

© FfWe.V.

COVIDready

BMBF-Fördermaßnahme „Risikomanagement von neuen Schadstoffen und Krankheitserregern im Wasserkreislauf (RiSKWa)“

# COVIDready

Dezentrales SARS-CoV-2 Monitoring im Abwasser:  
Entwicklung einer validierten Analyseverfahren für  
abwassertechnische Labore auf Kläranlagen

## Schlussbericht

Förderkennzeichen: 02WRS1621A-D

Projektlaufzeit: 01.06.2021 – 30.04.2023

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung

**FONA**  
Forschung für Nachhaltigkeit

**NaWaM**  
Nachhaltiges Wassermanagement

**RiSKWa**  
Risikomanagement von neuen Schadstoffen und  
Krankheitserregern im Wasserkreislauf



BMBF-Fördermaßnahme RISKWa

Verbundvorhaben

**COVIDready**

Dezentrales SARS-CoV-2 Monitoring im Abwasser:  
Entwicklung einer validierten Analyseverfahren für  
abwassertechnische Labore auf Kläranlagen

02WRS1621A-D



# IMPRESSUM

## Verbundkoordination



**Forschungsinstitut für Wasserwirtschaft und Klimazukunft an der RWTH Aachen (FiW) e. V.**  
Kackertstraße 15 – 17  
52072 Aachen  
Dr. sc. Dipl.-Ing.  
Frank-Andreas Weber

GEFÖRDERT VOM



**Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung**

IM RAHMEN DES BMBF-PROGRAMMS

**FONA**

Forschung für Nachhaltigkeit



BETREUT DURCH



**PTKA  
Projektträger Karlsruhe**  
Karlsruher Institut für Technologie

## Projektpartner



**Forschungsinstitut für Wasserwirtschaft und Klimazukunft an der RWTH Aachen (FiW) e. V.**  
Dr. sc. Dipl.-Ing.  
Frank-Andreas Weber  
Dr.-Ing. Daniel Bastian



**EGLV**  
Lippeverband

**Emschergenossenschaft  
Lippeverband**  
Prof. Dr.-Ing. Burkhard Teichgräber  
Dipl.-Ing. Peter Jagemann  
Dr.-Ing. Jens Schoth  
Dr. Christina Meinert-Berning  
(Kooperationslabor EGLV und Ruhrverband)



**RWTH Aachen University  
Institut für Siedlungswasserwirtschaft**  
Univ.-Prof. Dr.Ing. habil.  
Thomas Wintgens  
(Wissenschaftliche Leitung)  
Regina Dolny, M.Sc.  
Ursula Sikora  
apl. Prof. Dr. Volker Linnemann



**Johann Wolfgang Goethe-  
Universität Frankfurt  
Universitätsklinikum Frankfurt  
Institut für Medizinische Virologie**  
PD Dr. Marek Widera  
Dr. Alexander Wilhelm  
Prof. Dr. Sandra Ciesek

## Assoziierte Partner



**QIAGEN GmbH**  
Dr. Anja Wild



Endress+Hauser

**Endress+Hauser Conducta  
GmbH & Co. KG**  
Dr. Achim Gahr  
**Analytik Jena GmbH**  
Dr. Robert Möller

## Assoziierte Standorte



**WUPPERVERBAND**  
für Wasser, Mensch und Umwelt

### Zitierhinweis

Weber, F.-A., Bastian, D., Schoth, J., Wilhelm, A., Dolny, R., Sikora, U., Wintgens, T., Linnemann, V., Jagemann, P., Teichgräber, B., Widera, M. (2023): Dezentrales SARS-CoV-2 Monitoring im Abwasser: Entwicklung einer validierten Analyseverfahren für abwassertechnische Labore auf Kläranlagen (COVIDready).

Schlussbericht im BMBF-Verbundvorhaben COVIDready, Förderkennzeichen 02WRS1621A-D, FiW e.V., Aachen.

### Förderkennzeichen:

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 02WRS1621A-D gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.

<https://www.fiw.rwth-aachen.de/referenzen/covidready>

**Aachen, November 2023**



<b>I</b>	<b>Kurzdarstellung</b> .....	<b>1</b>
<b>I.1</b>	<b>Aufgabenstellung</b> .....	<b>1</b>
<b>I.2</b>	<b>Voraussetzungen unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde</b> .....	<b>3</b>
<b>I.3</b>	<b>Planung und Ablauf des Verbundvorhabens</b> .....	<b>5</b>
<b>I.4</b>	<b>Anknüpfung an den Stand der Wissenschaft und Technik</b> .....	<b>9</b>
I.4.1	Stand des Abwassermonitorings vor Beginn der Pandemie	9
I.4.2	Aufkommendes Monitoring auf SARS-CoV-2 im Abwasser	9
I.4.3	Voraussetzungen für dezentrale PCR für SARS-CoV-2 im Abwasser	11
<b>I.5</b>	<b>Zusammenarbeit mit anderen Stellen</b> .....	<b>12</b>
<b>I.6</b>	<b>Zusammenfassung der Projektergebnisse</b> .....	<b>14</b>
I.6.1	Workflow für abwassertechnische Labore	14
I.6.2	Früherkennung besorgniserregender Varianten	15
I.6.3	Datenauswertung: Entwicklung von Trendindikatoren	15
I.6.4	Gesamtheitliche Bewertung	16
I.6.5	Erzielte Publikationen	17
<b>II</b>	<b>Eingehende Darstellung</b> .....	<b>18</b>
<b>II.1</b>	<b>Entwicklung eines Workflows für abwassertechnische Labore</b> .....	<b>18</b>
II.1.1	Arbeiten mit SARS-CoV-2 im Abwasser	18
II.1.2	Optimierung und Validierung des Workflows	20
II.1.3	Begleitanalytik zur Annäherung des häuslichen Abwasseranteils	33
II.1.4	Durchführung und Auswertung eines Laborvergleichs	38
II.1.5	Zusammenfassung der Kernergebnisse des Arbeitspakets	48
<b>II.2</b>	<b>Methodenentwicklung und -anwendung dPCR</b> .....	<b>50</b>
II.2.1	Etablierung von dPCR für Mutantennachweis in Abwasser	50
II.2.2	Charakterisierung von auffälligen Positivproben aus AP3	57
II.2.3	Zusammenfassung der Kernergebnisse des Arbeitspakets	64
<b>II.3</b>	<b>Praxiseinsatz: Screening im Verbandsgebiet</b> .....	<b>65</b>
II.3.1	Untersuchte Kläranlagen / Probenahme	65
II.3.2	Probenlogistik	66
II.3.3	Methodenentwicklung zur Auswertung von SARS-CoV-2 Abwasserdaten	67
II.3.4	Pandemieverlauf in NRW anhand veröffentlichter Humandaten	80
II.3.5	Screening im Verbandsgebiet EGLV	82
II.3.6	Screening im Verbandsgebiet der assoziierten Partner	93
<b>II.4</b>	<b>Vergleich von Trendindikatoren</b> .....	<b>98</b>
<b>II.5</b>	<b>Roll-out: Abstimmung mit Akteuren aus dem Gesundheitswesen</b> .....	<b>100</b>
<b>III</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>103</b>

<b>IV</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>107</b>
<b>IV.1</b>	<b>Anhang A</b> .....	<b>107</b>
<b>IV.2</b>	<b>Anhang B</b> .....	<b>109</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung I.1:	Kartendarstellung der in COVIDready untersuchten Kläranlagen und ihrer Einzugsgebiete (blau) sowie weitere ESI-CorA (rot) und NRW-geförderte (grün) Kläranlagen, an denen ein SARS-CoV-2 Abwassermonitoring etabliert wurde. Die Symbolgröße der Kläranlagen ist proportional zu nominal angeschlossenen Einwohnern der Kläranlage. ....	2
Abbildung I.2:	Dezentraler, sukzessiver Workflow für abwassertechnische Labore. Schematische Darstellung des dezentralen Monitorings neuer Virusvarianten (Wilhelm et al. 2022a).....	14
Abbildung I.3:	Zeitreihe der Kläranlage Bottrop (vgl. auch Kapitel II.3.5).....	16
Abbildung I.4:	Heatmap-Darstellung der Trendauswertung für die zehn untersuchten Kläranlagen (vgl. auch Kapitel II.3.3).....	17
Abbildung II.1:	Genereller Workflow für das SARS-CoV-2-Abwassermonitoring, angepasst nach Michael-Kordatou et al. (2020) .....	20
Abbildung II.2:	Ausschnitt aus dem erstellten Schulungsvideo.....	21
Abbildung II.3:	Verwendeter qTOWER <sup>3</sup> G von Analytik Jena .....	24
Abbildung II.4:	Automatische Auswertung durch die Software qPCRsoft .....	25
Abbildung II.5:	Ergebnisse des Testkit-Vergleichs .....	28
Abbildung II.6:	Abwasserprobe über Membranfilter filtriert, links Homogenisiert durch Schütteln, rechts abgesetzt .....	29
Abbildung II.7:	Vergleichsmessung Druckluftfiltration und APUsim .....	32
Abbildung II.8:	Vergleich der ermittelten Trendindikatoren bei der Probenvorbereitung mittels Druckluftfiltration und APUsim.....	33
Abbildung II.9:	Übersicht der Messung der Leitfähigkeit .....	35
Abbildung II.10:	Übersicht der Messung des einwohnerspezifischen Harnstoffes für vier untersuchte Kläranlagen .....	35
Abbildung II.11:	Übersicht der einwohnerspezifischen Kreatinin-Fracht für vier untersuchte Kläranlagen.....	36
Abbildung II.12:	Übersicht der einwohnerspezifischen Ammoniumfracht für vier untersuchte Kläranlagen.....	36
Abbildung II.13:	Übersicht der Messung der Crassvirales für vier untersuchte Kläranlagen	37
Abbildung II.14:	Übersicht der Messung des PMMoV für sechs untersuchte Kläranlagen...	37
Abbildung II.15:	Herstellung authentischer SARS-CoV-2-Viren und Inaktivierung.....	39
Abbildung II.16:	Proben für die Qualitätskontrolle durch realitätsnahen Laborvergleich mit gespiktem Abwasser .....	40
Abbildung II.17:	Qualitätskontrolle- Realitätsnaher Laborvergleich mit gespiktem Abwasser. A) Positivanteil zur Zeit der Nullprobenahme (Quelle: RKI-Dashboard). B) Erhaltene Proben, angekommen unter Einhaltung der Kühlkette am Beispiel KWR (NL) .....	40

- Abbildung II.18: Design des Abwasser-Laborvergleichs. A) Schematische Darstellung des Versuchsplans mit den inaktivierten authentischen SARS-CoV-2-Varianten Beta, Delta und Omicron BA.1 und BA.2. B) Errechnete Spike-in Menge von hitzeinaktivierten SARS-CoV-2 Varianten. C) Variantenspezifische Spike-in Menge von SARS-CoV-2 Beta, Delta, BA.1 und BA.2. D) Von den teilnehmenden Laboren untersuchte SARS-CoV-2 Spike-Mutationen und Vorkommen in von bis Februar 2022 aufgetretenen SARS-CoV-2 VoCs. .43
- Abbildung II.19: Quantitativer Nachweis von SARS-CoV-2-Genom-Kopienäquivalenten. A) RT-PCR-basierter quantitativer Nachweis von SARS-CoV-2-Genomkopieäquivalenten (GCE) für jedes teilnehmende Labor. B) Zusammenfassung der ermittelten SARS-CoV-2 GCE aller teilnehmenden PCR-Labore (95 % Konfidenzintervalle, Fehlerbalken zeigen die Spanne der geringsten und höchsten gemessenen Konzentration, schwarze Punkte entsprechen einzelnen quantitativen SARS-CoV-2 GCE Assays). C) +D) Relation von gemessenen SARS-CoV-2 GCE und errechneter Spike-in Menge.....44
- Abbildung II.20: Qualitative Analyse der SARS-CoV-2-Varianten. A-C) Nachweis von SARS-CoV-2-Spike-Substitutionen, die in allen Labors analysiert wurden. Die entsprechende Nachweismethode (RT-qPCR, RT-dPCR oder RT-ddPCR) ist angegeben. Die folgenden SARS-CoV-2 Spike (S)-Substitutionen wurden mit variantenspezifischen Primern und Sonden untersucht, die in allen teilnehmenden Labors verwendet wurden: A) K417N, B) N501, und C)  $\Delta$ 69/70. D) Evaluierung der eingesetzten PCR-Primer/Sonden. Hell- bzw. dunkelblau weist auf die Abwesenheit bzw. Anwesenheit der entsprechenden Mutation in allen bis Februar 2022 auftretenden SARS-CoV-2 VoCs hin. Fehlende Sequenzinformationen kommerzieller Primer/Probes ist in grau hervorgehoben. Erwartete Effekte auf Assay Spezifizität und Sensitivität (a, d = geringer Effekt, b-c = moderater Effekt). E) Zusammenfassung der PCR-bestimmten relativen Anteile der angegebenen SARS-CoV-2-Spike-Substitutionen. Grau = falsch-positives/negatives Ergebnis, hell-grün = korrekte Bestimmung von Abwesenheit/Anwesenheit der entsprechenden Mutation, dunkelgrün = korrekte Bestimmung der Anwesenheit/Abwesenheit der entsprechenden Mutation innerhalb des gewählten Toleranzbereiches von 25 %. .....45
- Abbildung II.21: Genomanalyse von SARS-CoV-2-Varianten aus gespiktem Abwasser. ....47
- Abbildung II.22: Zusammenfassung der Ergebnisse des zweiten Laborvergleiches (vgl. Wilhelm et al., 2023, STOTEN) .....47
- Abbildung II.23: Vor- und Nachteile der Amplifikation und Detektion von SARS-CoV-2-RNA mittels RT-qPCR und RT-dPCR .....50
- Abbildung II.24: Methodenoptimierung: Effekt der Abwasserlagertemperatur auf die SARS-CoV-2 Viruslast-/Variantenbestimmung.....52
- Abbildung II.25: Das QIAcuity OneStep Advanced Probe Kit ermöglicht eine sensitivere SARS-CoV-2 Viruslastbestimmung bzw. Variantendetektion im Abwasser mittels RT-dPCR im Vergleich zu dem QIAcuity One-Step Viral RT-PCR Kit .....54

Abbildung II.26: PCR-Analysemethoden zur quantitativen und qualitativen Bestimmung von SARS-CoV-2. (DVTA 2022; Wikipedia 2008) .....	55
Abbildung II.27: Monitoring des SARS-CoV-2 Omikron-spezifischen Mutantenanteils von K417N mittels digitaler PCR. A) Die 7-Tage-Inzidenz (links) und der relative Anteil von Omikron (rechts) für Deutschland und Nordrhein-Westfalen (NRW) sind angegeben. Die epidemiologischen Daten basieren auf Individualtestungen und stammen vom Robert Koch-Instituts (RKI) in Deutschland. B) Gesamtwerte von SARS-CoV-2 (links) und die Omikron-detektierende Substitution K417N (rechts) in Abwasserproben der Kläranlage KLEM. C) Die 7-Tage-Inzidenz in NRW korreliert mit den nachgewiesenen SARS-CoV-2-Konzentrationen im Abwasser (links). Der durch Einzeltests ermittelte relative Mutantenanteil von Omikron ist in hohem Maße vergleichbar mit dem relativen Anteil von K417N, der im Abwasser gefunden wurde (rechts). (Wilhelm et al. 2022b).....	59
Abbildung II.28: RT-dPCR identifiziert BA.4/BA.5 frühzeitig als die dominierende SARS-CoV-2-Variante (L452R) (Wilhelm et al. 2022a) .....	61
Abbildung II.29: Monitoring der Ausbreitung von neuen Omikron- Sub-Varianten mittels 346T, 446S und 444T-SNP-PCR exemplarisch von Juni 2022 bis Januar 2023.....	63
Abbildung II.30: Relativer Anteil der SARS-CoV-2 Spike-Substitutionen F486V, F486S und F486P im Abwasser vom 26.12.2022 bis 15.03.2023.....	63
Abbildung II.31: Schritte im gesamten Workflow von der Probenentnahme zur Kommunikation .....	65
Abbildung II.32: Schematische Darstellung der Eingangsdaten und der Datenverarbeitung .....	67
Abbildung II.33: Datenanalyse und -Trendbewertung als Pipeline vom Datensatz zum Ergebnis.....	68
Abbildung II.34: Markierung der Wertebereiche für den Trendindikator Prozentuale Änderung $MA5_{Aktuell}$ zu $MA5_{Vorwochen}$ .....	76
Abbildung II.35: Aufbereitung des Pandemieverlaufs anhand der Informationen aus dem RKI GitHub und der RKI-Website, ergänzt um wichtige Termine aus einer Auflistung des LZG.NRW (vgl. Tabelle IV.1 im Anhang für genaue Datumsangaben) .....	80
Abbildung II.36: Zeitreihendarstellung Viruslast, berechnete 7-Tage-Inzidenz und hydraulische Auslastung der Kläranlage Bottrop .....	85
Abbildung II.37: Zeitreihendarstellung Viruslast, berechnete 7-Tage-Inzidenz und hydraulische Auslastung der Kläranlage Duisburg Alte Emscher .....	86
Abbildung II.38: Zeitreihendarstellung Viruslast, berechnete 7-Tage-Inzidenz und hydraulische Auslastung der Kläranlage Emschermündung .....	88
Abbildung II.39: Zeitreihendarstellung Viruslast, berechnete 7-Tage-Inzidenz und hydraulische Auslastung der Kläranlage Dortmund-Deusen.....	89
Abbildung II.40: Zeitreihendarstellung Viruslast, berechnete 7-Tage-Inzidenz und hydraulische Auslastung der Kläranlage Dortmund-Scharnhorst.....	90

Abbildung II.41: Zeitreihendarstellung Viruslast, berechnete 7-Tage-Inzidenz und hydraulische Auslastung der Kläranlage Dinslaken .....	92
Abbildung II.42: Zeitreihendarstellung Viruslast, berechnete 7-Tage-Inzidenz und hydraulische Auslastung der Kläranlage Aachen-Soers .....	94
Abbildung II.43: Zeitreihendarstellung der Kläranlage Eschweiler-Weisweiler .....	95
Abbildung II.44: Zeitreihendarstellung der Kläranlage Mönchengladbach-Neuwerk.....	96
Abbildung II.45: Zeitreihendarstellung der Kläranlage Wuppertal-Buchenhofen.....	97
Abbildung II.46: Vergleich von Trendindikatoren des SARS-CoV-2 Abwassersignals anhand von Daten der Kläranlage Bottrop. ....	98
Abbildung II.47: Vergleich von Trendindikatoren des SARS-CoV-2 Abwassersignals anhand von Daten der Kläranlage Aachen-Soers. ....	99
Abbildung II.48: Kläranlagenübergreifender Vergleich unterschiedlicher Trendindikatoren mit der Änderung der 7-Tage-Inzidenz. ....	99
Abbildung IV.1: Vergleich von Trendindikatoren des SARS-CoV-2 Abwassersignals anhand von Daten der Kläranlage Dinslaken .....	109
Abbildung IV.2: Vergleich von Trendindikatoren des SARS-CoV-2 Abwassersignals anhand von Daten der Kläranlage Dortmund-Deusen.....	109
Abbildung IV.3: Vergleich von Trendindikatoren des SARS-CoV-2 Abwassersignals anhand von Daten der Kläranlage Dortmund-Scharnhorst.....	110
Abbildung IV.4: Vergleich von Trendindikatoren des SARS-CoV-2 Abwassersignals anhand von Daten der Kläranlage Duisburg Alte Emscher .....	110
Abbildung IV.5: Vergleich von Trendindikatoren des SARS-CoV-2 Abwassersignals anhand von Daten der Kläranlage Eschweiler-Weisweiler .....	111
Abbildung IV.6: Vergleich von Trendindikatoren des SARS-CoV-2 Abwassersignals anhand von Daten der Kläranlage Mönchengladbach-Neuwerk.....	111
Abbildung IV.7: Vergleich von Trendindikatoren des SARS-CoV-2 Abwassersignals anhand von Daten der Kläranlage Wuppertal-Buchenhofen.....	112

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle I.1:	Arbeitsplan des Projekts COVIDready (inkl. Erweiterung in grün) .....	5
Tabelle I.2:	Meilensteine des Projekts COVIDready .....	6
Tabelle I.3:	Wesentliche Termine in der Projektlaufzeit .....	7
Tabelle II.1:	Ausgefüllter Anmeldebogen laut Biostoffverordnung (informativ, ohne Gewähr) .....	18
Tabelle II.2:	Kenndaten des in COVIDready etablierten analytischen Workflows .....	21
Tabelle II.3:	Zu erzielende Kontrollergebnisse der Positiv- und Negativkontrolle bei der qPCR .....	26
Tabelle II.4:	Bewertung des qPCR-Ergebnisses .....	26
Tabelle II.5:	Testkit Vergleich .....	27
Tabelle II.6:	PCR-Ergebnisse einer Abwasserprobe vom 24.01.2022 bei unterschiedlichen Vorbehandlungsschritten .....	30
Tabelle II.7:	Übersicht der Evaluation verschiedener Methoden zur Abwasserprobenvorbereitung und Extraktion der Nukleinsäuren .....	53
Tabelle II.8:	Informationen zu den untersuchten Kläranlagen .....	66
Tabelle II.9:	Gemessene Ct-Wert auf den Kläranlagen der Emschergenossenschaft und des Lippeverbands .....	83
Tabelle IV.1:	Zeitlicher Ablauf von Pandemie und Maßnahmen nach Zusammenstellung des LZG.NRW .....	107

**Abkürzungsverzeichnis**

BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BMG	Bundesministeriums für Gesundheit
BMUV	Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz, nukleare Sicherheit und Verbraucherschutz
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
COVID-19	Coronavirus-Krankheit-2019 (engl. <i>coronavirus disease 2019</i> )
ddPCR	digital droplet PCR
dPCR	Digital PCR
DWA	Deutsche Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall e. V.
EGLV	Emschergenossenschaft und Lippeverband
ESI-CorA	Emergency Support Instrument – Nachweis von SARS-CoV-2 im Abwasser
KLEM	Kläranlage Emschermündung
LOESS	Lokal gewichtete Regression-Streudiagramm-Glätter (engl. <i>locally estimated/weighted scatterplot smoothing</i> )
LZG.NRW	Landeszentrum Gesundheit Nordrhein-Westfalen
MAGS.NRW	Ministerium für Arbeit, Gesundheit und Soziales des Landes Nordrhein-Westfalen
NGS	Next generation sequencing
ÖGD	Öffentlicher Gesundheitsdienst
PMMoV	Pepper mild mottle virus
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>real-time quantitative polymerase-chain reaction</i> )
RKI	Robert Koch-Institut
RT-qPCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>reverse transcriptase quantitative polymerase-chain reaction</i> )
SARS-CoV-2	Schweres-akutes-Atemwegssyndrom-Coronavirus Typ 2 (engl. <i>severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2</i> )
VOC	Besorgniserregende Varianten (engl. <i>variants of concern</i> )
WBE	Abwasserbasierte Epidemiologie (engl. <i>wastewater-based epidemiology</i> )

# I Kurzdarstellung

## I.1 Aufgabenstellung

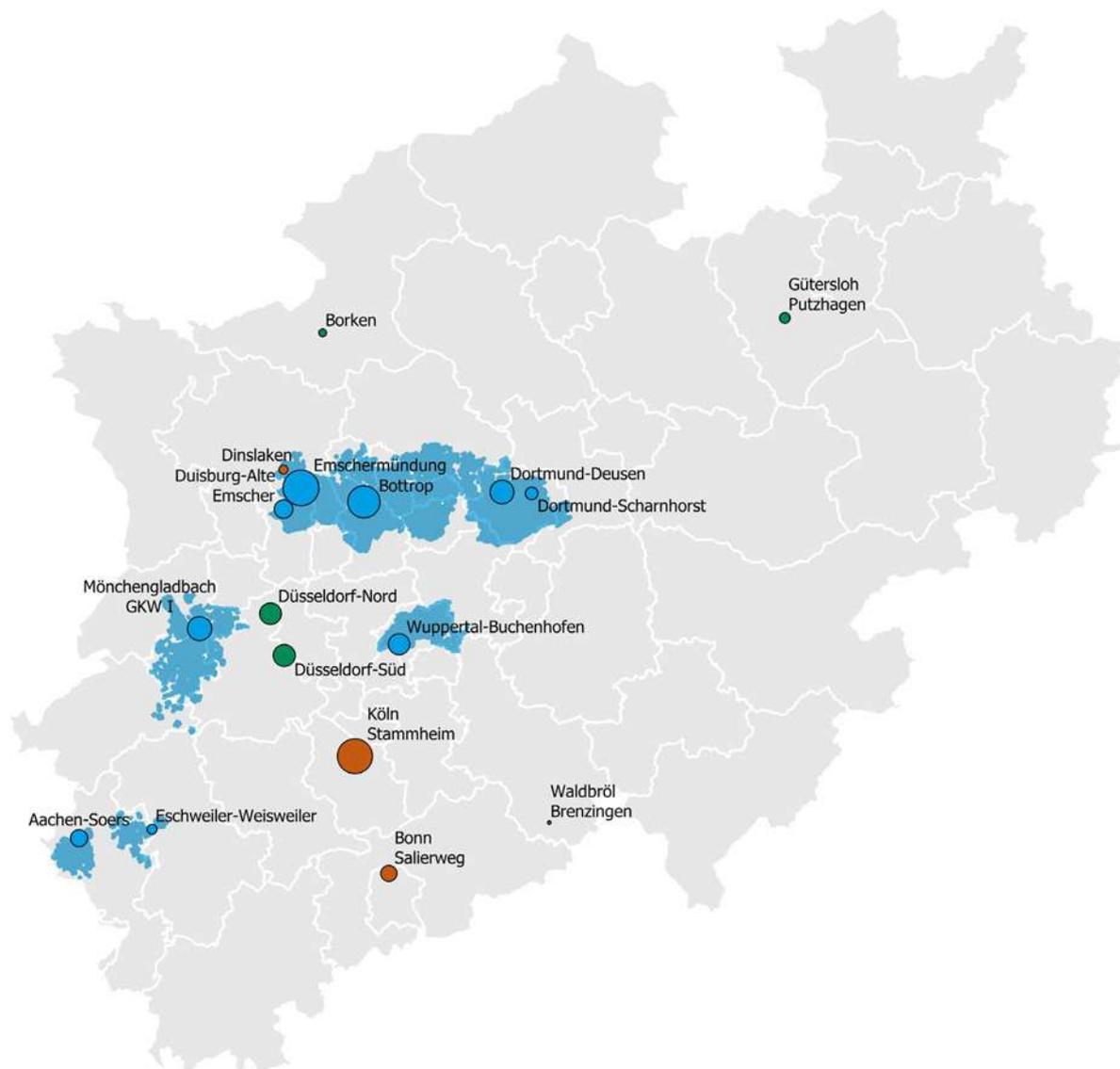
Die EU-Kommission hat die Mitgliedstaaten in der EU-Empfehlung C(2021) 1925 vom 17.03.2021 dazu aufgefordert, das Abwassermonitoring systematisch zur Bekämpfung der Corona-Pandemie zu nutzen. Auch in Deutschland sollte damit die Einführung eines nationalen Monitoringsystems für eine Reihe von Pilotstandorten vorbereitet werden. Für flächendeckende Analysen fehlten jedoch zu diesem Zeitpunkt die Kapazitäten in spezialisierten Laboren, die das Genmaterial des Corona-Erregers SARS-CoV-2 und seine Mutationen im Abwasser analysieren konnten. Die Projektpartner im BMBF-geförderten Verbundvorhaben COVIDready haben sich daher zum Ziel gesetzt, Methoden zu entwickeln und zu validieren, um bestehende abwassertechnische Labore auf Kläranlagen für diese Aufgabe fit zu machen. Um eine schnelle Meldung der Ergebnisse an die zuständigen Gesundheitsämter zu ermöglichen, war es ein weiteres Ziel, Schnittstellen und Kommunikationswege zwischen der Wasserwirtschaft und dem öffentlichen Gesundheitsdienst aufzubauen.

Nach der Empfehlung der EU-Kommission waren die Mitgliedsländer angehalten, so bald wie möglich nationale Monitoringsysteme für SARS-CoV-2 und seine Varianten einzuführen. Sie sollten sich auf Abwasserproben stützen, die mindestens zweimal wöchentlich in allen Städten mit mehr als 150.000 Einwohnern genommen werden. Das betraf in Deutschland 56 Städte und über 200 Kläranlagen, die für mehr als 100.000 Einwohnerwerte ausgebaut sind. Die Analysedaten sollen den zuständigen Gesundheitsämtern innerhalb von 48 Stunden gemeldet werden, um bei der Auswahl und Kommunikation von Anti-Corona-Maßnahmen zu unterstützen.

Für die flächenhafte Umsetzung der Kommissionsempfehlung fehlten in Deutschland mit seiner dezentral organisierten Abwasserwirtschaft virologische Laborkapazitäten und eingespielte Kommunikationswege mit dem öffentlichen Gesundheitswesen. Als Lösung hat das Verbundprojekt COVIDready die etablierten Labore von größeren Kläranlagen und Kläranlagenverbünde im Blick. Die Projektbeteiligten entwickelten praxistaugliche Methoden, die es abwassertechnischen Laboren erlauben, mit vorgefertigten Testkits anhand der Virus-RNA sowohl die Virusmenge zu bestimmen als auch als Frühwarnsystem für besonders besorgniserregende Mutanten zu dienen – den sogenannten „Variants of Concern“.

Im BMBF-geförderten Vorhaben COVIDready erarbeiteten das Forschungsinstitut für Wasserwirtschaft und Klimazukunft an der RWTH Aachen (FiW) e.V., der Lippeverband (LV), das Institut für Virologie des Universitätsklinikums der Goethe-Universität Frankfurt (KGU) und das Institut für Siedlungswasserwirtschaft der RWTH Aachen (ISA) die fachlichen Grundlagen, um-

Workflows und Schnittstellen mit den Gesundheitsbehörden für die Praxisanwendung des Abwassermonitorings aufzubauen. In der Projektlaufzeit wurden wegweisende Fortschritte bei der Etablierung eines dezentralen Workflows, bei der Früherkennung besorgniserregender Varianten und bei der Entwicklung konsistenter Datenauswerterroutinen erzielt. Emschergenossenschaft und Lippeverband (EGLV), FiW und KGU unterstützten zudem das Landeszentrum Gesundheit (LZG.NRW) und das Ministerium für Arbeit, Gesundheit und Soziales des Landes Nordrhein-Westfalen (MAGS.NRW) bei der gesamtheitlichen Bewertung vorliegender Befunde des Corona-Abwassermonitorings auf Landesebene in Nordrhein-Westfalen (NRW). Die Ergebnisse wurden im LZG-Wochenbericht Abwassermonitoring und im Pandemieradar des Robert Koch-Instituts (RKI) veröffentlicht.



**Abbildung I.1:** Kartendarstellung der in COVIDready untersuchten Kläranlagen und ihrer Einzugsgebiete (blau) sowie weitere ESI-CorA (rot) und NRW-geförderte (grün) Kläranlagen, an denen ein SARS-CoV-2 Abwassermonitoring etabliert wurde. Die Symbolgröße der Kläranlagen ist proportional zu nominal angeschlossenen Einwohnern der Kläranlage.

Da infizierte Personen SARS-CoV-2 Genmaterial auch über den Stuhl ausscheiden, liefert das Abwassermonitoring einen integralen Überblick über das Pandemiegeschehen im Einzugsgebiet von Kläranlagen – unabhängig von Angeboten und Nachfragen bei individuellen PCR-Tests. Im Rahmen des Verbundvorhabens COVIDready wurden 5 Kläranlagen von EGLV sowie weitere 4 Anlagen vom Wasserverband Eifel-Rur (WVER), dem Niersverband und dem Wupperverband zweimal wöchentlich untersucht, um eine integrale Trendüberwachung und eine Früherkennung besorgniserregender Varianten (VoCs) zu etablieren. Mit den beprobten 9 Kläranlagen wurden knapp 20 % der Bevölkerung NRWs erfasst. Zusammen mit 5 landesgeförderten sowie 3 über das EU-Pilotvorhaben ESI-CorA geförderten Standorten lässt sich die Pandemieentwicklung für rund 5,3 Mio. Einwohner oder knapp 30 % der Bevölkerung in NRW verfolgen (Abbildung I.1).

## **I.2 Voraussetzungen unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde**

Das Vorhaben schloss an Vorarbeiten der Antragsteller an, die weitgehend aus Eigenmitteln finanziert wurden. Während das Vorhaben COVIDready mit Fokus auf Nordrhein-Westfalen durchgeführt wurde, starteten zwei weitere BMBF-Vorhaben (Projekt „Biomarker“ mit Fokus auf Bayern und Baden-Württemberg, Projektkoordination: Prof. Drewes, TU München) und Projekt „SARS-GenASeq“ mit Fokus auf *Next generation sequencing* (NGS), Projektkoordination: Prof. Lackner, TU Darmstadt), sowie das Vernetzungsprojekt „CoroMoni“ (Projektkoordination: Frau Thaler, DWA, Hennef zur Bündelung der Forschungsaktivitäten in Deutschland. Der Projektträger Karlsruhe (PTKA) übernahm die Steuerung der vier BMBF-geförderten Verbundvorhaben. Die Projekte starteten im ersten Halbjahr 2021. Das Projekt COVIDready umfasste zunächst die Etablierung des dezentralen Workflows auf fünf Kläranlagen (drei Anlagen der EGLV mit Analyse durch das Kooperationslabor, das von EGLV gemeinsam mit dem Ruhrverband betrieben wird, und zwei Anlagen des WVER mit Analyse durch das ISA der RWTH Aachen).

Aus einer bereitgestellten EU-Finanzierung des Emergency Support Instrument (ESI) wurde zudem zum Ende 2021 das Projekt ESI-CorA initialisiert. Dafür hat die EU-Kommission Forschungsgelder in Höhe von insgesamt 20 Mio. Euro bereitgestellt. In Deutschland wurde das Pilotprojekt „Emergency Support Instrument zur Einführung eines nationalen SARS-CoV2-Abwassermonitorings“ (ESI-CorA) mit insgesamt 20 Pilotstandorten gefördert (Oktober 2021 - März 2023). Partner im Projekt waren PTKA (Federführung), das Robert Koch-Institut (RKI), das Umweltbundesamt (UBA) und die TU Darmstadt.

Insgesamt wurden aus Bundes- und EU-Mitteln die zweimal wöchentliche Beprobung an 44 Standorten finanziell unterstützt. Hinzu kamen Länderinitiativen, wie das Projekt CoMoTH in Thüringen und die zusätzliche Förderung der Standorte Düsseldorf, Borken, Gütersloh und

Waldbröl durch MAGS.NRW nach den Vorgaben der ESI-CorA-Pilotstandorte. Im Rahmen einer Aufstockung der BMBF-Projekte wurde eine Beteiligung im ESI-CorA-Begleitreis und eine gemeinsame Auswertung der Daten der drei BMBF-Projekte gefördert. Zudem konnten in COVIDready vier Pilotstandorte des Wasserverbandes Eifel-Rur, des Wupperverbandes und des Niersverbands in die zweimal wöchentliche Beprobung und den Analyse-Workflow des ISA-Labors aufgenommen werden.

Im Rahmen von ESI-CorA wurde eine einheitliche Dateneingabepattform auf Basis von Projektergebnissen aus dem Berchtesgadener Land (Projekt „Biomarker“) fortentwickelt, die auf einer Dateneingabe-App der Fa. Esri basiert. Durch die Eingabe-App und Online-Plattform sollte nach Einführung im Herbst 2022 eine zentralisierte Meldung der Daten erfolgen. Aufgrund technischer Hürden und Sicherheitsbedenken der Abwasserentsorger (kritischen Infrastruktur) war eine zeitnahe Meldung der Daten für einige Betreiber zunächst nicht umsetzbar. Zwischenzeitlich wurden seitens UBA Excel-Templates erarbeitet, die für einige Standorte Verwendung fanden.

### I.3 Planung und Ablauf des Verbundvorhabens

Das Projekt COVIDready wurde durch das Forschungsinstitut für Wasserwirtschaft und Klimazukunft an der RWTH Aachen (FiW) e. V. koordiniert. Das Institut für Siedlungswasserwirtschaft der RWTH Aachen (ISA) hatte die wissenschaftliche Leitung inne. Die Projektpartner Institut für Medizinische Virologie des Universitätsklinikum Frankfurt (KGU) und Lippeverband (LV) leiteten zentrale Arbeitspakete.

Das Projekt startete mit Bewilligung am 21.05.2021 planmäßig zum 01.06.2021 und war zunächst auf eine Laufzeit von einem Jahr bis zum 31.05.2022 ausgelegt. Mit Aufstockung zum 31.03.2022 wurde die Projektlaufzeit bis zum 30.04.2023 verlängert. Das Verbundvorhaben inkl. aller Teilvorhaben wurde zum 30.04.2023 abgeschlossen. Alle Arbeiten konnten, wie beantragt und im Rahmen von Änderungsanträgen ergänzt, im Wesentlichen im Zeitplan abgeschlossen werden (vgl. Tabelle I.1). Alle Meilensteine wurden innerhalb des Zeitplans erreicht (vgl. Tabelle I.2). Wesentliche Termine sind in Tabelle I.3 zusammengefasst.

**Tabelle I.1: Arbeitsplan des Projekts COVIDready (inkl. Erweiterung in grün)**

Arbeitspakete	Lead	2021		2022				23
		Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	April
<b>AP0</b> <b>Projektsteuerung</b>	<b>FiW</b>							
<b>AP1</b> <b>Workflow für abwassertechnische Labore</b>	<b>ISA</b>							
AP1.1 <i>Methodenentwicklung</i>	ISA							
AP1.2 <i>Etablierung und Validierung Workflow bei LV und ISA</i>	ISA			M1				
AP1.3 <i>Extraktionsverfahren von Fest- und Flüssigphase</i>	ISA							
AP1.4 <i>Begleitanalytik zur Bestimmung angeschlossener Einwohner</i>	ISA							
AP1.5 <i>Laborvergleich LV, ISA, KGU, KWR</i>	FiW							
<b>AP2</b> <b>Methodenentwicklung und -anwendung dPCR</b>	<b>KGU</b>							
AP2.1 <i>Etablierung von dPCR für Mutantennachweis in Abwasser</i>	KGU			M2				
AP2.2 <i>Charakterisierung von auffälligen Positivproben aus AP3</i>	KGU							
<b>AP3</b> <b>Praxiseinsatz: Screening im Verbandsgebiet</b>	<b>LV</b>							M4
AP3.1 <i>Screening im Verbandsgebiet EGLV</i>	LV							
AP3.2 <i>Screening im Verbandsgebiet WVER</i>	ISA							
<b>AP4</b> <b>Roll-out: Abstimmung mit Akteuren aus dem Gesundheitswesen auf Kreis-, Landes- und Bundesebene</b>	<b>FiW</b>				M3			
<b>AP5</b> <b>Begleitkreis ESI-CorA</b>	<b>FiW</b>							
AP5.1 <i>Planung und Durchführung von virtuellen Sprechstunden (Lead: TUM)</i>	FiW							
AP5.2 <i>Erarbeitung und Bereitstellung von Handreichungen (Lead: TUM)</i>	FiW							
AP5.3 <i>Begleitende gesamtheitliche Auswertung der abwasserbezogenen Daten in Korrelation zu Infektionszahlen (Lead: FiW)</i>	FiW							M5

**Tabelle I.2: Meilensteine des Projekts COVIDready**

	Meilensteine COVIDready	Projektmonat		Partner	Status (April 2023)
<b>M1</b>	Optimierter Workflow bei LV etabliert und Laborvergleich durchgeführt	Q1/22	März 2022	LV/ISA	erreicht
<b>M2</b>	dPCR bei KGU etabliert	Q1/22	März 2022	KGU	erreicht
<b>M3</b>	Konzept für Roll-out mit Akteuren abgestimmt, adressatenspezifischen Dokumentation des erarbeiteten Workflows	Q2/22	Mai 2022	FiW/LV	erreicht
<b>M4</b>	Auswertung der Screening-Daten von 9 Kläranlagen abgeschlossen	Q2/23	April 2023	FiW/LV	erreicht
<b>M5</b>	Begleitende gesamtheitliche Auswertung der abwasserbezogenen Daten in ESI-CorA abgeschlossen und Ergebnisse an Begleitkreis übergeben	Q2/23	April 2023	FiW	erreicht

- M1:** Der optimierte Workflow wurde im Dezember 2021 bei LV und ISA etabliert und ging ab Dezember/Januar in den Regelbetrieb für zunächst fünf Kläranlagenstandorte (ab Q2/2022 auf neun Standorte erweitert, nach Aufstockung der Projektmittel). Die Optimierungsmaßnahmen und der finale Workflow sind in Kapitel II.1 dokumentiert.
- M2:** Die dPCR wurde am KGU planmäßig in Betrieb genommen und die Methode etabliert und fortlaufend weiterentwickelt (vgl. Kapitel II.2).
- M3:** Das Konzept konnte planmäßig abgestimmt werden. Die Dokumentation erfolgte im Rahmen von Laboranweisungen (Standard Operating Procedures, SOPs) im Kooperationslabor (KL) des LV und im Labor des ISA. Die grundlegenden Vorgehensweisen wurden durch das FiW im Rahmen eines Schulungsvideos auf Basis von Laborarbeiten des KL und des ISA-Labors aufbereitet und zur Verfügung gestellt.
- M4:** Das Screening der neun Standorte konnte wie geplant durchgeführt werden. Es konnten Gemeinsamkeiten der grundlegenden Trends in den SARS-CoV-2 Genkopienzahlen auch kläranlagenübergreifend gezeigt werden (vgl. Kapitel II.3.4 bis II.3.6).
- M5:** Auf der Grundlage einer Abstimmung zwischen PTKA und den Koordinatoren der drei BMBF-Verbundvorhaben am 30.06.2022 (berichtigtes Protokoll versendet am 05.07.2022) soll sich die Datenauswertung ausschließlich auf die 28 Standorte der BMBF-/Ländervorhaben beziehen und nicht auf die 20 Standorte des EU-Projektes. Ergebnisse der 28 Standorte der BMBF-/Ländervorhaben wurden zusammen mit den anderen beiden BMBF-Projekten Biomarker und GenASeq sowie enger Abstimmung mit dem Ländervorhaben NRW erarbeitet und in einem gemeinsamen Beitrag mit Präsentation auf der Essener Tagung Wurzbacher, C., Drewes, J.E., Ho, J., Agrawal, S., Lackner, S., Schoth, J., Bastian, D., Weber, F.-A. (2023): SARS-CoV-2 Monitoring – Gesamtheitliche Datenauswertung von mehrjährigen Messreihen aus drei BMBF-Vorhaben. 56. Essener Tagung für Wasserwirtschaft, 07.-09.03.2023. GEWÄSSERSCHUTZ – WASSER – ABWASSER Band 256 vorgestellt.

