststrategie entwickeln (Festlegung von Probenart und Probenahmeort, Dokumentation in der Protokollvorlage, Probenahmehäufigkeit)
- ☐ Zeitrahmen des Abwasserüberwachungsprogrammes festlegen
- ☐ Wichtige Ansprechpartner und Kontaktpersonen identifizieren
- ☐ Beschaffung von notwendigem Material (Probenehmer, Transportmaterial etc.)
- ☐ Schulung des Personals (Kläranlage, Labor, Dateninterpretation)
- ☐ Analyselabor für die Analyse auswählen und Transport sicherstellen
- ☐ Kontakt zum zuständigen Gesundheitsamt herstellen
- ☐ Qualitätssicherung der Daten
- ☐ Einrichtung einer Datenbank
- ☐ Datenfluss festlegen
- ☐ Bereitstellung der Daten für die Gesundheitsämter
- ☐ Aggregation mit anderen Daten aus der Überwachung der öffentlichen Gesundheit
- ☐ Kommunikationsstrategie entwickeln (für Politik, Öffentlichkeit)

12.4 Probenbegleitschein für jede Einzelprobe

(bitte für jede Probe ausfüllen)

Name der Kläranlage

Probennahme Datum (tt/mm/jj):

Kläranlagenspezifische Probenidentifikationsnummer:

Probennahme (Anfangs- und End-)Zeitpunkt (hh:mm):

Gesamt-Volumen (Liter) der Mischprobe vor Abfüllung (geschätzt)

Temperatur des Rohabwassers (Grad Celsius):

Leitfähigkeit des Rohabwassers ($\mu\text{S}/\text{cm}$):

pH-Wert des Rohabwassers:

Probenversand Datum/Uhrzeit:
(z. B. Kurierdienst)

Adresse des Empfängers:

.....

.....

.....

12.5 Stammdatenblatt

SARS-CoV-2 – Probennahme - kommunales Rohabwasser	
Stammdaten (bitte einmalig ausfüllen und mit der ersten Probe übersenden oder wenn sich Daten ändern)	
Kläranlage/Adresse:	
.....	
.....	
Kontaktperson	Name:
	Telefon:
	E-Mail:
Angeschlossene Einwohner:	
Ausbaugröße:	
Mischwasseranteil	
Fremdwasseranteil	
Wasservolumen Indirekteinleiter (kontinuierlich/ diskontinuierlich):	
.....	
Probennahmestelle (Zulauf, nach Sandfang):	
Schöpfgerät (Typ):	
Automatischer Probennehmer (Typ):.....	
..... (z. B. Firma, Serie)	
Mischproben Typ: (volumen-/zeitproportional)	
Volumen/Intervall Teilproben: (z. B. 30 mL/1000 m3 oder 15 mL/5min)	
Bemerkungen:	
.....	

12.6 Begleitparamter

STAMMDATEN	
Angeschlossene Einwohner	
Ausbaugröße	
Trockenwetterabfluss	
Mischwasseranteil	
Fremdwasseranteil	
PROBENAHPME KONTEXT	
Wasservolumen Indirekteinleiter (kontinuierlich, diskontinuierlich)	
Wetterbedingungen (die Einfluss am Zeitpunkt der Probenahme haben)	
Volumenstrom für den Zeitraum der Proben- ahme (m ³ /d) bzw. (m ³ /s)	
pH-Wert	
Elektrische Leitfähigkeit	
Wassertemperatur	
NH ₄ -Konzentration	
PROBENAHPME	
Probenidentifikationsnummer	
Probenahmezeitpunkt (Datum, Uhrzeit)	
Probenahmezeitraum	
Probenahmeart (Einzelprobe/Mischprobe, zeit-oder volumenproportional)	
Probenvolumen	
MOLEKULARE ANALYSE	
SARS-CoV-2 Biomarker 1	
SARS-CoV-2 Biomarker 2	
Surrogatvirus	

12.7 Muster-Leistungsverzeichnisses zur Ausschreibung für Analyselabore

Das Muster-Leistungsverzeichnis zur Ausschreibung für die Analytik im Abwassermonitoring wurde von den Berliner Wasserbetrieben zur Verfügung gestellt. Das Verzeichnis wurde leicht modifiziert und für den allgemeinen Gebrauch angepasst. Es sollte allerdings beachtet werden, dass das Verzeichnis nur als Beispiel dient und für den individuellen Gebrauch und je nach Projekt verändert werden muss.

Muster - Leistungsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung
2. Definition Analysen von Abwasserproben auf SARS-CoV-2-RNA
3. Akkreditierungsanforderungen
4. Durchführung der Analytik
5. Beauftragung und Ausführungsfristen
6. Ergebnisdokumentation Prüfberichte
7. Bedarf
8. Beratung
9. Vertragslaufzeit

1. Einleitung

Das Unternehmen reinigt ca. Abwasser [\[Information über Kläranlagenbetrieb\]](#).

2. Definition Analysen von Abwasserproben auf SARS-CoV-2-RNA

Es handelt sich um Abwasserproben aus den Zuläufen von [\[Ort\]](#). Entsprechend der gewählten Leistungsoption und der gewählten Verlängerungsoption werden in der Zeit von [\[Datum\]](#) 1 Klärwerk bis zu 2-mal wöchentlich durch den Auftraggeber beprobt, abgefüllt und der Kühlung zugeführt. Diese Proben sollen auf Rückstände der RNA des neuartigen SARS-CoV-2-Virus hin untersucht werden, um Rückschlüsse auf das COVID19-Infektionsgeschehen in/um [\[Ort\]](#) zu ermöglichen. Die Probenaufbereitung sowie die Analytik sollen gemeinsam an ein externes Labor fremdvergeben werden. Ebenfalls fremdvergeben werden soll der Abtransport dieser Proben von den Standorten des Klärwerks [\[Ort\]](#).

3. Akkreditierungsanforderungen

Der Auftragnehmer muss mit der Vorlage einer gültigen Akkreditierung die Kompetenz nach DIN EN ISO/IEC 17025:2018-03 sowie DIN EN ISO 15189:2014-11 (Medizinische Laboratorien - Anforderungen an die Qualität und Kompetenz) inklusive Durchführung von quantitativen Real-Time Polymerase-Kettenreaktionen (q-RT-PCR) akkreditiert nach DIN EN ISO 15189 nachweisen.

Die Akkreditierungsurkunde des Bieters/Auftragnehmers und aller ggf. vorgesehener Unterauftragnehmer sind dem Auftraggeber mit dem Angebot sowie bei Änderungen während der Vertragslaufzeit in elektronischer Form zuzusenden.

4. Durchführung der Analytik

Ermittlung der Viruslast mittels RT-PCR

Der Auftragnehmer muss, die für die Durchführung des Auftrags, erforderlichen Apparaturen und Prozeduren nach dem JRC Technical Report JRC125065 oder einem vergleichbaren Protokoll vorweisen können (Gawlik BM, Tavazzi S, Mariani G, Skejo H, Sponar M, Higgins T, Medema G, Wintgens T, SARS-CoV-2 Surveillance employing Sewers Towards a Sentinel System, Feasibility assessment of an EU approach, EUR 30684 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2021, ISBN 978-92-76-36888-5, doi:10.2760/300580, JRC125065). Dies gilt insbesondere für die Aufbereitung von Abwasserproben und die damit einhergehende Extraktion von SARS-CoV-2-RNA. Ein Nachweis über erfolgreich durchgeführte Abwasseranalysen auf RNA-Rückstände des neuartigen SARS-CoV-2-Virus ist dem Auftraggeber vorab in Form eines PDF-Dokuments digital zu übermitteln (z. B. in Form anonymisierter bereits durchgeführter Analysen an anderen Standorten inkl. dem eingesetzten Probenaufbereitungsprotokoll, sowie den verwendeten Materialien und Methoden). Dies beinhaltet sowohl Ergebnisse der quantitativen Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) zur Bestimmung des RNA-Titers [\[falls gewünscht; als auch der Bestimmung von Variants of Concern \(VoC\) mittels Sequenzierung\]](#).

Die vom Auftraggeber entnommenen Proben müssen binnen 24 Stunden nach Übergabe an den Auftragnehmer der Aufbereitung und danach unmittelbar der RT-qPCR zugeführt werden. Die Proben sind während des gesamten Zeitraums von Probenabholung bis Aufbereitung zu kühlen, aber keinesfalls einzufrieren. Danach sind die Proben wie entsprechende sonstige DNA-/RNA-Extrakte handzuhaben und entsprechende Aliquote der aufbereiteten Proben sind als Rückstellproben für den Fall der Sequenzierung vorzuhalten. Die PCR muss auf mindestens [\[Anzahl, gewöhnlich 2\]](#) der gängigen Primer-Paare zurückgreifen, möglichst aus verschiedenen Genomregionen. Als Empfindlichkeit wird eine Zahl von <500 RNA-Kopien pro Liter Abwasser verlangt. (Dies entspricht in der einschlägigen Literatur Inzidenzwerten von 1/100000 bis 20/100000, je nach Quelle und je nach Testquote im untersuchten Gebiet.)

Falls im Projekt erwünscht:

[\[Ermittlung der Variants of Concern \(VoC\) bzw. Mutationen mittels Sequencing\]](#)

Proben, die aus der RT-qPCR mit Positivbefund hervorgehen, werden anschließend z. B. mittels Sanger oder „partial next generation sequencing amplicon-based sequencing“ sequenziert, um auf die gängigen jeweils aktuellen vom Robert-Koch-Institut (RKI) definierten Variants of Concern (VoCs) bzw. Mutationen analysiert zu werden. Hierfür sind mindestens die Anforderungen nach dem European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) Technical Guidance „Sequencing of SARS-CoV-2: first update“ (18.01.2021) sowie ECDC und World Health Organization Regional Office for Europe „Methods for the detection and identification of SARS-CoV-2 variants“ (März 2021) zu erfüllen. Die Ergebnisse sind in Form von Prozentangaben der jeweiligen VoC/Mutation in Bezug auf die entsprechend RT-qPCR ermittelte Gesamtlast an SARS-CoV-2-RNA anzugeben. Hierfür sind vom Auftragnehmer entsprechende bioinformatische Algorithmen zu verwenden.]