**Tabelle I.3: Wesentliche Termine in der Projektlaufzeit**

16.06.2021	Projekt-Kick-off-Veranstaltung unter Beteiligung aller Projektpartner und assoziierter Partner mit Teilnahme des Projektträgers (FiW, ISA, KGU, LV, QIA, E+H)
28.06.2021	Mitarbeit in CoroMoni AG4 (FiW)
02.07.2021	EU Sewage Sentinel System for SARS-CoV-2 (EU4S) (FiW, E+H)
30.07.2021	Landeszentrum Gesundheit NRW, Gespräch mit Frau PD Dr. Annette Jurke (LV, FiW, Frau Prof. Lackner TUD) Für einen Roll-Out von SARS-CoV-2 im Abwasser ist eine Abstimmungstermine mit Vertreter:innen des öffentlichen Gesundheitsdienstes auf Einladung von EGLV geplant.
03.08.2021	Teilnahme am CoroMoni AG4 (FiW und weitere Partner)
06.08.2021	BMG/BMU/BMBF- Projektgruppe Teilnahme an AG2 – Technik (Frank-Andreas Weber, FiW)
23.08.2021	Projektvorstellung bei Wasserverbänden Erftverband und LINEG
09/2021	Logistiktest LV: Probenlogistik, Analytik und Dashboard-Bereitstellung innerhalb 48 Stunden machbar
09/2021	Durchführung eines ersten Laborvergleich mit SARS-CoV-2 gespickten Proben
09.09.2021	COVIDready Projektvorstellung im Ausschuss für Wissenschaft und Digitalisierung der Stadt Aachen (FiW)
13.09.2021	Abstimmung einer Dashboard-Oberfläche zwischen COVIDready und SARS-GenASeq unter Federführung von LV
28.09.2021	Durchführung einer Vernetzungswshops mit Gesundheitsämtern und Stadtentwässerungsbetrieben im nördlichen Ruhrgebiet in Kreishaus der Stadt Borken. Hybrid-Format: 25 Teilnehmer:innen in Präsenz und 15 online (LV, FiW, KGU, Frau Prof. Lackner TUD)
15.10.2021	Fachgespräch mit dem MAGS, LZG und LANUV NRW 13.01.2022 (FiW, LV)
04.11.2021	CoroMoni Videokonferenz (FiW, LV, ISA)
15.11.2021	Abstimmung/Vernetzungsworkshop mit Gesundheitsämtern der Einzugsgebiete der durch LV beprobten Kläranlagen unter Teilnahme des LZG NRW (LV, FiW)
23./24.11.2021	EU4S - Town Hall Meeting
21.12.2021	Beantragung einer Aufstockung aller Teilprojekte in COVIDready
23.12.2021	Pressemitteilung, Omikron-Befunde im Abwasser in Bayern, Hessen und Nordrhein-Westfalen SARS-CoV-2-Monitoring auf Kläranlagen unterstützt Pandemiebekämpfung (u.a. LV, FiW, KGU)
14.01.2022	Fachgespräch mit dem MAGS NRW 14.01.2022 (FiW, LV, KGU) Vereinbarung eines regelmäßigen Treffens (2-wöchentlich)
16.01.2022	Einreichung eines AbstraCts zum "31 <sup>st</sup> Annual Meeting of the Society for Virology" (KGU)
28.01.2022	Fachgespräch mit dem MAGS, LZG und LANUV NRW 28.01.2022 (FiW, LV, KGU, ISA) Teilnahme des WVER als interessierter Dritter (Kläranlagenbeprobungen ISA) vereinbart
02.02.2022	DWA CoroMoni Videokonferenz
09.02.2022	Auftaktveranstaltung ESI-CorA
10.02.2022	<i>Vortrag zur Methodik bei einem öffentlichen Anwender-Workshop der Fa. Qiagen durch Dr. Widera/KGU</i>
11.03.2022	<i>Vortrag zum Projekt COVIDready auf Essener Tagung durch Dr. Weber / FiW</i>
15.03.2022	EU4S Town Hall vom 15. Bis 16.03.
28.03.2022	Austausch der Projektpartner und Externen zum durchgeführten Laborvergleich COVIDready
30.03.2022	<i>Vortrag „Wastewater Surveillance Allows Early Detection of SARS-CoV-2 Omicron variant in North Rhine-Westphalia Germany“ beim 31<sup>st</sup> Annual Meeting of the Society for Virology durch Dr. Wilhelm /KGU</i>
31.03.2022	Auftaktgespräch mit den Betreibern der Kläranlagen Wuppertal-Buchenhofen (Wupperverband) und Mönchengladbach-Neuwerk (Niersverband) in Vorbereitung auf die Aufnahme der regelmäßigen Beprobung
31.03.2022	<i>Vortrag zum Abwassermonitoring und der Rolle der großen Betreiber beim Austausch des Projekts CO-MOTH (Thüringen) durch Dr. Schoth / LV</i>
06.04.2022	Webinar UBA PCR-Analytik und Probenahme
04.05.2022	<i>Vortrag bei der DWA CoroMoni Videokonferenz durch Dr. Weber / FiW</i>
01.06.2022	Aufnahme der Kläranlagen Wuppertal-Buchenhofen (Wupperverband) und Mönchengladbach-Neuwerk (Niersverband) in die Routineanalytik des ISA nach erfolgter Projektaufstockung
15.06.2022	<i>Pressemitteilung BA4./BA.5 in NRW Abwasserproben dominant</i>

19.06.2022	Artikel zur Pressemitteilung BA4./BA.5 auf wdr.de und tagesschau.de
11.07.2022	Vorstellung des derzeitigen Standes des SARS-CoV-2 Monitoring beim Ministerium für Arbeit, Gesundheit und Soziales (MAGS) und dem Landeszentrum Gesundheit (LZG) des Landes Nordrhein-Westfalen durch das Projektkonsortium
12.07.2022	Workshop mit den Projekten Biomarker und SARS-GenA-Seq zur Datenauswertung
27.07.2022	<i>Print "Wastewater surveillance allows early Detection of SARS-CoV-2 omicron in North Rhine-Westphalia, Germany", <a href="https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157375">https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157375</a></i>
01.08.2022	<i>Pre-Print "Early Detection of SARS-CoV-2 Omicron BA.4/5 in German wastewater", <a href="https://doi.org/10.1101/2022.07.27.22278003">https://doi.org/10.1101/2022.07.27.22278003</a></i>
09.09.2022	Vortrag Schoth et al. „Dezentrales SARS-CoV-2 Monitoring im Abwasser: Entwicklungen in der abwasserbasierten Epidemiologie und Projekt COVIDready“, KomNetAbwasser
22.09.2022	Vortrag Bastian et al. „Dezentrales SARS-CoV-2 Monitoring im Abwasser: Entwicklungen in der abwasserbasierten Epidemiologie und Projekt COVIDready“, CoroMoni, digital
29.09.2022	Präsentation, Roll-Up und Videofilm COVIDready auf der Informationsveranstaltung Johannes-Rau-Forschungsgemeinschaft im Landtag NRW, Düsseldorf
30.09.2022	Abstimmungstermin aller 3 BMBF-Projekte COVIDready, Biomarker, Gen-A-Seq zu gesamtheitlichen Datenauswertung, Videokonferenz
14.11.2022	Austausch mit RKI im Rahmen von COVIDready, digital
18.11.2022	Austausch mit TU Wien, Universität Weimar und weiteren Forschungsakteuren, EGLV, Essen
01.12.2022	Vortrag Weber et al. im Rahmen vom FiW-Forum, Technologiezentrum Aachen
10.01.2023	Abstimmungstermin der BMBF-Projekte COVIDready und Biomarker zur gesamtheitlichen Datenauswertung
15.01.2023	Vortrag Wilhelm et al., „A versatile workflow for early monitoring of SARS-CoV-2 variants in community and aircraft wastewater“, GfV, Ulm
01.02.2023	Vortrag Widera et al. „Dezentrales SARS-CoV-2 Monitoring im Abwasser: Entwicklung einer validierten Analyseverfahren für abwassertechnische Labore auf Kläranlagen“, CoroMoni, digital
22.02.2023	Vortrag Widera et al.: Detection of SARS-CoV-2 variants in wastewater as an early warning and surveillance tool; SGVIVI Sino-German Mobility Programme for Research on Viral Immunology, digital
09.03.2023	Vortrag Wurzbacher, C., Drewes, J.E., Ho, J., Agrawal, S., Lackner, S., Schoth, J., Bastian, D., Weber, F.-A. (2023): SARS-CoV-2 Monitoring – Gesamtheitliche Datenauswertung von mehrjährigen Messreihen aus drei BMBF-Vorhaben. 56. Essener Tagung für Wasserwirtschaft, 07.-09.03.2023. GEWÄSSERSCHUTZ – WASSER – ABWASSER Band 255.
09.03.2023	Vortrag Teichgräber, B., Schoth, J., Jurke, A., Bastian, D. (2023): Abwassermonitoring – Erfahrungen aus der Corona-Pandemie für zukünftige pandemiebegleitende Frühwarnsysteme über den Abwasserpfad. 56. Essener Tagung für Wasserwirtschaft, 07.-09.03.2023. GEWÄSSERSCHUTZ – WASSER – ABWASSER Band 255.
22.03.2023	Vortrag Weber, F.-A., et al. (2023): Dezentrales SARS-CoV-2 Monitoring im Abwasser: Entwicklung einer validierten Analyseverfahren für abwassertechnische Labore auf Kläranlagen. ESI-CorA Abschlussveranstaltung, 22.03.2023, Karlsruhe.
13.04.2023	COVIDready Abschlussveranstaltung, 13.04.2023, Essen.
30.04.2023	Projektabschluss

## I.4 Anknüpfung an den Stand der Wissenschaft und Technik

### I.4.1 Stand des Abwassermonitorings vor Beginn der Pandemie

Die abwasserbasierte Epidemiologie (wastewater-based epidemiology, WBE) war vor dem Auftreten von SARS-CoV-2 v. a. auf die chemische Analyse von Schadstoffen und Biomarkern im Rohabwasser ausgerichtet, um qualitative und quantitative Daten über Einwohner innerhalb eines bestimmten Abwassereinzugsgebiets zu erhalten. WBE lieferte dabei Informationen über das Konsumverhalten (v. a. hinsichtlich Betäubungsmitteln) und die Exposition gegenüber Umweltchemikalien. Der Fokus lag nach Recherchen von Lorenzo und Picó (2019) dabei v. a. auf dem Konsum illegaler Drogen und missbräuchlich verwendeter Therapeutika und deren Metaboliten innerhalb des Abwassers einer Gemeinschaft (hier zumeist Kläranlageneinzugsgebiet). Problematisch wurde zumeist der Bezug der gewonnenen Daten auf die Population eingeschätzt. Hierbei sind z. B. Schwankungen in den Bevölkerungszahlen, Pendlerbewegungen, aber auch wechselnde Ausscheideraten zu nennen. Eine Möglichkeit stellt der Bezug auf sog. Normierungsparameter dar (vgl. Kapitel II.1.3 und II.3.3.2).

Vor Beginn der weltweiten Aktivitäten zum Abwassermonitoring auf SARS-CoV-2 wurden bereits Viren (Okoh et al. 2010; Gundy et al. 2008; van der Avoort et al. 1995; Kitajima et al. 2014) und Antibiotikaresistenzen (BMBF-Projekt HYREKA) im Abwasser bestimmt, um Rückschlüsse auf deren Verbreitung zu erlangen.

### I.4.2 Aufkommendes Monitoring auf SARS-CoV-2 im Abwasser

Über den Nachweis von SARS-CoV-2-Genfragmenten im Abwasser wurde bereits kurz nach dem Ausbruch der Pandemie berichtet. In einer der ersten Studien weltweit konnte in den Niederlanden gezeigt werden, dass mittels molekularbiologischer *reverse transcriptase quantitative polymerase-chain reaction* (RT-qPCR) Analyse SARS-CoV-2 Genfragmente nachweisbar und quantifizierbar sind (Medema et al. 2020). In dieser Studie konnte auch die prinzipielle Eignung als Frühwarn- und Indikationssystem demonstriert werden, mit positiven Befunden im Abwasser bevor die ersten klinischen SARS-CoV-2 Nachweise in Individualtestungen in einem Kläranlagen-Einzugsgebiet auftraten. Im weiteren Verlauf der Pandemie haben sich global eine Vielzahl von Initiativen zum SARS-CoV-2 Nachweis im Abwasser entwickelt mit einem Spektrum von analytischen *Workflows*, die im Kern nach Probenaufbereitung und Anreicherung von Genmaterial meist auf einer RT-qPCR Laboranalytik beruhen (La Rosa et al. 2020). Der Nachweis von Virus-Mutationen im Abwasser war zu Pandemiebeginn mittels zeitaufwändiger Gen-Sequenzierung in Speziallaboren möglich (Crits-Christoph et al. 2021). In einigen Ländern (z. B. den Niederlanden) wurde die Abwasserüberwachung bereits frühzeitig flächendeckend durchgeführt und, als komplementärer und integraler Indikator zum Infektionsgeschehen, auf Dashboards veröffentlicht.

Partner aus dem Projektkonsortium COVIDready konnten bereits im August 2020 Methoden zum Nachweis von SARS-CoV-2-Virusfragmenten im Abwasser für eine Überwachung des COVID-19-Infektionsgrads der Bevölkerung als erste Studie in Deutschland publizieren (Westhaus et al. 2020). Der Virusnachweis erfolgt mittels quantitativer RT-qPCR für mehrere CoV-2 Gene (M, RdRp, N und E Gene). Für die Vergleichbarkeit und Quantifizierung wurde ein *in-vitro* transkribierter RNA-Standard eingesetzt. Die Plausibilität der Ergebnisse wurde anschließend über Sanger-Sequenzierung kritisch überprüft und bestätigt (Westhaus et al. 2020).

In Deutschland war die Abwasserüberwachung auf SARS-CoV-2 zu Beginn des Jahres 2021 auf einzelne Vorhaben bzw. Regionen beschränkt. Trotz Aktivitäten mehrerer Forschergruppen u. a. Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH (UFZ), TU München, DVGW - Technologiezentrum Wasser (TZW) und TU Darmstadt wurden RT-qPCR Analysen von Abwasserproben mittels spezifischer Primer und Sonden nicht flächendeckend und routinemäßig für eine integrales Monitoring des Infektionsgeschehens verwendet – im Gegensatz zu etablierten Systemen unserer Nachbarländer (CoroMoni Arbeitskreise, DER SPIEGEL vom 29.01.2021, FAZ vom 22.03.2021). Eine flächendeckende Überwachung der deutschen Großstädte geht über die Kapazität einzelner Labore und Forschergruppen hinaus.

Mutationen in Genomen von RNA-Viren wie SARS-CoV-2 entstehen während der Virusreplikation in infizierten Wirtszellen, entsprechen also einem evolutionären Anpassungsmechanismus an den Wirt. Viele Tausende von Mutationen im SARS-CoV-2-Genom sind bereits aufgetreten, aber nur eine limitierte Anzahl verändert das Virus in einer nennenswerten Weise. Die genetische Evolution hat jedoch das Potenzial sich auf die Antigen-Eigenschaften, die Übertragbarkeit oder den Schweregrad des Virus auszuwirken. Da die COVID-19-Infektionsraten in 2021 weiter anstiegen, kam der Bereitstellung schneller und breit einsetzbarer, aber auch empfindlicher und zuverlässiger Tests zur Eindämmung der Ausbreitung von SARS-CoV-2 höchste Priorität zu. Zu Projektbeginn von COVIDready war kein flächendeckender Impfschutz in der Bevölkerung gegeben. Obwohl sukzessiv Impfstoffe weltweit eingeführt wurden, erschienen und erscheinen immer wieder neue Varianten, die entweder der natürlich erworbenen oder durch Impfung erlangten Immunität entkommen können (Wilhelm et al. 2021; Widera et al. 2021). Darüber hinaus treten besonders in Regionen mit internationalem Reiseverkehr kontinuierlich neue Varianten mit Mutationen auf, die mit einer deutlich erhöhten Übertragungswahrscheinlichkeit assoziiert sein können (Widera et al. 2021). Ein dezentrales Abwassermonitoring auch auf sogenannte Variants of Concern (VoC) würde die Möglichkeit für eine kontinuierliche Überwachung des Mutationsgeschehens bieten, um frühzeitige Präventionsmaßnahmen einleiten zu können.

### I.4.3 Voraussetzungen für dezentrale PCR für SARS-CoV-2 im Abwasser

Ab 2021 haben kommerzielle Anbieter Testkits für die Analyse von SARS-CoV-2 speziell für den Einsatz in der komplexen Abwasser-Matrix mit Inhaltsstoffen zur Elimination von PCR-Inhibitoren entwickelt und diese sukzessive für den Verkauf freigegeben. Auf Basis dieser Testkits war eine Entwicklung und Validierung von Workflows notwendig, die deren rasche Verbreitung und Nutzung in abwassertechnischen Laboren ermöglichen würden. Eine Auswahl der zu Beginn des Projektes COVIDready verfügbaren oder in Entwicklung befindlichen abwasserspezifischen Testkits ist im Folgenden dargestellt:

Die **Fa. IDEXX** bietet ein Testkit an, das für die RT-qPCR-basierte Quantifizierung von SARS-CoV-2-RNA aus Abwasserproben entwickelt wurde. Das Kit beinhaltet die von dem Center for Disease Control and Prevention (CDC 2020) entwickelten Primer und Sonden (SARS-CoV-2 N1 und N2) und kann auf allen qPCR-Geräten eingesetzt werden. Hierfür sind eine RNA-Isolation und Aufkonzentrierung mit In-House-Methoden oder Isolationskits anderer Hersteller notwendig.

Die **Fa. QIAGEN** bietet manuelle und automatisierte Isolationsmethoden bis hin zur qPCR und digital PCR (dPCR) basierten Geräten mit entsprechenden Testkits an. Die qPCR und dPCR-Testkits sind optimiert für die Testung von Abwasserproben und basieren ebenfalls auf den CDC-Primern und Sonden. Ein SARS-CoV-2 Standard wird mitgeliefert, sodass eine kontinuierliche Vergleichbarkeit gewährleistet wird. Spezifische Isolationskits in manuellem und automatisiertem Format wurden speziell auf die Beseitigung von PCR-Inhibitoren zur Aufbereitung der Abwasserproben ausgerichtet.

**Fa. Promega** bietet derzeit ein RT-qPCR Multiplex-Testkit an, das neben den CDC-Primern und Sonden zusätzlich das häufig im Abwasser vorkommende Pepper mild mottle virus (PMMoV) als Input-Kontrolle enthält. Ein Standard zur absoluten Quantifizierung der SARS-CoV-2 Genomkopieäquivalente wird mitgeliefert, sodass eine vergleichbare, kontinuierliche Überwachung ermöglicht wird. Diese Multiplex-PCR kann auf geeigneten qPCR-Geräten verschiedener Hersteller eingesetzt werden. Darüber hinaus bietet Promega auch manuelle und automatisierte Aufreinigungssysteme viraler Nukleinsäuren aus Abwasser an, sodass ein standardisierter Workflow von Isolation bis hin zur Messung ermöglicht wird. Auch variantenspezifische Testkits (SARS-CoV-2 Panel-8) werden mittlerweile angeboten.

Die **Fa. BioRad** bietet derzeit zusätzlich zu variantenspezifischen RT-qPCR Multiplex-Testkits eine auf der Technologie der digital droplet PCR (ddPCR) basierten Testmethode an. Bei der ddPCR wird eine Wasser-Öl-Emulsion genutzt, um tausende Tröpfchen zu erzeugen, in denen die einzelnen PCR Reaktionen stattfinden können. Im Vergleich zur RT-qPCR ist diese Methode weniger anfällig für PCR-Inhibitoren und unspezifische Nukleinsäure-Amplifikationen, sodass eine höhere Sensitivität und Spezifität erzielt werden kann. Dadurch ermöglicht die digitale PCR die Detektion von seltenen Varianten (z. B. SARS-CoV-2 Mutationen). Zahlreiche Testkits des gleichen Herstellers werden zur Quantifizierung sowie auch Identifizierung von Virusmutationen angeboten, die in einer Einzeltestung nach Bedarf analysiert werden können. Jedoch stellen hohe Anschaffungskosten der Geräte (exklusiv von BioRad) eine Hürde dar. Eine Isolierungsmethode wird bislang nicht angeboten, sodass eine RNA-Isolation und Aufkonzentrierung mit In-House-Methoden oder Isolationskits anderer Hersteller notwendig ist.

## **I.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen**

### **Zusammenarbeit mit dem EU-Vorhaben ESI-CorA**

Als Koordinator des Vorhabens COVIDready wirkte Herr Dr. Frank-Andreas Weber zusammen mit den Verbundkoordinatoren der anderen drei BMBF-Vorhaben Herrn Prof. Drewes, Frau Prof. Lackner und Frau Thaler im Begleitkreis ESI-CorA mit, um Wissenstransfer, Synergien und Schnittstellen zwischen den Vorhaben sicherzustellen. Die Kick-off-Veranstaltung für den Pilotbetrieb zur Einführung eines SARS-CoV-2-Abwassermonitorings im Rahmen des EU-Projekts ESI-CorA fand am 09.02.2022 statt. Zwischen 13.12.2021 und 06.03.2023 fanden insgesamt 23 Sitzungen mit Projektbeteiligten des Umweltbundesamtes, des Robert Koch-Institutes, des Bundesministeriums für Gesundheit (BMG) und des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz, nukleare Sicherheit und Verbraucherschutz (BMUV) unter Leitung des Engler-Bunte-Instituts (EBI) statt. Bearbeitete Aufgaben waren u. a. Wissenstransfer und Unterstützung des von PTKA betriebenen HelpDesks zur Beantwortung von aufkommenden Fragen und Erfahrungsaustausch der ESI-CorA-Standorte, Einbringung von Expertise bei der Erstellung detaillierter Handreichungen und fachlicher Austausch zu Datenauswertestrategien, Trendberechnung und Kommunikation von Ergebnissen. Auf der Grundlage einer Abstimmung zwischen PTKA und den Koordinatoren der drei BMBF-Verbundvorhaben am 30.06.2022 (berichtigtes Protokoll versendet am 05.07.2022) soll sich die von COVIDready geleistete Datenauswertung ausschließlich auf die 28 Standorte der BMBF-/Ländervorhaben beziehen und nicht auf die 20 Standorte des EU-Projektes. Ergebnisse des Vorhabens COVIDready und weiterer BMBF-Vorhaben wurden auch auf der ESI-CorA Abschlussveranstaltung am 22.03.2023 in Karlsruhe präsentiert (Weber 2023).

### **Zusammenarbeit innerhalb der BMBF-Projekte**

In Zusammenarbeit der BMBF-Projekte konnten mehrere Kooperationen bearbeitet werden. So war ein gemeinsamer Nachweis der Omicron-Variante im Abwasser noch vor den ersten Individual-Screening-Testungen und eine Bestätigung der PCR-Testung mittels NGS möglich. Die Ergebnisse wurden vorab mit Entscheidungsträgern auf Landes- und Bundesebene kommuniziert und nach Absprache in einer gemeinsamen Pressemitteilung am 23.12.2021 veröffentlicht.

Weiterhin nahm das DVGW - Technologiezentrum Wasser (TZW) und TU München erfolgreich am im Rahmen von COVIDready organisierten Laborvergleich teil. Die Ergebnisse wurden in Wilhelm et al. (2022b) veröffentlicht. In gemeinsamen Abstimmungsterminen wurden übergreifende Forschungsfragestellungen und Hypothesen ausgearbeitet. Ergebnisse der 28 Standorte der BMBF-/Ländervorhaben wurden zusammen mit den beiden BMBF-Projekten Biomarker und GenASeq sowie in enger Abstimmung mit dem Ländervorhaben NRW erarbeitet. In einer gemeinsamen Auswertung der langjährigen Monitoring-Datenreihen des TZW für die

Kläranlage Karlsruhe durch TZW und FiW konnten verschiedene Trenddetektionsalgorithmen und deren Aussagekraft über die einzelnen Pandemiephasen hinweg beobachtet werden. Die Datenauswertung wurde auf Basis von Python-Scripts durch TZW und FiW harmonisiert und Teile der Ergebnisse im Rahmen eines gemeinsamen Ergebnisvortrags der BMBF-Projekte durch Wurzbacher et al. (2023) auf der Essener Tagung 2023 vorgestellt.

## I.6 Zusammenfassung der Projektergebnisse

### I.6.1 Workflow für abwassertechnische Labore

In COVIDready wurde ein sukzessiver Workflow mit mehreren PCR-basierten Nachweismethoden entwickelt (Abbildung I.2). Die SARS-CoV-2 Viruslast wird in 24h-Mischproben mittels N1/N2-detektierenden Primern dezentral in abwassertechnischen Laboren untersucht. Die EGLV-Standorte werden im eigenen Kooperationslabor in Essen durchgeführt, das zusammen mit dem Ruhrverband betrieben wird. Die anderen Standorte werden im Umweltanalytischen Laboratorium des ISA analysiert. Beide Labore verwendeten im Wesentlichen denselben Workflow. Aufgrund der eigenen Probenlogistik und Analytik ist die Ergebnisübermittlung in unter 48 Stunden, teilweise sogar am selben Arbeitstag möglich. Dabei können folgende Lehren aus der Etablierung des Workflows in abwassertechnischen Laboren gezogen werden:

- Mit Support und Fortbildungen durch Fachleute ist eine Etablierung in abwassertechnischen Laboren möglich
- Tiefgehendes Vorwissen der generellen PCR Analytik ist nicht unbedingt notwendig
- Sauberes Arbeiten und räumliche Trennung von verschiedenen Schritten ist aufgrund von Kontaminationen notwendig
- Regelmäßige Rückfragen und Unterstützung der Testkit- und Gerätehersteller wichtig

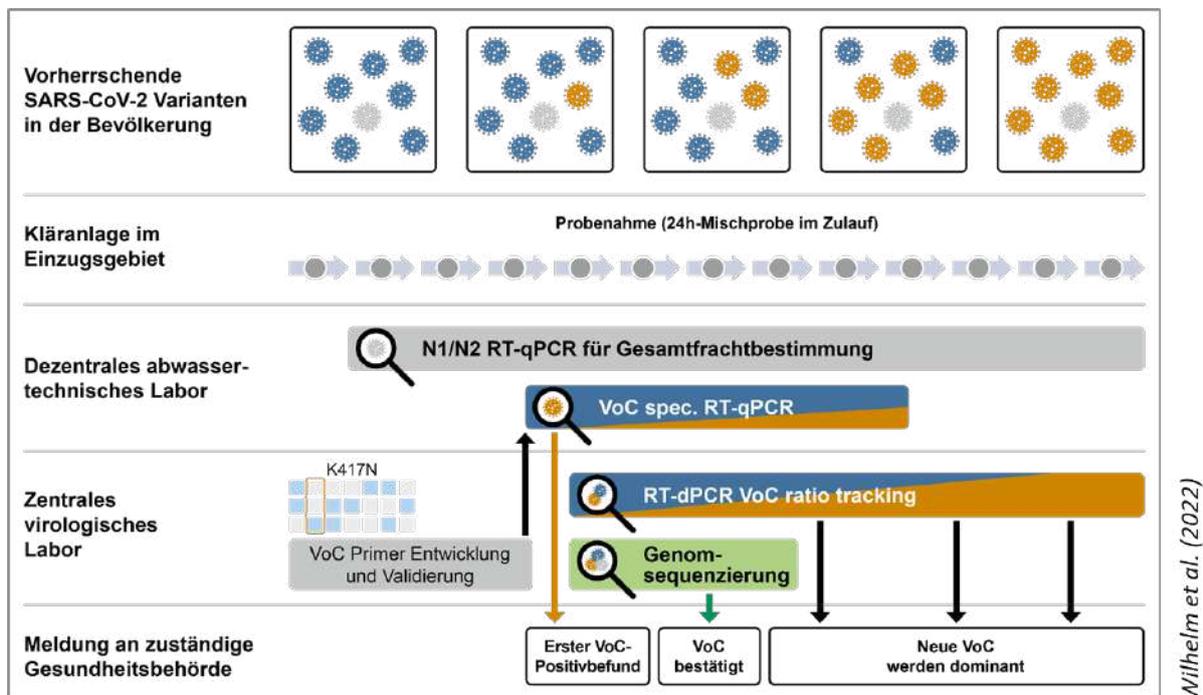


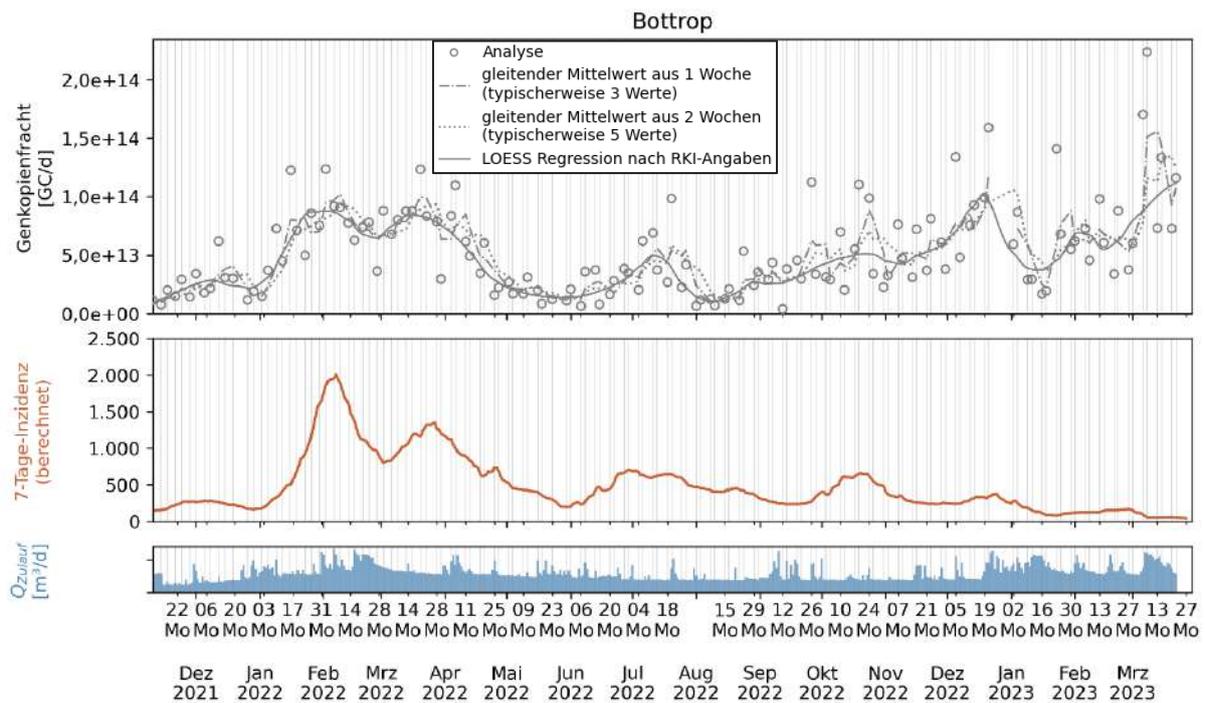
Abbildung I.2: Dezentraler, sukzessiver Workflow für abwassertechnische Labore. Schematische Darstellung des dezentralen Monitorings neuer Virusvarianten (Wilhelm et al. 2022a)

### **I.6.2 Früherkennung besorgniserregender Varianten**

Parallel zur Bestimmung der SARS-CoV-2-Genkopien mittels N1/N2-spezifischer PCR werden zu Zeiten eines relevanten SARS-CoV-2-Mutationsgeschehens spezifische Primer und Sonden seitens KGU zur Verfügung gestellt, die das Monitoring von charakteristischen Mutationen neu auftretender Varianten ermöglichen (Abbildung I.2). Auffällige Befunde werden mittels digitaler PCR und *Next-Generation-Sequenzierung* (NGS) in einem zentralen Labor bestätigt und die relativen und absoluten Anteile der Mutation-tragenden Genomäquivalente mittels digitaler PCR quantifiziert – dabei erfolgt eine enge Kommunikation mit den zuständigen Gesundheitsbehörden. Basierend auf diesem Arbeitsablauf wurde im Dezember 2021 die Ausbreitung der Omikron-Variante sowie im Mai/Juni 2022 die Prävalenz von BA.4/BA.5 überwacht und die Ergebnisse publiziert (Wilhelm et al. 2022b; Wilhelm et al. 2022a).

### **I.6.3 Datenauswertung: Entwicklung von Trendindikatoren**

Die SARS-CoV-2-Genkopien-Fracht ist nach dem aktuellen Kenntnisstand zwischen den beprobten Kläranlagen nicht direkt vergleichbar – selbst bei Analyse gleicher Zielgene. Auch eine Normierung der Fracht auf die nominal angeschlossenen Personen, den Trockenwetterzufluss oder Menge an Surrogatviren lieferte bislang keine einheitliche Bezugsgröße. Es wurde deswegen eine Datenauswertung entwickelt, die eine statistische Ausreißeranalyse ermöglicht. Deren Einordnung erfolgt über die abwassertechnische Bewertung von Einflüssen wie Niederschlagsereignissen, Spülstößen und weiterer Kenngrößen auf die einzelnen Abwasseranalysen. Die Trendeinordnung erfolgt in die Kategorien „Steigender Trend“, „Sinkender Trend“ und „Keine gesicherte Aussage möglich“. Dazu wurden Trendanalyse der im Abwasser gemessenen SARS-CoV-2-Genfracht in 9 Kläranlagen im Vergleich zur Trendentwicklung der im Kläranlageneinzugsgebiet geschätzten Inzidenz in einer Heatmap-Darstellung analysiert (Abbildung I.3 und Abbildung I.4).



**Abbildung I.3: Zeitreihe der Kläranlage Bottrop (vgl. auch Kapitel II.3.5)**

#### I.6.4 Gesamtheitliche Bewertung

Neben COVIDready werden bundesweit im Pilotvorhaben ESI-CorA, in weiteren Forschungsvorhaben und in Länderinitiativen Abwasseruntersuchungen auch von verschiedensten kommerziellen Laboren durchgeführt. Die Daten werden über die Bundesländer ans Umweltbundesamt und von dort qualitätsgesichert und normalisiert wöchentlich ans RKI für die Nutzung im RKI-Pandemieradar übermittelt. Im Auftrag des Landesentrums Gesundheit NRW für das Ministerium für Arbeit, Gesundheit und Soziales des Landes Nordrhein-Westfalen unterstützen EGLV, FiW und KGU das Land NRW bei der abwassertechnischen und virologischen Bewertung der in NRW vorliegenden Abwasserbefunde. Dazu wurden regelmäßig Lageberichte und Grafikauswertungen erstellt und entsprechend der COVIDready-Methodik die Datenauswertung der NRW-geförderten Standorte übernommen. Besonders für die Wasserverbände erwächst bei der Anwendung eines regionsorientierten Abwassermonitorings hinsichtlich Umwelt- und Gesundheitsfragen eine wichtige Rolle in der städteübergreifenden Zusammenarbeit mit den Gesundheitsbehörden in der Datenbewertung und in der Abrundung des Lagebildes.

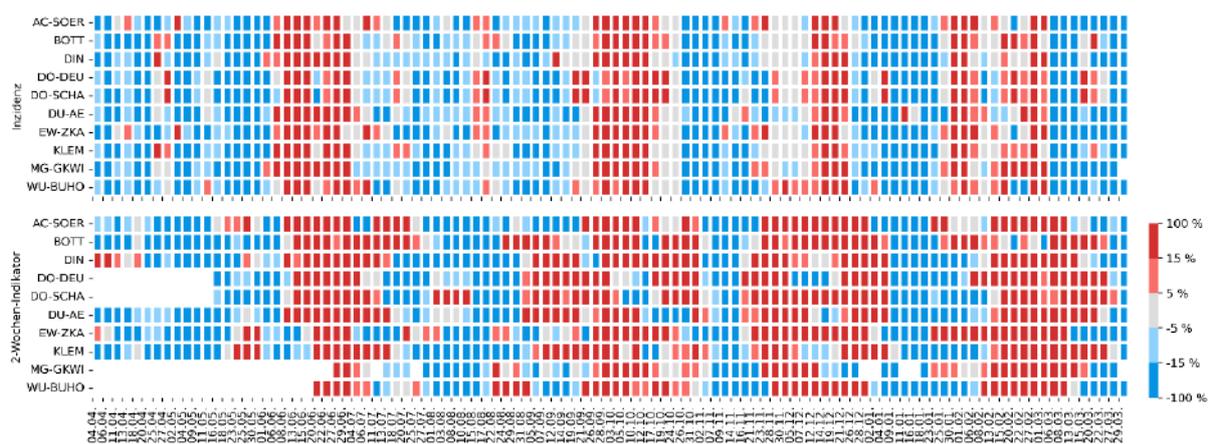


Abbildung I.4: Heatmap-Darstellung der Trendauswertung für die zehn untersuchten Kläranlagen (vgl. auch Kapitel II.3.3)

## I.6.5 Erzielte Publikationen

Westhaus, S., Weber, F.-A., Schiwy, S., Linnemann, V., Brinkmann, M., Widera, M., Greve, C., Janke, A., Hollert, H., Wintgens, T., Ciesek, S. (2020): **Detection of SARS-CoV-2 in raw and treated wastewater in Germany – Suitability for COVID-19 surveillance and potential transmission risks.** *Science of The Total Environment*, 14175. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141750>

Wilhelm, A., Schoth, J., Meinert-Berning, C., Agrawal, S., Bastian, D., Orschler, L., Teichgräber, B., Wintgens, T., Lackner, S., Weber, F.-A., Widera, M. (2022): **Wastewater surveillance allows early Detection of SARS-CoV-2 Omicron in North Rhine-Westphalia, Germany.** *Science of the Total Environment* 846, 157420. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157375>

Wilhelm, A., Agrawal, S., Schoth, J., Meinert-Berning, C, Bastian, D., Orschler, L., Ciesek, S., Teichgräber, B., Wintgens, T., Lackner, S., Weber, F.-A., Widera, M. (2022): **Early Detection of SARS-CoV-2 Omicron BA.4 and BA.5 in German wastewater.** *Viruses* 14(9), 1876. <https://doi.org/10.3390/v14091876>

Wilhelm, A., Schoth, J., Meinert-Berning, C., Bastian, D., Blum, H., Elsinga, G., Graf, A., Heijnen, L., Ho, J., Kluge, M., Krebs, S., Stange, C., Uchaikina, A., Dolny, R., Wurzbacher, C., Drewes, J.E., Medema, G., Tiehm, A., Ciesek, S., Teichgräber, B., Wintgens, T., Weber, F.-A., Widera, M. (2023): **Interlaboratory comparison using inactivated authentic SARS-CoV-2 variants as a feasible tool for quality control in COVID-19 wastewater monitoring.** *Science of the Total Environment* 903 (2023) 166540. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166540>

Wilhelm et al. (2023): **A versatile workflow to monitor SARS-CoV-2 variants in fresh and frozen wastewater using digital PCR – a retrospective surveillance from April to December 2021 in Germany**, in Vorbereitung.

Schoth et al. (2023): **COVIDready – Erkenntnisse aus 18 Monaten dezentralem SARS-CoV-2-Monitoring im Abwasser in Nordrhein-Westfalen**, Vom Wasser (in Druck)

## II Eingehende Darstellung

### II.1 Entwicklung eines Workflows für abwassertechnische Labore

#### II.1.1 Arbeiten mit SARS-CoV-2 im Abwasser

Alle uns vorliegenden Erkenntnisse machen deutlich, dass im Abwasser nur nicht-infektiöses SARS-CoV-2-Genmaterial enthalten ist (Westhaus et al. 2020). Um mit diesen Viren bzw. Genmaterial arbeiten zu dürfen, muss ein Labor den Anforderungen einer Schutzstufe 2 entsprechen. Eine Anzeige mit einer Gefährdungsbeurteilung nach § 7 der Biostoffverordnung für nicht gezielte Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen muss demnach bei der jeweiligen Bezirksregierung gestellt werden (Tabelle II.1). Zusätzlich müssen die geplanten Tätigkeiten, ein Lageplan, ein Stellplan im Raum, ein Hygiene- und Desinfektionsplan, eine Betriebsanweisung zum Arbeiten mit Abwasser, sowie die Dokumentation der Vorsorgeuntersuchungen der entsprechenden Mitarbeiter mitgesendet werden.

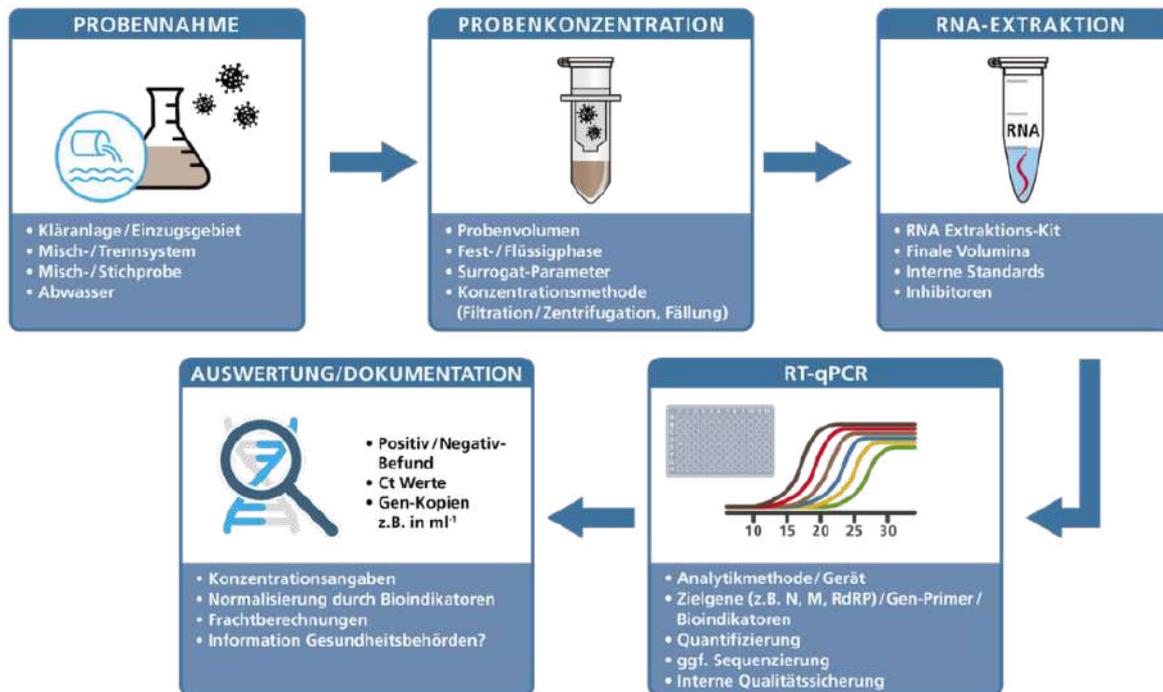
**Tabelle II.1: Ausgefüllter Anmeldebogen laut Biostoffverordnung (informativ, ohne Gewähr)**

Beschreibung der nicht gezielten Tätigkeiten:	Molekularbiologischer Nachweis von SARS-CoV-2 aus Abwasserproben mittels reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)
Verwendetes Material an oder in dem sich der biol. Arbeitsstoff befindet:	Abwasser
Identität des biol. Arbeitsstoffes:	SARS-CoV-2
Einstufung des biol. Arbeitsstoffes:	Risikogruppe 3 (gem. Beschluss 6/2020 des ABAS können Arbeitsschritte zum Nachweis von SARS-CoV-2 unter Bedingungen der Schutzstufe 2 nach TRBA 100 unter Berücksichtigung aerogener Übertragungswege durchgeführt werden.)
Infektionspotenzial des biol. Arbeitsstoffes:	SARS-CoV-2 ist Auslöser der Infektionserkrankung COVID19, die mitunter beim Menschen schwere Lungenerkrankungen auslösen kann. Aus der hier verwendeten Probenmatrix, Abwasser, ist es nach aktuellem Kenntnisstand noch nicht gelungen, vermehrungsfähige Viren zu gewinnen.
Betriebsabläufe und Arbeitsverfahren:	Genetisches Material soll zunächst durch Filtration von der wässrigen Phase der Abwasserprobe getrennt werden. Die Aufreinigung erfolgt automatisiert mit dem Gerät InnuPure C16 der Fa. Analytik Jena. Anschließend erfolgt der Nachweis der Viruslast mittels PCR unter Verwendung des Water SARS-CoV-2 RT-PCR Tests (Fa. IDEXX). Die Tätigkeiten werden in Räumen der Schutzstufe 2 unter Verwendung der persönlichen Schutzausrüstung (Schutzkitel, Schutzbrille, FFP2-Atemschutzmaske, Schutzhandschuhe) und Einhaltung des Hygieneplans durchgeführt.

Mögliche Übertragungswege der biol. Arbeitsstoffe bei der Durchführung der Tätigkeiten:	Nach aktuellem Kenntnisstand konnte noch kein infektiöses SARS-CoV-2 aus Abwasserproben isoliert werden. Denkbar wären aber Übertragungswege durch Aerosole bei der Probenvorbehandlung. Entsprechend kommen alle Vorschriften entsprechend der Schutzstufe 2 zum Tragen.
Erfahrungen aus vergleichbaren Tätigkeiten, Belastungs- und Expositionssituation:	Die Handhabung von Abwasserproben ist durch langjährige Erfahrung geprägt. Abwasser muss aufgrund des Infektionspotentials durch pathogene Mikroorganismen und Viren mit besonderer Vorsicht behandelt werden. Seit Beginn der Pandemie wird der Nachweis von SARS-CoV-2 weltweit in zahlreichen Laboren unter Bedingungen der Schutzstufe 2 erfolgreich umgesetzt.
<p><b>Abschließende Gefährdungsbeurteilung:</b></p> <p>Durch zahlreiche Untersuchungen verschiedener Institutionen ist der fragmentäre Nachweis von genetischem SARS-CoV-2-Material bereits weltweit gelungen. Studien mit dem Ziel, das Virus aus Abwasserproben zu vermehren zeigten, nach aktuellem Kenntnisstand, dass üblicherweise aus Abwasserproben keine Viruspartikel vermehrt werden konnten. Dies lässt darauf schließen, dass die Infektionsgefahr durch SARS-CoV-2 durch Abwasser eher gering ist. Darüber hinaus erfolgt hier keine gezielte Tätigkeit, die auf vitale Viruspartikel abzielt. Es sind ausschließlich diagnostische Tätigkeiten vorgesehen. Dafür liegen bewährte Arbeitsvorschriften vor. Das eingesetzte Personal ist qualifiziert und erfahren.</p> <p>Die vorgesehenen Tätigkeiten sind hinsichtlich der Sicherheitsmaßnahmen der Schutzstufe 2 zugeordnet. Der Umgang mit potentiell infektiösem Material erfolgt unter der Sicherheitswerkbank, sodass eine Gefährdung durch Bioaerosole nicht gegeben ist.</p> <p>Arbeitsmittel und Abfälle, die mit den Biostoffen in Kontakt waren, werden vor der Entsorgung durch Autoklavieren inaktiviert.</p> <p>Die Infektionsgefährdung wird bei Einhaltung der Betriebsanweisung für das S2-Labor incl. des Hygieneplans als gering eingestuft.</p> <p><b>Literatur:</b></p> <p>Biostoffverordnung vom 15. Juli 2013 (BGBl. I S. 2514), die zuletzt durch Artikel 146 des Gesetzes vom 29. März 2017 (BGBl. I S. 626) geändert worden ist</p> <p>Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA) 100 "Schutzmaßnahmen für Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen in Laboratorien"</p> <p>Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA) 500 „Grundlegende Maßnahmen bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen“ (April 2012)</p> <p>Empfehlung des ABAS zu Arbeitsschutzmaßnahmen bei Probenahme und Diagnostik von SARS-CoV-2. Beschluss 6/2020 des ABAS, aktualisiert am 8. Februar 2021</p>	

## II.1.2 Optimierung und Validierung des Workflows

Im Zuge der COVID19-Pandemie wurden in Laboren weltweit unterschiedliche Inhouse-Workflows für die Analyse von SARS-CoV-2 Genmaterial im Abwasser erarbeitet (Abbildung II.1). Die im Rahmen von ESI-CorA erstellten Handreichungen lassen unterschiedliche Probenahmeverfahren, Probenkonzentration, RNA-Extraktion, analysierte Zielgene und Auswertungsroutinen zu.