Generelles

Der Auftragnehmer gewährleistet, dass seine Mitarbeiter und bei Unterauftragsvergabe die Mitarbeiter seiner Unterauftragnehmer über die Besonderheiten dieser Leistungsbeschreibung und insbesondere über die Vorgaben zu den einzelnen Parametern (DIN-Vorschriften, Bestimmungsgrenzen, Einheiten, Bearbeitungszeiten) gemäß dieser Leistungsbeschreibung und der Angaben im Leistungsverzeichnisunterrichtet sind.

Die Durchführung der Analytik muss nach den hier geforderten Verfahren unter Einhaltung der geltenden Bestimmungsgrenzen/Empfindlichkeiten erfolgen.

Der Auftraggeber besteht darauf, dass die Verfahren in dieser Form mit der entsprechenden Qualitätssicherung durchgeführt werden, auch wenn auf Grund einer flexiblen Akkreditierung des Auftragnehmers Verfahren bereits ersetzt wurden.

Der Auftraggeber behält sich vor, die vom Auftragnehmer angewendete Methode einer Prüfung im Rahmen einer Vergleichsuntersuchung oder eines Audits zu unterziehen.

Bei gesetzlichen Änderungen während der Vertragslaufzeit, insbesondere Änderungen von Verfahren und Bestimmungsgrenzen, kann der Vertrag in gemeinsamer Absprache entsprechend angepasst werden.

Unterauftragsvergabe/Fremdvergabe

Im Leistungsverzeichnis ist vom Bieter zu jeder Preisposition das jeweils ausführende Labor mit Laborstandort zu benennen.

Probenabholung durch den Auftragnehmer:

Der Auftragnehmer stellt die Abholung der Proben am Tag der jeweiligen Probenbereitstellung durch den Auftraggeber vom Laborstandort des Auftraggebers innerhalb folgender Zeiten sicher:

Die Transportsicherheit und die Einhaltung der Kühlkette gemäß DIN38402-11, DIN EN ISO 5667-3 und DIN EN ISO 5667-16 sind ununterbrochen bis zur Bearbeitung der Proben nachweisbar sicherzustellen. Dies gilt insbesondere auch dann, wenn Proben zur Bearbeitung an einen Unterauftragnehmer weitergegeben werden. Weder der Transport noch die Weitergabe an Unterauftragnehmer darf zu einer Überschreitung der unter 4 geforderten Aufbewahrungs- und Analysezeiten führen, um die Richtigkeit der Ergebnisse nicht durch Degradation von Probenmaterial zu gefährden.

Der Auftraggeber behält sich vor, die Proben beim Auftragnehmer selbst anzuliefern.

Für diesen Fall stellt der Auftragnehmer sicher, dass die Proben innerhalb des im Folgenden genannten Zeitraumes uneingeschränkt und fachgerecht an einem von ihm benannten Laborstandort angenommen werden:

werktäglich Montag – Freitag zwischen 9:00 und 17:00 Uhr

Probengefäße

Der Auftragnehmer stellt entsprechend der geforderten Analytik zweckmäßige Probengefäße mit den benötigten Volumina von üblicherweise 50 – 250 ml bereit, sowie isolierte Transportboxen und Kühlakkus. (Nach Absprache kann auch der Auftraggeber geeignete Probengefäße zur Verfügung stellen.) Die Rückführung der Probengefäße sowie Transportboxen, Kühlakkus erfolgt z. B. im Austausch mit den abzuholenden Proben.

Aufbewahrung von Probenmaterial

Nach Abschluss der beauftragten Untersuchung gilt eine Rückstellfrist für die RNA-Extrakte (eingefroren) von 3 Monaten. Im Einzelfall können andere Aufbewahrungsfristen vom Auftraggeber vorgegeben werden.

Rückführung und Entsorgung von Probenmaterial

Die Entsorgung der Probenrückstände übernimmt der Auftragnehmer zu seinen Kosten.

Nach Absprache sind untersuchte Proben vom Auftragnehmer an den Auftraggeber zurückzuführen.

5. Beauftragung und Ausführungsfristen

Mit den etikettierten Proben wird ein Probenbegleitschein (bzw. Probennahmeprotokoll) des Auftraggebers mit den beauftragten Probennummern, Parametern, Prüfgegenstand, Einheit, Termin und Bearbeiter mitgeschickt, und/oder, nach Rücksprache, ggf. auch digital bereitgestellt.

Einhaltung der Ausführungsfristen

Der Auftragnehmer stellt sicher, dass die vereinbarten Fristen (siehe Pkt. 6) eingehalten werden auch im Fall von eventuellen betriebseigenen Schließzeiten des Auftragnehmers an Werktagen Montag bis Freitag (z. B. Brückentage zwischen Wochenend- und Feiertagen, Betriebsferien o.ä.).

Nachbeauftragungen

Zusätzliche Analysenparameter, die bisher nicht im Leistungsumfang enthalten sind, können nach entsprechender Anfrage zu Preis, Bestimmungsgrenze und Bearbeitungsdauer in den Vertrag aufgenommen werden.

6. Ergebnisdokumentation Prüfberichte

Der Auftragnehmer verpflichtet sich, die Daten digital mittels sogenannter [\[Datei, z. B. JSON-Files\]](#) an eine vom Auftraggeber zur Verfügung gestellte Schnittstelle zu übertragen. Das zu verwendende Datenformat innerhalb der [\[Datei, z. B. JSON-Files\]](#) wird vom Auftraggeber zur Verfügung gestellt und ist einzuhalten und liegt diesen Ausschreibungsunterlagen bei (als [\[Datei, z. B. JSON-Dummy-Datei\]](#) und als Excel-Beispiel mit Erläuterungen). Darin enthalten sind gängige Metadaten der jeweiligen Proben (Probennummer des Auftraggebers, Probenahmedatum und -Zeit, Ort, Ct-Werte der PCR-Biomarker, [\[falls gewünscht; sowie einige Detailinformationen aus der Sequenzierung\]](#); weitere Details siehe [\[Datei, z. B. JSON-Dummy bzw. Auflistung der in der JSON-Datei\]](#) zu übermittelnden Parameter und Metadaten). Das zur jeweiligen Probe zugehörige [\[Datei, z. B. JSON-File\]](#) ist jeweils spätestens 48 Stunden nach Probenabholung mit den PCR-Ergebnissen einzuspeisen und in um die Sequenzierungsergebnisse erweiterten Fassung spätestens nach 96 Stunden.

Der sicheren Dokumentation halber sind die Messergebnisse jeder einzelnen Probe zusätzlich als Prüfbericht in PDF-Form mit entsprechender Kennzeichnung des Labors (inkl. Akkreditierung usw.), der Probennummer, des Datums, des Parameters, der Einheit usw. zu übermitteln (jede Probe einzeln als PDF-Datei) per E-Mail an folgende E-Mail-Adresse: [\[E-Mail Adresse\]](#).

7. Bedarf

Es ist eine Probenzahl von minimal [\[Anzahl Proben, gewöhnlich 2\]](#) Proben pro Woche angesetzt, optional erweiterbar auf maximal [\[Anzahl Proben, gewöhnlich 7\]](#) Proben pro Woche, ab dem [\[Startdatum\]](#) optional verlängerbar um jeweils einen Monat bis maximal [\[Enddatum\]](#).

8. Beratung

Beratungsleistungen sind nicht Bestandteil der Ausschreibung. Im Falle einer notwendigen Rücksprache z. B. bei Verständnisproblemen der übermittelten Daten oder zur Korrektur möglicher Fehler ist der Auftragnehmer per E-Mail oder Telefon oder nach Absprache innerhalb üblicher werktäglicher Kernzeiten für den Auftraggeber erreichbar.

9. Vertragslaufzeit

Vertragsbeginn: [\[Startdatum\]](#)