**Abbildung II.1: Genereller Workflow für das SARS-CoV-2-Abwassermonitoring, angepasst nach Michael-Kordatou et al. (2020)**

Im Rahmen von COVIDready wurde ein von der Fa. Analytik Jena zusammen mit EGLV im Kooperationslabor (KL) erarbeiteten Workflow optimiert und validiert und parallel im Forschungslabor des ISA der RWTH Aachen mit weitgehend identischem Workflow aufgebaut und validiert (Tabelle II.2). Der Workflow wird im Folgenden beschrieben. Es wurde außerdem ein Schulungsvideo erstellt, das auf der Projekt-Homepage <https://covidready.de/> abrufbar ist, und interessierten abwassertechnischen Laboren einen Überblick geben soll, um den Aufwand und Arbeitsschritte eines Workflows zur Bestimmung von SARS-CoV-2 im Abwasser abschätzen zu können.

**Tabelle II.2: Kenndaten des in COVIDready etablierten analytischen Workflows**

<b>Aufkonzentration</b>	Druckfiltration 100 mL über elektroneg. Filter
<b>Extraktion</b>	INNUSCREEN IP Antipath / Magnetic Beads
<b>Primer/Maternalmix</b>	IDEXX Water SARS-CoV-2 RT-PCR
<b>Genbereiche</b>	N1+N2
<b>Standard</b>	stabiler Plasmidstandard KGU Frankfurt
<b>Kontrollen</b>	IDEXX Extraktionskontrolle & Positivkontrolle
<b>PCR-Methode</b>	RT-qPCR, z.B. Analytik Jena qTOWER <sup>3</sup>
<b>Zeitbedarf</b>	EGLV Logistik optimiert, im Idealfall Ergebnisse <b>noch am selben Arbeitstag</b> .

Die Kläranlagenbetreiber nehmen mit einem automatischen Probenehmer eine 24-Stunden Mischprobe. 2 Liter der homogenisierten Probe werden abgefüllt und können 24-48 Stunden kühl gelagert werden. Der pH-Wert und die elektrische Leitfähigkeit sollte vor Ort und/oder kurz nach Probenahme im Labor gemessen werden.

Zur SARS-CoV-2-Bestimmung muss die Probe für die RT-qPCR zunächst aufbereitet und aufkonzentriert werden. Im ersten Schritt werden 100 ml der abgesetzten Probe über einen mit deionisiertem Wasser gespülten, elektronegativen Membranfilter von Merck Millipore aus Cellulosemischester (0,45 µm) unter Stickstoffatmosphäre mit maximal 5 bar filtriert. Die Viruspartikel haften nun am Membranfilter, welcher mit der belegten Seite nach innen gefaltet, in 7 gleichgroße Streifen geschnitten und in ein innuSPEED Lysis Tube (IST Innuscreen GmbH) überführt wird. 3 Metallkugeln werden aus den 2 ml Lysis Tube herausgenommen, die Streifen vorsichtig mit einer Pinzette eingeführt und zwei Metallkugeln wieder auf die Streifen gegeben (Abbildung II.2).

**Abbildung II.2: Ausschnitt aus dem erstellten Schulungsvideo**

Nachdem 1.000 µl DNA/RNA Shield-Puffer (Zymo Research)<sup>1</sup> hinzu pipettiert wurde, wird die Probe in einer Mühle (SpeedMill Plus, Analytik Jena) für zwei Minuten bei 50 Hz behandelt. Hierbei wird das genetische Material der Probe vom Filter gelöst und im Puffer gelöst. Anschließend wird das Filtermaterial für zwei Minuten bei 10.000 RPM in einer Zentrifuge (Eppendorf 5430) pelletiert, so dass ein klarer Überstand zu sehen ist. 600 µl des Überstandes werden in ein steriles, nukleinsäurefreies Reaktionsgefäß gegeben und für weitere zwei Minuten bei 10.000 RPM zentrifugiert, um sicherzustellen, dass eine partikelfreie Probe vorliegt.

Die Extraktion wird mit Hilfe des innuPREP AniPath DNA/RNA Kit – IPC 16 (Analytik Jena) durchgeführt. Zunächst wird die Reagenzplatte manuell mit dem 8-fach-Piercer (Analytik Jena) durchstoßen (je Probe eine Reihe). Die mitgelieferte Proteinase K und die interne Kontrolle sind vor Anwendung durch vortexen gründlich zu durchmischen und für eine Minute bei 6.000 RPM zu zentrifugieren. Die MAG Suspension (IDEXX, Lösung mit magnetischen Beads) muss ebenfalls gut durchmischt sein.

Die aufgestochenen Kavitäten werden wie folgt für das Protokoll 2 (Isolation aus 400 µl zellfreien Körperflüssigkeiten, Zellkulturrückständen und Vollblut) befüllt:

1. 50 µl MAG-Suspension in die erste Kavität
2. 400 µl Lysepuffer in die dritte Kavität
3. 2 µl interne Kontrolle in die dritte Kavität
4. 400 µl Probe in die dritte Kavität
5. 50 µl Proteinase K in die dritte Kavität

Die Reagenzplatte wird im Anschluss in die Halterung des Probenhalters gegeben. Je Probe werden zwei Filterspitzen in den Spitzenblock eingesetzt. Achtung: Es müssen immer beide Plattenhalter im Gerät bestückt sein. Das Programm kann gestartet werden. Die Nukleinsäuren werden in 100 µl RNase-freiem Wasser eluiert und in den eingesetzten Elutionsgefäßen aufgefangen. Sie können im nächsten Schritt in dem qRT-PCR-Test analysiert werden.

Bevor jedoch die PCR-Platte belegt werden kann, müssen alle Komponenten des IDEXX Water SARS-CoV-2 RT-PCR test with IC Test-Kits aufgetaut, gevortext und für 1 Minute bei 6.000 RPM zentrifugiert (NeoLab Line Centrifuge) werden. Der SARS-CoV-2 Master Mix muss vor jedem RT-qPCR-Durchlauf gemischt werden. Auf die Lichtempfindlichkeit ist zu achten. Für die Menge des Master Mix kann folgende Formel verwendet werden:

$$V_{MMx} = (10 \mu l_{SARS-CoV-2 Mix} + 10 \mu l_{RNA Master Mix}) \times n + 10 \% [\mu l]$$

mit  $n$  = Anzahl der Proben

<sup>1</sup> Es wurden zwei verschiedene Puffer zur Überführung der Viruspartikel vom Filtermaterial in die Lösung verglichend getestet. Der DNA/RNA Shield Puffer hatte im Vergleich zum Dulbecco's Phosphate Buffered Saline eine deutlich bessere Ausbeute und wurde daher ausschließlich im Projekt verwendet.

Bei der Mischung beider Komponenten ist drauf zu achten, dass zuerst der SARS-CoV-2 Mix und danach der RNA Master Mix (MMx) in das Reaktionsgefäß pipettiert wird. Anschließend vortexen und für eine Minute bei 6.000 RPM zentrifugieren.

Es wird empfohlen einen Kühlakku unter die PCR-Platte zu legen, um die Kühlung der Reagenzien bis zum Laden in den Cykler sicherzustellen. Eine Ladezeit von 20 Minuten sollte nicht überschritten werden.

Vorgehen beim Beladen der Platte:

1. 20 µl des SARS-CoV-2 MMx in alle gewünschten Vertiefungen der PCR-Platte pipettieren
2. 5 µl jeder Kontrollreaktion in die entsprechende Vertiefung dazugeben:
3. Für die Negativkontrolle 5 µl PCR Reinstwasser verwenden
4. Für die Positivkontrolle 5 µl Positiv Kontrolle verwenden
5. 5 µl extrahierter RNA in die definierten Vertiefungen geben

Beispiel einer Belegung:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Zeile A: Negativer Kontrollversuch: 20 µl SARS-CoV-2 MMx + 5 µl PCR Reinstwasser in Doppelbestimmung

Zeile B: Probenversuch 1: 20 µl SARS-CoV-2 MMx + 5 µl extrahierte RNA in Doppelbestimmung

Zeile C: Probenversuch 2: 20 µl SARS-CoV-2 MMx + 5 µl extrahierte RNA in Doppelbestimmung

Zeile D: Probenversuch 3: 20 µl SARS-CoV-2 MMx + 5 µl extrahierte RNA in Doppelbestimmung

Zeile H: Positiver Kontrollversuch: 20 µl SARS-CoV-2 MMx + 5 µl Positiv Kontrolle in Doppelbestimmung

Nachdem die Platte beladen wurde, wird diese mit einer Folie abgedeckt und für 1,3 Minuten in der Plattenzentrifuge (NeoLab) zentrifugiert. Die PCR-Platte kann nun im qTOWER<sup>3</sup> (Analytik Jena, Abbildung II.3) gemessen werden.

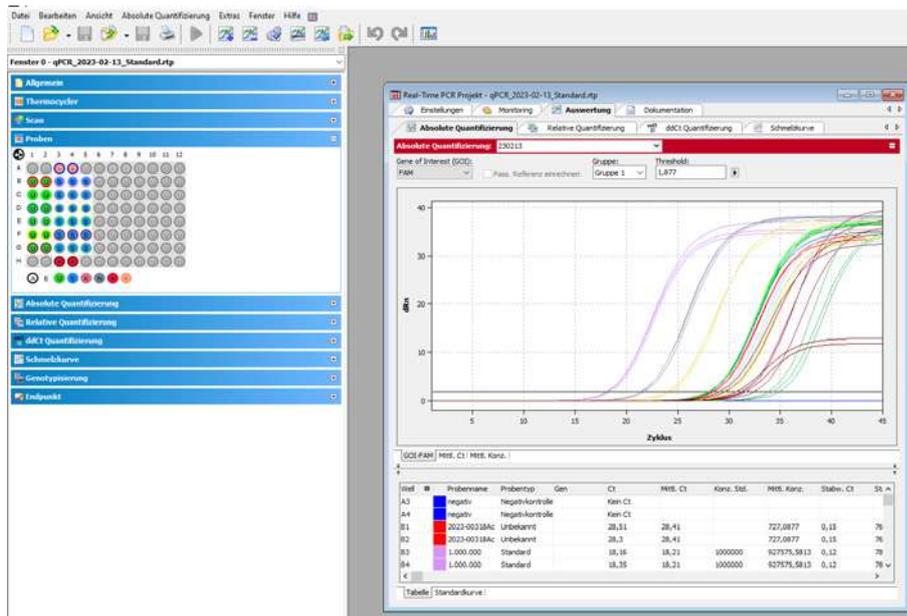


**Abbildung II.3: Verwendeter qTOWER<sup>3</sup> G von Analytik Jena**

Bei der RT-qPCR werden die spezifischen viralen Genom-Sequenzen (durch Primer definiert) in jedem Zyklus der PCR kopiert. Damit verdoppelt sich theoretisch mit jedem Zyklus die Anzahl der Zielsequenz und ermöglicht mit Hilfe eines Quantifizierungsstandards so die Ermittlung der Ausgangskonzentration der SARS-CoV-2-Genkopien. Die Anzahl der Zyklen, die durchlaufen werden, geben somit Auskunft über die Viruslast der Probe. Ein niedriger ct-Wert deutet auf eine hohe Viruslast hin.

Die Auswertung erfolgt digital durch den qTOWER<sup>3</sup> und der Software qPCRsoft (Analytik Jena). Dabei rechnet qPCRsoft den Mittelwert der einzelnen  $c_t$ -Werte der technischen Replikate aus und stellt diese graphisch und in einer Excel-Tabelle dar (Abbildung II.4). Anhand der  $c_t$ -Werte lässt sich eine Quantifizierung der SARS-CoV-2-Konzentration in der Probe ableiten.

Die Standardkurve gibt ein lineares Verhältnis zwischen dem  $c_t$ -Wert und der Menge an anfänglicher RNA wieder. Sie muss bei Anbruch eines neuen IDEXX SARS-CoV-2 Test-Kits erstellt werden. Hierzu werden Standards verwendet, bei denen die Konzentration des Zielgens bekannt ist. Der Standard wird in 6 Verdünnungsstufen in einer PCR-Reaktion in Dreifachbestimmung durchgeführt.



**Abbildung II.4: Automatische Auswertung durch die Software qPCRsoft**

Die Analyse der linearen Regressionsgerade gibt im Weiteren Auskunft darüber, wie viele Kopien des SARS-CoV-2 in der PCR-Reaktion nachgewiesen wurden. Dazu kann die folgende Formel angewendet werden:

$$\text{Genkopien} = 10^{\left(\frac{c_t - b}{m}\right)}$$

mit  $c_t$ -Wert = mittlerer Schwellenwert, der auf dem FAM Farbmodul gemessen wurde

mit  $b$  = y Achsenabschnitt der Standardkurve

mit  $m$  = Steigung der Standardkurve

Anschließend kann die SARS-CoV-2 Konzentration in der Probe bestimmt werden, indem die berechneten Genkopien relativ zum Anteil des ursprünglichen Abwasserprobenvolumens ausgedrückt werden. Dazu wird folgende Formel verwendet:

$$\text{Genkopien pro Liter} = \text{Genkopien} \times \left(\frac{\text{RNA}_{\text{gesamt}}}{\text{RNA}_{\text{PCR}}}\right) \times \left(\frac{\text{Konzentration}_{\text{gesamt}}}{\text{Konzentration}_{\text{extrahiert}}}\right) \times \left(\frac{1000 \text{ ml}}{\text{Abwasser}}\right)$$

mit  $\text{RNA}_{\text{gesamt}}$  = Gesamtvolumen der eluierten RNA = 0,1 ml

mit  $\text{RNA}_{\text{PCR}}$  = Volumen der gereinigten RNA, die in der PCR eingesetzt wurde = 0,005 ml

mit  $\text{Konzentration}_{\text{gesamt}}$  = Gesamtmenge an Abwasser = 1 ml

mit  $\text{Konzentration}_{\text{extrahiert}}$  = Volumen aus dem die RNA extrahiert wird = 0,4 ml

mit  $\text{Abwasser}$  = Volumen der ursprünglich verarbeiteten Abwasserprobe = 100 ml

Die Kontrollversuche werden jeweils in Doppelbestimmung analysiert. Dementsprechend zwei Versuche für die Positivkontrolle und zwei Versuche für die Negativkontrolle.

Für jede Charge von Proben, die während der Extraktion und PCR durchlaufen werden, sind die in Tabelle II.3 genannten Kontrollergebnisse zu erzielen.

**Tabelle II.3: Zu erzielende Kontrollergebnisse der Positiv- und Negativkontrolle bei der qPCR**

Kontrolle:	SARS-CoV-2 FAM c <sub>t</sub> Wert	Interne Kontrolle HEX c <sub>t</sub> Wert
PCR Positiv Kontrolle	< 40	Kein Signal
PCR Negativ Kontrolle	Kein Signal	Kein Signal
Extraktion Positiv Kontrolle	Kein Signal	< 36

Wenn die Grenzwerte nicht eingehalten werden, können die Probenergebnisse nicht interpretiert werden und müssen ggf. wiederholt werden.

Sind die Kontrollergebnisse gültig, kann die Bewertung der Abwasserproben erfolgen. Die Gültigkeit jeder Probe wird, wie in Tabelle II.4 dargestellt, nach dem Ergebnis der internen Kontrolle beurteilt.

**Tabelle II.4: Bewertung des qPCR-Ergebnisses**

Abwasserprobenergebnis	SARS-CoV-2 FAM c <sub>t</sub> Wert	Interne Kontrolle HEX c <sub>t</sub> Wert	Interpretation
<b>SARS-CoV-2 Negativ</b>	> 40 oder kein c <sub>t</sub> Wert	<36	SARS-CoV-2 RNA ist nicht vorhanden oder liegt unter der Nachweisgrenze
<b>SARS-CoV-2 Positiv</b>	< 40	< 36	SARS-CoV-2 RNA ist vorhanden. Das Ergebnis kann für die Quantifizierung verwendet werden
<b>Ungültige Probe</b>	beliebiger c <sub>t</sub> Wert	> 36 oder kein c <sub>t</sub> Wert	Das Fehlen des Signals der internen Kontrolle weist auf ein Problem und die Probe sollte erneut getestet werden

Im Rahmen der Methodenoptimierung wurde anhand zweier Proben untersucht, inwieweit die Ansäuerung der Probe zu einer quantitativ höheren Ausbeute der viralen RNA führt. Demzufolge wurden die Abwasserproben vor der Anreicherung am Membranfilter mit Salzsäure (1 mol/L) auf pH 3,55, bzw. 3,65 angesäuert. Durch die Ansäuerung verringerte sich der Ct-Wert um 0,57, bzw. 0,32 Ct. Dies sind normale Schwankungen im Bereich der PCR-Analytik, so dass eine Ansäuerung der Proben nicht weiterverfolgt wurde.

Die CrossAssemblyphage (CrAssvirales oder CrAssphage) als Begleitparameter wurde mit dem GoTaq® Enviro HF183/CrAssphage Quant Kit (Promega) analysiert.

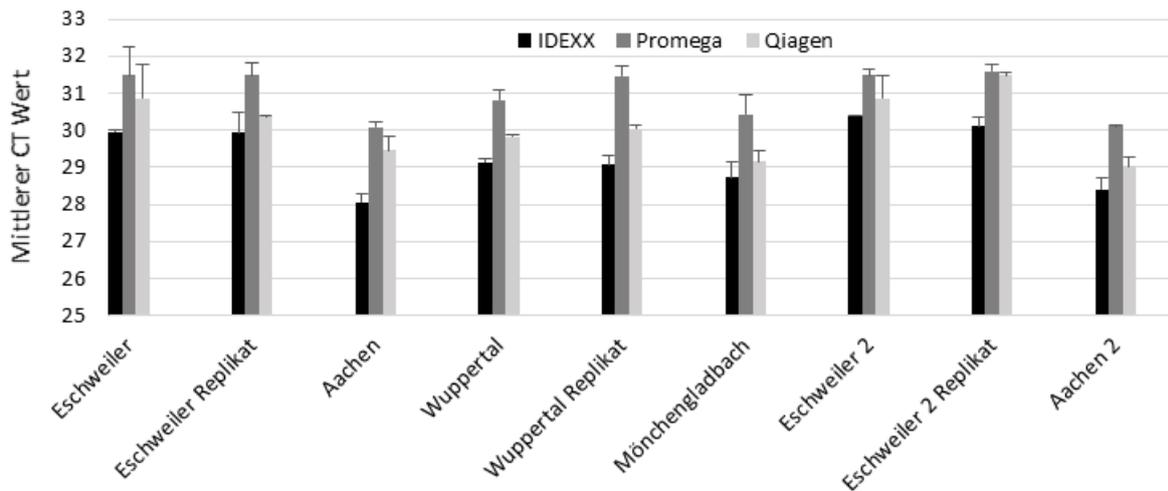
### II.1.2.1 Vergleich von Testkits verschiedener Hersteller

Es wurden 3 Testkits von unterschiedlichen Anbietern verglichen (Tabelle II.5). Hierzu wurden insgesamt 9 Proben aus unterschiedlichen Kläranlagen, zum Teil doppelt, parallel mit allen Testkits untersucht und ein Ct-Wert ermittelt. Mit Hilfe der Testkits (enthalten Primer und Sonden, die in bestimmten Regionen des Nukleokapsid-codierenden Gens binden) werden die vorhandenen Viruspartikel bzw. Nukleinsäuren konzentriert, um die Nachweisgrenze zu verbessern. Im Anschluss werden die Nukleinsäuren extrahiert, gereinigt und die Menge durch Amplifikation spezifischer genetischer Sequenzen quantifiziert. Virale RNA wird demnach in cDNA revers transkribiert, die anschließend in einem Echtzeit-PCR-Zyklusprotokoll amplifiziert wird. Die Fluoreszenzintensität der jeweiligen Zielparameter wird hierbei in unterschiedlichen Fluoreszenzkanälen gemessen.

**Tabelle II.5: Testkit Vergleich**

Testname	Hersteller	Zielgene	Standard im Kit	Primer/Probes zusammen	PCR Effizienz*
Water SARS-CoV-2 RT-PCR test with IC	IDEXX	N1, N2	nein aber Positivkontrolle und interne Kontrolle	ja	1-1,06 beim Plasmidstandard (4 Kalibrationen) 0,98 bei der Kalibration von Analytik Jena
GoTaq® Enviro Wastewater SARS-CoV-2 Systems	Promega	N1, N2, E	ja alle Zielgene incl. PMMoV Standard	nein aber immer kombiniert mit PMMoV	N1: 0,74 N2: 0,64 E: 0,70
QuantiNova® Pathogen +IC Kit + SARS-CoV-2 N1+N2 Assay Kits	Qiagen	N1, N2	nein aber interne Kontrolle**	ja	1,05 mit Plasmidstandard

Die Standardabweichung der Messung lag mit IDEXX zwischen 0,00 und 0,56, mit Promega zwischen 0,03 und 0,79 und mit Qiagen bei 0,02-0,93. Am sensitivsten zeigte sich das Kit von IDEXX, wobei zu beachten ist, dass Promega nur ein Zielgen misst, wohin gegen die anderen Anbieter zwei Gene detektieren, hier zeigt sich ein höherer Ct-Wert von 1,11-2,02 (Abbildung II.5).



**Abbildung II.5: Ergebnisse des Testkit-Vergleichs**

Das Testkit von Qiagen ist anspruchsvoller für Nutzer ohne große Vorkenntnisse. Beim Ansatz müssen die einzelnen Komponenten berechnet werden, die Beschreibung des Workflows ist erlernbar, jedoch für Neulinge mit Fehlerpotential verbunden. Die Primer und Probes müssen hierbei zusätzlich bestellt werden. In den Versuchen am ISA RWTH Aachen konnte daher die interne Kontrolle nicht wiedergefunden werden, da nur die Primer enthalten waren und man die spezifischen Probes noch zusätzlich hätte beschaffen müssen.

Das Testkit von Promega ist einfach im Handling, auch wenn die einzelnen Komponenten berechnet werden müssen, ist die Beschreibung gut strukturiert und auch für Personen ohne Erfahrung in der molekularbiologischen Analytik verständlich beschrieben. Ein Vorteil bei dem Kit ist die direkte Mitbestimmung von PMMoV im Cy5 Kanal.

Das IDEXX Testkit ist sehr einfach im Handling und es müssen nur zwei Komponenten gemischt werden. Die Beschreibung ist gut strukturiert und für neue Nutzer verständlich dargestellt. Aufgrund der guten Handhabbarkeit und der guten Testergebnisse wurde in COVIDready mit dem Testkit von IDEXX gearbeitet.

### II.1.2.2 Extraktionsverfahren von Fest- und Flüssigphase

Feststoffhaltige Abwässer stellen die Anreicherung über Membranfilter vor Herausforderungen, da diese schnell verstopft werden und der entstehende Filterkuchen den Permeat-Fluss reduziert. Der Workflow sieht daher ein Absetzen der Probe vor der Filtration vor. Somit wird die Festphase jedoch nicht ausreichend mit untersucht. Da sich Bakterien und Viren an Schwebstoffe anhängen können, könnte ein Teil der Virenfracht nicht mitberücksichtigt werden.

Aufgrund dessen wurde untersucht, ob die Wiederfindungsquote durch andere Anreicherungs- und Homogenisierungsprozesse verbessert werden kann. Für die Analysen wurden unterschiedliche Verfahren angewendet. In der ersten Untersuchung wurde die Abwasserprobe durch kräftiges Schütteln homogenisiert. In der Folge bildete sich auf dem Filterkuchen ein deutlicher Rückstand der Feststoffe. Als Vergleichsprobe wurde die Abwasserprobe 30 min lang sedimentiert, das gängige Verfahren. In Abbildung II.6 ist der elektronegative Filter (MF-Millipore 0,45 µm MCE Membrane, 47 mm, Nitrocellulose membrane, Hydrophilic, nonsterile, Merck Millipore) beider Ansätze nach der Anreicherung im Edelstahl Druckfilter einsehbar. Es ist deutlich zu erkennen, dass durch die homogenisierte Probe (linkes Bild) mehr Festkörper angereichert werden konnten als in der sedimentierten Probe (rechtes Bild).



**Abbildung II.6: Abwasserprobe über Membranfilter filtriert, links Homogenisiert durch Schütteln, rechts abgesetzt**

Zusätzlich wurde vergleichend die Probe mittels Ultraschallbad (Bandelin Sonorex Super RK 514 H), Zentrifuge (Thermo Megafuge 1.0R, 30 Minuten bei 6.240 x g; Analyse von Pellet und Überstand) und Dispergiergerät (IKA Labortechnik T25; fünf Minuten bei 20.000 RPM) homogenisiert und jeweils 100 ml auf einem Membranfilter angereichert. Das Pellet im Zentrifugenröhrchen wurde mit destilliertem Wasser gewaschen, erneut zentrifugiert und mit dem Viral-RNA-Buffer von Zymo homogenisiert.

In Tabelle II.6 sind die Ergebnisse dargestellt. Alle Proben sind 24h-Mischproben des Zulaufs der KA Aachen-Soers.

**Tabelle II.6: PCR-Ergebnisse einer Abwasserprobe vom 24.01.2022 bei unterschiedlichen Vorbehandlungsschritten**

Vorbehandlung	Ct-Wert FAM	Ct-Wert HEX	Standard-abweichung FAM	Standard-abweichung HEX	Genomkopien PCR	Genomkopien/Liter
Abgesetzt	27,97	26,41	0,35	0,22	19.008	9.503.898
Geschüttelt	28,39	27,75	0,27	0,24	14.266	7.133.007
Zentrifugation Überstand	28,94	26,82	0,06	0,17	9.797	4.898.554
Zentrifugation Pellet	27,97	26,38	0,19	0,14	19.008	9.503.898
Zentrifugation Summe	-	-	-	-	28.805	14.402.452
Ultraturax	27,69	26,94	0,13	0,07	23.015	11.507.681
Ultraschall	28,92	28,35	0,08	0,22	9.932	4.965.953

Die Ct-Werte liegen zwischen 27,69 - 28,94 (maximale Differenz 1,25) für den Farbkanal FAM und zwischen 26,38 – 28,35 (maximale Differenz 1,97) für den Farbkanal HEX.

Die Farbkanäle sind spezifische Detektionskanäle, um die Amplifikation der DNA während des PCR Prozesses zu messen. Jeder Farbkanal repräsentiert eine spezifische Fluoreszenzfarbe (z. B. FAM Fluorescein), die mit einem bestimmten Detektionsfarbstoff verknüpft ist.

Die Unterschiede in den Ergebnissen werden als nicht erheblich different eingeschätzt. Das gängige Verfahren des Absetzens zeigte bei beiden Farbkanälen den zweitniedrigsten Ct-Wert und somit eine gute Ausbeute.

Auf den ersten Blick führt die Zentrifugation des Abwassers in Summe der Genomkopien von Überstand und Pellet zwar zu einer gesteigerten Ausbeute und die Durchlaufzeit am Membranfilter verringert sich durch den Schritt der Zentrifugation, der zeitliche Aufwand lässt den Workflow allerdings nicht beschleunigen.

Somit konnte in den durchgeführten Versuchen festgestellt werden, dass der Absetz- und Filtrationsschritt keinen wesentlichen Einfluss auf die Messergebnisse hat und das Verfahren des Absetzens weiterhin einen geeigneten Workflow darstellt.

### II.1.2.3 Untersuchung zur Automatisierung der Probenfiltration im Kooperationslabor von EGLV

Die Aufkonzentration der Proben mittels Druckluftfiltration stellt bei dem analytischen Workflow einen zumeist limitierenden Faktor in dem zeitlichen Ablauf dar. Besonders bei Kläranlagen mit einem angeschlossenen Trennsystem kann es dazu kommen, dass eine Filtration bis zu 2,5 Stunden dauert. Auch bei der Gefährdungsbeurteilung stellt die Druckluftfiltration einen schwierigen Punkt dar. Im Forschungsvorhaben wurde deswegen in einer Vergleichsuntersuchung analysiert, ob durch eine automatisierte Filtration dieser Schritt optimiert werden kann.

Verwendet wurde hierfür die APU sim von Analytik Jena, welche ursprünglich für die Probenaufbereitung von AOX-Proben konzipiert wurde. Mittels der APU sim können bis zu sechs Proben gleichzeitig analysiert werden. Die gewünschte Filtrationsgeschwindigkeit kann durch die Einstellung der Pumpen reguliert werden. Das Probenvolumen, welches aufbereitet werden kann, beträgt bis zu 100 ml und ist somit für die SARS-CoV-2 Untersuchungen ausreichend.

### **Betriebliche Einschätzung hinsichtlich Handhabbarkeit**

Beim Vergleich zwischen der Filtration über die APU sim und Druckluftfiltration wurden jeweils drei Proben parallel filtriert.

Während bei der Druckluftfiltration die Proben nur nacheinander filtriert werden können und eine ständige Anwesenheit der AnwenderInnen erforderlich ist, ist es bei der APU sim möglich, bis zu sechs Proben parallel zu filtrieren ohne dauerhaft anwesend sein zu müssen. Die Dauer der Filtration für alle sechs Proben liegt immer fix bei 20 Min (100 ml Probe). Im Vergleich dazu variiert die Filtrationsdauer pro Probe bei der Druckluftfiltration von Probe zu Probe und liegt zwischen 3 Min und 2,5 Stunden.

Die APU sim ist innerhalb kurzer Zeit vorbereitet (Vorbereitung der sechs Kartuschen, Einlegen der Filter und Spritzen, Einstellungen an der APU sim). Dagegen ist die Nachbereitung (Reinigung) im Vergleich zur Druckluftfiltration wiederum etwas aufwendiger, was jedoch kaum störenden Einfluss hat, da auch hierbei die APU sim selbstständig läuft und alle sechs Spritzen parallel gereinigt werden. Es ist somit möglich, andere Tätigkeiten währenddessen zu erledigen. Bei der Druckluftfiltration hingegen ist die Reinigung nach jeder einzelnen Probe durchzuführen, bevor die nächste Probe filtriert werden kann.

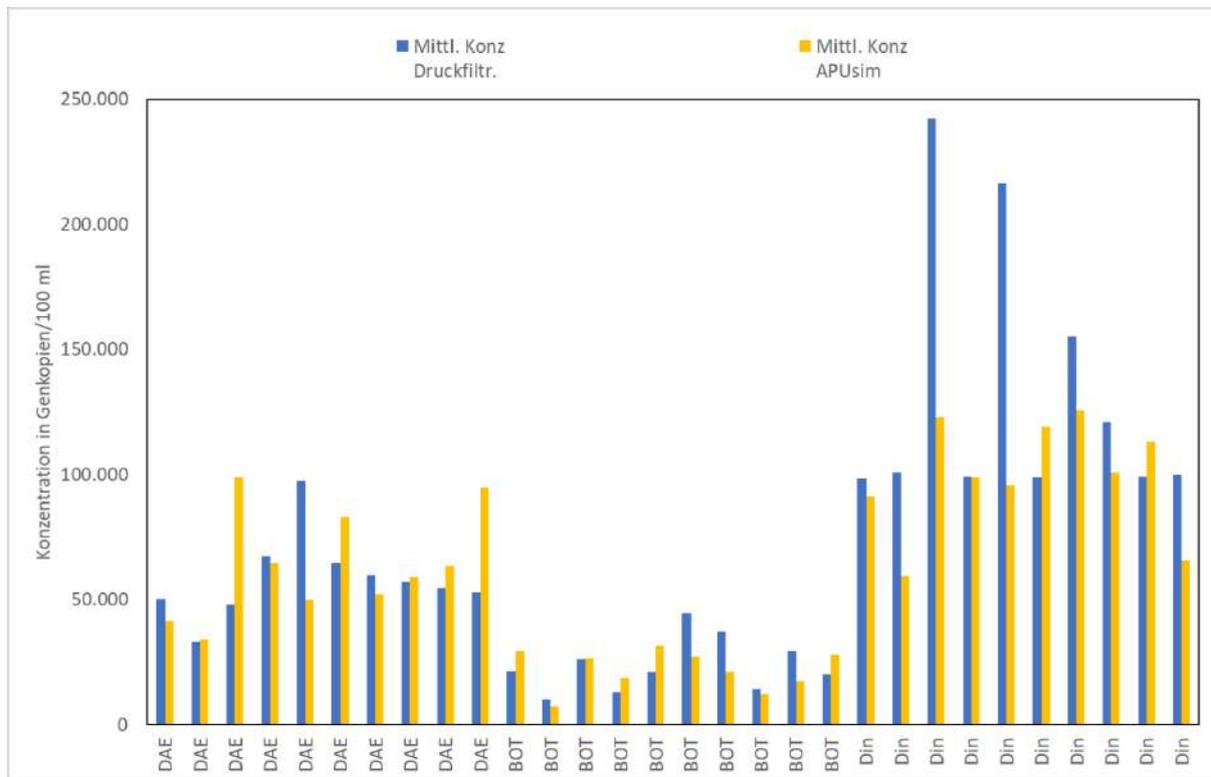
Insgesamt erleichtert die APU sim enorm die zeitlichen Abläufe der Filtration und anderer Tätigkeiten, da sie eine gewisse Planbarkeit garantiert und sich die Zeit vom Probeneingang bis zum Befundausgang verkürzt.

### **Auswertung der Ergebnisse**

Für die Vergleichsuntersuchungen wurden die Kläranlagen Duisburg-Alte-Emscher, Bottrop und Dinslaken im Zeitraum vom 15.02.2023 bis zum 20.03.2023 parallel untersucht. Untersucht wurde die Konzentration von SARS-CoV-2.

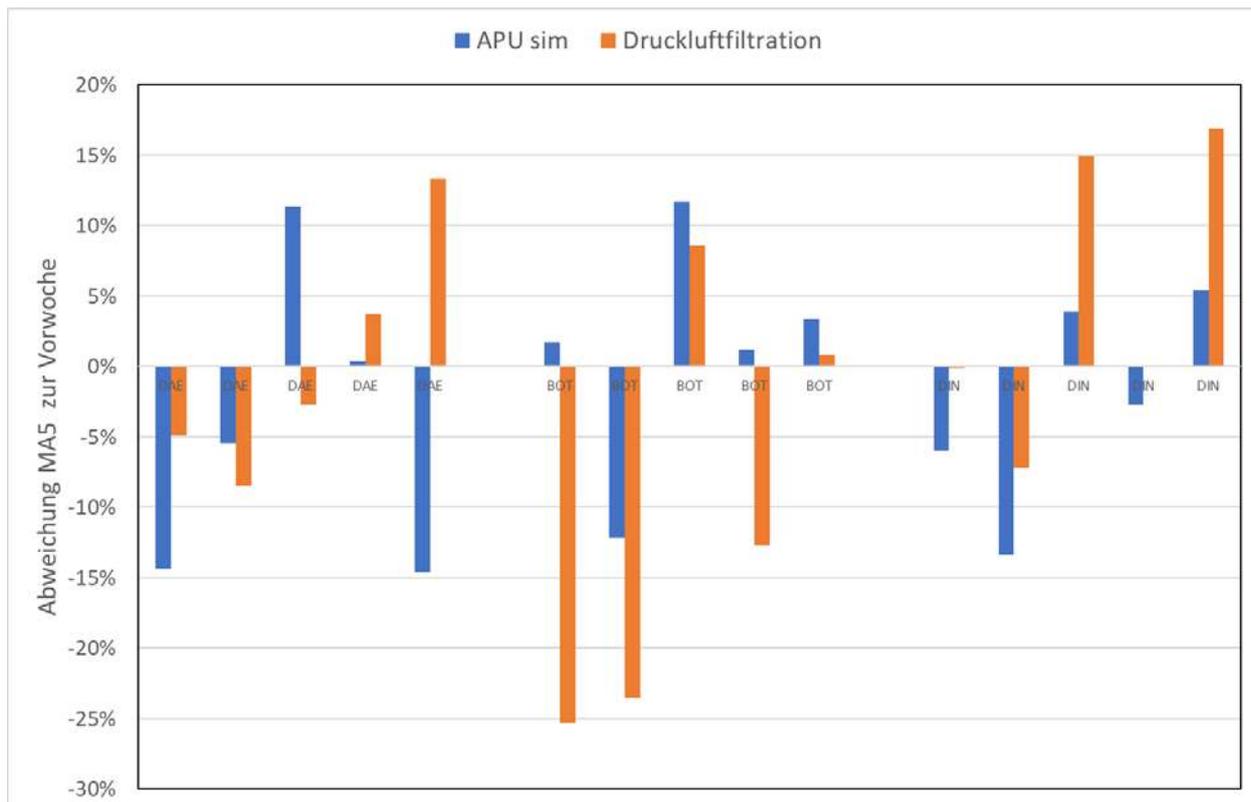
In Abbildung II.7 sind die gemessenen SARS-CoV-2 Konzentrationen der Vergleichsmessungen der jeweiligen Kläranlage dargestellt. Die Auswertung der Versuche hat gezeigt, dass die gemessenen Konzentrationen sich zum Teil sehr stark unterscheiden. Hierbei ist aber nicht zu erkennen, dass mittels der Druckluftfiltration mehr oder weniger gemessen werden konnte. Im Vergleich zu der Druckluftfiltration findet der eigentliche Filtrationsprozess bei der APU sim unter vergleichbareren Bedingungen statt. Warum es innerhalb der Messreihe zu so starken

Schwankungen kommt, kann abschließend nicht gesagt werden. Hierfür bedarf es weiterer Untersuchungen, die innerhalb des Forschungsvorhabens nicht mehr durchgeführt werden konnten.



**Abbildung II.7: Vergleichsmessung Druckluftfiltration und APUsim**

Um die gemessenen Ergebnisse im Kontext einer Trendabschätzung vornehmen zu können, wurde wie in Kapitel I.6.3 beschrieben die Trendentwicklung innerhalb der Vergleichsuntersuchungen gemessen und ausgewertet. In Abbildung II.4 zeigt sich, dass es innerhalb der Werte zu einer starken Streuung kommt und dem entsprechend verschiedene Trends berechnet werden.



**Abbildung II.8: Vergleich der ermittelten Trendindikatoren bei der Probenvorbereitung mittels Druckluftfiltration und APUsim**

### II.1.3 Begleitanalytik zur Annäherung des häuslichen Abwasseranteils

Die Abwasserzusammensetzung und somit auch die gemessenen SARS-CoV-2 Konzentrationen werden durch Niederschläge, verschiedene Einleitungen aus Industrie und Haushalten, Grundwasserinfiltration, Spülstößen und weiteren Faktoren beeinflusst. Um diesen Effekten bei der Ergebnisbewertung Rechnung zu tragen, bedarf es geeigneter Normalisierungsparameter. Häufig werden Abflussraten, elektrische Leitfähigkeit (Probleme mit Streusalz im Winter) oder auch Ammoniakkonzentrationen (z. T. Probleme mit Industrieeinleitern) verwendet. In der abwasserbasierten Epidemiologie werden auch Methoden mit Surrogatviren u. a. PMMoV und CrAssvirales angewendet. Am häufigsten wird jedoch die Normalisierung anhand der Abflussdaten durchgeführt (Mitranescu et al. 2022).

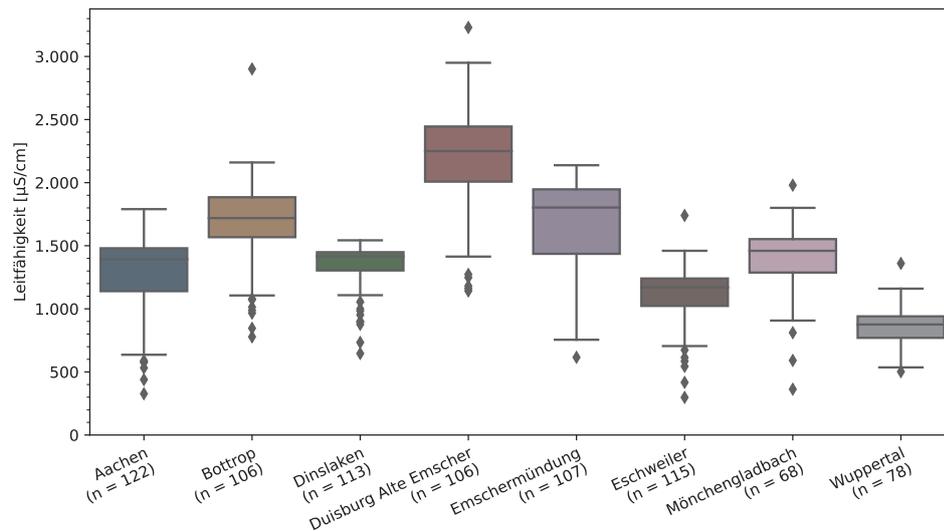
Für die SARS-CoV-2-Normalisierung wird klassischerweise die gemessene RNA Konzentration einer 24h-Mischprobe mit dem Abwasserdurchfluss der letzten 24 Stunden an der Probenahmestelle multipliziert, um die tägliche Viruslast zu berechnen. Diese Belastung kann wiederum auf die Bevölkerung des Einzugsgebiets normiert werden, sodass die Viruslast verschiedener Gebiete miteinander verglichen werden kann. Diesem Ansatz der Durchflussnormalisierung liegt die Annahme zugrunde, dass die entnommene Probe repräsentativ ist für die

häusliche Abwassermenge der Bevölkerung, die an das Pumpwerk oder die Kläranlage angeschlossen ist. Allerdings existieren mehrere Situationen, in denen diese Annahme mit Unsicherheiten verbunden ist. Dies ist der Fall bei kurzfristiger Änderung der Bevölkerungszahl durch Pendler oder Tourismus. Ebenfalls kann diese Annahme aufgrund von Dynamiken im Kanalsystem beeinträchtigt werden, z. B. Mischwasserabscheidungen bei Regenereignissen, Pumpenausfällen oder anderen betrieblichen Problemen. Folglich besteht Bedarf nach einer zusätzlichen Qualitätskontrolle in der abwasserbasierten Epidemiologie. Die Normalisierung durch zwei unabhängige Parameter könnte der richtige Weg sein, um die Repräsentativität der Probe für die Ausscheidung von SARS-CoV-2 zu überprüfen. Darüber hinaus sind an vielen Orten keine Durchflussdaten verfügbar, so dass andere Arten von Normalisierungsparametern herangezogen werden müssen (Langeveld et al. 2023).

Im Projekt wurde begleitend zur PCR Analytik der pH-Wert (DIN EN ISO 10523: 2012-04) und die Leitfähigkeit (DIN EN 27888: 1993-11), sowie verschiedene Summenparameter in einer 24-Stunden-Mischprobe hinter dem Sandfang gemessen:

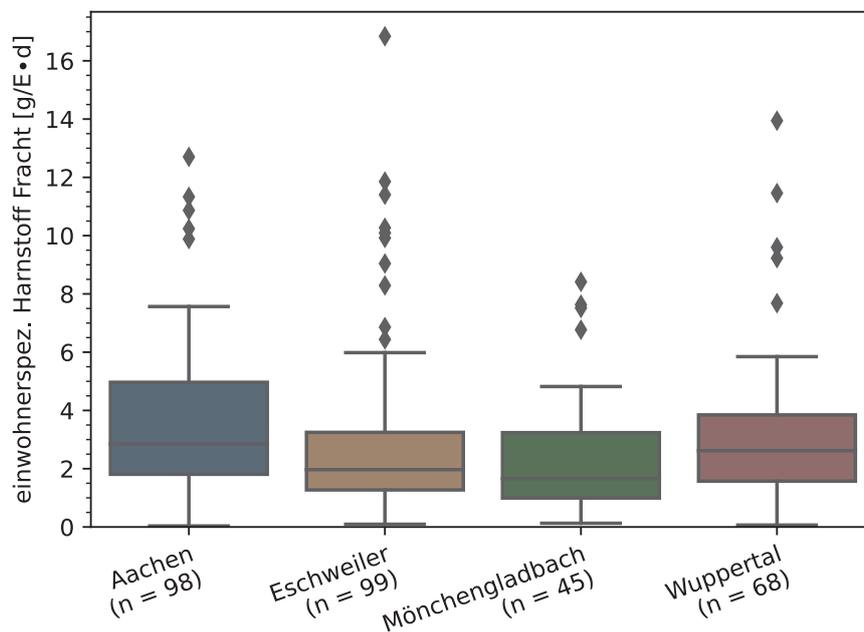
- Abfiltrierbare Stoffe AFS (DIN EN 872: 2003-08)
- Trockenrückstand TR (DIN 38409-1: 1987-01)
- Gesamter und gelöster organischer Kohlenstoff TOC, DOC und gesamt gebundener Stickstoff TNb (DIN EN 1484: 1997-08)
- CSB (DIN ISO 15705: 2003-01)
- Ammoniumstickstoff, Ortho-Phosphat, Chlorid, Sulfat, Kreatinin (Stoffwechselprodukt, welches nur über den Harn ausgeschieden wird) und Harnstoff (DIN ISO 15923-1: 2014-07)

In Abbildung II.9 sind die Ergebnisse der Leitfähigkeitsmessung dargestellt. Die Ergebnisse variieren stark innerhalb der Anlagen.

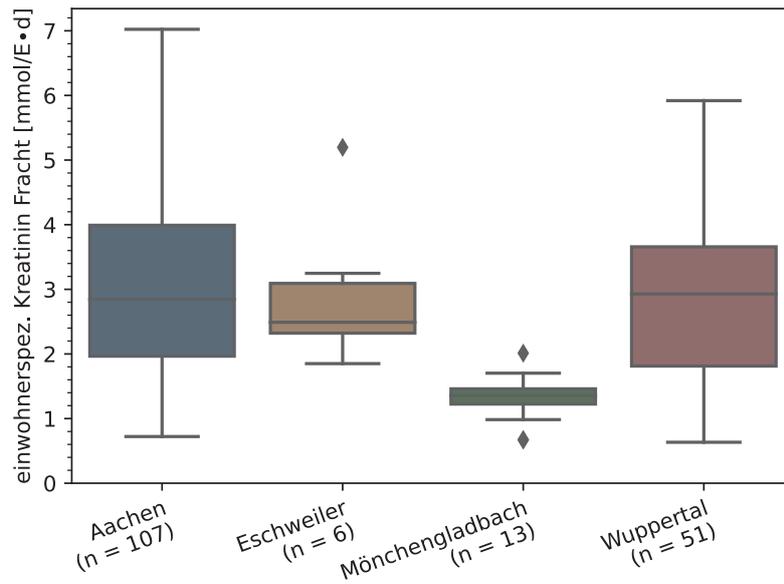


**Abbildung II.9: Übersicht der Messung der Leitfähigkeit**

In Abbildung II.10 ist die einwohnerspezifische Harnstoff-Fracht aufgeführt. Die Mediane der Kläranlagen liegen vergleichsweise nahe beieinander. Zwischen den Kläranlagen sind keine Unterschiede erkennbar, wohingegen die einwohnerspezifische Kreatinin-Fracht ein anderes Bild darstellt (Abbildung II.11). Eine Vergleichbarkeit konnte hier nicht festgestellt werden.

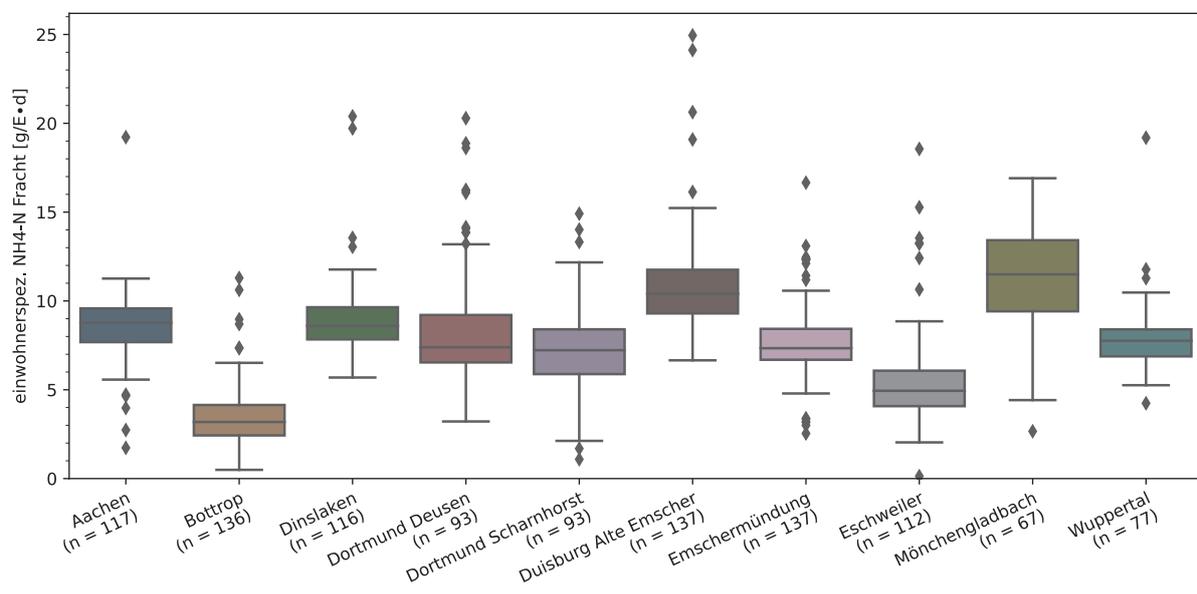


**Abbildung II.10: Übersicht der Messung des einwohnerspezifischen Harnstoffes für vier untersuchte Kläranlagen**



**Abbildung II.11: Übersicht der einwohnerspezifischen Kreatinin-Fracht für vier untersuchte Kläranlagen**

Auch die gemessenen Ammoniumkonzentrationen wurden auf eine einwohnerspezifische Fracht umgerechnet (Abbildung II.12). Die Spannweite der einzelnen Kläranlagen ist weit und zwischen den Kläranlagen sind die Unterschiede hoch.



**Abbildung II.12: Übersicht der einwohnerspezifischen Ammoniumfracht für vier untersuchte Kläranlagen**

Um die Eignung der Crassvirales als Normalisierungsparameter zu beurteilen, müssen zeitliche, räumliche und saisonale Schwankungen betrachtet werden. Die zeitliche Konstanz der Crassviralen Konzentration wurde von Ahmed et al. (2021) und Langeveld et al. (2021) Langeveld et al. (2023) in Untersuchungen bestätigt. Auch Greenwald et al. (2021) konnte zeigen, dass die räumlichen Schwankungen der Viruskonzentration im Vergleich zu anderen

Normalisierungsbiomarkern konstanter sind, weltweit sind aber auch größere Schwankungen detektiert worden. Eine Saisonalität konnte nicht detektiert werden (Ballesté et al. 2019). Somit zeigen die Forschungen, dass die Crassvirales in der Umwelt stabil sind und als Normalisierungsparameter verwendet werden können.

In Situationen, in denen keine Abflussdaten verfügbar sind, kann laut Langeveld et al. (2021) auch eine direkte Normalisierung anhand des Verhältnisses SARS-CoV-2/Crassvirales vorgenommen werden. Die Daten zeigen einen ähnlichen Median zwischen den Kläranlagen und auch Min- und Max-Werte, die miteinander vergleichbar sind, ähnlich der Daten des Harnstoffs. Für eine Normalisierung wären daher sowohl die Crassvirales (Abbildung II.13) als auch die PMMoV (Abbildung II.14) geeignete Normalisierungsparameter.

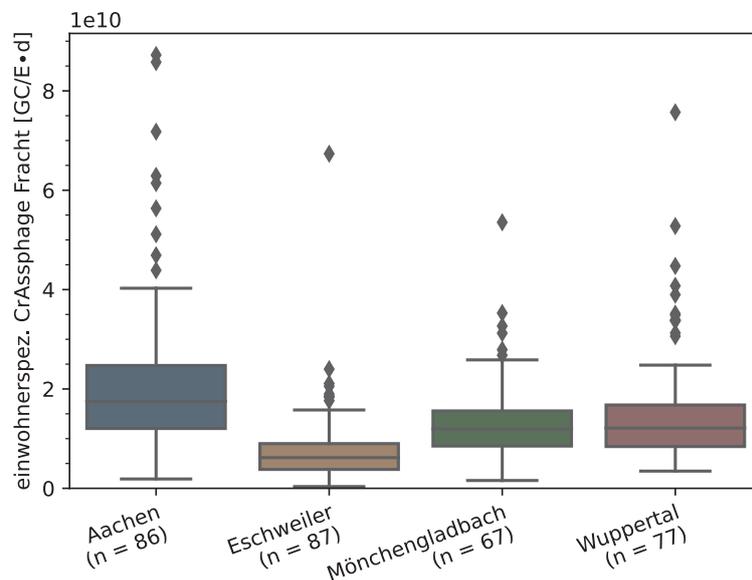


Abbildung II.13: Übersicht der Messung der Crassvirales für vier untersuchte Kläranlagen

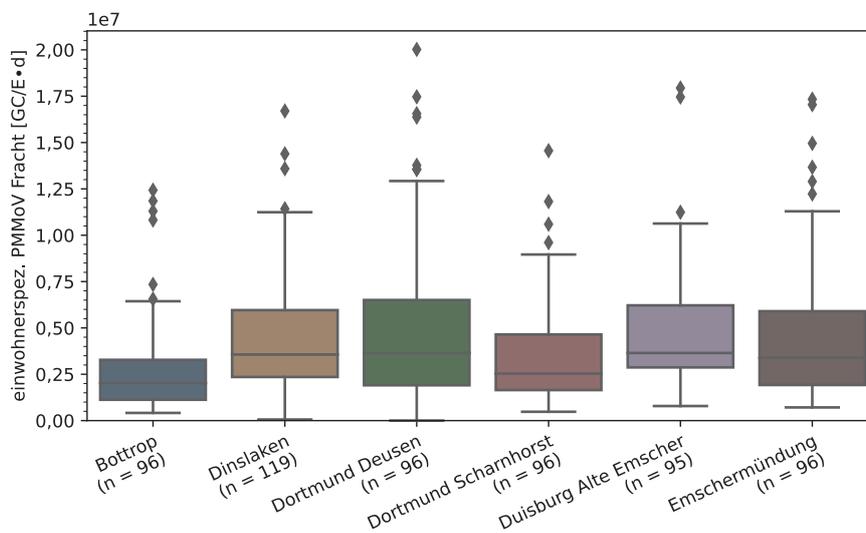


Abbildung II.14: Übersicht der Messung des PMMoV für sechs untersuchte Kläranlagen

### II.1.4 Durchführung und Auswertung eines Laborvergleichs

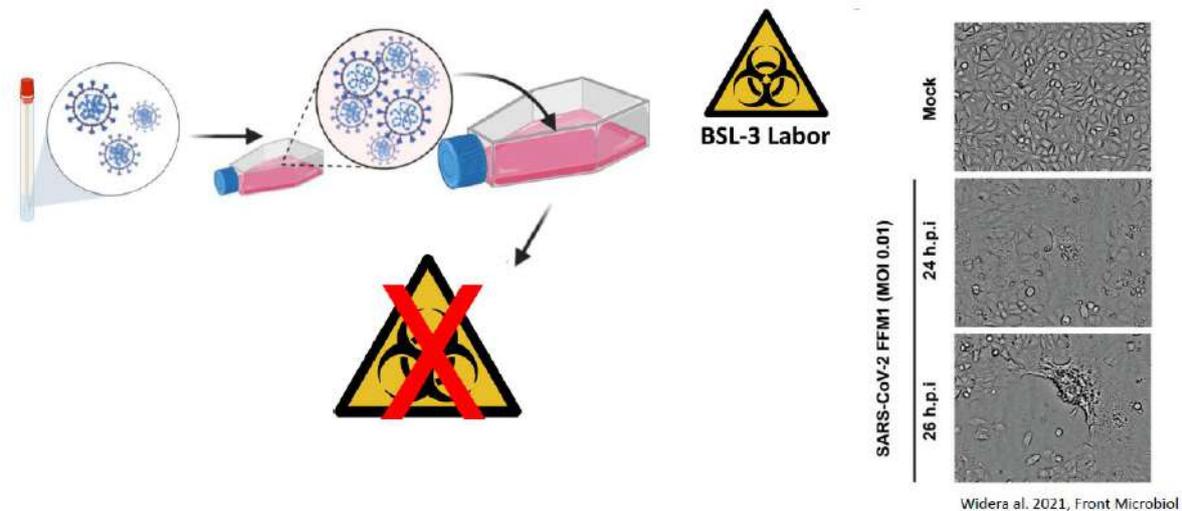
Für die Extraktion von Nukleinsäuren aus Abwasserproben gibt es ein breites Spektrum an veröffentlichten, selbst entwickelten RNA-Isolierungsmethoden sowie kommerziell erhältlichen Komplettlösungen (Philo et al. 2021; Whitney et al. 2021). Unabhängig davon, ob eine kommerzielle oder eine öffentlich zugängliche Methode verwendet wird, sind die Genauigkeit und Konsistenz der Analyseergebnisse von entscheidender Bedeutung. Um die Konsistenz der Ergebnisse zu überprüfen und die Genauigkeit der Analysemethode zu bewerten, können Laborvergleiche durchgeführt werden, bei denen dieselben Testproben in mehreren unabhängigen Labors gemessen werden. Diese Laborvergleiche ermöglichen es, potenzielle Diskrepanzen und Fehler in den Analyseergebnissen zu ermitteln, die auf eine Vielzahl von Faktoren wie Probenvorbereitung, Isolierung oder Analysemethode in einem Labor zurückzuführen sein können. Daher können Laborvergleiche dazu beitragen, die Qualität und Zuverlässigkeit fehleranfälliger Testmethoden zu verbessern, indem sie die Schwächen und Stärken hervorheben und Verbesserungsmöglichkeiten aufzeigen.

Im Rahmen von COVIDready wurden insgesamt zwei Laborvergleiche mit Rückstell-Abwasserproben aus Zeiten mit geringer COVID-19-Inzidenz durchgeführt, die mit hitzeinaktivierten authentischen SARS-CoV-2-Varianten in unterschiedlichen Konzentrationen und Verhältnissen gespiked wurden. Die gespikten Proben wurden verblindet und an teilnehmende Labore für PCR- und/oder NGS-Analyse verschickt. Die übermittelten Ergebnisse wurden für den Laborvergleich verwendet.

Die Vorbereitung und der Versand gespikter Abwasserproben im Rahmen der beiden Laborvergleiche wurde seitens KGU ausgerichtet. Die Durchführung und Auswertung der Laborvergleichsergebnisse sind nachfolgend dargestellt.

Unter BSL3-Konditionen wurden suszeptible Zellen mit Patientenprobenmaterial infiziert (Wilhelm et al., 2022c) und der virushaltige Zellkulturüberstand mit zuvor etablierten Methoden inaktiviert (Widera et al., 2021). Die inaktivierten Viren wurden anschließend für Sensitivitäts- und Spezifitätsanalysen eingesetzt und als Ausgangsmaterial für das Spiken von Abwasserproben verwendet.

### II.1.4.1.1 Laborvergleich 1: Projektinterner Laborvergleich



**Abbildung II.15: Herstellung authentischer SARS-CoV-2-Viren und Inaktivierung**

Ein erster Laborvergleich zum Nachweis von SARS-CoV-2 im Abwasser wurde am 13.09.2021 durch das KGU ausgerichtet. Hierfür wurden am LV Abwasserproben (wegen niedriger Inzidenz vermeintlich negativ) entnommen und am 24.08.2021 am KGU zugestellt (4°C). In einem Vorversuch wurden die Abwasserproben erfolgreich mit inaktiviertem SARS-CoV-2 gespikt (Abbildung II.15), wobei ein Vorab-Test mittels RT-qPCR eine proportionale Verringerung der Ct-Werte zeigte. Die Abwasserproben wurden auf Konzentrationen mit hitzeinaktivierten parentalen SARS-CoV-2 B (FFM1) oder SARS-CoV-2 B.1.617.2 (Delta) gespikt, die zuvor charakterisiert und sequenziert worden sind (Toptan et al. 2020; Wilhelm et al. 2021). Die Konzentrationen wurden mittels RT-dPCR wie folgt bestimmt: Probe 1:  $6 \times 10^6$  Kopien/L (100 % FFM1); Probe 2:  $6 \times 10^7$  Kopien/L (90 % Delta, 10 % FFM1); Probe 3: negativ; Probe 3:  $6 \times 10^5$  c/L (100 % FFM1). Zwischen dem berechneten Input und der gemessenen SARS-CoV-2-RNA-Menge konnte ein deutlicher Unterschied von mehreren log-Stufen nachgewiesen werden, was auf starke Nuklease-Aktivität im Abwasser zurückzuführen ist. Anhand dieser Vorwerte wurden 4 Laborvergleich-Proben gespikt und an das ISA und LV versandt (06.09.2021). Die Zustellung der Proben an beide Labore wurde unter Einhaltung der Kühlkette bestätigt. Die Messung der Proben wurde für den 09.09.2021 vereinbart, wobei das ISA bis dahin noch nicht am Laborvergleich teilnehmen konnte. Die Auswertung der Proben wurde am 29.09.2021 besprochen, wobei die Ergebnisse des Laborvergleichs zwischen KGU und LV bei Mehrfachbestimmungen (n=3) mit einem Target (N2) gute Übereinstimmungen ergaben. Die Tendenzen der Proben konnten in den mit hohen und intermediären Mengen gespielter SARS-CoV-2 RNA qualitativ gut wiedergegeben werden. Mangels Kalibrierungsstandard am LV konnte jedoch noch keine Kopienzahl verglichen werden.

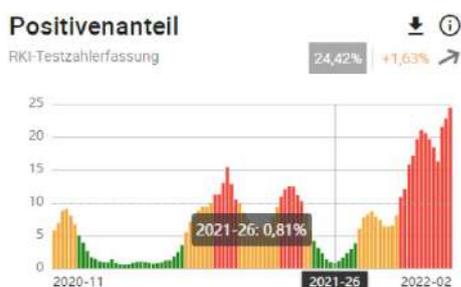
### II.1.4.1.2 Laborvergleich 2: Qualitätskontrolle durch realitätsnahen Laborvergleich mit gespiktem Abwasser



**Abbildung II.16: Proben für die Qualitätskontrolle durch realitätsnahen Laborvergleich mit gespiktem Abwasser**

Ein weiterer Laborvergleich zum Nachweis von SARS-CoV-2-Varianten im Abwasser wurde durch KGU ausgerichtet. Hierfür wurden Rückstell-Abwasserproben aus Zeiten niedriger Inzidenz und Negativität für die Omikron-Variante (KW26/2021) als Ausgangsmaterial ausgesucht und durch EGLV zur Verfügung gestellt.

Die SARS-CoV-2-Subvariante von Omikron (BA.2) wurde kurz nach dem Auftreten der BA.1-Variante identifiziert. Eine Anzucht in Zellkultur und RNA-Isolierung für weitere PCR-Analysen und Laborvergleiche ist am KGU geglückt. Erweiterte RT-dPCR-Analysen der Abwasserproben, die anhand der Positionen E484A, T547K und H655Y zwischen den Subvarianten BA.1 und BA.2 sowie Delta unterscheiden können, wurden auf Spezifität überprüft (siehe auch Methodenentwicklung und Anwendung dPCR).



**Abbildung II.17: Qualitätskontrolle- Realitätsnaher Laborvergleich mit gespiktem Abwasser. A) Positivenanteil zur Zeit der Nullprobenahme (Quelle: RKI-Dashboard). B) Erhaltene Proben, angekommen unter Einhaltung der Kühlkette am Beispiel KWR (NL)**

Wegen niedriger Inzidenz und vermeintlicher Negativität für die Omikron-Varianten wurde KW26/2021 als Ausgangsmaterial ausgesucht (Abbildung II.17). Mehrere Liter dieser Proben werden am 26.01.2022 am KGU zugestellt (4°C). Mehrere Liter dieser Proben wurden Ende Januar 2022 am KGU mit inaktiviertem, authentischem SARS-CoV-2 Beta, Delta sowie Omikron BA.1 und BA.2 in verschiedenen Konzentrationen gespikelt (Abbildung II.18). Nach hausinterner Qualitätskontrolle konnten die Proben an alle Laborvergleichsteilnehmer zum Zweck der Viruslastquantifizierung (quantitativ) sowie Virusvariantennachweis (qualitativ) an die vorgesehenen Labore (KGU, ISA, LV sowie in Unterauftrag an KWR (Niederlande)) und die weiteren Teilnehmer (vgl. FiW AP1) verschickt und der Laborvergleich im Februar 2022 durchgeführt werden. Die Ergebnisauswertung vom 02.03.2022 (Abbildung II.19 + Abbildung II.20) belegt recht hohe Vergleichbarkeit in der Tendenz bzw. hinsichtlich der Kopienzahlbestimmung. Unter Einsatz verschiedener Methoden (RT-qPCR, dPCR, ddPCR) und Verwendung individueller Testkits konnten alle teilnehmenden Labore eine prinzipiell korrekte Konzentrationsabstufung der untersuchten Proben angeben.

Für den quantitativen (RT-dPCR und RT-ddPCR) und semiquantitativen (RT-qPCR) Nachweis der Varianten wurden mehrere variantenspezifische Primer und Sonden verwendet, die die Spike-Substitutionen  $\Delta 69/70$ , G339D, K417N, L452R, N501Y, H655Y, N856K detektieren (Abbildung II.19A-E). Zusätzlich wurde eine Omikron-spezifische Multiplex-PCR (OmMet) eingesetzt. Der semiquantitative Nachweis viraler Varianten ohne Angabe von Genomkopie-Äquivalenten, aber mit Angabe des qualitativen Nachweises wurde mit RT-qPCR für  $\Delta 69/70$ , K417N, L452R und N501Y durchgeführt. Sowohl bei den Laboren, die variantenspezifische digitale RT-PCR durchführen, als auch bei den klassischen RT-qPCR-Analysen traten allerdings Bestimmungsfehler auf, die zu einer falschen Interpretation der detektierten Varianten führten (Abbildung II.20E). Insbesondere bei den häufig verwendeten Assays für N501Y und  $\Delta 69/70$  wurde keine Korrelation zwischen der verwendeten PCR-Methode und der Validität der erhobenen Daten festgestellt.

Abhängig von den verwendeten Primer/Sonden-Paaren (K417N, N501Y,  $\Delta 69/70$ , H655Y, G339) konnten zwei Laboratorien (4 und 6) die Probe 2 mit der höchsten SARS-CoV-2-RNA-Konzentration mittels eines schrittweisen Ausschlussverfahrens als Beta identifizieren.

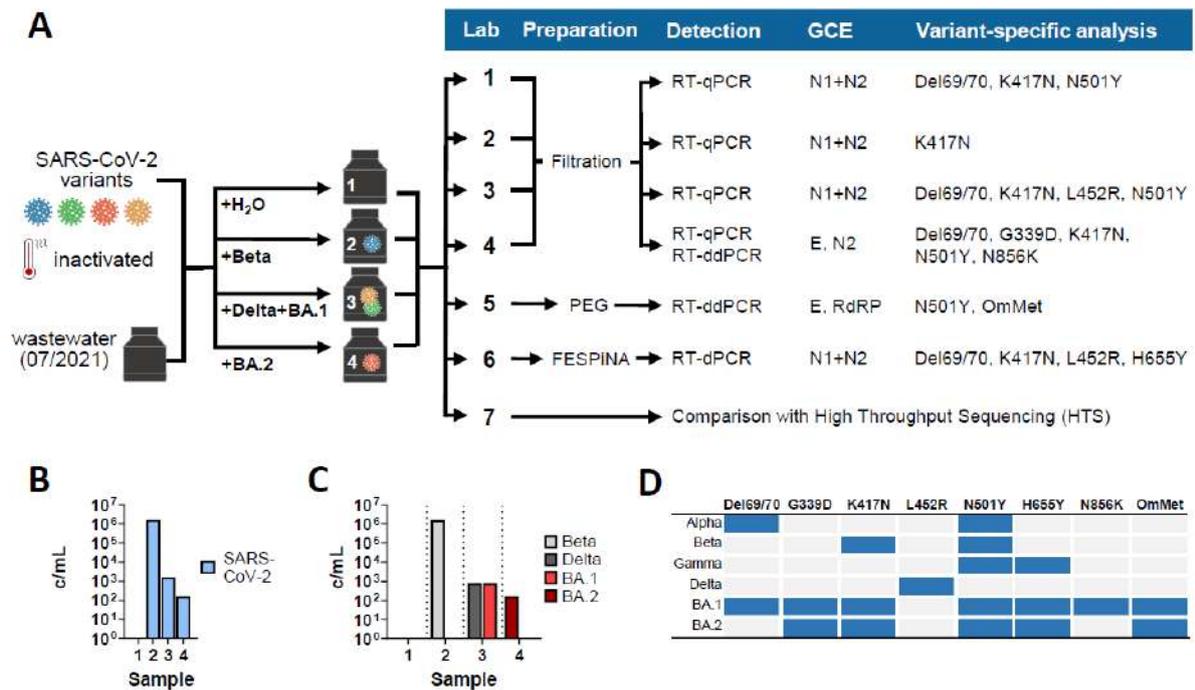
Bei Probe 3, die mäßige Mengen an Delta und BA.1 enthielt, wie sie in Zeiten geringerer Inzidenzen beobachtet wurden, wurde das Vorhandensein von BA.1-verbundenen Substitutionen (K417N,  $\Delta 69/70$ , H655Y, N501Y, OmMet, G339D, N856K) überwiegend korrekt nachgewiesen. Bemerkenswert war, dass 15 von 18 durchgeführten BA.1-bezogenen PCR-Tests erfolgreich BA.1 nachweisen konnten. Der Test für L452R, der ausschließlich von Labor 6 (KGU) durchgeführt wurde, wies SARS-CoV-2 Delta korrekt nach, auch wenn unter Angabe einer geringeren relativen Mutantenfraktion als für Probe 3 erwartet (Abbildung II.19).

Probe 4, die so aufbereitet war, dass sie in etwa der Nachweisgrenze entsprach, war mit geringsten Mengen der Omikron BA.2-RNA gespikelt. Das Vorhandensein von BA.2 konnte von den meisten Laboren sowohl mit RT-qPCR als auch mit RT-dPCR oder RT-dPCR mit dem Assay für K417N erfolgreich nachgewiesen werden (Abbildung II.19). Darüber hinaus waren die Assays für G339D sowie OmMet für einen sehr empfindlichen Nachweis von BA.2 in Abwasser geeignet. Nur 50% der N501Y-spezifischen Assays waren in der Lage BA.2 nachzuweisen, während der Assay spezifisch für die Del69/70-Position im SARS-CoV-2-Spike in 50 % der Assays falsch-positiv nachgewiesen wurde. Auch der Test für N856K, der für die Omikron-Untervariante BA.1 spezifisch ist, führte bei der Untersuchung der Probe 4 zu einem falsch-positiven Signal.

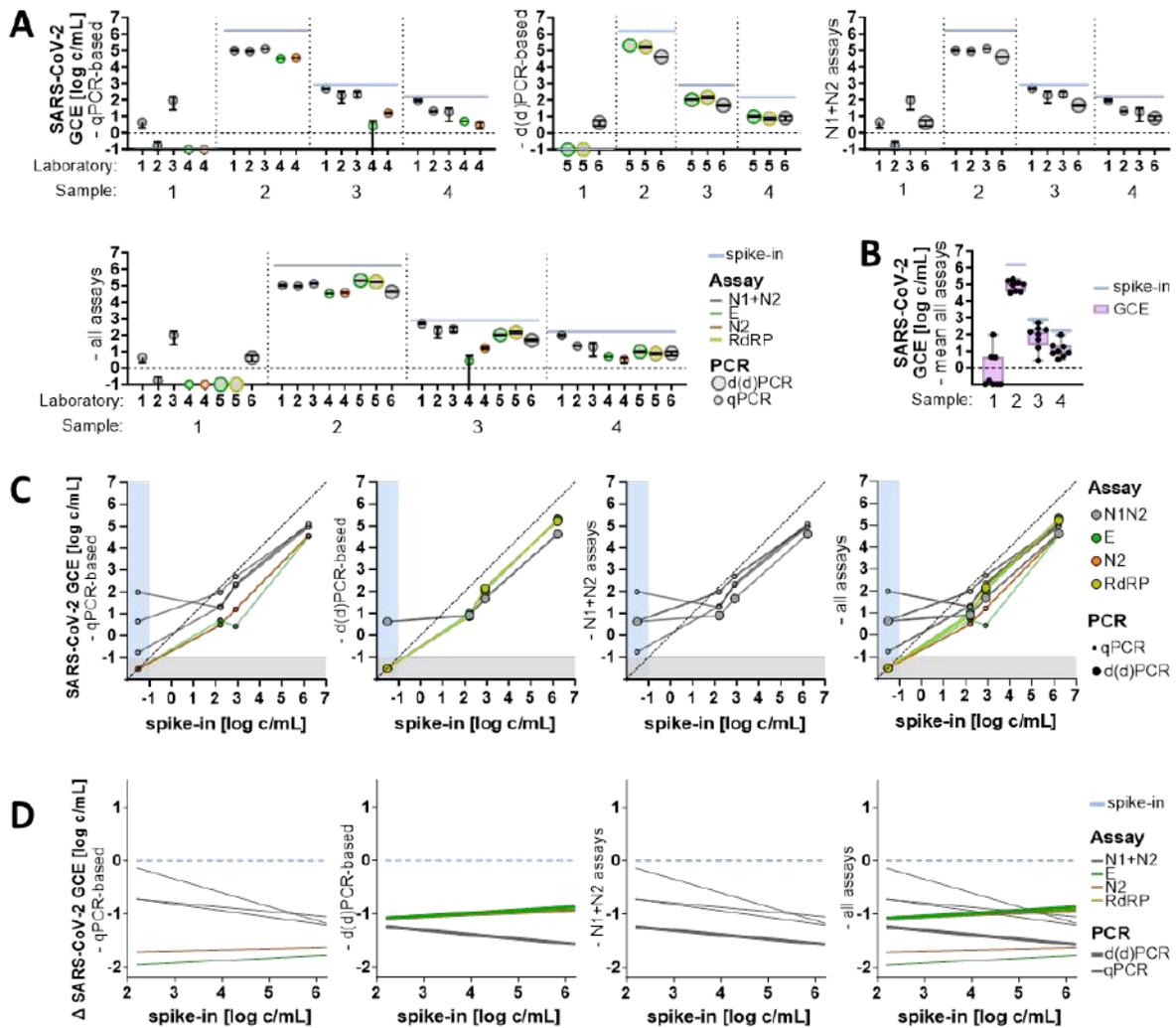
Insgesamt waren die meisten Labore in der Lage, SARS-CoV-2-variantenspezifische Mutationen auch in Proben mit geringer Spike-in-Menge zuverlässig nachzuweisen. Die Ausfälle standen nicht im Zusammenhang mit der angewandten PCR-Methode, sondern mit der Performance des zugrunde liegenden variantenspezifischen PCR-Assays.

### **NGS-Sequenzierung von SARS-CoV-2-Varianten**

Ein NGS-Labor war in der Lage, Probe 2 mit einer Abdeckung von 99 % korrekt als SARS-CoV-2 Beta (B.1.351) zu identifizieren (Figure II.21). Hier lag die höchste Konzentration an gespikelter Virusmenge vor. Bei geringeren Spike-in-Mengen wurde ein Rückgang der sequenzierten Genom-Abdeckung auf 86 % bzw. 57 % für die beiden nacheinander sequenzierten Replikate von Probe 3 beobachtet. Dennoch konnte Probe 3 korrekt als eine Mischung aus Delta und Omikron BA.1 erkannt werden. Die Probe 4 mit niedriger Konzentration konnte jedoch mangels ausreichender Abdeckung (<50 %) als Omikron-Untervariante, nicht aber als BA.2 identifiziert werden. Ein weiteres NGS-Labor war nicht in der Lage korrekte Daten zu SARS-CoV-2-Varianten zu melden (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die Variantenidentifizierung durch NGS-Sequenzierung im Vergleich zur PCR größere Mengen an viraler RNA erfordert und bei einer Analyse mit geringer Genomabdeckung nur eine begrenzte Vorhersagekraft hat.



**Abbildung II.18: Design des Abwasser-Laborvergleichs.** A) Schematische Darstellung des Versuchsplans mit den inaktivierten authentischen SARS-CoV-2-Varianten Beta, Delta und Omicron BA.1 und BA.2. B) Errechnete Spike-in Menge von hitzeinaktivierten SARS-CoV-2 Varianten. C) Variantenspezifische Spike-in Menge von SARS-CoV-2 Beta, Delta, BA.1 und BA.2. D) Von den teilnehmenden Laboren untersuchte SARS-CoV-2 Spike-Mutationen und Vorkommen in von bis Februar 2022 aufgetretenen SARS-CoV-2 VoCs.



**Abbildung II.19: Quantitativer Nachweis von SARS-CoV-2-Genom-Kopienäquivalenten.** A) RT-PCR-basierter quantitativer Nachweis von SARS-CoV-2-Genomkopieäquivalenten (GCE) für jedes teilnehmende Labor. B) Zusammenfassung der ermittelten SARS-CoV-2 GCE aller teilnehmenden PCR-Labore (95 % Konfidenzintervalle, Fehlerbalken zeigen die Spanne der geringsten und höchsten gemessenen Konzentration, schwarze Punkte entsprechen einzelnen quantitativen SARS-CoV-2 GCE Assays). C) +D) Relation von gemessenen SARS-CoV-2 GCE und errechneter Spike-in Menge.

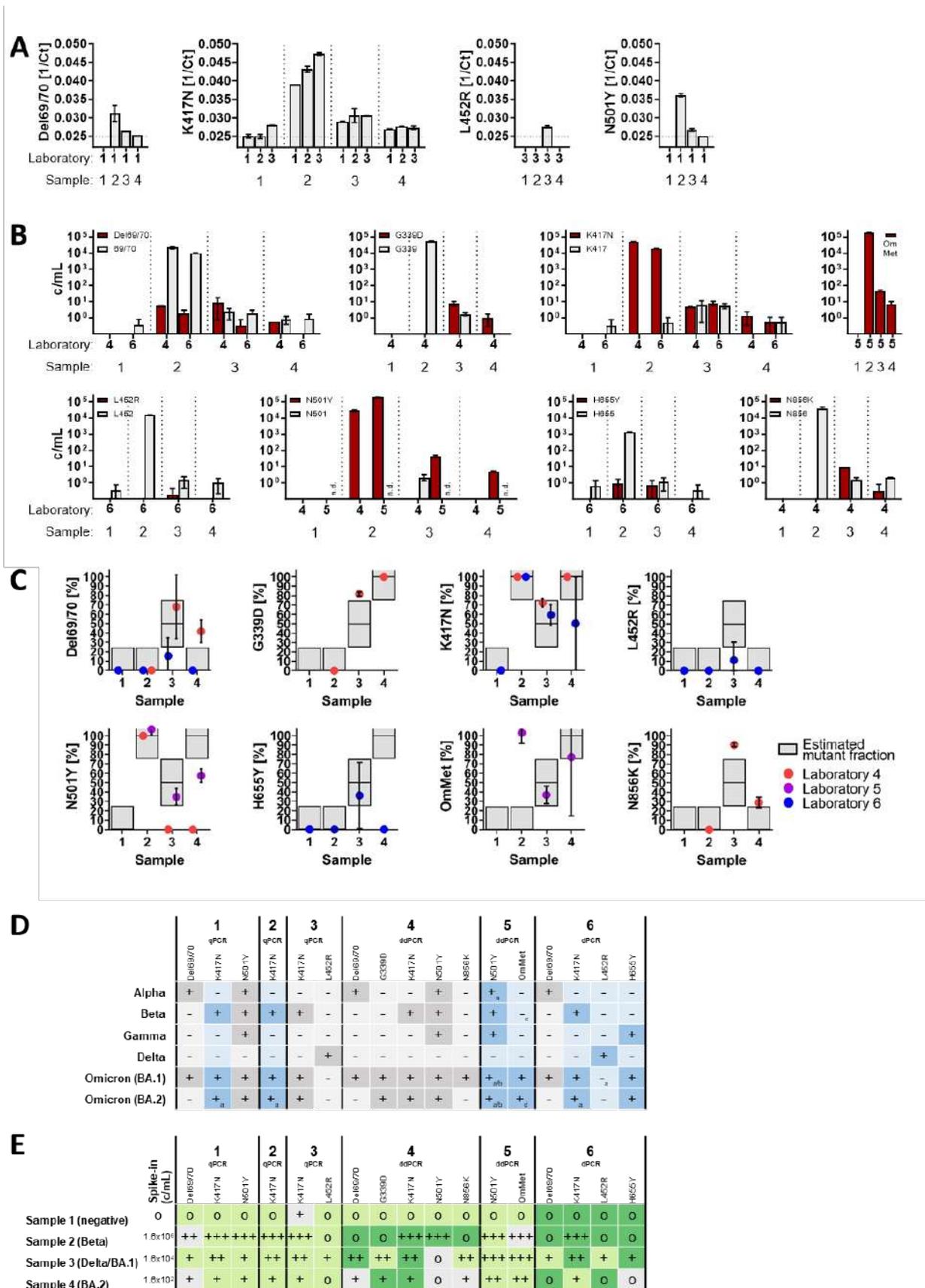


Abbildung II.20: Qualitative Analyse der SARS-CoV-2-Varianten. A-C) Nachweis von SARS-CoV-2-Spike-Substitutionen, die in allen Labs analysiert wurden. Die entsprechende Nachweismethode (RT-qPCR, RT-dPCR oder RT-ddPCR) ist angegeben.

Die folgenden SARS-CoV-2 Spike (S)-Substitutionen wurden mit variantenspezifischen Primern und Sonden untersucht, die in allen teilnehmenden Labors verwendet wurden: A) K417N, B) N501, und C)  $\Delta$ 69/70. D) Evaluierung der eingesetzten PCR-Primer/Sonden. Hell- bzw. dunkelblau weist auf die Abwesenheit bzw. Anwesenheit der entsprechenden Mutation in allen bis Februar 2022 auftretenden SARS-CoV-2 VoCs hin. Fehlende Sequenzinformationen kommerzieller Primer/Probes ist in grau hervorgehoben. Erwartete Effekte auf Assay Spezifität und Sensitivität (a, d = geringer Effekt, b-c = moderater Effekt). E) Zusammenfassung der PCR-bestimmten relativen Anteile der angegebenen SARS-CoV-2-Spike-Substitutionen. Grau = falsch-positives/negatives Ergebnis, hellgrün = korrekte Bestimmung von Abwesenheit/Anwesenheit der entsprechenden Mutation, dunkelgrün = korrekte Bestimmung der Anwesenheit/Abwesenheit der entsprechenden Mutation innerhalb des gewählten Toleranzbereiches von 25 %.

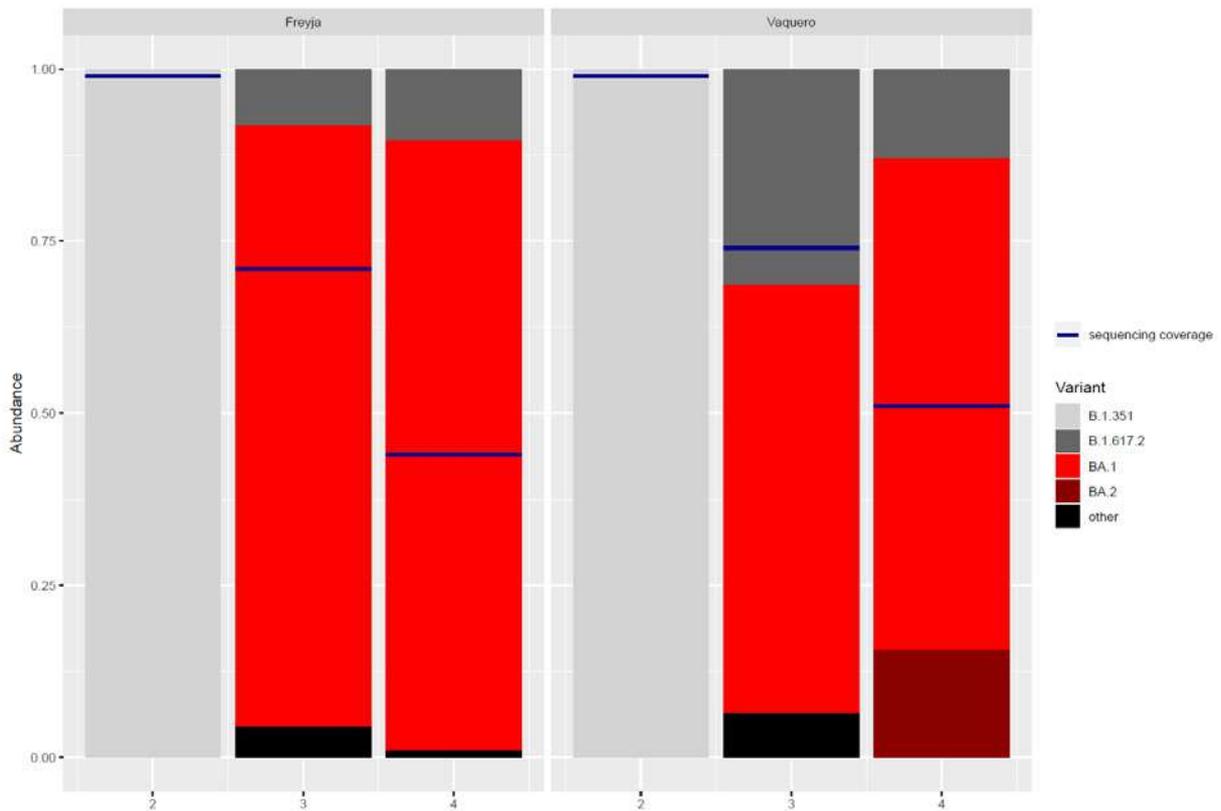


Abbildung II.21: Genomanalyse von SARS-CoV-2-Varianten aus gespiktem Abwasser.

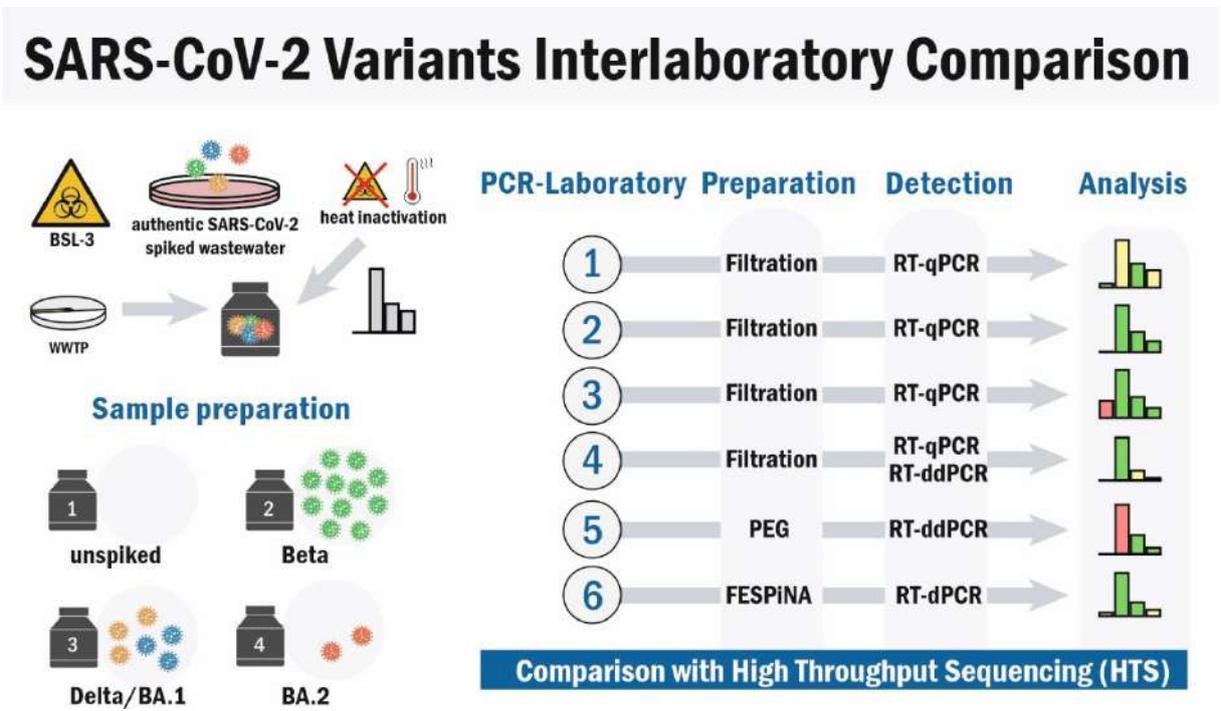


Abbildung II.22: Zusammenfassung der Ergebnisse des zweiten Laborvergleiches (vgl. Wilhelm et al., 2023, STOTEN)

### II.1.5 Zusammenfassung der Kernergebnisse des Arbeitspakets

Der etablierte Workflow zum SARS-CoV-2-Abwassermonitoring ist mit vergleichsweise überschaubarem Aufwand in gut ausgebauten abwassertechnischen Analytik-Laboren möglich. Die Methodik ist erlernbar und kann auch von Laborpersonal ohne bisherige Erfahrung in molekularbiologischer Analytik erlernt und durchgeführt werden. Die Auswertung und Interpretation der Ergebnisse erfordert eine detaillierte und aufwendigere Einarbeitung und sollte immer in Kooperation mit Experten erfolgen. Neben der SARS-CoV-2-Analytik können neben den normalen Standardparametern bei Abwässern gegeben falls die Harnstoffkonzentration oder die Crassvirales als Normalisierungsparameter ergänzend gemessen werden. Ein Bedarf zur Normalisierung gab es in diesem Projekt jedoch nicht.