13 Weiterführende Literatur

- Aberi P, Arabzadeh R, Insam H, Markt R, Mayr M, Kreuzinger N, Rauch W: Quest for Optimal Regression Models in SARS-CoV-2 Wastewater Based Epidemiology. *Int J Environ Res Public Health*. 2021 Oct 14;18(20):10778. doi: 10.3390/ijerph182010778. PMID: 34682523; PMCID: PMC8535556.
- Agrawal S, Orschler L, Lackner S: Long-term monitoring of SARS-CoV-2 RNA in wastewater of the Frankfurt metropolitan area in Southern Germany. *Sci Rep*. 2021 Mar 8;11(1):5372. doi: 10.1038/s41598-021-84914-2. PMID: 33686189; PMCID: PMC7940401.
- Agrawal S, Orschler L, Lackner S: Metatranscriptomic Analysis Reveals SARS-CoV-2 Mutations in Wastewater of the Frankfurt Metropolitan Area in Southern Germany. *Microbiol Resour Announc*. 2021 Apr 15;10(15):e00280-21. doi: 10.1128/MRA.00280-21. PMID: 33858934; PMCID: PMC8050976.
- Agrawal S, Orschler L, Lackner S: Long-term monitoring of SARS-CoV-2 RNA in wastewater of the Frankfurt metropolitan area in Southern Germany. *Sci. Rep.* 2021;11(1):5372. doi: 10.1038/s41598-021-84914-2
- Agrawal S, Orschler L, Tavazzi S, Greither R, Gawlik BM, Lackner S: Genome sequencing of wastewater confirms the arrival of the SARS-CoV-2 omicron variant at Frankfurt airport but limited spread in the city of Frankfurt, Germany, in November 2021. *Microbiol. Resour. Announc*. 2022;11 doi: 10.1128/MRA.01229-21. - [DOI](#) - [PMC](#) - [PubMed](#)
- Ahmed W, Angel N, Edson J, Bibby K, Bivins A, O'Brien JW, Choi PM, Kitajima M, Simpson SL, Li J, Tschärke B, Verhagen R, Smith WJM, Zaugg J, Dierens L, Hugenholtz P, Thomas KV, Mueller JF: First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. *Sci Total Environ*. 2020 Aug 1;728:138764. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.138764. Epub 2020 Apr 18. PMID: 32387778; PMCID: PMC7165106.
- Ahmed W, Simpson SL, Bertsch PM, Bibby K, Bivins A, Blackall LL, Bofill-Mas S, Bosch A, Brandão J, Choi PM, Ciesielski M, Donner E, D'Souza N, Farnleitner AH, Gerrity D, Gonzalez R, Griffith JF, Gyawali P, Haas CN, Hamilton KA, Hapuarachchi HC, Harwood VJ, Haque R, Jackson G, Khan SJ, Khan W, Kitajima M, Korajkic A, La Rosa G, Layton BA, Lipp E, McLellan SL, McMinn B, Medema G, Metcalfe S, Meijer WG, Mueller JF, Murphy H, Naughton CC, Noble RT, Payyappat S, Petterson S, Pitkänen T, Rajal VB, Reyneke B, Roman FA Jr, Rose JB, Rusiñol M, Sadowsky MJ, Sala-Comorera L, Setoh YX, Sherchan SP, Sirikanchana K, Smith W, Steele JA, Sabburg R, Symonds EM, Thai P, Thomas KV, Tynan J, Toze S, Thompson J, Whiteley AS, Wong JCC, Sano D, Wuertz S, Xagoraki I, Zhang Q, Zimmer-Faust AG, Shanks OC: Minimizing errors in RT-PCR detection and quantification of SARS-CoV-2 RNA for wastewater surveillance. *Sci Total Environ*. 2022 Jan 20;805:149877. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.149877. Epub 2021 Aug 25. PMID: 34818780; PMCID: PMC8386095.
- Alm E, Broberg EK, Connor T, Hodcroft EB, Komissarov AB, Maurer-Stroh S, Melidou A, Neher RA, O'Toole Á, Pereyaslov D; WHO European Region sequencing laboratories and GISAID EpiCoV group; WHO European Region sequencing laboratories and GISAID EpiCoV group*: Geographical and temporal distribution of SARS-CoV-2 clades in the WHO European Region, January to June 2020. *Euro Surveill*. 2020 Aug;25(32):2001410. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.32.2001410. Erratum in: *Euro Surveill*. 2020 Aug;25(33): PMID: 32794443; PMCID: PMC7427299.
- Amman F, Markt R, Endler L, Hupfau S, Agerer B, Schedl A, Richter L, Zechmeister M, Bicher M, Heiler G, Triska P, Thornton M, Penz T, Senekowitsch M, Laine J, Keszei Z, Klimek P, Nägele F, Mayr M, Daleiden B, Steintechner M, Niederstätter H, Heidinger P, Rauch W, Scheffknecht C, Vogl G, Weichlinger G, Wagner AO, Slipko K, Masseron A, Radu E, Allerberger F, Popper N, Bock C, Schmid D, Oberacher H, Kreuzinger N, Insam H, Berghthaler A: Viral variant-resolved wastewater surveillance of SARS-CoV-2 at national scale. *Nat Biotechnol*. 2022 Jul 18. doi: 10.1038/s41587-022-01387-y. Epub ahead of print. PMID: 35851376.
- Arabzadeh R, Grünbacher DM, Insam H, Kreuzinger N, Markt R, Rauch W: Data filtering methods for SARS-CoV-2 wastewater surveillance. *Water Sci Technol*. 2021 Sep;84(6):1324-1339. doi: 10.2166/wst.2021.343. PMID: 34559069.
- Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin: TRBA 220 Sicherheit und Gesundheit bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen in abwassertechnischen Anlagen, Technische Regel für Biologische Arbeitsstoffe. <https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/TRBA-220.html>
- Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, Nukleare Sicherheit und Verbraucherschutz (2017): Statistik Abwasserentsorgung. <https://www.bmu.de/download/statistik-abwasserentsorgung>
- Bustin SA et al. (2009): The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem*.55:611–22.
- Calderón-Franco D, Orschler L, Lackner S, Agrawal S, Weissbrodt DG: Monitoring SARS-CoV-2 in sewage: Toward sentinels with analytical accuracy. *Sci Total Environ*. 2022 Jan 15;804:150244. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.150244. Epub 2021 Sep 10. PMID: 34798752; PMCID: PMC8428994.