Die Methodik wurde im Rahmen von Standardverfahrensanweisungen im Umweltanalytischen Laboratorium des ISA und im Kooperationslabor von Emschergenossenschaft und Lippeverband mit dem Ruhrverband dokumentiert. Die Verfahrensanweisungen ermöglichen, ergänzt um einen fertiggestellten Kurzfilm zur Dokumentation des Workflows, dessen Etablierung auch in weiteren Laboren. Das Video zum Workflow der RT-qPCR wurde mit Texteinblendungen in deutscher Sprache versehen (<https://covidready.de/>). Das Workflow-Video basiert auf einer textlichen Zusammenfassung des Laborablaufs durch den LV und wurde um Anmerkungen von ISA und KGU ergänzt. Als Zielpublikum wurden große Abwasserentsorger identifiziert, die eigene Laborkapazitäten aufbauen möchten. Entsprechend hat das Video den Charakter eines textbegleitenden Schulungsvideos zur Etablierung des Workflows und steht nicht für sich allein.

In dieser Studie haben wir einen Vergleich zwischen Laboren durchgeführt, die auf PCR- und NGS-basierte abwasserepidemiologische Analysen von SARS-CoV-2 und deren Varianten spezialisiert sind. Gefrorene Rückstellproben aus Zeiträumen mit geringer COVID-19-Inzidenz wurden mit verschiedenen inaktivierten authentischen SARS-CoV-2-Varianten in abgestuften Konzentrationen und Verhältnissen versetzt. Die Proben wurden zur Analyse mit laborspezifischen Methoden an die teilnehmenden Laboratorien geschickt, und die gemeldeten viralen RNA-Genomkopien und der Nachweis viraler Varianten wurden mit den erwarteten Werten verglichen. Trotz unterschiedlicher Isolierungs- und Nachweismethoden in den teilnehmenden Laboren konnte eine hohe Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit der abwasserbasierten SARS-CoV-2-Genom-Kopienäquivalentmessungen nachgewiesen werden.

Die PCR-basierte Genotypisierung war in Abhängigkeit von der zugrundeliegenden PCR-Assay-Qualität in der Lage, den relativen Anteil variantenspezifischer Substitutionen auch in Proben mit geringer Spike-in-Menge vorherzusagen. Die Identifizierung von Varianten durch

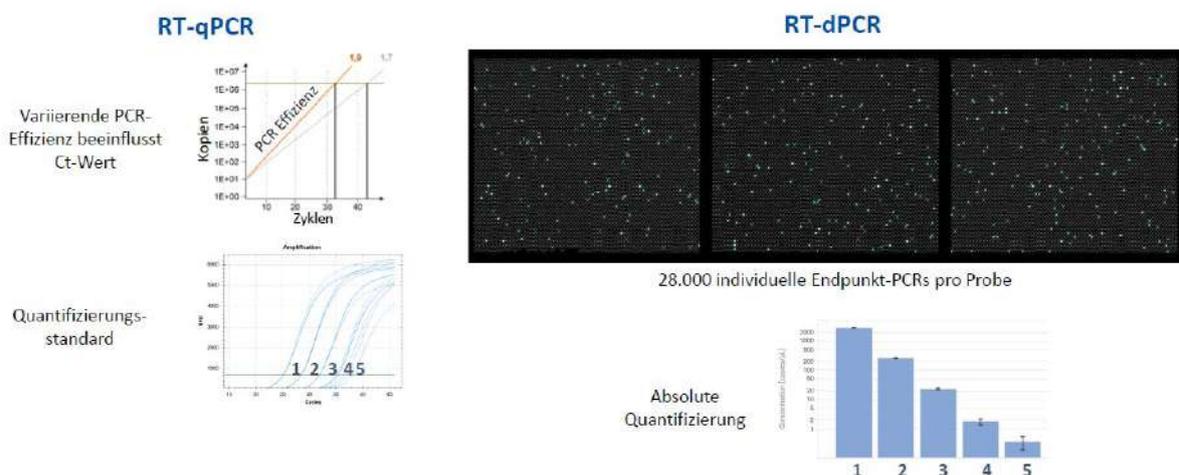
NGS-Sequenzierung erforderte jedoch große Mengen an viraler RNA und hatte einen begrenzten Vorhersagewert, wenn die Analyse bei geringer Genomabdeckung durchgeführt wurde.

Zusammenfassend zeigt der Laborvergleich, dass trotz unterschiedlicher Extraktions- und Analysemethoden eine hohe Übereinstimmung der SARS-CoV-2-Genomkopieäquivalente erreicht werden konnte. Daher ist ein dezentraler Ansatz zur Überwachung des SARS-CoV-2-Abwassers aus unserer Sicht geeignet, um vergleichbare Analyseergebnisse zu erzielen. Eine vorherige Qualitätskontrolle der einzelnen Arbeitsabläufe ist für eine korrekte Variantenvorhersage unerlässlich. Da das Abwasser-Monitoring zu einem Routinetest für die SARS-CoV-2-Surveillance geworden ist und für Schutz- und Präventionsmaßnahmen bei künftigen Pandemien eingesetzt werden könnte, empfehlen wir die Durchführung obligatorischer Qualitätskontrollen und realistischer Vergleiche zwischen den Labors für relevante Analysen unter Verwendung negativer Abwasserproben, die mit authentischen Viren versetzt sind.

## II.2 Methodenentwicklung und -anwendung dPCR

### II.2.1 Etablierung von dPCR für Mutantennachweis in Abwasser

Der Begriff der digitalen RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) beschreibt eine Methode, die es erlaubt die absolute Menge bestimmter RNA-Moleküle in einer Probe zu quantifizieren. Im Gegensatz zur traditionellen RT-PCR, in der das Gesamtvolumen der Probe in einer einzigen Reaktion verwendet wird, ermöglicht die digitale RT-PCR die Aufteilung der Probe in mehrere tausend Kompartimente, in denen einzelne Reaktionen stattfinden. Hierbei wird anhand einer Fluoreszenzdetektion die Anzahl PCR-positiver Kompartimente als Grundlage der absoluten Quantifizierung in der zu untersuchenden Probe enthaltenden RNA-Moleküle verwendet (Abbildung II.23). Im Rahmen des Arbeitspakets AP2 sollte ein PCR-Gerät („*QIAcuity One*“ der Fa. Qiagen) zur digitalen PCR-Analytik von SARS-CoV-2-Genomkopieäquivalenten getestet werden. Hierbei sollten die potenziellen Vorteile der hohen Amplifikationseffizienz, der Unempfindlichkeit gegenüber PCR-Inhibitoren, sowie hohe Sensitivität evaluiert werden. Ferner sollten Multiplex-Analysen zur Bestimmung der Frequenz von SARS-CoV-2-Varianten eingesetzt werden. Die Sensitivität und Spezifität dieser Variantennachweise sollte durch „Spiken“ von SARS-CoV-2 negativen Abwasserproben mit inaktiviertem Virusmaterial (authentische SARS-CoV-2-Viren inkl. Varianten) auch innerhalb von internationalen Laborvergleichen evaluiert werden.



**Abbildung II.23: Vor- und Nachteile der Amplifikation und Detektion von SARS-CoV-2-RNA mittels RT-qPCR und RT-dPCR**

Mittels klassischer RT-qPCR-Analytik wurde parallel mit dem Vergleich von Testkits zur Detektion von SARS-CoV-2 und deren Varianten begonnen und Reagenzienvergleiche (Promega versus Qiagen) ausgewertet. Das digitale PCR-Gerät „*QIAcuity One*“ der Fa. Qiagen (dPCR) wurde am 02.09.2021 geliefert und installiert. Ein Geräte-Training erfolgte am 03.09.2021. Die initiale Testung mittels CDC N1/N2- Primern separat im FAM- und Cy5-Kanal konnte bei Einsatz der *26K Nanoplates* mit dem *QIAcuity One-Step Viral RT-PCR Kit* der Fa.

Qiagen erfolgreich etabliert werden. Seit dem 06.09.2021 wurden kontinuierlich Optimierungen hinsichtlich der Methodenbedingungen der SARS-CoV-2-Varianten-Analytik durchgeführt. Die Optimierungen wurden auf folgende Prozessierungsschritte angewandt:

- 1) Extraktion der RNA: Initial wird die virale RNA aus der Abwasserprobe gereinigt, aufkonzentriert und isoliert.
- 2) Reverse Transkription: Die isolierte RNA wird mittels des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA (komplementäre DNA) umgewandelt (erfolgt zusammen mit Schritt 3; One-Step-Verfahren)
- 3) Primerssetup und Amplifikation: Innerhalb jeder Reaktionskammer (Kompartimente) wird die cDNA separat amplifiziert. Nach abgeschlossener Amplifikation werden fluoreszierende Farbmarker verwendet, um PCR-positiven Kompartimente zu detektieren.
- 4) Detektion und Analyse: Durch die Analyse der Anzahl der positiven und negativen Kompartimente kann die Anzahl der RNA-Moleküle in der ursprünglichen Probe berechnet werden. Das Signal-Rausch-Verhältnis ist hierbei entscheidend.

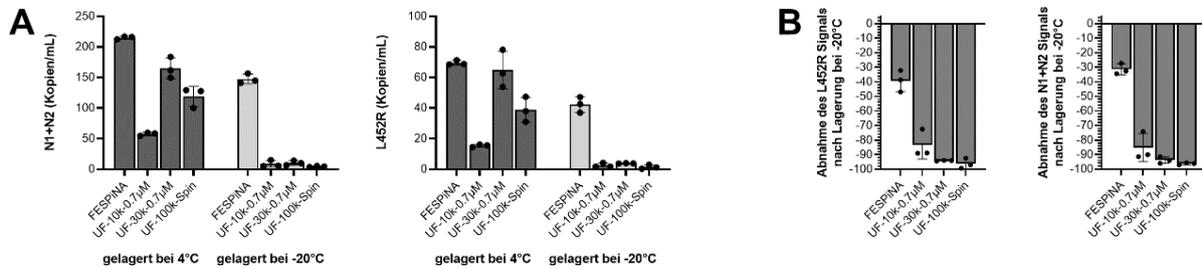
Diese Einzelschritte wurden im Rahmen der Methodenetablierung optimiert und sind nachfolgend beschrieben.

### II.2.1.1 Probenvorbereitung und Extraktion der Nukleinsäuren

Ein essenzieller Schritt der Feinanalytik ist die Probenaufbereitung. Hierzu wurden zunächst Verfahren zur Isolation der im Abwasser-befindlichen viralen Nukleinsäuren zur maximalen Sensitivitätssteigerung optimiert. Die Qualität der Template-RNA ist hierbei wichtig, um eine effiziente PCR ohne Anwesenheit inhibitorischer Störfaktoren zu gewährleisten.

Die gängige, aber aufwendige Ultrafiltration-basierte bzw. Amicon-Säulen basierte Methode wurde in Verbindung mit kommerziell erhältlichen Kits (u. a. der Firmen Promega und Qiagen) hinsichtlich Ihrer Effizienz getestet. Anschließend wurden die Isolationsverfahren bezüglich ihrer Ausbeute (Menge der SARS-CoV-2-Genomkopieäquivalente) hin verglichen. Zunächst wurden Optimierungen der Isolationsmethodik durchgeführt und verschiedene Amicon-Röhrchen (10kDa - 100kDa) zur Aufkonzentrierung der Abwasserproben miteinander verglichen. 30kDa und 100kDa erzielten hierbei im Vergleich zu 10kDa-Röhrchen die höchste Ausbeute (Abbildung 1). Parallel wurde die sogenannte 4S-Methode (Sewage, Salt, Silica, and SARS-CoV-2 (4S) getestet, die eine einfache und zeitsparende Methode für Probenaufbereitung mit hoher Ausbeute darstellen kann (Whitney et al. 2021). Die ersten Testversuche führten jedoch zum irreversiblen Verstopfen der Silicamembranen, sodass die Methode verbessert und insbesondere die Vorfiltration verfeinert werden musste. Das Endprotokoll wird im Nachfolgenden als FESPiNA bzw. Direct capture bezeichnet (Filtrated Ethanol Salt Precipitation-based isolation of Nucleic Acids). Im Gegensatz zu den Ultrafiltration-basierten Methoden ermöglicht FESPiNA auch die Isolation von eingefrorenen Rückstellproben (Abbildung II.24 sowie Tabelle II.7). Diese Fähigkeit ist besonders dann relevant, wenn eine retrospektive Analyse der Abwasserproben (ggf. > 1 Jahr Lagerung) erfolgen soll. Eine solche retrospektive Analyse von

Rückstellproben zur Zeit des SARS-CoV-2-Variantenübergangs von Alpha zu Delta wurde im Langzeitverlauf durchgeführt (siehe Kapitel II.2.2). Die Ergebnisse dieser Studie werden zusammen mit den Erkenntnissen aus der Methoden-Optimierung in einem Manuskript veröffentlicht.



**Abbildung II.24: Methodenoptimierung: Effekt der Abwasserlagertemperatur auf die SARS-CoV-2 Viruslast-/Variantenbestimmung**

Im Vergleich zu dem Amicon-Röhrchen stellte sich die FESPINA-Methode in Kombination mit einer auf dem „Wizard Enviro TNA Kit“ (Fa. Promega) basierten RNA-Extraktion als eine einfache und zeitsparende Methode für die Probenaufbereitung von gekühlten Abwasserproben sowie eingefrorenen Rückstellproben dar. Die Testversuche zeigten, dass die Methode sowohl für gespikete als auch authentische Abwasserproben zur SARS-CoV-2-Viruslastbestimmung sowie auch zur Charakterisierung von Virusvarianten bestens geeignet ist.

FESPINA ermöglicht darüber hinaus die Extraktion von SARS-CoV-2-RNA aus bis zu 24 Abwasserproben innerhalb von ca. vier Arbeitsstunden (Tabelle II.7). Ultrafiltration-basierte Methoden benötigen hierfür mit acht Arbeitsstunden erheblich länger.

Eine häufige Komplikation bei der Extraktion von Nukleinsäuren von Abwasserproben ist das Verstopfen der Filter. Insbesondere bei der Verwendung von 10-kDa-Amiconröhrchen kam es trotz vorherigen Zentrifugierens häufig zu verstopften Filtern und somit zu einem vorzeitigen Abbruch der Extraktion von RNA der betreffenden Abwasserprobe. Die Verstopfungsgefahr war sehr hoch bei Abwasserproben mit hohem Feststoffanteil (Tabelle II.7). Die Verwendung von 30kDa- und 100kDa-Amiconröhrchen reduzierte das Risiko verstopfter Amiconfilter, jedoch stieg gleichzeitig das Risiko einer verstopften Silicamembran während der darauffolgenden Aufreinigung von Nukleinsäuren mit kommerziell erhältlichen Kits (u. a. der Firmen Promega und Qiagen). Das finale Protokoll von FESPINA wies insgesamt ein signifikant geringes Risiko verstopfter Filter-, sowie Silicamembranen auf unabhängig von der im Abwasser enthaltenen Feststoffmenge.

**Tabelle II.7: Übersicht der Evaluation verschiedener Methoden zur Abwasserprobenvorbereitung und Extraktion der Nukleinsäuren**

	FESPiNA	UF -10kDa	UF -30kDa	UF -100kDa
<b>Arbeitszeit</b>	~4h	~8h	~8h	~8h
<b>Verstopfungsgefahr</b> (Filter-/Silicamembran)	gering/gering	sehr hoch/moderat	hoch/hoch	moderat/sehr hoch
<b>geeignet für kommunales Abwasser</b> (geringe/hohe Feststoffmengen)	ja/ja	ja/nein	ja/nein	ja/nein
<b>geeignet für Rückstellproben</b> (gelagert bei 4°C/-20°C)	ja/ja	ja/nein	ja/nein	ja/nein

### II.2.1.2 Reverse Transkription

Das anfangs von der Fa. Qiagen zur Verfügung gestellte Kit (QIAcuity One-Step Viral RT-PCR Kit) hat sich im Vergleich zur konventionellen RT-qPCR als wenig sensitiv bei der Analyse von SARS-CoV-2-Varianten in Abwasserproben erwiesen. Im Laufe der Projektlaufzeit stellte die Firma Qiagen eine Weiterentwicklung des o. g. Detektionskits (QIAcuity OneStep Advanced Probe Kit) zur Verfügung. Stabilere Enzyme sowie eine erhöhte relative Resistenz gegenüber inhibitorischen Bestandteilen konnten einen deutlichen Performance Zuwachs generieren (Abbildung II.25).

SARS-CoV-2 RNA wurde aus Abwasser aus Januar 2022 extrahiert. Zu dieser Zeit war SARS-CoV-2 Omikron BA.1 dominant. Sowohl bei der Bestimmung der SARS-CoV-2 Viruslast mittels des dualen N1+N2 Assays, sowie bei dem variantenspezifischen Multiplex-Assays für K417 und K417N konnten mehr positive Signale mit dem QIAcuity OneStep Advanced Probe Kit im Vergleich zu dem QIAcuity One-Step Viral RT-PCR Kit ermittelt werden.

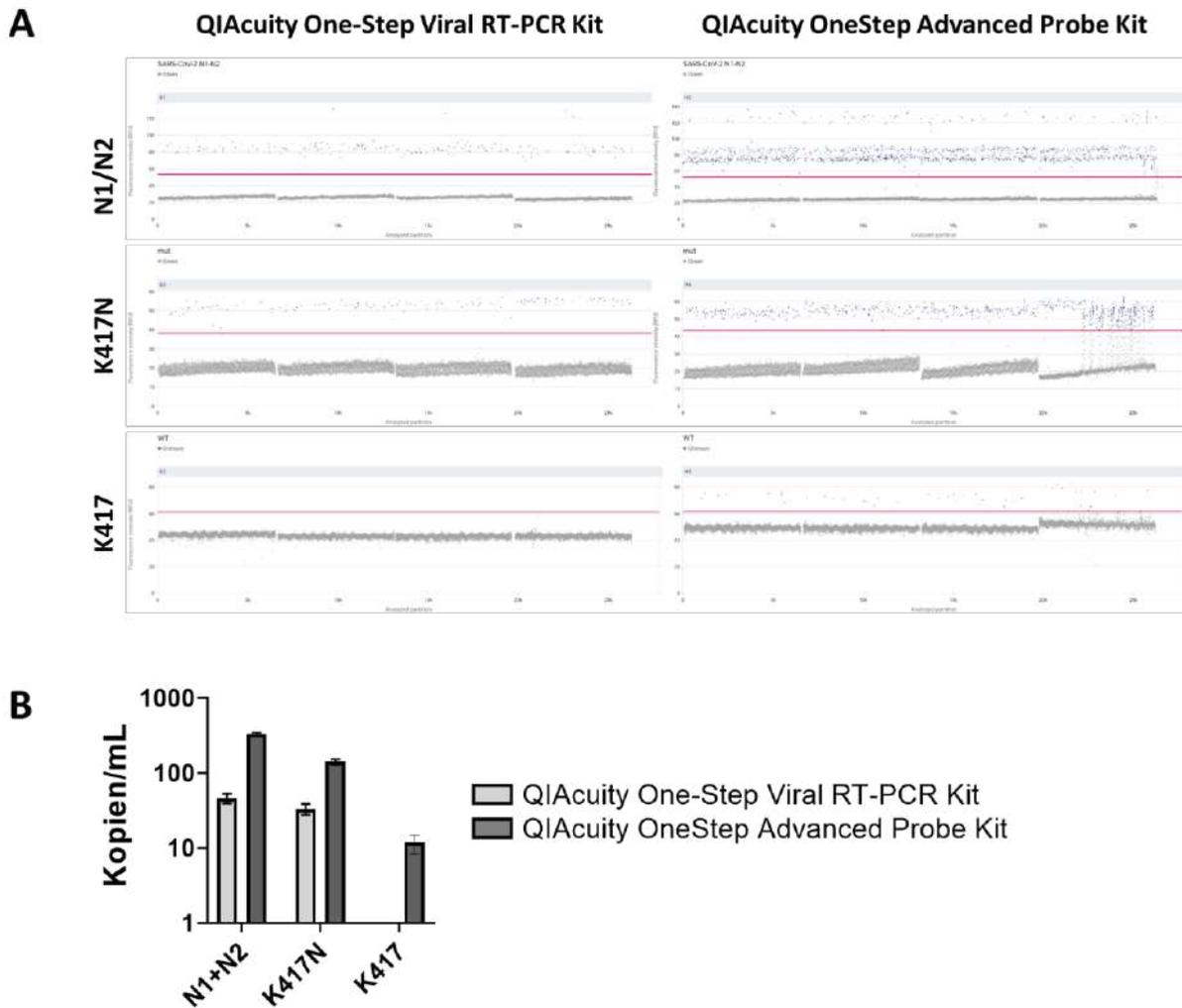
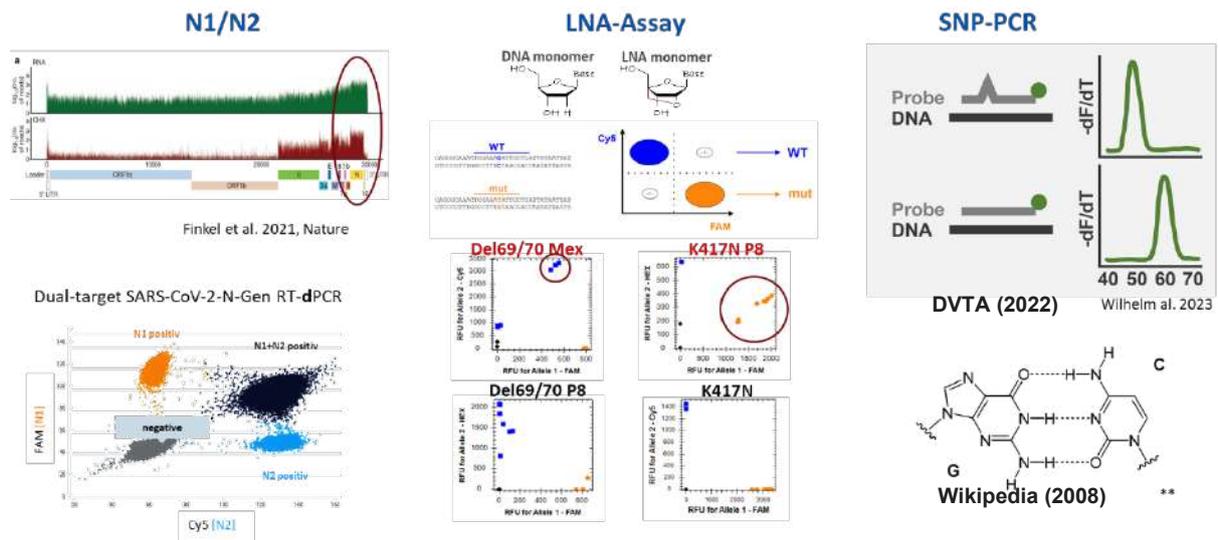


Abbildung II.25: Das QIAcuity OneStep Advanced Probe Kit ermöglicht eine sensitivere SARS-CoV-2 Viruslastbestimmung bzw. Variantendetektion im Abwasser mittels RT-dPCR im Vergleich zu dem QIAcuity One-Step Viral RT-PCR Kit

### II.2.1.3 Primersetup und Amplifikation

Die RT-PCR (inklusive dPCR) ist eine molekularbiologische Methode zur *in vitro* Vervielfältigung bestimmter Nukleinsäure-Sequenzen. Hierfür sind zahlreiche Sequenz- und Detektionsspezifische Voraussetzungen notwendig, die individuell optimiert werden können. Die Wahl der richtigen Primer und Sonden ist von entscheidender Bedeutung, um eine sensitive und spezifische Amplifikation zu erreichen. Die codierende Sequenz des SARS-CoV-2 N-Gens ist innerhalb aller viralen mRNA-Isoformen (genomische und subgenomische RNA) enthalten und damit das am häufigsten vorkommende virale Gen (Finkel et al. 2021; Long 2021). Es eignet sich daher ideal zur Detektion der stark degradierten viralen RNA im Abwasser. Die Detektion von SARS-CoV-2 N mittels Dual-Target-Ansatz (N1/N2) erhöht die Trefferquote und verbessert die Sensitivität (Abbildung II.26).



**Abbildung II.26: PCR-Analysemethoden zur quantitativen und qualitativen Bestimmung von SARS-CoV-2. (DVTA 2022; Wikipedia 2008)**

Die absolute Quantifizierung mittels dPCR konnte im Vergleich zu einer kommerziellen auf Kalibrierungsstandards (hergestellt durch Verdünnungsreihen bekannter DNA-Fragmente, die das Zielgen enthalten) basierten Quantifizierung mittels RT-qPCR-Methode eine Differenz von bis zu Faktor 10 ermitteln. Das Ergebnis macht deutlich, dass unterschiedliche Kalibrierungsstandards bei der RT-qPCR basierten Bestimmung vereinheitlicht werden müssen, um vergleichbare quantitative Ergebnisse in den einzelnen Laboren zu erzielen. Eine dPCR-basierte Vorab-Quantifizierung eines einheitlichen Kalibrierungsstandards, der an alle Labore des Konsortiums verschickt wird, würde hier einen deutlichen Mehrwert bringen. Ein entsprechender Kalibrationsstandard wurde in KGU hergestellt und den Kooperationspartnern in Aachen und Essen zur Verfügung gestellt.

Die variantenspezifischen Primer/Sonden sollten eine minimale Dimerbildung aufweisen und keine Kreuzreaktionen mit unspezifischen Sequenzen eingehen. Letzteres hat sich insbesondere bei der spezifischen Detektion von SARS-CoV-2-Varianten als essenzielle Voraussetzung herausgestellt. Im Rahmen der Etablierung und Evaluierung der PCR-Assays wurden SARS-CoV-2-Virusstocks hergestellt und zur Spezifitäts- und Sensitivitätstestung eingesetzt (siehe auch Kapitel II.1.4). Um in den anfänglichen Niedriginzidenzphasen der Pandemie ausreichend authentisches Probenmaterial für die Workflow-Entwicklung zur Verfügung zu haben, wurden große Mengen an infektiösen SARS-CoV-2 B.1.617.2 (Delta), B.1.1.7 (Alpha) sowie B (Ursprungsvirus) hergestellt und mit bereits etablierten Methoden inaktiviert, sodass Abwasserproben mit den inaktivierten Viren (in unterschiedlichen Verhältnissen der Varianten zueinander) gespikelt werden können. Die Auswertung der Inaktivierungskontrolle war erfolgreich.

Kommerzielle Testkits verschiedener Anbieter zum Nachweis von SARS-CoV-2 Varianten wurden auf Ihre Sensitivität und vor allem Spezifität hin überprüft. Der (d)PCR-basierte Nachweis von SARS-CoV-2-Varianten erfordert eine spezifische Diskriminierung von „Wildtyp“ und Mutante, was allerdings bei einigen kommerziell verfügbaren Kits nicht gegeben war (z. B. K417N-Assay des Promega Panel-8 Kits). Auch bei einigen publizierten Primern und Probes (Del69/70 Mex) wurden falsch positive Detektionen beobachtet (Wilhelm et al. 2022a; Wilhelm et al. 2022b)

Zwecks Nachweis von SARS-CoV-2-Varianten mittels dPCR wurde zunächst ein von der Firma I.A.G.E. entwickeltes Multiplex-Kit getestet, das jedoch wegen unzureichender Fluoreszenzintensitäten (auch bei der Positivkontrolle) sowie veralteter Mutationsnachweise von weiteren Testreihen ausgeschlossen wurde. Ein z. T. LNA-basiertes und flexibles auf Einzelkomponenten basiertes Primer/Probe-System wurde daher entwickelt und getestet (Promega, IDT, Qiagen). Unter Zuhilfenahme gespikter Proben konnten die SARS-CoV-2-Varianten B.1.1.7 (Alpha, N501Y, P681H), B.1.617.2 (Delta, L452R, P681R) und P.2 (Zeta, E484K) eindeutig diskriminiert werden. Die Bestimmung der Linearität bei quantitativem Einsatz sowie die Nachweisgrenze (auch bei Mischproben) wurden bestimmt und die Reaktionsbedingungen optimiert.

In Rahmen dieses Projektteils wurde letztendlich auf ein auf Einzelkomponenten-basiertes Primer/Probe-System gesetzt, welches eigens entwickelt und getestet wurde. Hierbei kann simultan der Anteil von Wildtyp (Cy5, HEX) und Mutante (FAM) an bestimmten Positionen im Virusgenom in mehreren Fluoreszenzkanälen nachgewiesen werden. Auch vorab als valide definierte kommerziell erhältliche Primer/Probe-Kits der Fa. Promega (Panel 8) sowie individuell hergestellte LNA-Probes und Primer wurden für den dPCR-Einsatz hinsichtlich Sensitivität und Spezifität erfolgreich implementiert.

Die meisten Standard-PCR-Protokolle verwenden eine Temperatur von 95°C für 30 Sekunden, um die Doppelstrang-DNA in Einzelstrang-DNA zu denaturieren. Wenn die Denaturierung unzureichend ist, kann dies zu einer geringeren Ausbeute oder unspezifischen Amplifikation führen. Die vom Hersteller vorgegebenen 5 Sekunden Denaturierung erwiesen sich als bei Einsatz von 24-well Nanoplates als geeignet für diverse Anwendungen.

Die Annealing-Temperatur sollte so gewählt werden, dass die Primer spezifisch an die Ziel-Sequenz binden. Eine niedrige Annealing-Temperatur kann zu unspezifischer Bindung führen, während eine hohe Annealing-Temperatur zu geringer Ausbeute führen kann. Die optimale Annealing-Temperatur der Primer/Probes des N1/N2 Dual-Assays sowie aller verwendeten LNA-Assays, wie beispielsweise zur Detektion der Substitutionen L452R, K417N, Del144, H655Y und D950N wurde ermittelt und in darauffolgenden dPCR Testungen berücksichtigt.

Die Anzahl der PCR-Zyklen sollte so gewählt werden, dass eine ausreichende Amplifikation erreicht wird, ohne dass unspezifische Produkte gebildet werden. Eine zu hohe Anzahl von PCR-Zyklen kann zu unspezifischer Amplifikation führen, während eine zu niedrige Anzahl von PCR-Zyklen zu geringer Amplifikation führen kann. Die Anzahl von 50 PCR-Zyklen erwies sich als optimale Bedingung für sensitive dPCR-Assays ohne das Auftreten unspezifischer Amplifikationen. Auch die Optimierung der Reaktionsbedingungen wie der Konzentration von Primern, Sonden und Enzymen hat dazu beitragen, das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern. Ebenfalls erwies sich die Vergrößerung des eingesetzten Volumens aufgereinigter Nukleinsäuren von 5 µL auf 10 µL als sinnvoll, insbesondere bei Proben, bei denen eine geringe Menge detektierbarer SARS-CoV-2 RNA zu erwarten war. Hierbei war die Verwendung von Positiv- und Negativen-Kontrollen sowie internen Kontrollen zur Überprüfung des Priming-Erfolgs (im Testkit standardmäßig enthalten) erforderlich.

#### **II.2.1.4 Detektion und Analyse**

Bei der Auswertung der digitalen RT-PCR ist das Signal-Rausch-Verhältnis entscheidend, um eine Diskriminierung zwischen PCR-positiven und negativen Kompartimenten zu ermöglichen. Eine Ansammlung von Signalen, die zwischen den Schwellenwerten des positiven und des negativen Signals auftreten, werden als „Rain“ (engl. Regen)-Phänomen bezeichnet. Dieses Phänomen tritt aufgrund von Schwankungen während der Amplifikation auf und kann die Interpretation der Ergebnisse erschweren. Innerhalb des Projektteils wurde die Ergebnisinterpretation durch verschiedene Optimierungsschritte verbessert.

Die Optimierung der Belichtungsdauer wurde für jedes Zielgen unter Berücksichtigung der Excitations- und Emissionsspektren angepasst, um die maximal dynamische Abdeckung zu erhalten. Qualitativ hochwertige Primer und Proben mit sehr geringen basal Fluoreszenzniveaus wurden von der Firma IDT synthetisiert und bezogen. Hierbei konnten Hintergrundsignale durch den Einsatz von hochwertigen Quenchern reduziert werden.

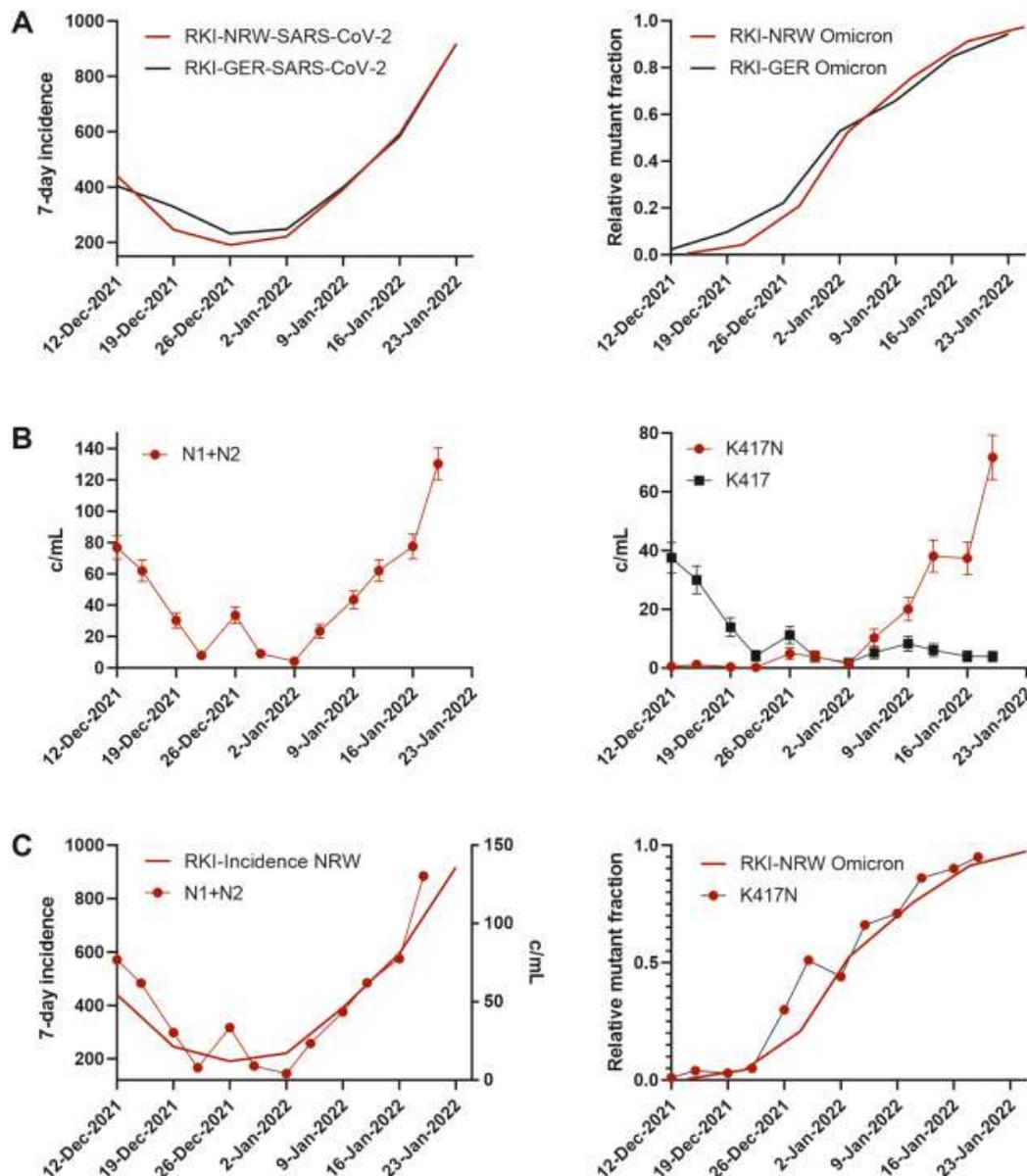
#### **II.2.2 Charakterisierung von auffälligen Positivproben aus AP3**

Im Verlauf der Pandemie stellen neue SARS-CoV-2-Varianten, die durch Mutationen der viralen Erbinformationen und evolutionärer Anpassung an den Wirt auftreten, das Gesundheitswesen immer wieder vor Herausforderungen. Neue Virusvarianten haben insbesondere das Potenzial, sich auf die Antigen-Eigenschaften, die Übertragbarkeit oder auf den Schweregrad der Viruserkrankung auszuwirken. Da Mutationen auch die therapeutischen Möglichkeiten einschränken und zum Beispiel die Wirksamkeit monoklonaler Antikörper (Cathcart et al. 2021;

VanBlargan et al. 2022; Wilhelm et al. 2022c) oder anderer antiviraler Wirkstoffe (z. B: Paxlovid) beeinträchtigen können (Hu et al. 2022; Jochmans et al. 2023; Service 2022), ist es von großer Bedeutung, die Verbreitung relevanter Varianten auf breiter Ebene zu beobachten.

Um die dynamische Ausbreitung kritischer Virusvarianten ohne teure Sequenzierungskosten überwachen zu können, sollten auch im Rahmen dieses Vorhabens in regelmäßigen Abständen ausgewählte und auffällige Proben sowie Rückstellproben aus AP3 mittels dPCR untersucht werden.

In Abwasserproben vom Zulauf zweier Großkläranlagen der Emschergenossenschaft in Duisburg und Dinslaken konnte erstmals am Donnerstag, den 9.12.2021, eine für die SARS-CoV-2-Variante Omikron charakteristische Mutation (K417N) detektiert und an Folgetagen auch das Auftreten weiterer typischer Mutationen ( $\Delta 69/70$  sowie N501Y) bestätigt werden. Im Sinne eines Frühwarnsystems konnten diese Abwasserbefunde erste Hinweise liefern, dass die Omikron-Variante im Einzugsgebiet dieser Kläranlagen auftritt. Im weiteren Verlauf konnte anhand Proben aus insgesamt drei überwachten Klärwerken (Bottrop, Duisburg Alte Emscher und Emschermündung) der Nachweis erbracht werden, dass sich das Verhältnis der Spike-Variationen K417N, N501Y,  $\Delta 69/70$  hinzu Omikron als bereits dominante Variante entwickelt hat (siehe Pressemitteilung 12/2021). Die optimierte RT-dPCR-Methodik (Abbildung II.27) eignet sich daher als vielseitiges Instrument zur schnellen abwasserbasierten Überwachung der SARS-CoV-2-Variantenausbreitung.

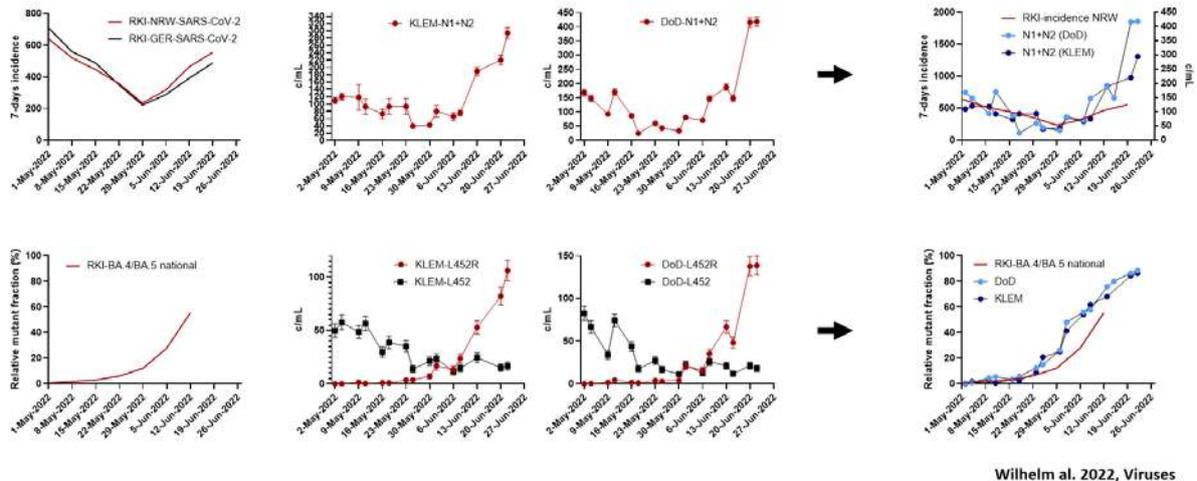


**Abbildung II.27: Monitoring des SARS-CoV-2 Omikron-spezifischen Mutantenanteils von K417N mittels digitaler PCR.** A) Die 7-Tage-Inzidenz (links) und der relative Anteil von Omikron (rechts) für Deutschland und Nordrhein-Westfalen (NRW) sind angegeben. Die epidemiologischen Daten basieren auf Individualtestungen und stammen vom Robert Koch-Instituts (RKI) in Deutschland. B) Gesamtwerte von SARS-CoV-2 (links) und die Omikron-detektierende Substitution K417N (rechts) in Abwasserproben der Kläranlage KLEM. C) Die 7-Tage-Inzidenz in NRW korreliert mit den nachgewiesenen SARS-CoV-2-Konzentrationen im Abwasser (links). Der durch Einzeltests ermittelte relative Mutantenanteil von Omikron ist in hohem Maße vergleichbar mit dem relativen Anteil von K417N, der im Abwasser gefunden wurde (rechts). (Wilhelm et al. 2022b)

Die Ende 2020 bis Anfang 2021 durchgeführte Studie über den (d)PCR-basierten Erstdnachweis der SARS-CoV-2 Omikron-Variante im Abwasser konnte im international anerkannten Fach-Journal *Science of The Total Environment* als Open-Access-Publikation am 01.08.2022 veröffentlicht werden (Wilhelm et al., 2022b). Hierbei wurde ein sukzessiver Workflow mit RT-

qPCR, dPCR und NGS-Sequenzierung eingesetzt und die SARS-CoV-2 Omikron-Variante bereits am 8. Dezember 2021 im Abwasser aus NRW nachgewiesen. Die Bestätigung wurde durch NGS-Sequenzierung in einer am 14. Dezember 2021 erhaltenen Probe erbracht. Die Ausbreitung im Einzugsgebiet der untersuchten Kläranlagen konnte schließlich mittels digitaler PCR erbracht und am 19. Januar 2022 Omikron als die dominante Variante quantifiziert werden. Am 10.02.2022 konnte die Methode bei einem öffentlichen Vortrag für Anwender (Workshop der Fa. Qiagen) durch Dr. Widera/KGU vorgestellt werden. Die Ergebnisse dieser Studie wurden zudem am 30.03.2022 in einem Vortrag „Wastewater Surveillance Allows Early Detection of SARS-CoV-2 Omikron variant in North Rhine-Westphalia Germany“ beim 31<sup>st</sup> Annual Meeting of the Society for Virology durch Dr. Wilhelm /KGU vorgestellt. Als Synthese dieser Projektergebnisse wurde in Abstimmung mit den Projektpartnern eine Übersichtsgrafik (Abbildung I.2) zum dezentralen Testworkflow unter Einbeziehung der zur Verfügung stehenden molekularbiologischen Methoden (RT-qPCR, RT-dPCR und NGS-Sequenzierung) erzeugt und öffentlich zur Verfügung gestellt (Wilhelm et al. 2022b).

Kurz darauf sind in Südafrika neue SARS-CoV-2 Omikron-Subvarianten BA.4 und BA.5 identifiziert worden. Eine Virus-Isolation und Anzucht in Zellkultur unter BSL3-Konditionen sowie eine nachfolgende RNA-Isolierung für die Validierung der PCR-Analysen sowie weiterer Testreihen (unter anderem Tests zum Nachweis der Positionen E484A, F486V, D950, L452R) ist dazu unmittelbar am KGU erfolgt. Individuell von der Fa. IDT hergestellte LNA-Probes und Primer zur Detektion der L452R-Mutation wurden für den Nachweis der neuen Omikron-Varianten BA.4/BA.5 hinsichtlich Sensitivität und Spezifität erfolgreich evaluiert. Somit konnte das KGU bereits wenige Tage nach Bekanntwerden der neuen Subtypen spezifische Primer und Sonden zur Verfügung stellen und diese in den zuvor publizierten Analyse-Workflow integriert werden. Unter KGU-Anleitung wurden hierzu durch die Projektpartner Abwasserproben untersucht. Proben, bei denen dezentral eine für SARS-CoV-2 BA.4/BA.5 charakteristische Mutationen nachgewiesen (L452R) wurde, wurden zur Verifizierung gekühlt an das KGU verschickt. Mittels der o. g. FESPiNA-Methode, die zur Isolation von RNA aus frischen sowie eingefrorenen Abwasserproben etabliert wurde, konnten die Rückstellproben im KGU-Labor isoliert werden. Mittels der zuvor etablierten digitalen PCR-Methode konnte der relative Anteil dieser Mutation in einer am 05.06.2022 entnommenen Probe in mehreren Klärwerken auf über 50 % bestimmt werden (Abbildung II.28) (Wilhelm et al. 2022a). Die Anwesenheit von BA.4/BA.5 wurde ferner mittels variantenspezifischer PCR (E484A/F486V Einzelnukleotid-Polymorphismus-Test) bestätigt. Diese Methode wurde aufgrund Ihrer schnellen Verfügbarkeit und dem spezifischen Nachweis der BA.4/BA.5 gewählt.



**Abbildung II.28: RT-dPCR identifiziert BA.4/BA.5 frühzeitig als die dominierende SARS-CoV-2-Variante (L452R) (Wilhelm et al. 2022a)**

Das Screening von BA.4/BA.5 erforderte neben der Untersuchung via RT-dPCR eine Verifizierung mit einem Einzelnukleotid-Polymorphismus-PCR-Assay (SNP-PCR). Dieser Test ermöglicht durch Schmelzkurvenanalyse des Amplifikats den Nachweis von variantenspezifischen Mutationen (Wilhelm et al. 2022a). Die SARS-CoV-2 Omikron-Varianten BA.2, BA.4 und BA.5 weisen die E484A-Mutation auf, während die Kombination aus E484A und F486V (E484A/F486V) einen exklusiven BA.4/BA.5-Nachweis ermöglicht. Die proprietären Primer und Sonden (SARS-CoV-2 VirSNiP Mutations Assay, Kat.-Nr. 53-0839-96) wurden vom TIB Molbiol Syntheselabor GmbH (Berlin, Deutschland) erworben. Nach dem Zyklus wurde eine Schmelzkurvenanalyse mit einer Heizrate von 0,2 °C/Sekunde durchgeführt. Ein hoher Schmelzpeak (~60 °C) war hierbei ein Hinweis auf das Vorhandensein der SARS-CoV-2-Varianten BA.4/BA.5, während BA.2-Sequenzen einen niedrigeren Schmelztemperaturpeak (~53 °C) aufwies. Eine abschließende NGS-Sequenzierung der relevanten Proben wurde in Kooperation mit der TU Darmstadt erfolgreich durchgeführt. Am 15.06.2022 wurde basierend auf diesen Daten eine Pressemitteilung zur Dominanz von SARS-CoV-2 BA.4./BA.5 in NRW veröffentlicht. Ein Manuskript wurde am 27.07.2022 veröffentlicht (Wilhelm et al. 2022a).

Die anfänglichen Entwicklungen der SARS-CoV-2-Pandemie ermöglichten eine evidenzbasierte Vorhersage zum wahrscheinlichen Auftreten neuer Varianten in Deutschland. Jüngst wurde jedoch im Vergleich zu den vorherigen Pandemie-Phasen eine starke Diversifizierung der Omikron-Subvarianten beobachtet. Mehrere Untervarianten kursieren unabhängig voneinander und limitieren anhand ihres überlappenden Mutationsprofils die Detektionsmethoden.

Mehrere SARS-CoV-2-Varianten haben sich auf Grund ihrer immunevasiven und wegen der höheren Übertragungswahrscheinlichkeit gegen die bis Herbst 2022 dominante BA.5 durchsetzen und auch in Deutschland ausbreiten können. Insbesondere standen hier die Varianten

BQ.1.1 und XBB.1.5 im Fokus, die durch einen mit erheblichen Replikationsvorteil sowie sehr starke Immunevasion gekennzeichnet sind (Cao et al. 2023).

Variantspezifische Einzelnukleotid-Polymorphismus-PCRs (SNP-PCR) für mehrere Spike-Position waren zur Variantendiskriminierung verfügbar. Da sich die Sequenzen untereinander (weil von Omikron-Sublinien abstammend) ähnlich sind und sich eine Diskriminierung technisch komplex erweist, war eine im Rahmen dieses Arbeitspakets erarbeitete Stufendiagnostik erforderlich.

Ein universeller Genotypisierungstest basierend auf der Spike-Position R346T stand zur Verfügung, der neue Varianten universell detektieren kann und eine Diskriminierung zur vorausgehenden BA.4/5-Situation erlaubt. Bei einem Positiv-Nachweis für R346T (u. a. positiv für BA.4.6, BA.2.75.2 sowie XBB.1.5 und BQ.1.1, aber negativ für BA.4/5) wurde anschließend eine „Stufendiagnostik“ zur weiteren Bestimmung der Subvarianten durchgeführt (z. B. Position Spike K444T und G446S). Ferner wurde ein Test entwickelt, der die Spike-Mutation E484A-F486P detektiert, die für XBB.1.5 spezifisch ist. Alle anderen XBB-Varianten haben die Mutation E484A-F486S, wie auch in der BA.2.75.2 gegeben, sodass eine Unterscheidung technisch möglich war. Wegen des dynamischen Mutationsgeschehens entwickeln verschiedene Omikron-Varianten unabhängig voneinander die gleichen Mutationen. Es ist daher meist nicht möglich, eine eindeutige Mutation zu identifizieren. Dies gilt auch für die XBB.1.5-Mutationen, da die F486P-Mutation zum Beispiel auch für die selten auftretende Variante CJ.1 (BA.2.75 Sub-Linie) beschrieben wurde.

Aktuell (letzte analysierte Probe vom 22.02.2023) deutet der Nachweis der Spike-Substitution R346T in den beprobten Kläranlagen (KLEM, DoD) auf das dominante Vorkommen (90 %) diverser BA.5- und anderer Omikron-Subvarianten hin (Test u. a. positiv für BA.2.75.2, CJ.1, BA.4.6, BF.7 sowie BQ.1.1, BJ.1, XBB und XBB.1.5) hin. Im Vergleich lag der relative Anteil am 30.01.23 bei ca. 85 %. Der Anteil der für SARS-CoV-2 BQ.1, BQ.1.1 und CH.1.1 charakteristischen Mutation K444T in SARS-CoV-2-Spike reduzierte sich im Februar auf ca. 30 % (in KLEM und DoD). Im Vergleich lag der relative Anteil von K444T-tragenden SARS-CoV-2 Varianten am 30.01.2023 bei ca. 40 %. Der Anteil von SARS-CoV-2 XBB.1.5 stieg im Februar deutlich an und lag am 22.02.23 bei ca. 70 % (KLEM und DoD) (Abbildung II.29 und Abbildung II.30).

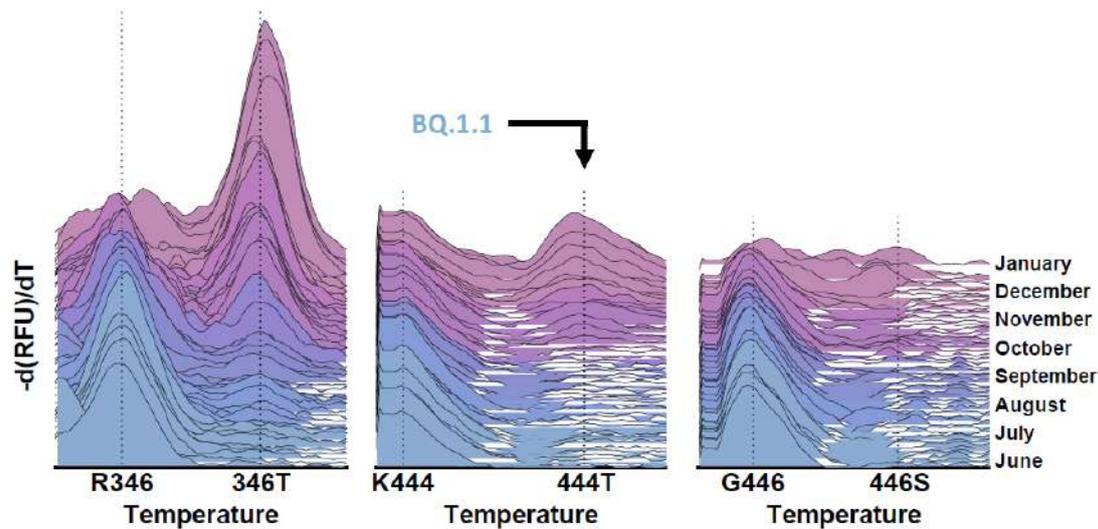


Abbildung II.29: Monitoring der Ausbreitung von neuen Omikron- Sub-Varianten mittels 346T, 446S und 444T-SNP-PCR exemplarisch von Juni 2022 bis Januar 2023

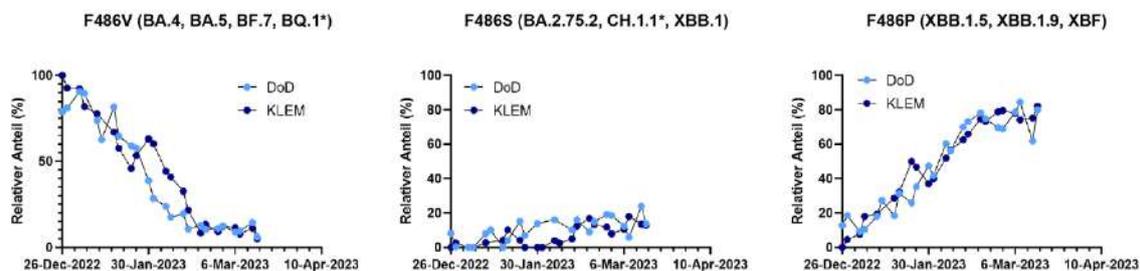


Abbildung II.30: Relativer Anteil der SARS-CoV-2 Spike-Substitutionen F486V, F486S und F486P im Abwasser vom 26.12.2022 bis 15.03.2023

Die Abwasserproben entstammen aus dem Klärwerk Emschermündung (KLEM) und Dortmund-Deusen (DoD). In Klammern sind die mittels **F486V**, **F486S** und **F486P-PCR** detektierten Omikron-Subvarianten aufgezählt, welche anhand der Daten aus Individualtestungen in Deutschland (Quelle: RKI) einen Anteil >1 % in der betreffenden Berichtwoche ausmachen. Der PCR-Test, der die Spike-Mutation **F486P** detektiert, weist XBB.1.5, XBB.1.9 sowie XBF nach. Wegen des dynamischen Mutationsgeschehens entwickeln heutzutage verschiedene Omikron-Varianten unabhängig voneinander die gleichen Mutationen. Es ist daher meist nicht möglich, eine eindeutige „Varianten-Mutation“ zu identifizieren. Dies gilt auch für die XBB.1.5, da die F486P-Mutation zum Beispiel auch für die selten auftretenden Varianten XBF, XBB.1.9 und CJ.1 (BA.2.75 Sub-Linie) beschrieben wurde. Alle anderen XBB-Varianten tragen die Mutation **F486S**, wie auch in der BA.2.75.2 gegeben, sodass eine Unterscheidung technisch möglich ist. Vorausgehenden Varianten (z.B. BA.4, BA.5, BF.7, BQ.1) enthalten hingegen die Spike Substitution F486V.

### II.2.3 Zusammenfassung der Kerneergebnisse des Arbeitspakets

Die abwasserbasierte SARS-CoV-2-Epidemiologie (WBE) hat sich als hervorragendes Instrument zur Überwachung der Pandemiedynamik erwiesen, das individuelle Teststrategien unterstützt. WBE kann auch als Frühwarnsystem zur Überwachung des Auftretens neuartiger Erreger oder viraler Varianten eingesetzt werden. Für eine zeitnahe Übermittlung der Ergebnisse ist jedoch eine ausgefeilte Probenlogistik und -analytik erforderlich, die dezentral in Laboren in der Nähe der Probe-Entnahmestellen durchgeführt wird. Eine vergleichende Qualitätskontrolle der Analyseverfahren, insb. der Validierung der variantenspezifischen PCR-Assays ist unerlässlich, um zuverlässige und gleichwertige Ergebnisse zu erhalten.

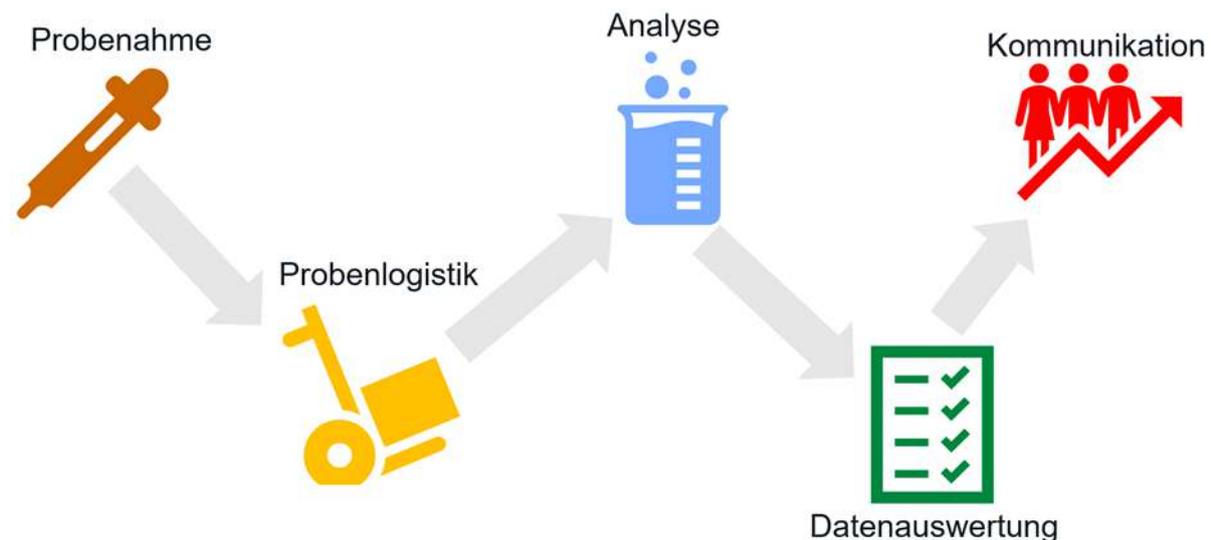
Die von kommerziellen Herstellern zur Verfügung gestellten Methoden zur SARS-CoV-2-Detektion erlauben eine suboptimale Detektion von SARS-CoV-2 und deren Varianten. Eine sehr gute Sensitivität und Spezifität der SARS-CoV-2-Variantennachweise durch RT-dPCR wurde durch zahlreiche Optimierungsstrategien erzielt. Es sollte durch „Spiken“ von SARS-CoV-2 negativen Abwasserproben mit inaktiviertem Virusmaterial (authentische SARS-CoV-2-Viren inkl. Varianten) auch innerhalb von internationale Laborvergleichen evaluiert werden.

COVIDready setzt einen dezentralen Überwachungsansatz um, welcher Meldungen zum Auftreten neuer Virusvarianten innerhalb von 48 h an die Behörden ermöglicht. Qualitätskontrolle erfolgt durch realitätsnahe Laborvergleiche und ermöglicht die Validierung des dezentralen Ansatzes.

Die Detektion von SARS-CoV-2 durch Dual-Targets (N1/N2) erhöht die Trefferquote und verbessert die Sensitivität. Mittels digitaler PCR (dPCR) in Kombination mit spezifischen LNA-Sonden kann der Anteil neuer SARS-CoV-2-Varianten im Abwasser präzise und zeiteffizient bestimmt werden. SNP-PCR-Analysen ermöglichen die frühzeitige Bestätigung neuer Varianten im Abwasser (Stufendiagnostik). Eine vorherige Validierung von PCR-Assays ist für einen variantenspezifischen Nachweis unerlässlich.

## II.3 Praxiseinsatz: Screening im Verbandsgebiet

Basierend auf dem in AP1 untersuchten dezentralen, analytischen Workflow war es das Ziel des Forschungsvorhabens, die abwasserbasierte Epidemiologie praxisorientiert in zwei verschiedene Untersuchungsgebiete zu etablieren. Hierbei wurde der gesamte benötigte Workflow von der Probenahme bis hin zur Kommunikation etabliert und hinsichtlich Schnelligkeit, Zuverlässigkeit und potentiell limitierenden Faktoren untersucht.



**Abbildung II.31: Schritte im gesamten Workflow von der Probenentnahme zur Kommunikation**

Leitparameter bei der Erarbeitung der einzelnen Teilschritte des Workflows war es, praxisorientierte Lösungen zu finden. Dies umfasst neben der Logistik, welche an die Lage der Anlagen angepasst worden ist, die Datenauswertung, die anhand der vorhandenen Daten und Infrastruktur der Betreiber aufgebaut worden ist und die Kommunikation mit den Gesundheitsbehörden, welche in Absprache der verschiedenen Stakeholder in einem interaktiven Prozess entstanden ist. Im Folgenden werden die verschiedenen Aspekte detailliert beschrieben.

### II.3.1 Untersuchte Kläranlagen / Probenahme

Im Forschungsvorhaben COVIDready wurden ab 06/2022 zehn verschiedene Kläranlagen aus NRW untersucht, an denen 3,4 Mio. Menschen angeschlossen sind. Die Kläranlagen von Emshergenossenschaft/Lippeverband wurden im Kooperationslabor von EGLV und Ruhrverband analysiert. Die weiteren Standorte werden durch das Fachgebiet für Siedlungswasserwirtschaft der RWTH Aachen analysiert. Beprobte wurden alle Standorte mit einer 24-h-Mischprobe, die durch einen automatischen Probenehmer hinter dem Sandfang genommen wurde. Die Beprobung erfolgt dabei volumenstrom- oder mengenproportional.

Um die Einflüsse der Pendler auf die Ergebnisse beim Abwassermonitoring besser quantifizieren zu können, wurde zum Start des Projekts an allen Anlagen der Sonntag und der Mittwoch beprobt. Durch die Unterscheidung zwischen Wochenende und wochentags können Rückschlüsse auf den Effekt der Pendler gezogen werden. Etwaige Ungenauigkeiten, die

durch Tourismusströme am Wochenende erzeugt werden, gehen hier in die Daten mit ein. Ab März/April 2022 wurde auf Vorgabe des Projektträgers die Beprobung auf die Untersuchungstage Montag und Mittwoch angepasst.

**Tabelle II.8: Informationen zu den untersuchten Kläranlagen**

Kläranlage	Betreiber	Angeschl. Einwohner 2020	SARS-CoV-2 Messreihe	Labor	Gesundheitsämter im EZG
Bottrop	EGLV	732.816	seit 07/2021	KL	>10
Emschermündung	EGLV	906.222	seit 07/2021	KL	>10
Duisburg-Alte Emscher	EGLV	242.172	seit 07/2021	KL	2
Dortmund-Deusen	EGLV	399.425	seit 04/2022	KL	4
Dortmund-Scharnhorst	EGLV	113.439	seit 04/2022	KL	1
Dinslaken	EGLV	56.812	seit 02/2022	KL	1
Aachen-Soers	WVER	206.424	seit 11/2021	ISA	1
Eschweiler-Weisweiler	WVER	68.244	seit 02/2022	ISA	1
Mönchengladbach GW I	Niersverband	412.000	seit 06/2022	ISA	5
Wuppertal-Buchenhofen	Wupperverband	317.483	seit 06/2022	ISA	1

### II.3.2 Probenlogistik

Die Probenlogistik stellt für die möglichst schnelle Bereitstellung der Analyseergebnisse einen der wichtigsten und zum Teil auch am schwersten zu kalkulierenden Punkt dar. Im Zuge des Forschungsvorhabens wurden für die verschiedenen Standorte unterschiedliche Möglichkeiten während eines Praxistests untersucht.

#### Kommerzielles Logistikunternehmen

Die Probenlogistik für die Standorte Mönchengladbach und Wuppertal-Buchenhofen wurde von einem kommerziellen Logistikunternehmen übernommen. Hier wurden die Proben Dienstag- bzw. Donnerstagmittag verschickt. Beauftragt wurden über den Durchführungszeitraum verschiedenen Firmen, die sich als unterschiedlich zuverlässig erwiesen haben.

### Probenlogistik durch verbandseigene Mitarbeiter

Die Probenlogistik für die Kläranlagen Duisburg-Alte-Emscher, Dinslaken, Emschermündung und Bottrop wurde innerhalb einer Tour abgebildet, die durch einen Mitarbeiter von EGLV abgefahren worden ist. Hier trafen die Proben zumeist dienstags und donnerstags vor 11:00 Uhr ein. Mit einer entsprechenden Vertretungsregelung kann so sichergestellt werden, dass die Proben rechtzeitig und zuverlässig geliefert werden.

### Probenlogistik durch einen Probenkurier

Die Standorte Dortmund-Deusen und Dortmund Scharnhorst wurden durch einen externen Probenkurier durchgeführt, der gezielt verschiedene Kläranlagen von EGLV anfährt. Hier wurden die Proben für die SARS-CoV-2 Analytik in eine bereits bestehende Tour integriert, um so möglichst Kosten zu sparen. Durch die organisierte Probenlogistik konnte sichergestellt werden, dass die Proben dienstags und donnerstags rechtzeitig geliefert wurden, wobei es zum Teil aber zu Verzögerungen um wenige Stunden kam. Ursache hierfür ist, dass die zeitliche Anforderung, die an die SARS-CoV-2-Untersuchungen gestellt wird, für andere Beprobungsreihen nicht gegeben ist und eine Integration der Proben eine Herausforderung darstellen kann. Durch die Beauftragung eines weiteren Kuriers wären die Kosten weiter gestiegen.

### II.3.3 Methodenentwicklung zur Auswertung von SARS-CoV-2 Abwasserdaten

Für die Auswertung wurde eine Routine auf Basis von Python entwickelt. Diese umfasst die Aggregation, Verarbeitung, Trendbewertung und Darstellung der Daten. In Abbildung II.33 ist eine grobe schematische Repräsentation des Workflows zur Aus- und Bewertung der Daten dargestellt.

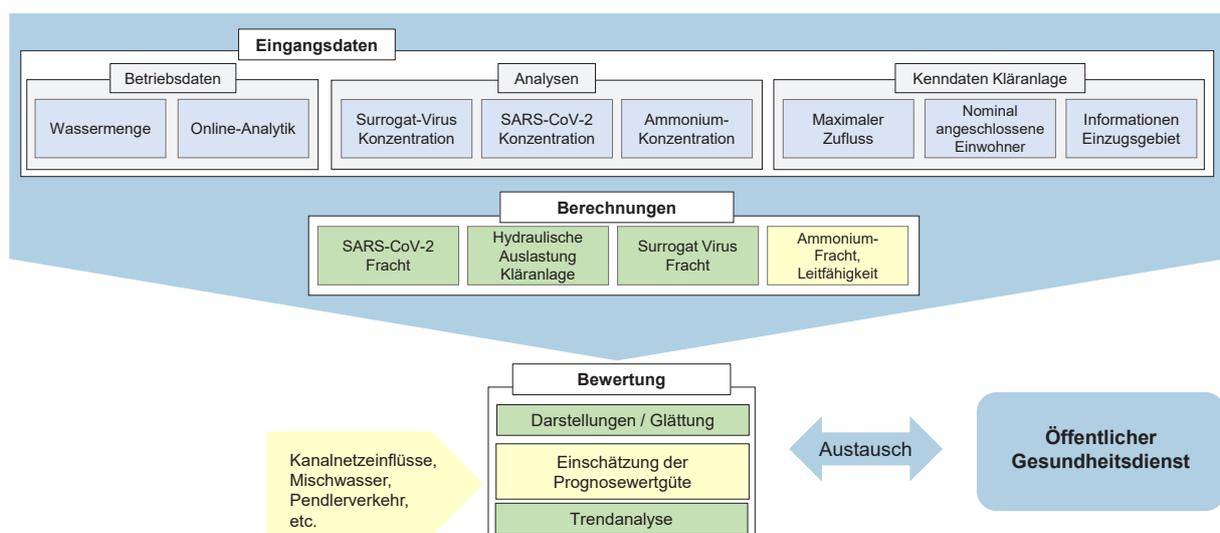
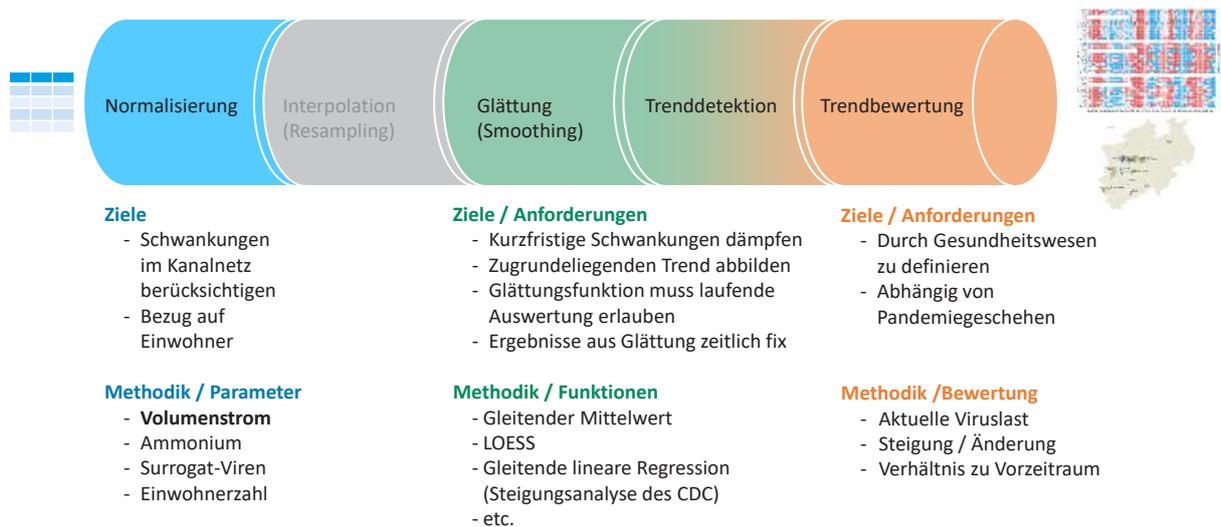


Abbildung II.32: Schematische Darstellung der Eingangsdaten und der Datenverarbeitung

Aus dieser, eher zur Veranschaulichung dienenden Darstellung wurde eine Datenauswertungs-Pipeline entwickelt. Der Begriff „Pipeline“ beschreibt in der Data-Science einen Schritt für Schritt ablaufenden Auswertungsvorgang, wie er in Abbildung II.33 dargestellt ist. Die Entwicklung der Pipeline erfolgte in Anlehnung u. a. an Arbeiten von Rauch et al. (2022). Wichtig: Bei der dargestellten Auswertung ist der Punkt der Qualitätssicherung der bereitgestellten Eingangsdaten (vgl. Kapitel II.3.3.1) bereits abgeschlossen.



**Abbildung II.33: Datenanalyse und -Trendbewertung als Pipeline vom Datensatz zum Ergebnis**

Die Datenauswertungs-Pipeline wird in den nachfolgenden Kapiteln näher erläutert.

### II.3.3.1 Eingangsdaten

Für die Auswertung der verschiedenen Anlagen werden zunächst bei den jeweiligen Standorten die Tageswassermenge und sofern vorhanden, die Abwassertemperatur, die Leitfähigkeit und der pH-Wert aus dem Zulauf abgefragt. Darüber hinaus werden für die Routine noch wichtige Kenndaten der Kläranlage bzw. des Einzugsgebiets erfasst. Hierunter fallen die maximal aufzunehmende Wassermenge, die nominal angeschlossenen Einwohner laut der NRW Informationsdatenbank ELWAS-WEB mit Stand 2020 sowie etwaige zusätzliche Informationen aus dem Einzugsgebiet. Die Informationen aus dem Einzugsgebiet werden einbezogen, sofern wiederkehrend nicht zu definierende Ausreißer in den Messungen festgestellt werden. Seitens der Labore werden die Konzentrationen von SARS-CoV-2 und eines Surrogat-Virus (ISA: Crassvirales, LV: PMMoV) und die Ammoniumkonzentration gemessen.

Die Eingangsdaten können unter anderem den folgenden Einflüssen ausgesetzt sein:

- Bewegung der Bevölkerung innerhalb des Gebiets (Pendler, Tourismus, usw.)
- Einflüsse im Kanalsystem (Dimensionierung des Kanals, RÜB, SKU, Pumpwerke)
- Eventuell äußere Einflüsse (Temperatur, Niederschlag, UV-Einstrahlung, Fremdeinleiter, ...)
- Probenahme

- Analytik

Aufgrund häufiger Änderungen in der Bereitstellung der Daten (zunächst eigenes Datenformat → ESI-CorA-Datenformat → AMELAG-Datenformat), waren häufige Anpassungen in der Datenaggregation notwendig, die die Fortentwicklung der eigentlichen Auswerteroutine behinderten. Dies wurde dadurch erschwert, dass durch Umstellung der zu berichtenden Einheiten zwischen den einzelnen Dateninfrastrukturen, zeitweise Fehler bei der Dateneingabe händisch nachkontrolliert werden mussten.

### II.3.3.2 Normalisierung

#### II.3.3.2.1 Grundlagen

Die Normalisierung von Daten aus dem Abwassermonitoring auf SARS-CoV-2 auf weitere Parameter dient zum Ausgleichen von Schwankungen, die sich aus der Verdünnung fäkaler Abwässer durch gewerbliche/industrielle Abwässer, Regenwasser oder Grundwasserinfiltration ergeben. Zudem sollen z. B. Schwankungen in der Abwasserbeschaffenheit aufgrund von Pendlerbewegungen oder kurzfristigen Großereignissen ausgeglichen werden. Viele Parameter, die zur Normalisierung von Abwasserproben verwendet werden können, sind bereits untersucht worden. (Maal-Bared et al. 2023)

Der Standardansatz in der Abwasserüberwachung ist die Normalisierung anhand von Durchflussmessungen. Hierfür muss aber eine durchfluss- oder mengengenproportionale Beprobung, z. B. in Form von 24-Stunden-Mischproben gewährleistet sein (vgl. Langeveld et al. 2023).

Launay et al. (2016) schlugen die Verwendung der elektrischen Leitfähigkeit (LF) als Näherungswert für die Verdünnung von Abwasser mit Regenwasser vor, da sich die typischen LF-Werte für städtischen Regenwasserabfluss (~200-250  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) deutlich von denen des Abwassers (~1000-1500  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) unterscheiden. Sie zeigten in ihrer Studie, dass die Verdünnungsrate auf der Grundlage von LF ähnlich gut berechnet werden kann wie die Verdünnungsrate auf der Grundlage von inerten menschlichen Abwasser-Tracern wie Ibuprofen, Naproxen und Diclofenac. Die elektrische Leitfähigkeit hat dabei den großen Vorteil, dass sie online via Messsonde und somit kontinuierlich bestimmt werden kann.

Die Normalisierung der SARS-CoV-2-RNA-Konzentrationen auf endogene Fäkalmarker, die spezifisch für menschliche Fäkalien im Abwasser sind wird angewandt, um den Gehalt an menschlichen Fäkalien oder die Fäkalienstärke zu schätzen (Been et al. 2014; Choi et al. 2019) (American Public Health Laboratories, 2022; Centre for Disease Control and Prevention, 2022). Zu den häufig untersuchten Biomarkern gehören Pepper Mild Mottle Virus (PMMoV), CrAssphage, fäkale Coliforme und weitere (Ai et al. 2021; Duvallet et al. 2022; Feng et al. 2021; LaTurner et al. 2021; Vadde et al. 2022; Sakarovitch et al. 2022; Zhan et al. 2022; Wilder et al. 2021). Die Hypothese ist, dass die Normalisierung quantitativer Virusdaten mit diesen

Fäkalmarkern die Korrelationen zwischen RNA-Konzentrationen und Fallzahlen verbessern kann, da so die Variabilität des menschlichen Fäkaliengehalts in der Probe berücksichtigt wird. Dies setzt voraus, dass die endogenen Abwassermarker die Ausscheidung von SARS-CoV-2 und dessen Transport im Kanalnetz abbilden (Crank et al. 2021; Castro-Gutierrez et al. 2022). Häufig wurde eine Normalisierung auf CrAssvirales/ CrAssphagen untersucht (Crank et al. 2020; Hillary et al. 2021; Wilder et al. 2021; Langeveld et al. 2023; Heijnen et al. 2021). Hierbei handelt es sich um ein sehr häufig vorkommendes Virus, das fast ausschließlich in menschlichen Fäkalien gefunden wird und weltweit beim Menschen vorkommt (Edwards et al. 2019). Weltweit werden hohe crAssphage-Konzentrationen in häuslichen Abwässern gemeldet und es wird berichtet, dass die Belastung keine signifikanten saisonalen Schwankungen aufweist (Ballesté et al. 2019), was sie zu einem potenziell nützlichen Index für die menschliche Fäkalienfraktion des Abwassers macht. Weitere Informationen hierzu sind auch Kapitel II.1.3 zu entnehmen.

PMMoV ist nicht direkt ein endogener fäkaler Marker, wird aber häufig zur Normalisierung von SARS-CoV-2-RNA-Daten verwendet (D'Aoust et al. 2021; Wu et al. 2021). Dabei soll insbesondere die Normalisierung der SARS-CoV-2-Konzentrationen in Feststoffen ermöglicht werden. Obwohl PMMoV in hohen Konzentrationen aus Fäkalien und unbehandeltem Abwasser gewonnen wird, sind die PMMoV-Konzentrationen im Abwasser in hohem Maße von der Verfügbarkeit und dem Verzehr infizierter Paprika und einiger anderer Nachtschattengewächse und ihrer Produkte abhängig (Holm et al. 2022; Symonds et al. 2018; Wu et al. 2021; Zhang et al. 2005). Somit ist die Ausscheidung stark durch geografische, saisonale und soziokulturelle Randparameter beeinflusst.

Mehrere Studien zeigten, dass die Normalisierung durch Biomarker die Korrelationen mit den Fallzahlen auf Gemeinde-/Kreisebene nicht durchgängig verbessert (Duvall et al. 2022; Feng et al. 2021; Greenwald et al. 2021; Sakarovitch et al. 2022; Zhan et al. 2022; Langeveld et al. 2023; Maal-Bared et al. 2023). Nachfolgend werden zwei aktuelle Studien, einmal zur CrAssphage und einmal zu PMMoV, näher beschrieben.

Langeveld et al. (2023) untersuchten zwei alternative Normalisierungsmethoden, die elektrische Leitfähigkeit und die CrAssphage und verglichen diese mit der Normalisierung auf den Durchfluss. Zu diesem Zweck wurden zwischen September 2020 und August 2021 an neun Messstellen mengenproportionale 24-Stunden-Proben ( $n = 1.116$ ) genommen. Darüber hinaus wurden 221 Stuhlproben aus dem Klinikum Rotterdam analysiert, um die tägliche CrAssphagen-Belastung pro Person zu bestimmen. Die Ergebnisse zeigen, dass, obwohl die Ausscheidungsraten von CrAssphage pro Person stark variieren und eine bimodale Verteilung aufweisen, auf Bevölkerungsebene die CrAssphage-Belastung pro Person und Tag über die Zeit in allen Einzugsgebieten ähnlich war. Folglich wurde geschlossen, dass CrAssphage als

quantitativer Biomarker für die Einwohnergewichtung für Einzugsgebiete oberhalb von ca. 6.000 angeschlossenen Einwohnern verwendet werden kann. Die elektrische Leitfähigkeit wurde als besonders geeignet angesehen, um die Verdünnungsraten des Abwassers im Verhältnis zu den Trockenwetter-Abflusskonzentrationen zu bestimmen. Die allgemeine Schlussfolgerung lautet, dass eine Durchfluss-Normalisierung erforderlich ist, um auch kurzfristige Trends in der Viruszirkulation zuverlässig zu bestimmen. Die Normalisierung auf CrAssphage und/oder die Messung der elektrischen Leitfähigkeit kann dabei als Qualitätskontrolle dienen.

Maal-Bared et al. (2023) untersuchten in einer Studie die Auswirkungen von Durchfluss, Populationsgröße und Biomarker-Normalisierung auf die Korrelationen und Vorlaufzeiten für zehn Gemeinden in zwölf Abwassereinzugsgebieten in Alberta (Kanada) zwischen September 2020 und Oktober 2021 ( $n = 1.024$ ). Dabei wurde versucht festzustellen, ob die Normalisierung durch das Pepper Mild Mottle Virus (PMMoV) im Vergleich zu anderen Normalisierungsparametern (z. B. Durchfluss, gemeldete und dynamische Populationsgrößen, BSB, AFS,  $\text{NH}_3$ ,  $P_{\text{ges}}$ ) Vorteile bietet. Die PMMoV-Konzentrationen korrespondierten mit den Zuflussmengen der Anlagen und waren in den städtischen Zentren am höchsten. Die SARS-CoV-2-Zielgene E, N1 und N2 waren alle negativ mit dem pH-Wert des Abwasserzuflusses verbunden, während PMMoV positiv mit der Temperatur assoziiert war. Die Einzugsgebiet-übergreifende Analyse der Daten zeigte, dass die Normalisierung die  $p$ -Werte um fast 0,1 erhöhte und für Ammoniak, TKN und TP am höchsten war, gefolgt von PMMoV. Die Normalisierung durch andere Parameter schwächte die Assoziationen ab. Keiner der festgestellten Unterschiede war statistisch signifikant. Die standortspezifischen Korrelationen zeigten, dass die Normalisierung der SARS-CoV-2-Daten durch PMMoV die Korrelationen nur bei zwei der zwölf Messstellen signifikant verbesserte; bei beiden handelte es sich um große Abwasserschächte oder Mischwasserkanäle. Bei fünf Messstellen verbesserte die Normalisierung durch herkömmliche Abwasserparameter und dynamische Bevölkerungsschätzungen die Korrelationen. Die Vorlaufzeit der SARS-CoV-2 Daten vor den Meldezahlen lag sowohl bei gepoolten als auch bei standortspezifischen Vergleichen zwischen ein und vier Tagen. Insgesamt wurde eine Normalisierung auf spezielle Abwasserparameter nur dann empfohlen, wenn mindestens zwei parallele Verfahren Verwendung finden und sich als nützlich erwiesen haben für die Normalisierung nach einer initialen Testphase. Die Normalisierung anhand von klassischen Abwasserparametern und die dynamische Bevölkerungsschätzung sollten laut den Autoren weiter untersucht werden. Grundsätzlich wurde die Zulaufvolumenstrommessung als probates Mittel für die Normalisierung identifiziert.

Auf Basis der dargestellten Erkenntnisse der genannten Autoren und aufgrund festgestellter hoher Schwankungen bei den Biomarkern PMMoV und CrAssphage fand im Rahmen der nachfolgend dargestellten Untersuchungen primär eine Normalisierung mittels Tageswassermengen innerhalb der 24-Stunden-Beprobungszeiträume statt. Eine Normalisierung auf die

Leitfähigkeit würde ebenfalls v. a. die Regenbeeinflussung widerspiegeln und wurde daher nur zur Kontrolle der Ergebnisse betrachtet.

### II.3.3.2.2 Frachten und hydraulische Auslastung im Zulauf der Kläranlagen

Aus der Tageswassermenge  $Q_{zu}$  [ $m^3/d$ ] sowie der gemessenen SARS-CoV-2 Konzentration  $C_{SARS-CoV-2}$  [Genkopien/100ml] bzw. der gemessenen Konzentration des Surrogatvirus  $C_{Surrogatvirus}$  [Genkopien/100ml] werden gemäß den Gleichungen Gl.: 2-1 und Gl.: 2-2 die entsprechenden Frachten berechnet.

$$B_{d,SARS-CoV-2} \left[ \frac{\text{Genkopien}}{d} \right] = Q_{zu} \left[ \frac{m^3}{d} \right] * C_{SARS-CoV-2} \left[ \frac{\text{Genkopien}}{100ml} \right] \quad \text{Gl.: 2-1}$$

$$B_{d,Surrogatvirus} \left[ \frac{\text{Genkopien}}{d} \right] = Q_{zu} \left[ \frac{m^3}{d} \right] * C_{Surrogatvirus} \left[ \frac{\text{Genkopien}}{100ml} \right] \quad \text{Gl.: 2-2}$$

Um abschätzen zu können, ob bedingt durch die signifikant größere Abwassermenge in Folge eines Niederschlags ein Einfluss auf die Messergebnisse vorlag, wird die hydraulische Auslastung der Kläranlage mit der Tageswassermenge  $Q_{zu}$  und der maximalen Wassermenge  $Q_{max}$  gemäß der Gleichung Gl.: 2-3 berechnet.

$$\text{Auslastung}_{KA} [\%] = Q_{max} \left[ \frac{m^3}{d} \right] / Q_{zu} \left[ \frac{m^3}{d} \right] \quad \text{Gl.: 2-3}$$

Die Berücksichtigung des Verhältnisses des Surrogatvirus bezogen auf das Ammonium als Indikatorwert für die Prognosewertgüte konnte aufgrund der geringen Datenbasis noch nicht ausreichend geprüft werden, sodass dieser Parameter zum derzeitigen Stand nicht mit in diesen Bericht aufgenommen wird.

### II.3.3.2.3 Weitere Normalisierungsparameter

Die in Kapitel II.3.3.2.1 erläuterte Normalisierung auf die Leitfähigkeit oder anhand von humanen Fäkalmarkern kann laut Langeveld et al. (2023) über folgende Gleichungen erfolgen, wenn eine Volumenstrommessung zur Verfügung steht:

$$\text{mult. factor} (crAss) = \frac{Q_{TW,ref}}{q_E \cdot EW} * \frac{C_{crAss,TW,ref}}{C_{crAss}} \quad \text{Gl.: 2-4}$$

$Q_{TW,ref}$	Täglicher Trockenwettervolumenstrom im Referenzzeitraum	$[m^3/d]$
$q_E$	Einwohnerspezifischer Abwasseranfall (typ. 0,12 $m^3/d$ )	$[m^3/(E \cdot d)]$
EW	Einwohner im Einzugsgebiet	[E]
$C_{crAss,TW,ref}$	Mittlere crAssphage Konzentration im Trockenwetterfall	$[GC/m^3]$
$C_{crAss}$	Analysierter Wert in 24-Stunden-Mischprobe	$[GC/m^3]$

Steht keine Volumenstrommessung zur Verfügung, dann ist  $Q_{TW,ref}$  abzuschätzen.

#### II.3.3.2.4 Einwohnerspezifische SARS-CoV-2 Fracht

Der Bezug auf die im Einzugsgebiet lebende Bevölkerung kann auch anhand von Daten des Kanalnetzbetreibers zu den angeschlossenen Einwohnern erfolgen. Entsprechende Daten werden nicht kontinuierlich erhoben, sind (nach Erfahrung der Abwasserentsorger) zumeist über mindestens ein Jahr als statisch anzunehmen und spiegeln keine Pendlerbewegungen wider.

#### II.3.3.3 **Resampling**

Unter *Resampling* wird eine Angleichung der Abstände zwischen Datenpunkten in einem Datensatz verstanden. Da die Analysentage mit Montag und Mittwoch ungleich in der Woche verteilt sind, führt eine Anwendung der nachfolgenden Schritte zur Glättung und Trendbestimmung (vgl. nachfolgende Kapitel) zu einer Trendverzerrung. Das *Resampling* kann ein sog. *up-* oder *down-sampling* erfolgen. Beim *down-sampling* würden die Daten z. B. auf einen Wochen-Mittelwert verdichtet. Nach Rauch et al. (2022) kann das *down-sampling* auf Wochenmittelwerte die Robustheit des Datensatzes erhöhen und kurzfristige wocheninterne Schwankungen z. B. aufgrund von Pendlereinflüssen minimieren. Das *up-sampling* kann eine Interpolation der Daten (z. B. linear, polynomisch, kubisch oder anhand des nächsten Nachbarn) enthalten. Aufgrund der hohen Varianz in den Datenpunkten wurde darauf hier verzichtet. Stattdessen wurde der Datensatz um die Wochentage ohne SARS-CoV-2 Analysen erweitert. Für die weiteren Tage standen dann die Volumenströme und z. T. weitere Parameter zur Verfügung.

#### II.3.3.4 **Glättung/Regression**

##### II.3.3.4.1 Allgemeine Hinweise

Für die Glättung, bzw. Regression von Daten wird vereinfacht zwischen parametrischen und nicht-parametrischen Regressionsmodellen unterschieden. Der Hauptunterschied zwischen parametrischen und nichtparametrischen Regressionsmodellen liegt in der Annahme über die Form der Beziehung zwischen den Variablen. Parametrische Modelle bieten eine klare mathematische Funktion, um die Beziehung zu modellieren, während nichtparametrische Modelle flexibler sind und keine explizite Funktion für die Beziehung vorgeben. Nichtparametrische Modelle können jedoch anfälliger für Überanpassung und schwieriger zu interpretieren sein, da sie keine klare Funktionsform haben (Norvig und Russell 2021).