- Cheung KS, Hung IFN, Chan PPY, Lung KC, Tso E, Liu R, Ng YY, Chu MY, Chung TWH, Tam AR, Yip CCY, Leung KH, Fung AY, Zhang RR, Lin Y, Cheng HM, Zhang AJX, To KKW, Chan KH, Yuen KY, Leung WK: Gastrointestinal Manifestations of SARS-CoV-2 Infection and Virus Load in Fecal Samples From a Hong Kong Cohort: Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology*. 2020 Jul;159(1):81-95. doi: 10.1053/j.gastro.2020.03.065. Epub 2020 Apr 3. PMID: 32251668; PMCID: PMC7194936.
- Cui J, Li F, Shi ZL: Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol*. 2019 Mar;17(3):181-192. doi: 10.1038/s41579-018-0118-9. PMID: 30531947; PMCID: PMC7097006.
- Daleiden B et al.: Wastewater surveillance of SARS-CoV-2 in Austria: development, implementation, and operation of the Tyrolean wastewater monitoring program. *J. Water Health* 20, 314–328 [2022].
- Dumke R, de la Cruz Barron M, Oertel R, Helm B, Kallies R, Berendonk TU, Dalpke A: Evaluation of Two Methods to Concentrate SARS-CoV-2 from Untreated Wastewater. *Pathogens*. 2021 Feb 12;10(2):195. doi: 10.3390/pathogens10020195. PMID: 33673032; PMCID: PMC7917696.
- ECDC: Technical Report: Guidance for representative and targeted genomic SARS-CoV-2 monitoring (3 May 2021). <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Guidance-for-representative-and-targeted-genomic-SARS-CoV-2-monitoring-updated-with%20erratum-20-May-2021.pdf>
- Environmental surveillance for SARS-CoV-2 to complement public health surveillance. Interim guidance. 14 April 2022. Geneva: World Health Organization; 2022 (<https://www.who.int/publications/i/item/WHO-HEP-ECH-WSH-2022.1> , accessed 14 April 2022).
- Fernandez-Cassi X, Scheidegger A, Bänziger C, Cariti F, Tuñas Corzon A, Ganesanandamoorthy P, Lemaitre JC, Ort C, Julian TR, Kohn T: Wastewater monitoring outperforms case numbers as a tool to track COVID-19 incidence dynamics when test positivity rates are high. *Water Res*. 2021 Jul 15;200:117252. doi: 10.1016/j.watres.2021.117252. Epub 2021 May 17. PMID: 34048984; PMCID: PMC8126994.
- Harvey WT, Carabelli AM, Jackson B, Gupta RK, Thomson EC, Harrison EM, Ludden C, Reeve R, Rambaut A; COVID-19 Genomics UK (COG-UK) Consortium, Peacock SJ, Robertson DL: SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat Rev Microbiol*. 2021 Jul;19(7):409-424. doi: 10.1038/s41579-021-00573-0. Epub 2021 Jun 1. PMID: 34075212; PMCID: PMC8167834.
- Ho J, Stange C, Suhrborg R, Wurzbacher C, Drewes JE, Tiehm A: SARS-CoV-2 wastewater surveillance in Germany: long-term RT-digital droplet PCR monitoring, suitability of primer/probe combinations and biomarker stability. *Water Res*. 2022;210
- Hoehl S, Ciesek S: Die Virologie von SARS-CoV-2 [The virology of SARS-CoV-2]. *Internist (Berl)*. 2020 Aug;61(8):789-792. German. doi: 10.1007/s00108-020-00853-6. PMID: 32705298; PMCID: PMC7376823.
- Huggett JF et al. (2013): The digital MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative digital PCR Experiments. *Clin. Chem*. 59:892-902].
- Huisman JS, Scire J, Caduff L, Fernandez-Cassi X, Ganesanandamoorthy P, Kull A, Scheidegger A, Stachler E, Boehm AB, Hughes B, Knudsen A, Topol A, Wigginton KR, Wolfe MK, Kohn T, Ort C, Stadler T, Julian TR: Wastewater-Based Estimation of the Effective Reproductive Number of SARS-CoV-2. *Environ Health Perspect*. 2022 May;130(5):57011. doi: 10.1289/EHP10050. Epub 2022 May 26. PMID: 35617001; PMCID: PMC9135136.
- HZI: Coronaviren. <https://www.helmholtz-hzi.de/de/wissen/wissensportal/keime-und-krankheiten/coronaviren/>
- Jäck HM, Ensser A: Virologie und Immunologie von Coronaviren: Eine Übersicht. <https://www.trillium.de/zeitschriften/trillium-immunologie/archiv/trillium-immunologie-ausgaben-2020/heft-2/2020-covid-19/virologie-und-immunologie-von-coronaviren-eine-uebersicht.html>
- La Rosa G, Bonadonna L, Lucentini L, Kenmoe S, Suffredini E: Coronavirus in water environments: Occurrence, persistence and concentration methods – A scoping review. *Water Research*. 2020;179:115899. doi: 10.1016/j.watres.2020.115899.
- Liu G, Qu J, Rose J, Medema G: Roadmap for Managing SARS-CoV-2 and Other Viruses in the Water Environment for Public Health. *Engineering (Beijing)*. 2022 May;12:139-144. doi: 10.1016/j.eng.2020.09.015. Epub 2021 Jan 20. PMID: 33654547; PMCID: PMC7909608.
- Lundy L, Fatta-Kassinos D, Slobodnik J, Karaolia P, Cirka L, Kreuzinger N, Castiglioni S, Bijlsma L, Dulio V, Deviller G, Lai FY, Alygizakis N, Barneo M, Baz-Lomba JA, Béen F, Cíková M, Conde-Pérez K, Covaci A, Donner E, Ficek A, Hassard F, Hedström A, Hernandez F, Janská V, Jellison K, Hofman J, Hill K, Hong PY, Kasprzyk-Hordern B, Kolarević S, Krahulec J, Lambropoulou D, de Llanos R, Mackuľak T, Martínez-García L, Martínez F, Medema G, Micsinai A, Myrmet M, Nasser M, Niederstätter H, Nozal L, Oberacher H, Očenášková V, Ogorzaly L, Papadopoulos D, Peinado B, Pitkänen T, Poza M, Rumbo-Feal S, Sánchez MB, Székely AJ, Soltysova A, Thomaidis NS, Vallejo J, van Nuijs A, Ware V, Viklander M: Making Waves: Collaboration in the time of SARS-CoV-2 - rapid development of an international co-operation and wastewater surveillance database to support public health decision-making. *Water Res*. 2021 Jul 1;199:117167. doi: 10.1016/j.watres.2021.117167. Epub 2021 Apr 22. PMID: 34015748; PMCID: PMC8060897.

- Medema G, Heijnen L, Elsinga G, Italiaander R, Brouwer A: Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in Sewage and Correlation with Reported COVID-19 Prevalence in the Early Stage of the Epidemic in The Netherlands. *Environ Sci Technol Lett.* 2020 May 20;acs.estlett.0c00357. doi: 10.1021/acs.estlett.0c00357. PMID: PMC7254611.
- Medema G, Been F, Heijnen L, Petterson S: Implementation of environmental surveillance for SARS-CoV-2 virus to support public health decisions: Opportunities and challenges. *Curr Opin Environ Sci Health.* 2020 Oct;17:49-71. doi: 10.1016/j.coesh.2020.09.006. Epub 2020 Oct 1. PMID: 33024908; PMID: PMC7528975.
- Mitrancescu A, Uchaikina A, Kau AS, Stange C, Ho J, Tiehm A, Wurzbacher C, Drewes JE: Wastewater-Based Epidemiology for SARS-CoV-2 Biomarkers: Evaluation of Normalization Methods in Small and Large Communities in Southern Germany. *medRxiv* 2022.07.07.22277349; doi: <https://doi.org/10.1101/2022.07.07.22277349>
- NIBSC: Working Standard NIBSC Anti-SARS-CoV-2 Antibody Diagnostic Calibrant NIBSC code: 20/162 Instructions for use [Version 2.0, Dated 24/05/2021]. <https://www.nibsc.org/documents/ifu/20-162.pdf>
- Parasa S, Desai M, Thoguluva Chandrasekar V, Patel HK, Kennedy KF, Roesch T, Spadaccini M, Colombo M, Gabbiadini R, Artifon ELA, Repici A, Sharma P: Prevalence of Gastrointestinal Symptoms and Fecal Viral Shedding in Patients With Coronavirus Disease 2019: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw Open.* 2020 Jun 1;3(6):e2011335. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2020.11335. PMID: 32525549; PMID: PMC7290409.
- Philo SE, Keim EK, Swanstrom R, Ong AQW, Burnor EA, Kossik AL, Harrison JC, Demeke BA, Zhou NA, Beck NK, Shirai JH, Meschke JS: A comparison of SARS-CoV-2 wastewater concentration methods for environmental surveillance. *Sci Total Environ.* 2021 Mar 15;760:144215. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.144215. Epub 2020 Dec 10. PMID: 33340739; PMID: PMC7832770.
- Radu E, Masseron A, Amman F, Schedl A, Agerer B, Endler L, Penz T, Bock C, Bergthaler A, Vierheilg J, Hufnagl P, Korschineck I, Krampe J, Kreuzinger N: Emergence of SARS-CoV-2 Alpha lineage and its correlation with quantitative wastewater-based epidemiology data. *Water Res.* 2022 May 15;215:118257. doi: 10.1016/j.watres.2022.118257. Epub 2022 Mar 6. PMID: 35303559; PMID: PMC8898540.
- Robert-Koch-Institut und Umweltbundesamt (2022): Technischer Leitfaden 01 zum Abwassermonitoring im Pandemie-Radar: Probenahme von Rohabwasser auf Kläranlagen sowie Erfassung kläranlagenspezifischer Daten zur Normalisierung
- Robert-Koch-Institut und Umweltbundesamt (2022): Technischer Leitfaden 02 zum Abwassermonitoring im Pandemie-Radar: Molekularbiologische Analytik von SARS-CoV-2-Genfragmenten und viralen Fäkalindikatoren in Abwasserproben
- RKI: SARS-CoV-2: Virologische Basisdaten sowie Virusvarianten. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Virologische_Basisdaten.html
- RKI: Anwendung der SARS-CoV-2 Varianten Nomenklatur der WHO durch das RKI. www.rki.de/covid-19-varianten-nomenklatur
- RKI: Aktuelle Situationsberichte, Wochenberichte und Pandemieradar. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Situationsberichte/Gesamt.html;jsessionid=C23B6E01948A812B8ABE0EFBFCB26874.internet061?nn=13490888
- Rossmann K, Großmann G, Frangoulidis D et al.: Innovatives SARS-CoV-2-Krisenmanagement im öffentlichen Gesundheitswesen: Corona-Dashboard und Abwasserfrühwarnsystem am Beispiel Berchtesgadener Land. *Bundesgesundheitsbl* 65, 367–377 [2022]. <https://doi.org/10.1007/s00103-021-03425-7>
- Rossmann K, Clasen R, Münch M, Wurzbacher C, Tiehm A, Drewes JE: SARS-CoV-2 crisis management with a wastewater early-warning system in the Bavarian district of Berchtesgadener Land, Germany. *Dtsch Arztebl Int* 2021; 118: 479–80. DOI: 10.3238/arztebl.m2021.0261
- Tamáš M, Potocarova A, Konecna B, Klucar L, Mackulak T: Wastewater Sequencing-An Innovative Method for Variant Monitoring of SARS-CoV-2 in Populations. *Int J Environ Res Public Health.* 2022 Aug 8;19(15):9749. doi: 10.3390/ijerph19159749. PMID: 35955106; PMID: PMC9367975.
- Westhaus S, Weber FA, Schiwy S, Linnemann V, Brinkmann M, Widera M, Greve C, Janke A, Hollert H, Wintgens T, Ciesek S: **Detection of SARS-CoV-2 in raw and treated wastewater in Germany – suitability for COVID-19 surveillance and potential transmission risks** *Sci. Total Environ.*, 751 (2021), p. 141750, [10.1016/j.scitotenv.2020.141750](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141750)
- WHO/BS.2020.2403 Establishment of the WHO International Standard and Reference Panel for anti-SARS-CoV-2 antibody. <https://www.who.int/publications/m/item/WHO-BS-2020.2403>
- WHO: Public health surveillance for COVID-19: interim guidance. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-SurveillanceGuidance-2022.1>
- WHO: Genomic sequencing of SARS-CoV-2: a guide to implementation for maximum impact on public health. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240018440>