Ein parametrisches Regressionsmodell ist ein Modell, das eine bestimmte funktionale Beziehung zwischen den Variablen annimmt und eine Reihe von parametrischen Schätzungen verwendet, um die unbekannt Parameter der Modellfunktion zu schätzen. Ein Beispiel für ein parametrisches Regressionsmodell ist die lineare Regression, bei der eine lineare Beziehung

zwischen der abhängigen und der unabhängigen Variablen angenommen wird und die Schätzungen der Steigung und des y-Achsenabschnitts verwendet werden, um die Modellfunktion zu schätzen (Norvig und Russell 2021).

Im Gegensatz dazu sind nichtparametrische Regressionsmodelle eine flexible Methode, die keine Annahmen über die funktionale Form der zugrunde liegenden Beziehung macht. Diese Modelle verwenden statt einer spezifischen Funktion oder Annahme eine Schätzung der Beziehung, die auf den Daten selbst basiert. Ein Beispiel für ein nichtparametrisches Regressionsmodell ist der gleitende Mittelwert, bei dem für jeden Wert der abhängigen Variablen ein Mittelwert über einen bestimmten Zeitraum berechnet wird (Norvig und Russell 2021).

#### II.3.3.4.2 Gleitender Mittelwert

Um die Einflüsse der Schwankungen in einzelnen Analysewerte zu reduzieren, wird aus den berechneten Frachten der gleitende Mittelwert aus 8 Tagen (eine Woche mit i. d. R. drei Analysewerte, nachfolgend auch MA3) und aus 15 Tagen (zwei Wochen mit i. d. R. fünf Analysewerte, nachfolgend auch MA5) gebildet. Hierbei werden alle Analysewerte verwendet, die qualitätsgesichert aus dem jeweiligen Labor zur Verfügung gestellt wurden. Liegt am Probenahmetag eine Beeinflussung durch eine größere Menge an Niederschlag vor, so erfolgte im Praxistest eine deskriptive Datenanalyse, jedoch wurde der Wert in der Berechnung des gleitenden Mittelwerts mitberücksichtigt. In Kapitel II.3.3.7.1 wird exemplarisch auch ein Ausschluss von identifizierten Ausreißern dargestellt.

#### II.3.3.4.3 Locally estimated scatterplot smoothing (LOESS)

LOESS (Locally Estimated/Weighted Scatterplot Smoothing) ist eine nichtparametrische Regressionsmethode, die verwendet wird, um die Beziehung zwischen einer abhängigen und einer unabhängigen Variablen zu modellieren. LOESS basiert auf der Idee, dass eine Funktion, die eine Beziehung zwischen den Variablen beschreibt, in kleinen Bereichen der unabhängigen Variablen linear sein kann. LOESS verwendet eine bewegliche Fenstertechnik, um für jeden Wert der unabhängigen Variablen ein lokales lineares Modell zu schätzen. Dabei werden nur die Beobachtungen in der Nähe des aktuellen Wertes der unabhängigen Variablen berücksichtigt. Die Glättung erfolgt durch eine Gewichtung der Beobachtungen innerhalb des Fensters, wobei Beobachtungen in der Nähe des aktuellen Wertes stärker gewichtet werden als entferntere Beobachtungen. Die Gewichte werden basierend auf einer Kern-Funktion, wie z. B. einer Glockenkurve, berechnet. LOESS ist generell ein flexibles Werkzeug für die explorative Datenanalyse und Modellierung von Beziehungen zwischen Variablen. Es kann jedoch anfällig für Überanpassung sein, insbesondere wenn die Fenstergröße zu klein gewählt wird. Eine sorgfältige Wahl der Fenstergröße und der Kernfunktion ist daher wichtig, um ein angemessenes Modell zu erhalten. (Cleveland 1979)

### II.3.3.5 Darstellung und abwassertechnische Bewertung

Basierend auf den Projektergebnissen kann, bedingt durch die unterschiedlichen Einzugsgebiete, keine feste, Kläranlagenübergreifende Bewertungsmatrix für die Auswirkung von Niederschlagsereignissen definiert werden, sodass die Relevanz der Beeinflussung auf Basis der Erfahrungen in Form einer Expertenbewertung eingebracht wird.

Für die Bewertung der einzelnen Abwasserbefunde an den jeweiligen Standorten werden die oben beschriebenen Parameter in verschiedenen Grafiken dargestellt (vgl. Grafiken in Kapitel II.3.5 und II.3.6). Im oberen Teil der Grafiken sind die berechneten SARS-CoV-2 Frachten sowie die geglätteten Kurven dargestellt.

In der darunter liegenden Grafik wird die berechnete Inzidenz für das Einzugsgebiet dargestellt. Da die genauen Daten aus dem Einzugsgebiet der Kläranlage nicht bekannt waren, wurde dieser Wert anhand der aus den unterschiedlichen Städten und Landkreisen an die jeweilige Kläranlage angeschlossenen Einwohnern berechnet. Hierfür wurde die aktuell Fallzahl im Einzugsgebiet gemäß der Gleichung Gl.: 2-4 berechnet. Diesem Ansatz liegt die Vereinfachung zugrunde, dass die Virusinfektionen konstant über die Fläche verteilt vorliegen.

$$AkFA_{EZG} = \sum AFA_{Stadt} * \frac{E_{Stadt,KLA}}{E_{Stadt}} \quad \text{Gl.: 2-5}$$

$AkFA_{EZG}$	Aktuelle Fallzahlen im Einzugsgebiet der Kläranlage
$AFA_{Stadt}$	Aktuelle Fallzahlen der angeschlossenen Stadt
$E_{Stadt,KLA}$	Einwohner der Stadt die an der Kläranlage angeschlossen sind
$E_{Stadt}$	Einwohner der Stadt

Aus der Fallzahl konnte dann die geschätzte 7-Tage-Inzidenz des Einzugsgebiets berechnet werden. Diese dient zur Untersuchung, ob ähnliche Trends in der Inzidenz und in den Abwasserdaten zu identifizieren waren.

In der dritten Teilgrafik sind die Tageswassermengen der Kläranlagen dargestellt, die über den gesamten Zeitraum betrachtet werden. Auf Basis der Daten wurde eine deskriptive Auswertung getätigt und Ausreißer identifiziert.

### II.3.3.6 Entwicklung eines Trendindikators

Die SARS-CoV-2 Genkopie-Fracht ist nach dem aktuellen Kenntnisstand der Autoren zwischen den beprobten Kläranlagen nicht direkt vergleichbar. Dies ist zum einen in den unterschiedlichen Zielgenen, bzw. Biomarkern begründet, die je nach Analysemethode abweichende Signale liefern können. Aber auch bei Anwendung des gleichen Analytik-Workflow auf unterschiedliche Kläranlagenzuläufe zeigen sich deutliche Unterschiede in den ermittelten Genkopie-Konzentrationen, bzw. Genkopie-Frachten. Auch eine Normierung des Werts auf die nominal angeschlossenen Personen im Kläranlageneinzugsgebiet lieferte bislang keine

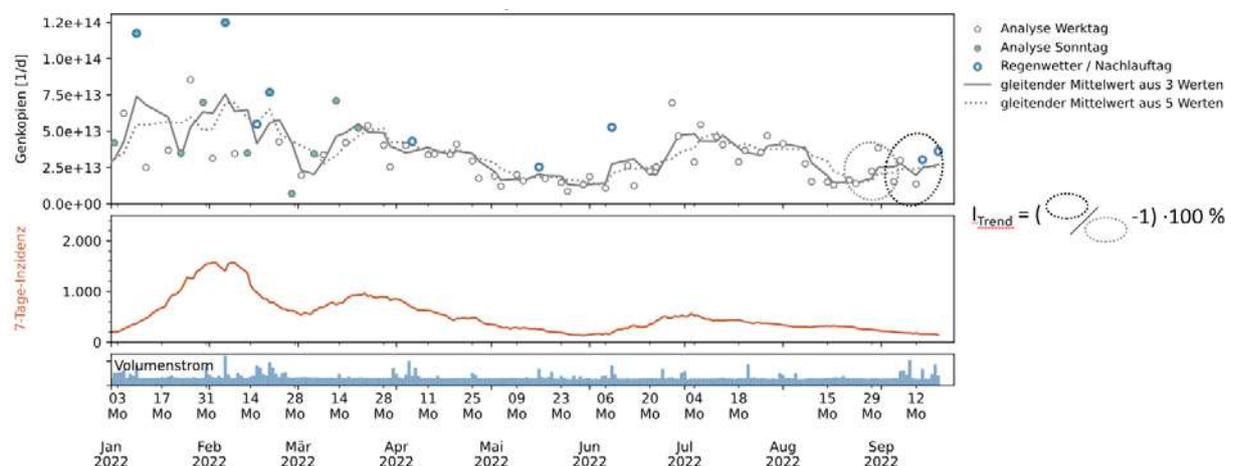
einheitliche Bezugsgröße. Entsprechend wird an dieser Stelle von einer Ermittlung des derzeitigen Niveaus des Infektionsgeschehens anhand von anlagenübergreifenden Summen- oder Mittelwertbildungen der Genkopie-Frachten abgesehen.

1. Die Trendbestimmung erfolgt je Kläranlage und liefert als Ausgangswert - je nach untersuchtem Trendindikator - eine prozentuale Veränderung des derzeitigen Zeitraums zum Vorzeitraum,
2. die Steigung einer, mittels linearer Regression angenäherten Funktion im Betrachtungszeitraum oder
3. eine Einordnung des Trends in die Kategorien „Steigender Trend“, „Sinkender Trend“ und „Kein gesicherter Trend“.

Die Ergebnisse der untersuchten Indikatoren werden in Trend-Grafiken je Einzelkläranlage dargestellt. Die Darstellung ermöglicht die Gruppierung nach Zeiträumen mit gemeinsamer Trendentwicklung anhand von Experteneinschätzung. Eine automatisierte Bewertungsfunktion und die Zusammenfassung der Kläranlagentrends in einen Gebietsindikator werden erprobt und mit dem Auftraggeber LZG diskutiert, bevor eine Implementierung stattfindet. Dabei wird ermittelt, ob eine Verdichtung der derzeit enthaltenen Informationen, wie geographische Lage und angeschlossene Einwohnerzahl je Einzelkläranlage in einen aggregierten Gebietsindikator zu einem Gewinn oder Verlust an Aussagekraft für NRW führt.

Nachfolgend werden die einzelnen Trendindikatoren vorgestellt und erläutert. Da es sich hierbei um Auswertungen aus laufenden Forschungsvorhaben handelt, ist diese Sektion des Berichts im Verlauf des Beratungsauftrags Änderungen und Ergänzungen unterworfen.

Ein derzeit untersuchter Trendindikator ist die prozentuale Veränderung des gleitenden Mittelwerts aus zwei Wochen (i. d. R. 5 Werte; MA5) zum aktuellen Probenahmetag (aktuelle Woche) zum MA5 des gleichen Probenahmetages vor zwei Wochen (vgl. Abbildung II.34).



**Abbildung II.34: Markierung der Wertebereiche für den Trendindikator Prozentuale Änderung MA5<sub>Aktuell</sub> zu MA5<sub>Vorwochen</sub>**

Zurzeit wird an einem Ausschlusskriterium für stark abweichende Genkopienfrachten gearbeitet, welcher nach Verifizierung über Datensätze weiterer Kläranlagen als zusätzliches Tool für die Bewertung zur Verfügung stehen wird.

Für das Trendkriterium des RKI wird der Wert aus der LOESS-Regression der aktuellen Woche mit dem Wert aus der Vorwoche verglichen.

### **II.3.3.7 Untersuchung alternativer Glättungs- und Trenddetektionsmethoden**

Im Rahmen des Austauschs auf nationaler und internationaler Ebene wurden anhand der COVIDready-Daten noch weitere Methoden zur Datenglättung und Trenddetektion untersucht. Diese sind nachfolgend kurz aufgeführt und werden in Kapitel II.3.5 und II.3.6 exemplarisch der vorgenannten Methodik gegenübergestellt.

#### **II.3.3.7.1 LOESS nach RKI-Angaben**

Das Robert Koch-Institut (RKI) verwendet für das bundesweite Pandemieradar eine LOESS-Regression mit integrierter Kreuz-Validierung. Auf Nachfrage wurde der entsprechende Code, der in der Software R geschrieben ist, im Oktober 2022 freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Eventuelle Anpassungen an der Methode, die zeitweise erfolgt sein könnten, sind nicht bekannt und wurden im Rahmen der Arbeiten in COVIDready daher nicht berücksichtigt. Nachfolgend findet sich eine Erläuterung der Vorgehensweise, die durch das RKI zur Verfügung gestellt wurde:

*Für jeden Standort wird die Veränderung der mittels einer lokal gewichteten Regression (LOESS-Methode) berechneten / vorhergesagten Viruslast zum aktuellsten Messzeitpunkt innerhalb einer Woche gegenüber der für 7 Tage vorher vorhergesagten Viruslast berechnet. Die Kurven, auf denen die vorhergesagten Viruslasten liegen, werden mit Hilfe des LOESS-Verfahrens für jeden Standort einzeln geschätzt. Das LOESS-Verfahren verwendet eine lokal gewichtete Regressionsfunktion, sodass in die Vorhersage einer Viruslast auf der LOESS-Kurve ein bestimmter Anteil aller beobachteter Viruslasten um den Messwert herum einbezogen wird, wobei der Einfluss mit der Entfernung zum Zeitpunkt der vorherzusagenden Viruslast abnimmt. Der Anteil an einzubeziehenden Viruslasten wird für jeden Standort mit Hilfe der generalisierten Kreuz-Validierungs-Methode festgelegt, welches die Vorhersagegüte der Kurve optimiert. Die Idee der Kreuzvalidierungsmethode ist es, eine beobachtete Viruslast aus den Daten zu entfernen, diese auf Basis eines Anteils aller anderen beobachteten Viruslasten um den Messwert herum mit dem LOESS-Verfahren vorherzusagen und die resultierende Abweichung zwischen beobachteter und vorhergesagter Viruslast zu berechnen. Dieses Verfahren wird für alle Messzeitpunkte durchgeführt und die berechneten Abweichungen summiert. Der optimale Anteil an einzubeziehenden Viruslasten nach dem Kreuzvalidierungskriterium ist der, der diese Summe minimiert. So ergibt sich für jeden Standort eine glatte Kurve und für jeden Zeitpunkt (auch zwischen den Messzeitpunkten) eine vorhergesagte Viruslast. Die prozentuale Veränderung zwischen der vorhergesagten Viruslast zum aktuellsten Messzeitpunkt innerhalb einer Woche und der für 7 Tage vorher vorhergesagten Viruslast wird berechnet und es wird angegeben, an wie vielen Standorten sich in 7 Tagen ein steigender Trend ("ansteigend", definiert als Änderung > 15 %), ein fallender Trend ("fallend", Änderung < -15 %) oder keine*

relevante Änderung ("stabil", Änderung zwischen -15 % und 15 %) beobachten lässt. (Team Abwasser-surveillance RKI, E-Mail vom 19.10.2022)

Der nicht modifizierte Code des RKI wird für die Berechnung der Kurve „LOESS-Regression nach RKI-Methode“ in Kapitel II.3.3.7.1 verwendet.

### **Anmerkung**

Durch die verwendete *generalisierte Kreuz-Validierungs-Methode* wird die Kurve der LOESS-Regression des Pandemie-Radars bei wechselnden Datenmengen automatisch über den ganzen Betrachtungszeitraum angepasst. Untersuchungen mit den Daten aus COVIDready zeigen, dass in einem Datensatz, der Phasen hoher und niedriger Befunde im Abwasser umfasst, die gesamte Kurve stärker geglättet wird, als dies bei gleitenden Mittelwerten der Fall ist. Die Auswirkungen sind in Kapitel II.3.3.7.1 exemplarisch dargestellt. Eine Mitigationsstrategie könnte eine Unterteilung des Datensatzes einer Kläranlage in unterschiedliche Pandemiephasen sein. Dies wurde im Rahmen von COVIDready nicht abschließend geprüft.

### **II.3.3.7.2 Internationale Ansätze am Beispiel der CDC-Methode**

Das Center for Disease Control and Prevention (CDC) der Vereinigten Staaten hat auf seiner Website eine Methode zur Trenddetektion in Abwasserdaten veröffentlicht, die nachfolgend maschinell übersetzt wurde:

*Die Klassifizierung von Abwassertrends ist die statistische Analyse von Veränderungen in der normalisierten Konzentration von SARS-CoV-2 im Abwasser (d. h. nicht durch qualitative visuelle Bewertung). Anhand der Trends in diesen Abwasserdaten lassen sich die (gemeldeten und nicht gemeldeten) COVID-19-Trends innerhalb der Gemeinde, die zum Abwassersystem beiträgt, beurteilen. Trends der SARS-CoV-2-Konzentrationen im Abwasser können nicht anhand von weniger als drei Probenahmestellen ermittelt werden (z. B. sind bei einer konsequenten wöchentlichen Probenahme 15 Tage an Daten erforderlich, um Trends abzuschätzen). Sie können die Trends in Kategorien einteilen, die auf der Dauer und der Richtung der Veränderung der Viruskonzentration basieren, um sie zu interpretieren und für die öffentliche Gesundheit zu nutzen.*

**Trendberechnung:** *Die Verteilung der SARS-CoV-2-Konzentrationen im Abwasser ist bei der Berechnung von Trends in den Viruskonzentrationen zu berücksichtigen. Vor der Berechnung von Trends sollten die Konzentrationen normalisiert werden, um Änderungen in der Abwasserverdünnung und Unterschiede im relativen Eintrag menschlicher Abfälle im Laufe der Zeit zu berücksichtigen.*

*Trends können mithilfe einer linearen Regression mit mindestens drei Messungen berechnet werden, wobei die Steigung den Trend beschreibt. Die unabhängige Variable in der Trendregression sollte das Datum und nicht die Anzahl der Messungen sein, um Veränderungen pro Tag und nicht pro Messung abzuschätzen. Da die SARS-CoV-2-Konzentrationen im Abwasser wahrscheinlich lognormal verteilt sind, sollten die normalisierten SARS-CoV-2-Konzentrationen vor der Berechnung von Trends und anderen Statistiken log-transformiert werden. Für Trends, die mit  $\log_{10}$ -transformierten Konzentrationen*

berechnet werden, berechnen Sie die prozentuale tägliche Veränderung (engl. Percent daily change, PDC) der Viruskonzentrationen aus der Steigung als:

$$PDC = (10^{\text{Steigung}} - 1) \cdot 100 [\%] \quad \text{Gl.: 2-6}$$

Beziehen Sie Abwasserproben mit SARS-CoV-2-Werten unterhalb der Nachweisgrenze in die Trendberechnungen ein. Dies kann geschehen, indem der Probe ein Wert von der Hälfte der Nachweisgrenze des Assays zugewiesen wird.

**Variabilität der Messung:** Für eine präzisere Auswertung von Abwasserdaten können Trendberechnungen die Variabilität in jeder SARS-CoV-2-Messung durch statistische Gewichtung mittels gewichteter Regressionen der kleinsten Quadrate einbeziehen, die die Variabilität in den Schritten Probenahme, Verarbeitung und Quantifizierung berücksichtigen können.

**Trend-Klassifizierung:** Trends können grob nach Dauer (kurzfristig oder anhaltend) und Richtung (Anstieg, Rückgang oder Plateau) klassifiziert werden.

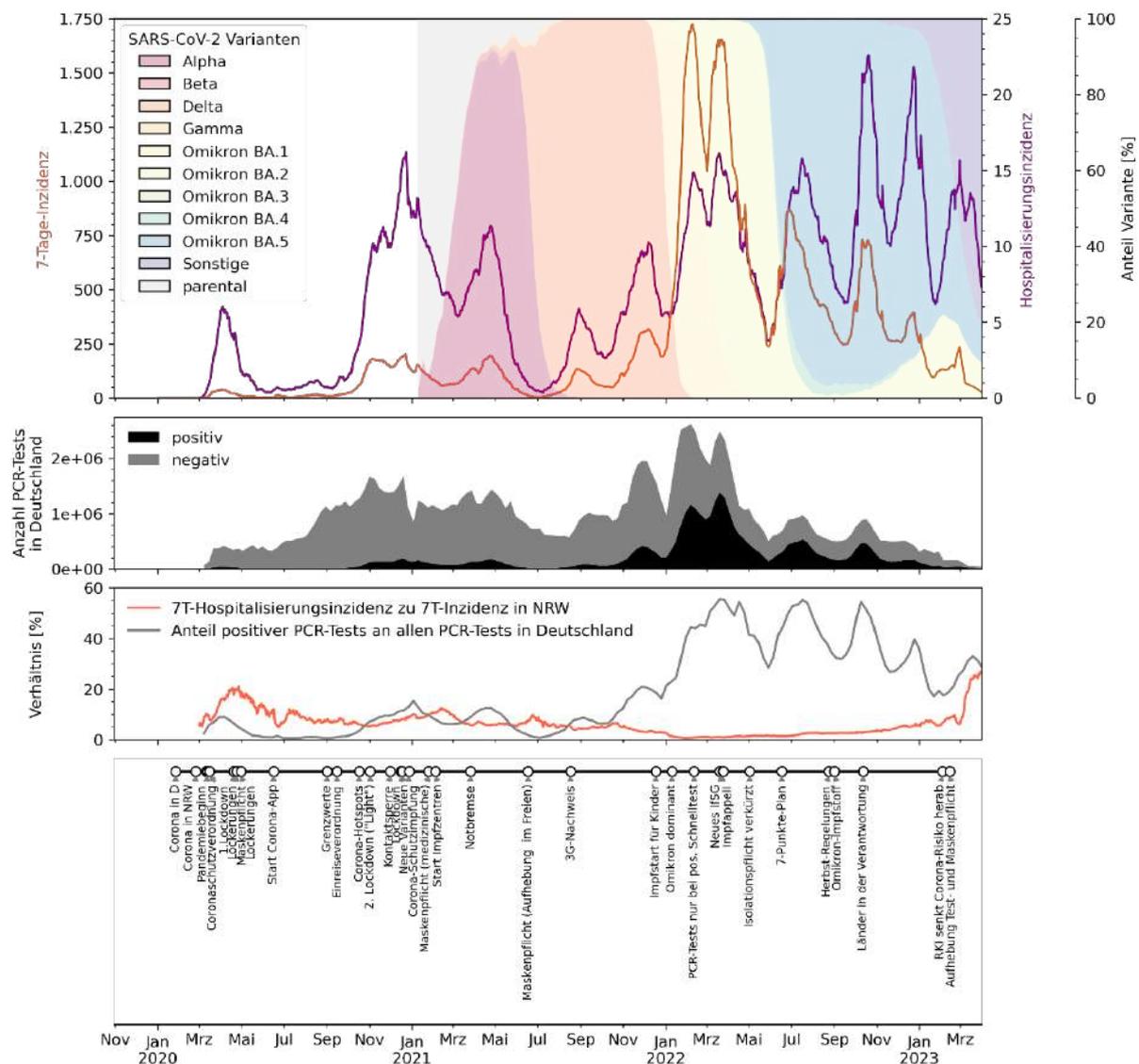
**Dauer:** Die Klassifizierung der Trends hängt von der Häufigkeit der Probenahmen ab. Beispielsweise könnten kurzfristige SARS-CoV-2-Abwassertrends als Trends definiert werden, die sich über weniger als zwei Wochen erstrecken, und anhaltende Trends könnten als Trends definiert werden, die sich über zwei Wochen oder länger erstrecken. Auf der Grundlage einer zweimal wöchentlich stattfindenden Abwasserprobenahme könnten kurzfristige Trends aus drei Proben berechnet werden, die über einen Zeitraum von acht Tagen entnommen wurden, und anhaltende Trends aus fünf Proben, die über einen Zeitraum von 15 Tagen entnommen wurden.

**Richtung:** Sie können die normalisierten SARS-CoV-2-Konzentrationstrends in "steigend", "fallend" oder "Plateau" einteilen, indem Sie die Trends auf statistische Signifikanz prüfen. Die statistische Signifikanz zeigt an, dass ein zunehmender oder abnehmender Trend vorliegt, der die Variabilität der SARS-CoV-2-Daten berücksichtigt. Sie können auch einen Mindestschwellenwert für die prozentuale tägliche Veränderung in Verbindung mit der statistischen Signifikanz verwenden, um die Trendrichtung zu bestimmen.

(maschinell übersetzt; Formatierung angepasst; Quelle: CDC 2023)

### II.3.4 Pandemieverlauf in NRW anhand veröffentlichter Humandaten

Die pandemische Situation war in Deutschland z. T. großen Änderungen zwischen unterschiedlichen dominierenden Virusvarianten, aber auch innerhalb von Zeiträumen mit einer dominierenden Variante unterworfen. In Abbildung II.35 ist die Pandemiesituation anhand veröffentlichter Zahlen des RKI grafisch aufgearbeitet. Dieses sind ergänzt um wichtige Termine aus einer Auflistung des LZG.NRW.



**Abbildung II.35: Aufbereitung des Pandemieverlaufs anhand der Informationen aus dem RKI GitHub<sup>2</sup> und der RKI-Website<sup>3</sup>, ergänzt um wichtige Termine aus einer Auflistung des LZG.NRW (vgl. Tabelle IV.1 im Anhang für genaue Datumsangaben)**

<sup>2</sup> Inzidenz: Robert Koch-Institut (2023): SARS-CoV-2 Infektionen in Deutschland, Berlin: Zenodo. DOI:10.5281/zenodo.7992609.; Hospitalisierung: Robert Koch-Institut (2023): COVID-19-Hospitalisierungen in Deutschland, Berlin: Zenodo. DOI:10.5281/zenodo.7992772.; PCR-Testungen: Robert Koch-Institut (2023): SARS-CoV-2-PCR-Testungen in Deutschland, Berlin: Zenodo. DOI: 10.5281/zenodo.7969958

<sup>3</sup> Variants of Concern: Robert-Koch-Institut (2023): Besorgniserregende SARS-CoV-2-Virusvarianten (VOC), [https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges\\_Coronavirus/Virusvariante.html](https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Virusvariante.html)

Die nachfolgend dargestellten Screenings (Kapitel II.3.5 und II.3.6) wurden zwischen Dezember 2021 und April 2023 durchgeführt. Innerhalb dieses Zeitraums war zunächst die Delta-Variante dominant. Diese wurde zum Jahreswechsel 2021 auf 2022 von Omikron BA.1 abgelöst. Im Mai/Juni 2022 erfolgte dann der Wechsel über BA.4 auf BA.5. Ab Ende 2022 fand eine Diversifizierung der Virusvarianten statt.

Die 7-Tage-Inzidenz für NRW erreichte in der Phase mit dominierender Omikron BA.1 Variante ihren Höhepunkt. Innerhalb der Folgezeit von Juni 2022 bis November 2022 mit dominierender BA.5 Variante waren drei ausgeprägte Erkrankungswellen zu verzeichnen, die jedoch in der Inzidenz sukzessive ein schwächeres Signal hervorriefen. Das Verhältnis an positiven PCR-Tests auf die Gesamt-PCR-Tests in Deutschland war in den beiden ersten Omikron BA.5 Wellen nahezu identisch, was für eine höhere Dunkelziffer spricht. In der dritten, von Omikron BA.5 dominierten Welle lag die Anzahl an PCT-Tests bei ca.  $\frac{1}{2}$  der vorherigen Welle. Somit kann auch hier die Dunkelziffer höher liegen. Untermauert wird diese Hypothese von der gleichzeitig angestiegenen Hospitalisierungsinzidenz. Dies wird besonders deutlich, wenn das Verhältnis aus Hospitalisierungsinzidenz und 7-Tage-Inzidenz gebildet wird. Hier ist im Jahr 2022 ein kontinuierlicher Anstieg dieses Verhältnisses zu verzeichnen. Der sprunghafte Anstieg dieser Verhältniszahl ab März 2023 koinzidiert mit dem Wegfall der Corona-Test- und Meldepflicht und ist somit voraussichtlich nicht auf eine erhöhte Hospitalisierungsrate zurückzuführen.

Es ist eine starke Anfälligkeit der Individualdaten für geänderte Testregime und die allg. politische Situation erkennbar. Ein davon unabhängiges Kontrollwerkzeug, wie die abwasserbasierte Epidemiologie kann hier aufgrund allgemeiner Kostenvorteile direkten Mehrwert bieten.

### II.3.5 Screening im Verbandsgebiet EGLV

Innerhalb des Forschungsvorhabens COVIDready konnte der dezentrale Workflow erfolgreich für sechs verschiedene Anlagen umgesetzt werden. Basierend auf den Erfahrungen des Abwasserscreenings aus zwei Jahren Projektlaufzeit können die folgenden Aspekte aus Sicht eines Abwasserentsorgers festgehalten werden:

Probenahme:

- Innerhalb des Forschungsvorhabens wurde keine unterschiedlichen Probenahmearten untersucht. Für die Beurteilung eines Trends des Infektionsgeschehens hat sich die volumenproportionale Probenahme als zuverlässig herausgestellt.
- Der genaue Probenahmezeitraum sollte sich nach dem Probenahmekonzept auf den Anlagen richten. Für das Abwassermonitoring spielt der genaue Zeitraum eine untergeordnete Rolle.

Probenlogistik

- Unter der Prämisse, die Ergebnisse schnellstmöglich bereitstellen zu können, stellt die Probenlogistik einen wichtigen Faktor dar. Am besten bewährt hat sich der Transport der Proben mit beschäftigten Personen. Die Durchführung des Praxistests hat dabei gezeigt, dass für eine Übermittlung der Ergebnisse am selben Tag die Proben bis 10:00 Uhr im Labor angeliefert werden müssen. Mit einer steigenden Anzahl an Proben kann sich das Zeitfenster verschieben.
- Besonders in den Sommermonaten ist sicherzustellen, dass die Probe auch während des Transports ausreichend gekühlt ist.
- Bei der Planung von Logistikstrecken sind vor allem in Ballungsgebieten ausreichend Pufferkapazitäten zu berücksichtigen.

Laboranalytik

- Der im Forschungsvorhaben COVIDready angewandte Analyseworkflow von Analytik Jena konnte gut in dem Kooperationslabor von Emschergenossenschaft, Lippeverband und Ruhrverband etabliert werden. Entscheidender Vorteil ist hier die Probenvorbereitung mittels Filtration.
- In dem gesamten Analyseworkflow stellt die Filtration aber auch den zeitaufwendigsten Schritt dar und kann je nach Kläranlage bis zu einer halben Stunde dauern. Besonders bei einer immer größer werdenden Anzahl an Proben würde für die schnelle Aufbereitung eine Automatisierung von zentraler Bedeutung sein.
- Die Dauer der Filtration des Abwassers der verschiedenen untersuchten Anlagen unterscheidet sich zum Teil signifikant. Während die meisten Kläranlagen bei einer Filtrationszeit um die drei bis fünf Minuten lagen, benötigte die Kläranlage Dinslaken

(Trennsystem) bis zu 30 Minuten. Die Auswirkung der Filtrationsdauer auf die Ergebnisse wurde innerhalb des Forschungsvorhabens nicht untersucht.

- Eine Auswertung der gemessenen Ct-Werte ist in der Tabelle 8 dargestellt. Der niedrigste Ct-Werte konnte auf den kleineren Anlagen gemessen werden.
- Insgesamt bewegen sich die Ct-Werte auf den verschiedenen Anlagen in einem vergleichbaren Bereich.

**Tabelle II.9: Gemessene Ct-Wert auf den Kläranlagen der Emschergenossenschaft und des Lippeverbands.**

Kläranlage	Max	Min	Median	Q1	Q2
Bottrop	32,11	26,35	28,32	27,6	28,91
Duisburg Alte-Emscher	33,17	25,44	27,08	26,59	27,57
Emschermündung	30,59	24,99	26,62	26,12	27,22
Dortmund-Deusen	29,35	24,77	26,66	26,31	27,35
Dinslaken	28,57	24,26	26,24	25,47	26,93
Dortmund Scharnhorst	30,2	24,8	26,87	26,2	27,39

#### Datenauswertung

- Die Auswertung der Daten hat gezeigt, dass in den Zeiten mit einer hohen Testbereitschaft innerhalb der Bevölkerung der Verlauf der Inzidenz gut über die Abwasserdaten abgebildet werden kann.
- In Zeiträumen mit reduzierten Testungen und einer höheren Dunkelziffer entkoppelt sich der Verlauf der Abwasserbefunde von der Inzidenz und stellt somit einen weiteren wichtigen Parameter dar.
- Im Zeitraum von November 2021 bis März 2022 konnte zum Teil ein Unterschied zwischen dem beprobten Sonntag (Wochenende) und dem Mittwoch (Werktag) in den Abwasserbefunden festgestellt werden. Dies erklärt zum Teil die starken Schwankungen zu Beginn der verschiedenen Messkurven. Für ein gezieltes Kläranlagenmonitoring sollten die Einflüsse aus Pendlerbewegungen und Tourismusströmungen mitberücksichtigt werden.
- Bedingt durch die zum Teil sehr starken Schwankungen in den Analysenwerten stellt die Bewertung des Einzelwerts eine größere Herausforderung dar. Auch die Angabe von kurzfristigen Trends kann auf Basis von zwei Analysenwerten pro Woche nur begrenzt vorgenommen werden.
- In Zeiten mit sehr starken Niederschlägen nimmt die Schwankung der einzelnen Messwerte im Vergleich zu längeren Trockenperioden zu.

- Auch bei einem steigenden Trend der Abwasserbefunde schwanken die Werte stärker als bei einem sinkenden Trend.
- Besonders bei einem starken Niederschlag nach einer längeren Trockenperiode nimmt die gemessene SARS-CoV-2 Fracht am einzelnen Probenstag signifikant zu.
- Die Darstellung längerfristiger Trends der Abwasserbefunde über das ganze Gebiet bietet eine gute Möglichkeit, das aktuelle Infektionsgeschehen über die Abwasserdaten mit zu beurteilen.
- Nach Aufhebung/Lockerung der Coronaregelungen nimmt die Schwankung der Abwasserbefunde weiter zu.

#### Kommunikation

- Abwassermonitoring ist eine interdisziplinäre Aufgabe, die das Mitwirken von verschiedenen Akteuren erfordert. Besonders die Kommunikation der Abwasserbefunde und die daraus resultierende Interpretation stellt eine große Herausforderung dar.
- Besonders wichtig für die Kommunikation ist die abwassertechnische Einordnung des einzelnen Messergebnisses, um sicherzustellen, dass Einzelwerte nicht überinterpretiert werden.
- Basierend auf den Erfahrungen des Vorhabens sollte eine Veröffentlichung der Daten seitens des Gesundheitswesens erfolgen. Hier bedarf es eines engen Austauschs mit den Abwasserentsorgern.
- Wichtig für zukünftige Kommunikationsstrategien ist es, die Akzeptanz und das Verständnis von Abwasserdaten weiter zu steigern. Darüber hinaus muss mit dem ÖGD der genaue Bedarf erörtert werden.

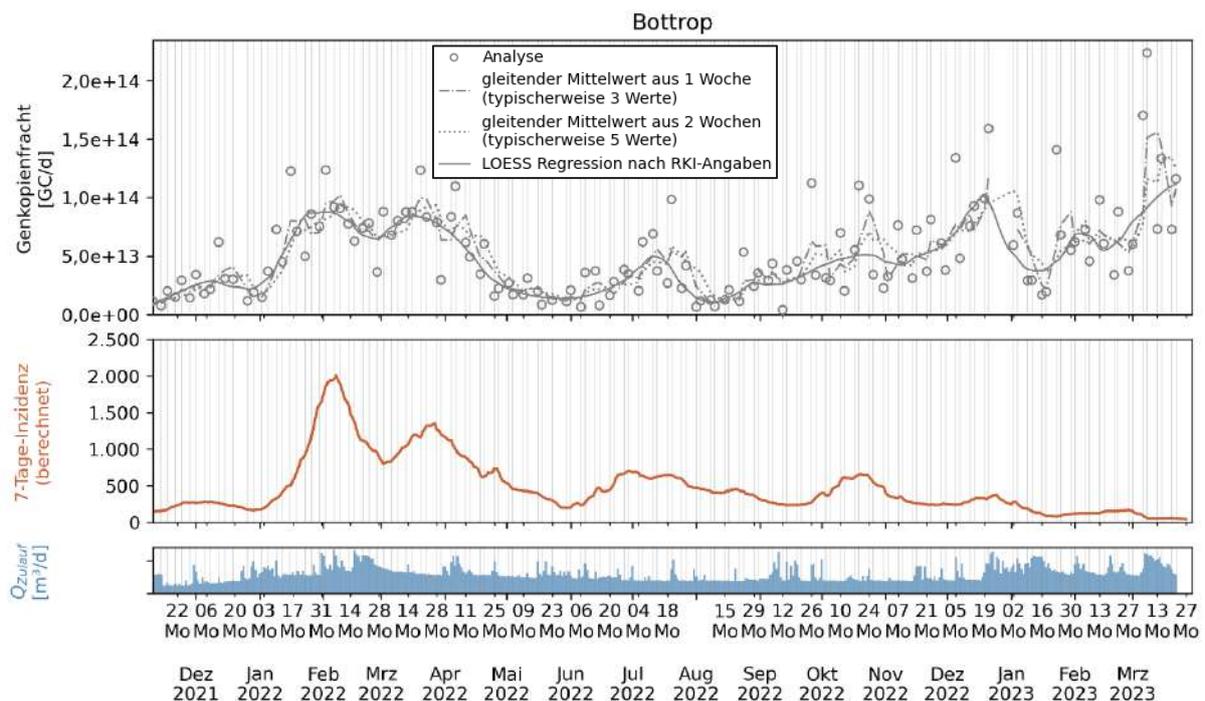
### II.3.5.1 Kläranlage Bottrop

#### Probenlogistik

Die Kläranlage Bottrop wurde durch einen Mitarbeiter von Emschergenossenschaft und Lippeverband angefahren. Über den gesamten Untersuchungszeitraum konnten die Proben zuverlässig und schnell transportiert werden.

#### Laboranalytik

Die Laboranalytik zeigte bei der Kläranlage keine Auffälligkeiten. Die Filtration des Abwassers verlief in weniger als fünf Minuten ohne Probleme. Der niedrigste gemessene Ct-Wert betrug 26,36 der höchste 32,11. Der Median betrug 28,32. In Vergleich zu den anderen untersuchten Kläranlagen wurden hier zumeist die höchsten Ct-Werte gemessen. Auffällig war bei den Untersuchungen auch, dass bei der Kläranlage Bottrop bei einer Lagerung der Proben der größte Effekt auf die Ergebnisse festzustellen war. Eine eindeutige Festlegung der Ursache konnte nicht vorgenommen werden, es bleibt aber anzumerken, dass die Kläranlage Bottrop industriell geprägt ist.



**Abbildung II.36: Zeitreihendarstellung Viruslast, berechnete 7-Tage-Inzidenz und hydraulische Auslastung der Kläranlage Bottrop**

#### Datenauswertung

Wie in der Abbildung II.36: zu erkennen ist, konnte der Verlauf der Inzidenz über die Abwassermessungen im Zeitraum vom 12/2021 bis 08/2022 sehr gut abgebildet werden. Im folgenden Zeitraum hat sich der Verlauf der SARS-CoV-2 Fracht im Abwasser von der berechneten Inzidenz abgekoppelt. Im Zeitraum von Dezember 2021 bis ca. November 2022 zeigen die

Abwasserbefunde auf der Kläranlage Bottrop im Vergleich zu dem folgenden Zeitraum bis zum Projektende eine geringere Schwankung. Auffällig dabei ist, dass besonders ab Januar 2023 die Schwankungen in den Abwasserdaten signifikant zunehmen. Mit zu berücksichtigen hierbei ist, dass ab Dezember 2022 die Niederschlagshäufigkeit zugenommen hat, was in der hydraulischen Auslastung der Kläranlage zu erkennen ist.

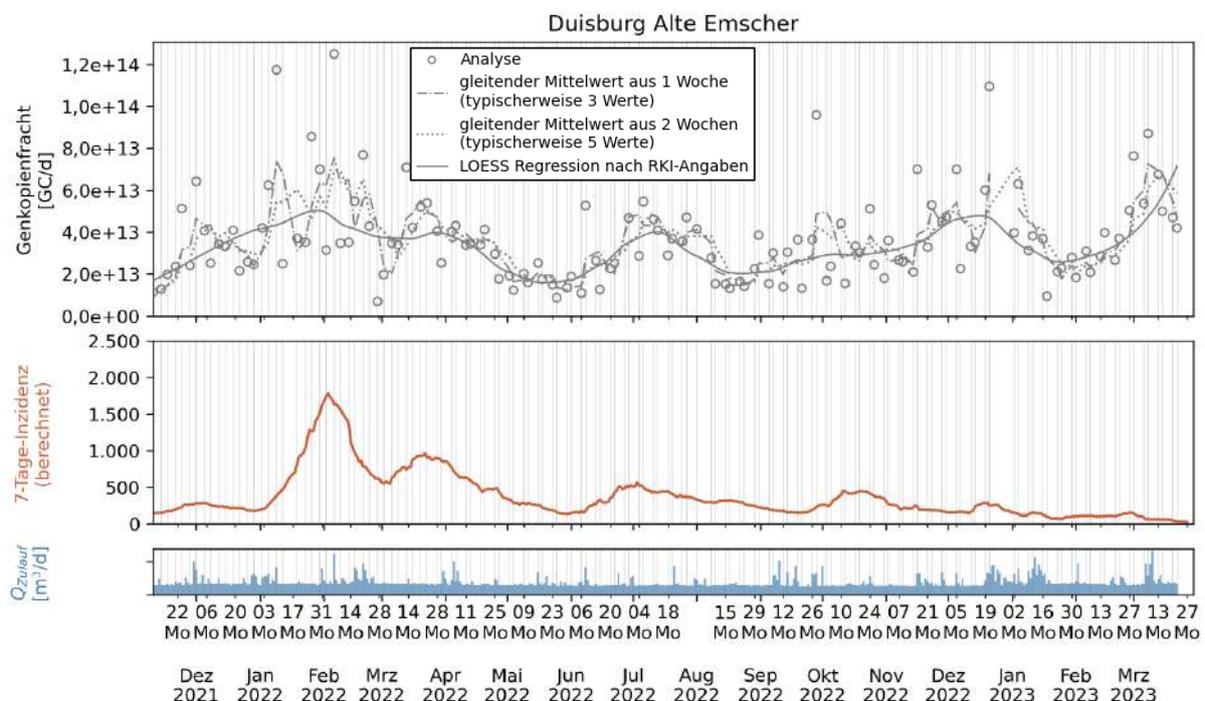
### II.3.5.2 Kläranlage Duisburg Alte Emscher

#### Probenlogistik

Die Probenlogistik für die Kläranlage Duisburg Alte Emscher wurde wie bei der Kläranlage Bottrop durch einen eigenen Mitarbeiter durchgeführt.

#### Laboranalytik

Die Laboranalytik auf der Kläranlage Duisburg Alte Emscher zeigt keine Auffälligkeiten. Die Filtrationsdauer verlief in einem ähnlichen Zeitraum wie die der Kläranlage Bottrop. Der höchste gemessene Ct-Wert betrug 33,17 und ist der von allen Kläranlagen am höchsten gemessenen Wert. Der niedrigste Ct-Wert betrug 25,44. Der Median belief sich auf 27,08 und liegt somit nach Bottrop von allen untersuchten Kläranlagen an zweithöchster Stelle. 25 % der gemessenen Ct-Werte lagen unterhalb von 26,59 und 85 % unterhalb von 27,57.



**Abbildung II.37: Zeitreihendarstellung Viruslast, berechnete 7-Tage-Inzidenz und hydraulische Auslastung der Kläranlage Duisburg Alte Emscher**

### **Datenauswertung**

Wie auch auf der Kläranlage Bottrop konnten die Infektionswellen auf der Kläranlage Duisburg Alte Emscher im Januar/Februar 2022 über das Abwasser abgedeckt werden. Auch die Sommerwelle im Juli 2022 konnte im Abwasser aufgezeigt werden. Ab Januar 2023 scheint sich der Verlauf der Abwasserbefunde auf der Kläranlage Duisburg Alte Emscher von der Inzidenz zu entkoppeln. Besonders der Anstieg der Abwasserbefunde Anfang Februar 2023 spiegelt sich nicht in der kalkulierten Inzidenz wider. Im Zeitraum von November 2021 bis März 2022 konnte ein Unterschied zwischen dem beprobten Sonntag (Wochenende) und dem Mittwoch (Werktag) in den Abwasserbefunden festgestellt werden. Dies erklärt die starken Schwankungen zu Beginn der Messkurve. Die Zunahme der Schwankung in den Messwerten ab Januar 2023 konnte auf der Kläranlage Duisburg Alte Emscher nicht so stark wie in Bottrop festgestellt werden. Der Einfluss der unterschiedlichen Größe und Struktur der untersuchten Einzugsgebiete sollte hier berücksichtigt werden.