- WHO: SARS-CoV-2 genomic sequencing for public health goals: Interim guidance [8 January 2021]. https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-genomic_sequencing-2021.1
- Wilhelm A, Schoth J, Meinert-Berning C, Agrawal S, Bastian D, Orschler L, Ciesek S, Teichgräber B, Wintgens T, Lackner S, Weber FA, Widera M: Wastewater surveillance allows early detection of SARS-CoV-2 omicron in North Rhine-Westphalia, Germany. Sci Total Environ. 2022 Jul 16;846:157375. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.157375. Online ahead of print. PMID: 35850355
- Wilhelm A, Schoth J, Meinert-Berning C, Agrawal S, Bastian D, Orschler L, Ciesek S, Teichgräber B, Wintgens T, Lackner S, Weber FA, Widera M: Wastewater surveillance allows early detection of SARS-CoV-2 omicron in North Rhine-Westphalia, Germany. Sci Total Environ. 2022 Jul 16;846:157375. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.157375. Epub ahead of print. PMID: 35850355; PMCID: PMC9287496.
- Wilhelm A, Agrawal S, Schoth J, Meinert-Berning C, Bastian D, Orschler L, Ciesek S, Teichgräber B, Wintgens T, Lackner S, Weber FA, Widera M: Early Detection of SARS-CoV-2 Omicron BA.4 and BA.5 in German Wastewater. Viruses. 2022 Aug 25;14(9):1876. doi: 10.3390/v14091876. PMID: 36146683; PMCID: PMC9503272.
- Zheng X, Deng Y, Xu X, Li S, Zhang Y, Ding J, On HY, Lai JCC, In Yau C, Chin AWH, Poon LLM, Tun HM, Zhang T: Comparison of virus concentration methods and RNA extraction methods for SARS-CoV-2 wastewater surveillance. Sci Total Environ. 2022 Jun 10;824:153687. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.153687. Epub 2022 Feb 5. PMID: 35134418; PMCID: PMC8816846.

Mit Hilfe des Abwassermonitorings können gesundheitsrelevante Parameter erhoben werden wie stuhlgängige Viren und Bakterien sowie Drogen. Eine Anwendungsmöglichkeit des Abwassermonitorings zeigte sich in der COVID-19-Pandemie. Das die COVID-19-Erkrankung verursachende SARS-CoV-2-Virus und dessen Fragmente lassen sich im Abwasser nachweisen. Hierdurch gewinnt man zeitnahe Informationen zur Verbreitung des Virus in der Bevölkerung und zu aktuellen Trendentwicklungen. Das Abwassermonitoring liefert den Gesundheitsbehörden wertvolle Zusatzinformationen zur Bewertung der Infektionslage.

Dieser Report enthält Leitlinien zum Arbeitsablauf des SARS-CoV-2-Abwassermonitorings. Zu den behandelten Themen zählt der gesamte Workflow des Abwassermonitorings, über Probenahme, Analytik, Qualitätssicherung bis hin zum Datenfluss, der Dateninterpretation und -kommunikation. Des Weiteren werden hilfreiche Dokumente bereitgestellt, die Kläranlagenbetreibern, den Gesundheitsämtern und Krisenstäben einen einfachen Einstieg ins Abwassermonitoring ermöglichen sollen. Hintergrundinformationen liefern das nötige Wissen für ein umfassendes Verständnis des Abwassermonitorings und eine zielgerichtete Umsetzung. Die Leitlinien sollen sicherstellen, dass sich mit dem Abwassermonitoring qualitativ hochwertige und robuste Daten generieren lassen, die den Gesundheitsbehörden und Krisenstäben ergänzende, nützliche Informationen liefern, um eine evidenzbasierte Entscheidungsfindung zu fördern und so das Pandemiemanagement zu erleichtern. Die Leitlinien richten sich hauptsächlich an Beschäftigte der Abwasserwirtschaft. Sie liefern aber auch nützliche Informationen für Labormitarbeitende und Beschäftigte im öffentlichen Gesundheitswesen.