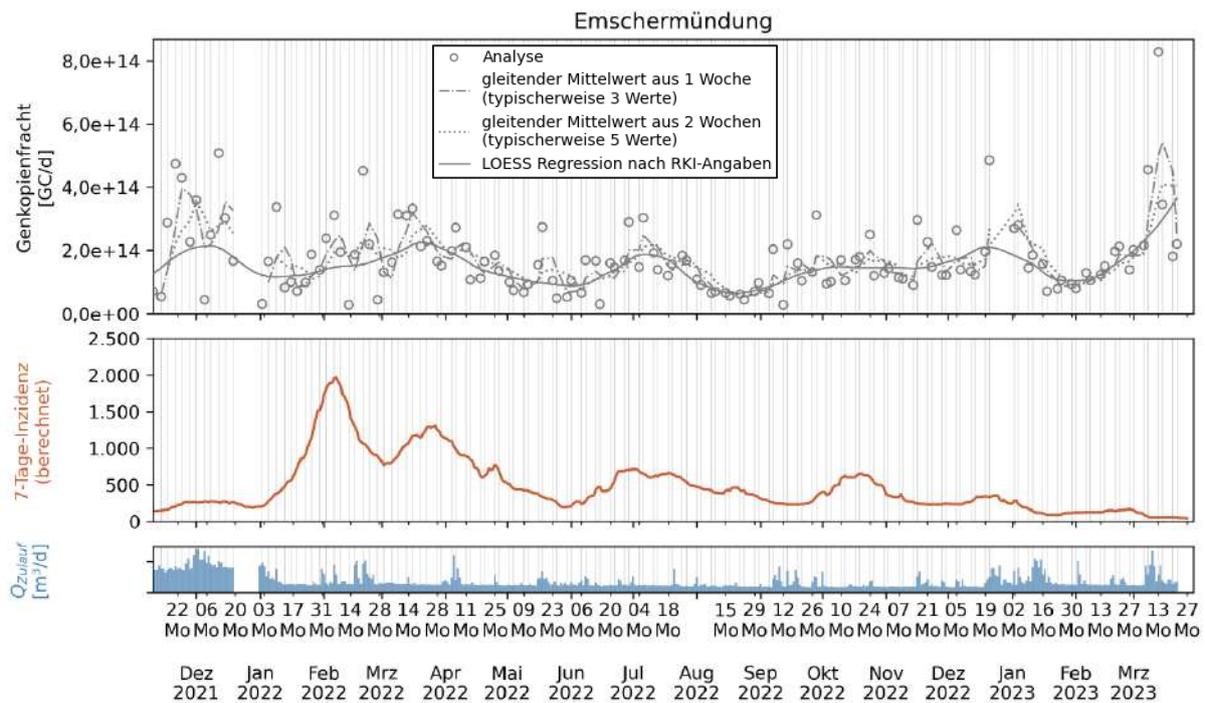
### **II.3.5.3 Kläranlage Emschermündung**

#### **Probenlogistik**

Die Probenlogistik für die Kläranlage Emschermündung wurde wie bei der Kläranlage Bottrop durch einen eigenen Mitarbeiter durchgeführt.

#### **Laboranalytik**

Die Laboranalytik auf der Kläranlage Emschermündung zeigt keine Auffälligkeiten. Die Filtrationsdauer verlief in einem ähnlichen Zeitraum wie bei der Kläranlage Bottrop. Der höchste gemessene Ct-Wert betrug 30,59 und liegt somit im mittleren Bereich aller untersuchten Kläranlagen.



**Abbildung II.38: Zeitreihendarstellung Viruslast, berechnete 7-Tage-Inzidenz und hydraulische Auslastung der Kläranlage Emschermündung**

### Datenauswertung

Im Zuge des Baus des Abwasserkanals Emscher (AKE) kam es am 03.01.2023 zu einem Umschluss der Kläranlage Emschermündung. Durch den Umschluss wurde das Zulaufwasser nicht mehr aus der Emscher entnommen, sondern über den AKE zur Kläranlage geführt. Neben einer Veränderung des untersuchten Einzugsgebiets ergibt sich hieraus auch eine Veränderung der Abwasserzusammensetzung. Auf der Kläranlage Emschermündung zeigt sich wie auf der Kläranlage Bottrop in dem Zeitraum mit einer Beprobung des Wochenendes eine größere Schwankung in den Abwasserdaten. Mit zu berücksichtigen ist hier aber auch der oben beschriebene Umschluss der Kläranlage. Insgesamt zeigt sich, dass die Abwasserbefunde auf der Kläranlage Emschermündung bis zum November 2022 die Inzidenz gut abbilden. In dem darauffolgenden Zeitraum entkoppelt sich der Verlauf der Abwasserbefunde von dem Verlauf der Inzidenz.

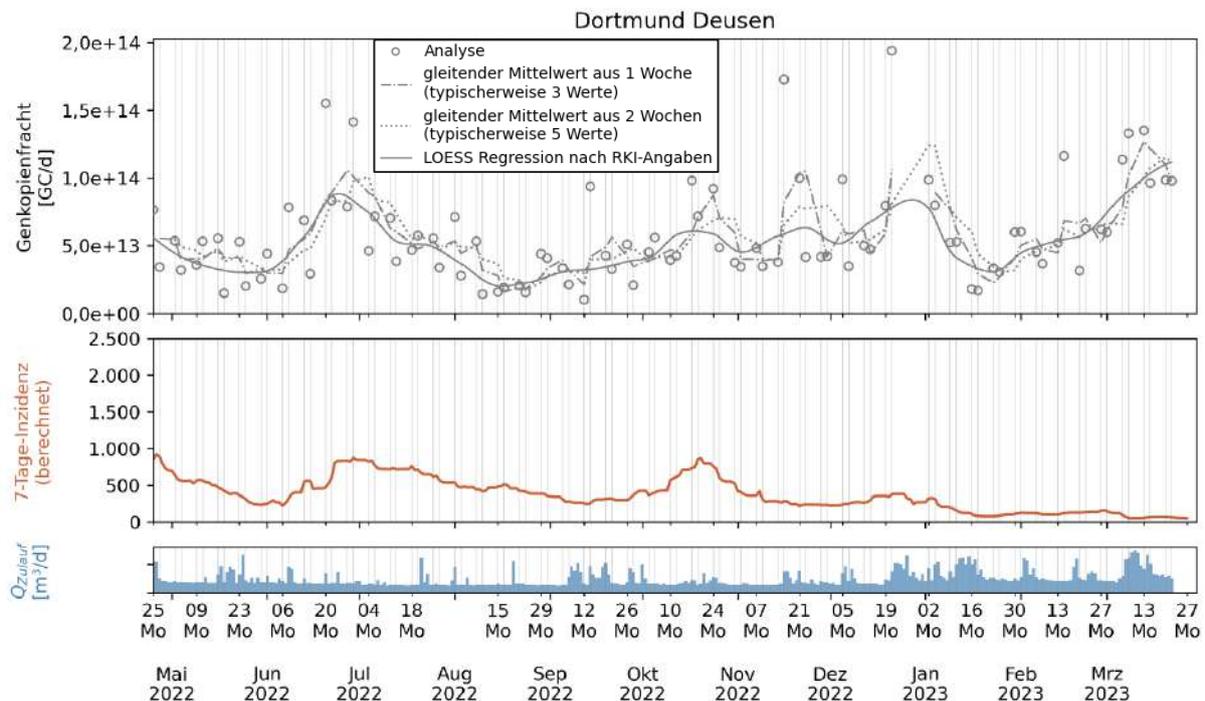
### II.3.5.4 Kläranlage Dortmund-Deusen

#### Probenlogistik

Die Probenlogistik für die Kläranlage Dortmund-Deusen wurde durch die Erweiterung eines bereits bestehenden Auftrags für den Probentransport aus der Region etabliert. Bezogen auf das gesamte Projekt konnten auch hier die Proben zumeist schnell und zuverlässig gelieft werden.

## Laboranalytik

Die Laboranalytik auf der Kläranlage Dortmund-Deusen zeigt keine Auffälligkeiten. Die Filtrationsdauer verlief in einem ähnlichen Zeitraum wie bei der Kläranlage Bottrop. Der höchste gemessene Ct-Wert betrug 29,53 und liegt somit abgesehen von Dortmund-Scharnhorst unterhalb der anderen untersuchten Kläranlagen. Hierbei muss gesagt werden, dass die Datenreihe bedingt durch den späteren Start der Untersuchung deutlich kürzer ist und erst nach der Omikronwelle startet.



**Abbildung II.39: Zeitreihendarstellung Viruslast, berechnete 7-Tage-Inzidenz und hydraulische Auslastung der Kläranlage Dortmund-Deusen**

## Datenauswertung

Bedingt durch die spätere Hinzunahme der Kläranlage Dortmund-Deusen in das Untersuchungsprogramm beginnt die Datenreihe erst deutlich später. Eine Untersuchung der Unterschiede zwischen Wochentagen und Wochenenden wurde auf der Kläranlage nicht durchgeführt. Insgesamt konnte auf der Kläranlage Dortmund-Deusen bis November 2022 der Verlauf der Inzidenz über das Abwasser gut wiedergegeben werden. Im darauffolgenden Zeitraum entkoppelte sich der Verlauf der Abwasserbefunde von der Inzidenz. Besonders auffällig bei der Kläranlage Dortmund-Deusen ist, dass nach einer längeren Trockenperiode der Einfluss eines größeren Niederschlags im Einzugsgebiet durch ein Ansteigen der SARS-CoV-2 Genkopienfracht klar zu erkennen ist. Exemplarisch zu nennen ist hier der 16.11.2022. Aber auch ohne eine vorlaufende längere Trockenperiode ist ein Einfluss des Niederschlags in den Daten zu erkennen. Der Vergleich der Messdaten vom 12.09.2022 und 14.09.2022 zeigt, dass mit einem steigenden Niederschlag die SARS-CoV-2 Genfracht signifikant nach oben steigt. Für

eine detaillierte Analyse der Auswirkungen eines Starkniederschlags auf die Messergebnisse ist die Datenmenge nicht ausreichend.

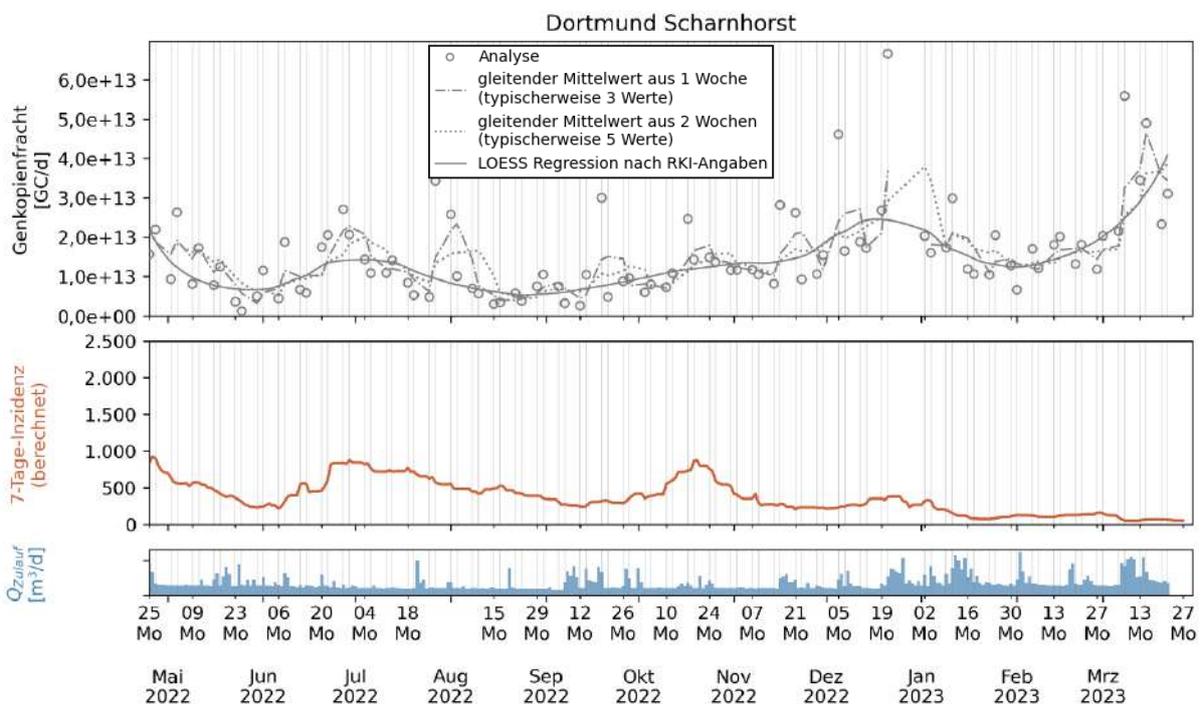
### II.3.5.5 Kläranlage Dortmund-Scharnhorst

#### Probenlogistik

Die Probenlogistik für die Kläranlage Dortmund-Scharnhorst wurde auch durch eine Erweiterung eines bereits bestehenden Auftrags für den Probentransport aus der Region etabliert. Bezogen auf das gesamte Projekt konnten auch hier die Proben zumeist schnell und zuverlässig geliefert werden.

#### Laboranalytik

Die Laboranalytik auf der Kläranlage Dortmund-Scharnhorst zeigt keine Auffälligkeiten. Die Filtrationsdauer verlief in einem ähnlichen Zeitraum wie bei der Kläranlage Bottrop. Der höchste gemessene Ct-Wert betrug 30,2 und liegt somit abgesehen von Dortmund-Scharnhorst unterhalb der anderen untersuchten Kläranlagen mit einem Mischsystem. Hierbei muss gesagt werden, dass die Datenreihe bedingt durch den späteren Start der Untersuchung deutlich kürzer ist und erst nach der Omikronwelle startet.



**Abbildung II.40: Zeitreihendarstellung Viruslast, berechnete 7-Tage-Inzidenz und hydraulische Auslastung der Kläranlage Dortmund-Scharnhorst**

#### Datenauswertung

Wie auch bei der Kläranlage Dortmund-Deusen beginnt die Datenreihe der Kläranlage erst Ende April. Auffällig ist, dass die beiden Dortmunder Anlagen einen ähnlichen Verlauf in den

Abwasserbefunden anzeigen, was bedingt durch die räumliche Nähe eine Plausibilisierung der Daten sein kann. Auch auf der Kläranlage Dortmund-Scharnhorst zeigen sich in den Messreihen große Schwankungen, die in einem Zusammenhang mit Starkregenereignissen stehen. Auffällig bei dieser Kläranlage sind zwei große Peaks, die am 27.07.2022 und 01.08.2023 gemessen wurden. Ein Einfluss des Niederschlags auf die beiden Messwerte kann weitestgehend ausgeschlossen werden. Eine abschließende Begründung für die Ursache der hohen Messwerte konnte nicht gefunden werden. Hier zeigt sich, dass die Bewertung des Einzelwerts immer noch eine größere Herausforderung darstellt.

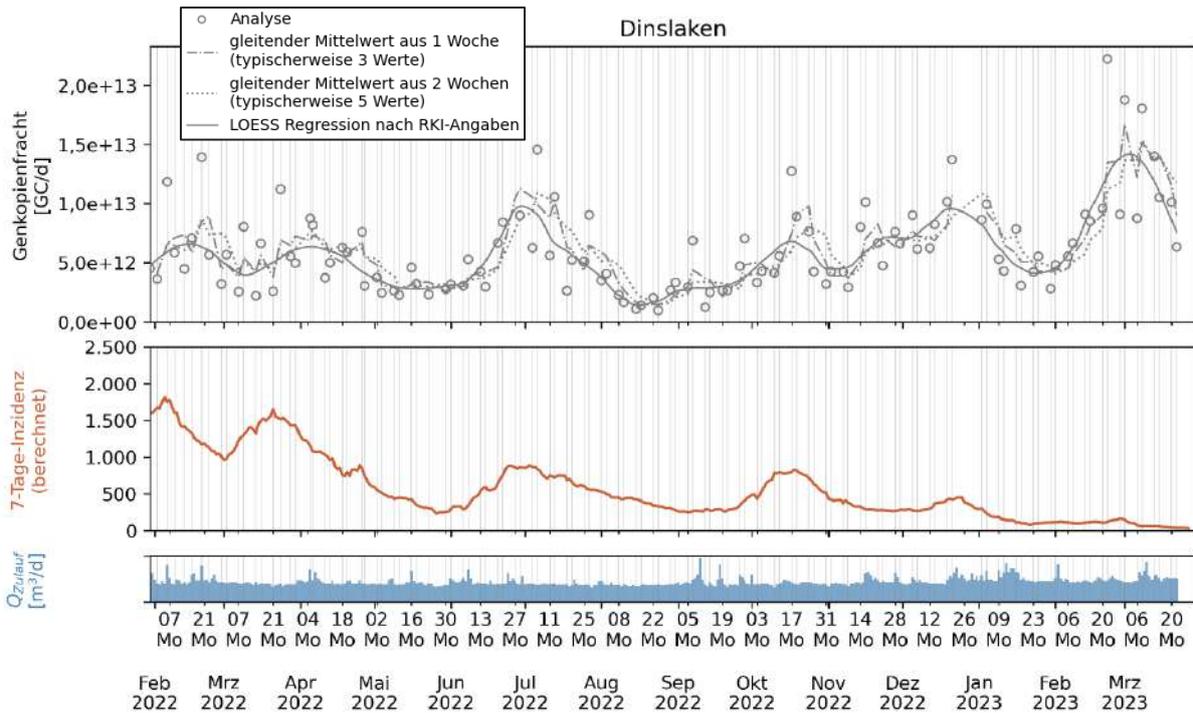
### **II.3.5.6 Dinslaken**

#### **Probenlogistik**

Die Probenlogistik für die Kläranlage Dinslaken wurde wie bei der Kläranlage Bottrop durch einen eigenen Mitarbeiter durchgeführt.

#### **Laboranalytik**

Bei der Laboranalytik der Kläranlage Dinslaken konnte festgestellt werden, dass im Vergleich zu den anderen untersuchten Kläranlagen die Filtration der Proben mit bis zu 30 Minuten deutlich länger gedauert hat als bei den anderen Kläranlagen. Dies ist unter anderem auf das Trennsystem im Einzugsgebiet der Kläranlage zurückzuführen. Auch bei den gemessenen Konzentrationen zeigte sich, dass hier die höchsten Analysewerte erzielt werden konnten. So liegt der Median der Ct-Werte mit 26,24 unterhalb aller anderen Kläranlagen. Dies lässt sich durch das Trennsystem, aber auch durch das kleinere Einzugsgebiet und den geringeren Anteil an Industrie erklären. Bei der Interpretation der Messwerte muss auch hier berücksichtigt werden, dass die Kläranlage erst später in das Messprogramm aufgenommen worden ist.



**Abbildung II.41: Zeitreihendarstellung Viruslast, berechnete 7-Tage-Inzidenz und hydraulische Auslastung der Kläranlage Dinslaken**

### Datenauswertung

Auf der Kläranlage Dinslaken konnte wie auch auf den anderen untersuchten Kläranlagen in der Emscher-Lippe-Region der Verlauf der Inzidenz über die Befunde im Abwasser bis Ende 2022 sehr gut dargestellt werden. Danach kommt es zu einer Entkoppelung der Abwasserbefunde von der Inzidenz. Trotz des vorhandenen Trennsystems im Einzugsgebiet der Kläranlage Dinslaken sind bei der hydraulischen Auslastung der Kläranlage Einflüsse von Niederschlägen aus dem EZG zu erkennen, die auch einen Einfluss auf die Streuung der Messergebnisse haben.

## **II.3.6 Screening im Verbandsgebiet der assoziierten Partner**

Die nachfolgend dargestellten Kläranlagen wurden im umweltanalytischen Labor des ISA analysiert. Die Probenlogistik war unterschiedlich organisiert. Die Proben des WVER wurden aufgrund der Nähe zum ISA-Labor direkt durch MitarbeiterInnen des ISA abgeholt. Bei den Standorten des Niersverbands und des Wupperverbands wurden externe Versanddienstleister für die Logistik verwendet.

### **II.3.6.1 Kläranlage Aachen-Soers (WVER)**

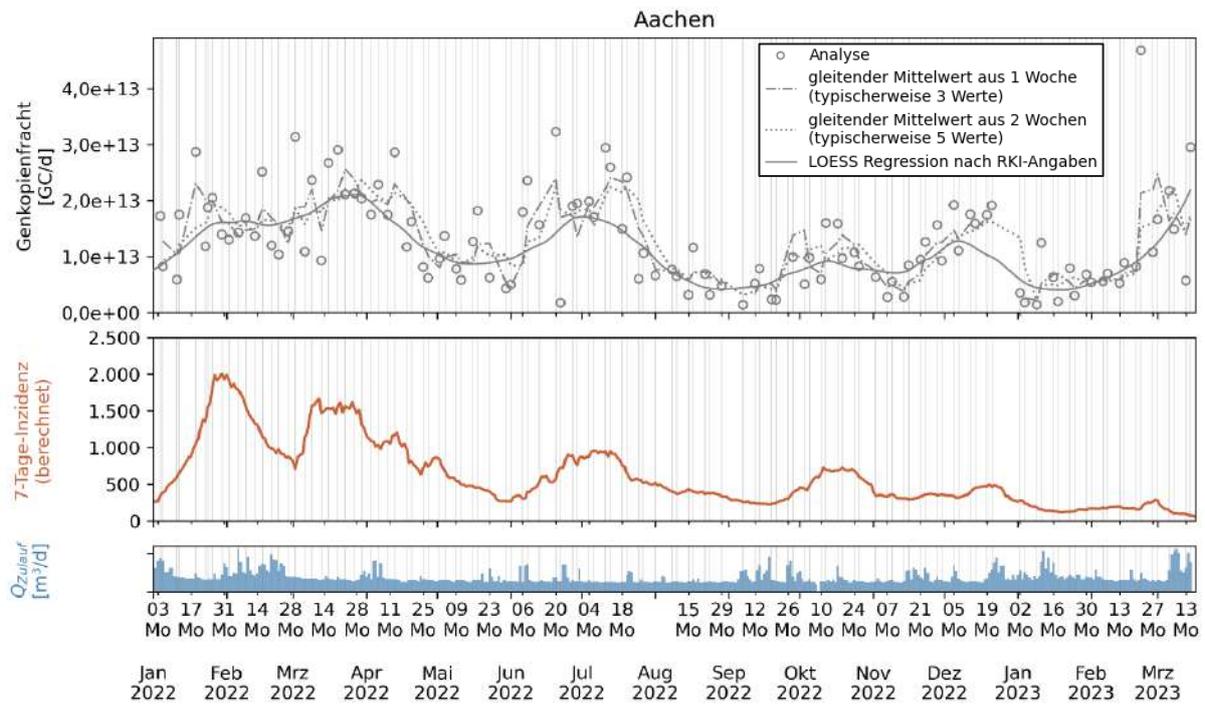
#### **Probenlogistik**

Die Proben wurden durch das ISA direkt abgeholt und gekühlt in das Umweltanalytische Laboratorium des ISA am Standort der Kläranlage Aachen-Soers transportiert.

#### **Laboranalytik**

Die Extraktion der Proben erfolgte am Probenahmetag. Die Extrakte wurden eingefroren und am darauffolgenden Tag gemeinsam mit den Proben der Kläranlagen mit externem Versand analysiert (Mönchengladbach und Wuppertal).

Bei der Laboranalytik der Kläranlage Aachen-Soers konnte festgestellt werden, dass im Vergleich zu den anderen untersuchten Kläranlagen die Filtration der Proben mit bis zu 120 Minuten länger gedauert hat als bei den anderen Kläranlagen, ausgenommen Mönchengladbach-Neuwerk. Auch bei den gemessenen Konzentrationen zeigte sich, dass hier die niedrigsten (Ct 26,4) und höchsten Analysewerte (Ct 36,1) erzielt werden konnten. So liegt der Median der Ct-Werte mit 28,7 unterhalb aller anderen Kläranlagen.



**Abbildung II.42: Zeitreihendarstellung Viruslast, berechnete 7-Tage-Inzidenz und hydraulische Auslastung der Kläranlage Aachen-Soers**

### Datenauswertung

Im Rahmen der Untersuchungen wurde die Kläranlage Aachen-Soers vor Umstellung auf die Beprobung Montag/Mittwoch aus den ESI-CorA Handreichungen zunächst statt montags am Sonntag beprobt. Dies ist aus Abbildung II.42 bis April zu erkennen. Die Anlage wies dabei an Sonntagen zumeist eine deutlich geringere Viruslast im Abwasser aus, als dies am Werktag der Fall war. Entsprechend ist die Ausbildung von „Sägezähnen“ im zeitlichen Verlauf deutlich erkennbar. Z. T. wird der Effekt durch Starkregenereignisse überlagert. Insgesamt sind im gleitenden 2-Wochen-Mittel und in der LOESS-Regression die Pandemiewellen aus der 7-Tage-Inzidenz abgebildet.

### **II.3.6.2 Kläranlage Eschweiler-Weisweiler (WVER)**

#### Probenlogistik

Die Proben wurden durch das ISA am Probenahmetag abgeholt und gekühlt in das Umweltanalytische Labor des ISA am Standort der Kläranlage Aachen-Soers transportiert.

#### Laboranalytik

Die Anreicherung und Extraktion der Proben erfolgte am Probenahmetag. Die Extrakte wurden eingefroren und am darauffolgenden Tag gemeinsam mit den Proben der Kläranlagen mit externem Versand analysiert (Mönchengladbach und Wuppertal).

Die Laboranalytik auf der Kläranlage Eschweiler-Weisweiler zeigt keine Auffälligkeiten (Filtration in wenigen Minuten). Die Filtrationsdauer verlief in einem ähnlichen Zeitraum wie bei der



Bei der Laboranalytik der Kläranlage Mönchengladbach-Neuwerk konnte festgestellt werden, dass im Vergleich zu den anderen untersuchten Kläranlagen die Filtration der Proben mit bis zu 180 Minuten deutlich länger gedauert hat als bei den anderen Kläranlagen. Bei den gemessenen Konzentrationen wurden Analysenwerte zwischen 27,3 und 32,7 mit einem Median von 29,5 erzielt werden. So liegen die Ergebnisse im selben Bereich wie die anderen Kläranlagen. Hierbei muss gesagt werden, dass die Datenreihe bedingt durch den späteren Start der Untersuchung deutlich kürzer ist und erst nach der Omikronwelle startet.

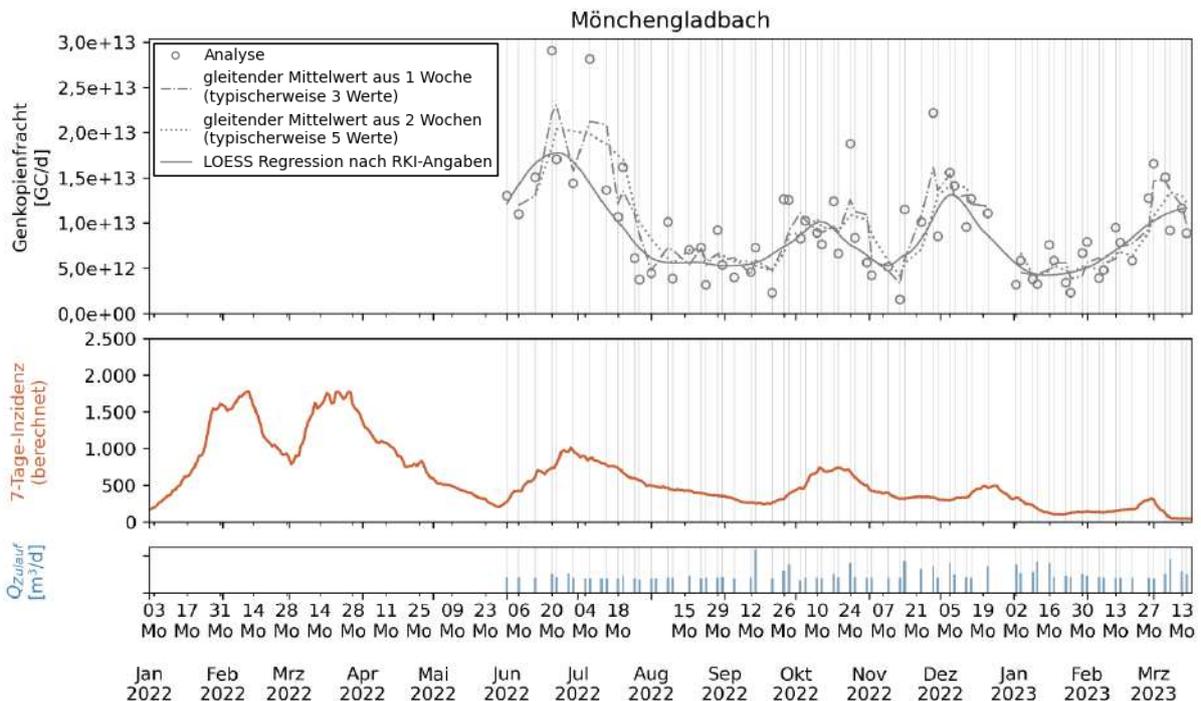


Abbildung II.44: Zeitreihendarstellung der Kläranlage Mönchengladbach-Neuwerk

### Datenauswertung

Aufgrund fehlender Messdaten basiert die Trenddetektion z. T. nur auf den als Mindestanzahl festgelegten drei Werten in einem 2-Wochen-Zyklus (vgl. Abbildung II.44). An den Weihnachtstagen 2022 war aufgrund von Versandproblemen somit eine Lücke im gleitenden- 2-Wochen-Mittel zu verzeichnen.

Insgesamt sind im gleitenden 2-Wochen-Mittel und in der LOESS-Regression die Pandemieebenen aus der 7 Tage-Inzidenz abgebildet.

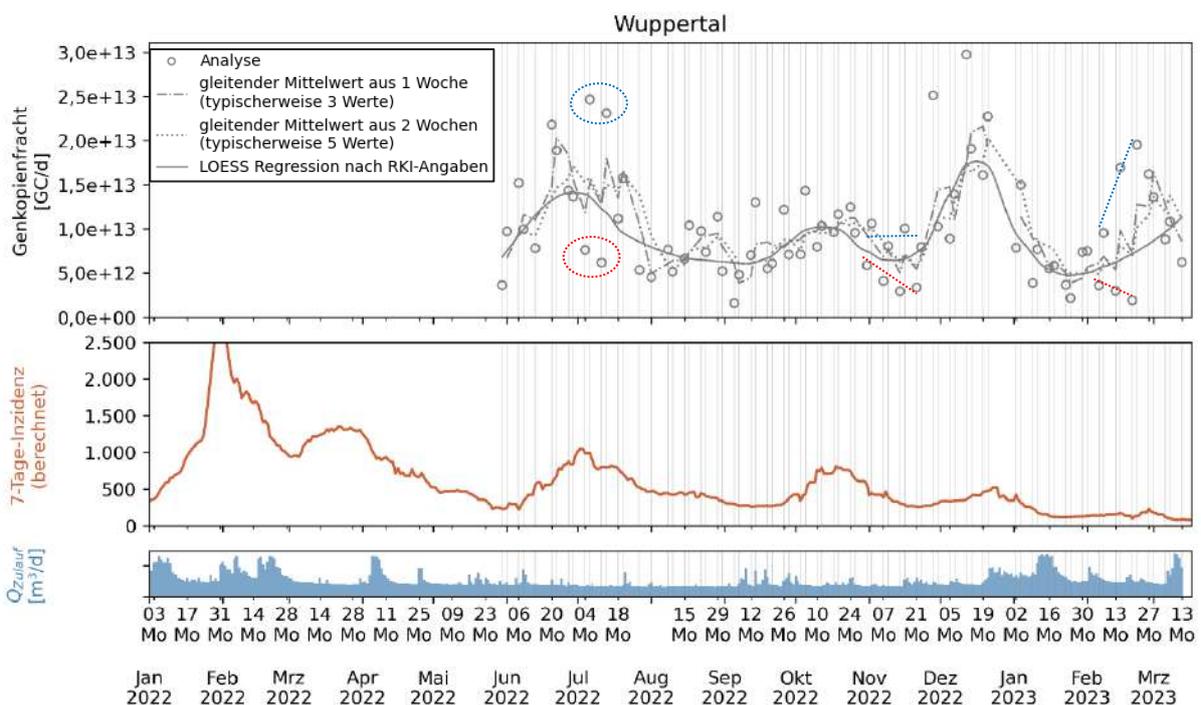
### II.3.6.4 Wuppertal-Buchenhofen (Wupperverband)

#### Probenlogistik

Die Proben wurden durch das Kläranlagenpersonal am Probenahmetag gekühlt verpackt und an einen Versanddienstleister für einen Über-Nacht-Versand bis 9 Uhr des Folgetages übergeben.

## Laboranalytik

Die Anreicherung und Extraktion der Proben erfolgte am Ankunftstag der Probe im Labor des ISA. Die Extrakte wurden direkt am selben Tag analysiert. Die Laboranalytik auf der Kläranlage Wuppertal-Buchenhofen zeigt keine Auffälligkeiten. Die Filtrationsdauer verlief in einem ähnlichen Zeitraum wie bei Kläranlage Aachen-Soers. Der höchste gemessene Ct-Wert betrug 33,7 und der niedrigste Ct-Wert 27,3. Der Median lag bei einem Ct-Wert von 29,6. Die Werte liegen somit im Bereich der untersuchten Kläranlagen. Hierbei muss gesagt werden, dass die Datenreihe bedingt durch den späteren Start der Untersuchung erst nach der Omikronwelle startet.



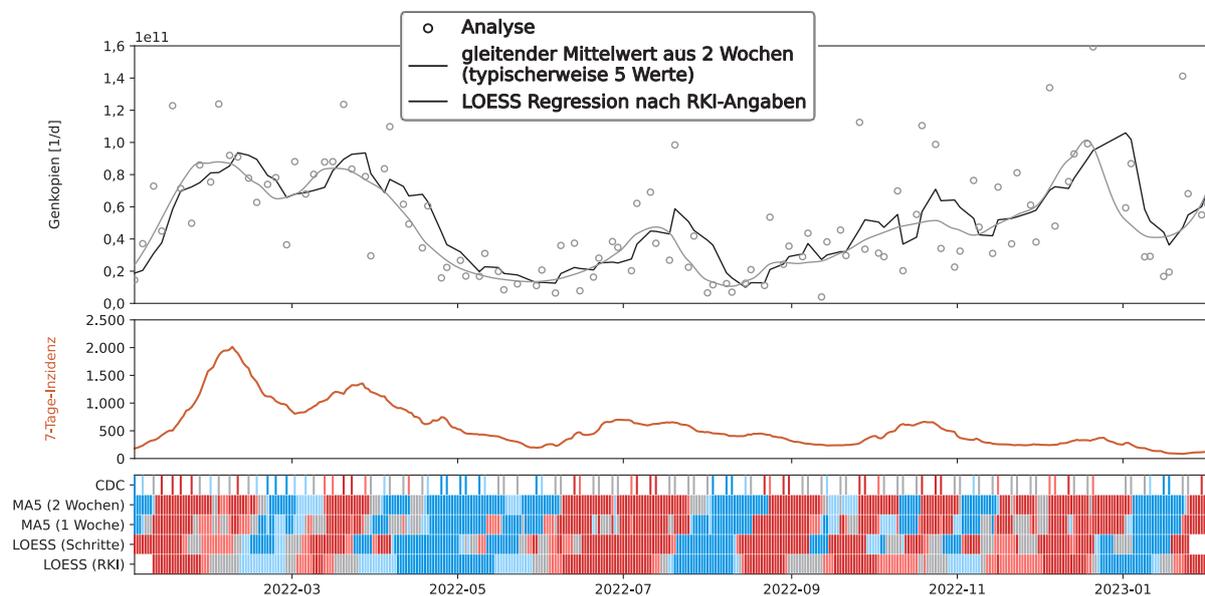
**Abbildung II.45: Zeitreihendarstellung der Kläranlage Wuppertal-Buchenhofen**

## Datenauswertung

Für Wuppertal zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen der Montags- und Mittwochsprobe (Abbildung II.45). Die Montagsprobe einer Woche liegt dabei zumeist niedriger. Dies war im Juli 2022 sehr stark ausgeprägt, wo die Genkopienzahl für die Montagsproben (roter Kreis) um den Faktor 4 niedriger lagen als für die Mittwochssproben (blauer Kreis). Interessant ist, dass die Proben z. T. auch einen anderen Trend aufweisen. Dies kann im November 2022 beobachtet werden, wo die Montagsproben einen sinkenden Trend abbilden (rote Linie), während die Mittwochssproben einen stagnierenden/schwankenden Trend abbilden. Im Februar 2023 ist der Trend über drei Wochen sogar gegenläufig (Montagsproben: sinkender Trend; Mittwochssproben: steigender Trend). Insgesamt sind im gleitenden 2-Wochen-Mittel und in der LOESS-Regression die Pandemiewellen aus der 7 Tage-Inzidenz abgebildet. Das gleitende 2-Wochen-Mittel zeigte darüber hinaus im August 2022 einen Anstieg, während in der Inzidenz einen gleichbleibenden Trend zu verzeichnen war.

## II.4 Vergleich von Trendindikatoren

Aus Kapitel II.3 geht hervor, dass die Genkopienfracht im Abwasser Schwankungen in Abhängigkeit von der Virusvariante unterworfen ist. Aus diesem Grund sollte bei der Annäherung langfristiger Datenreihen entweder ein Splitting auf Zeiträume dominierender Virusvarianten durchgeführt werden, um eine angepasste Trenddetektion anhand absoluter Genkopienfrachten zu erlauben, oder es sind Methoden zu entwickeln, die unabhängig von wechselnden Genkopienfrachten weiterhin aussagekräftig sind. In Abbildung II.46 und Abbildung II.47, sowie in Abbildung IV.1 bis Abbildung IV.7 (IV.2 Anhang B), werden die unterschiedlichen in Kapitel II.3.3.6 und II.3.3.7 erläuterten Trendindikatoren hinsichtlich ihrer Aussagekraft grafisch miteinander verglichen.



**Abbildung II.46: Vergleich von Trendindikatoren des SARS-CoV-2 Abwassersignals anhand von Daten der Kläranlage Bottrop.**

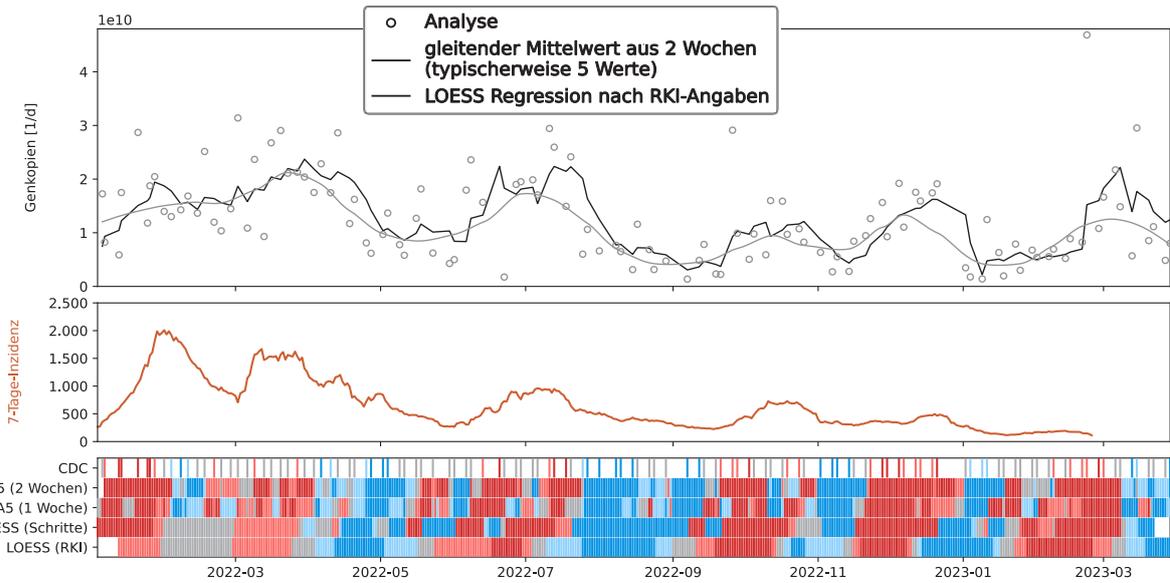


Abbildung II.47: Vergleich von Trendindikatoren des SARS-CoV-2 Abwassersignals anhand von Daten der Kläranlage Aachen-Soers.

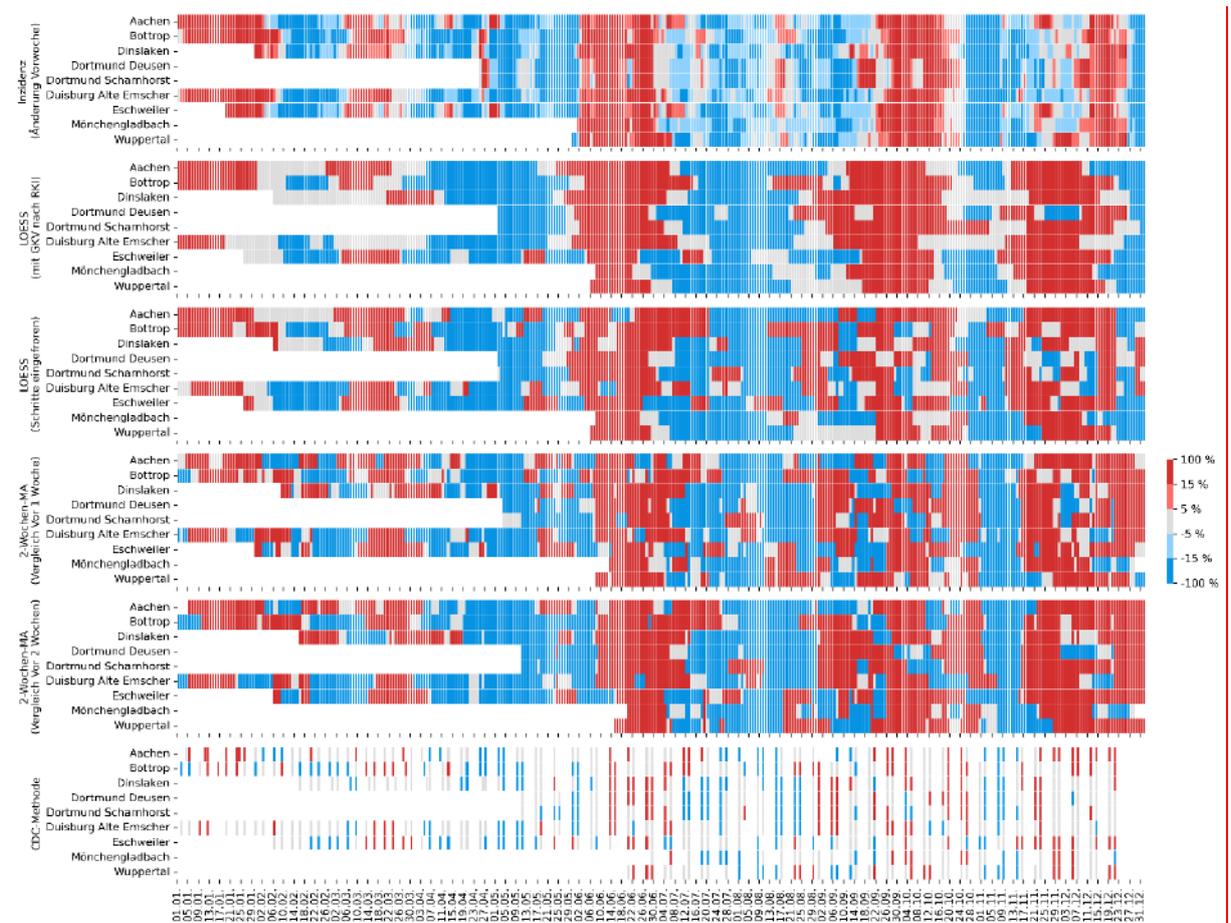


Abbildung II.48: Kläranlagenübergreifender Vergleich unterschiedlicher Trendindikatoren mit der Änderung der 7-Tage-Inzidenz.

## II.5 Roll-out: Abstimmung mit Akteuren aus dem Gesundheitswesen

Unsere Abwasseruntersuchungen in Nordrhein-Westfalen sowie die Ergebnisse weiterer Forschungskonsortien in Hessen (Agrawal et al. 2021), Baden-Württemberg (Ho et al. 2022) und Bayern (Roßmann et al. 2022) zeigen, dass die Monitoringergebnisse dem öffentlichen Gesundheitsdienst erlauben, Maßnahmen zur Eindämmung der Pandemie frühzeitig, verlässlich, und einzugsgebietspezifisch zu treffen und begründet zu kommunizieren.

Der Projektstart von COVIDready im Mai 2021 fiel mit dem Übergang von der Alpha- in die Delta-Welle zusammen und im Juni bis August zunächst in eine sich relativ entspannenden Lage mit abnehmenden 7-Tage-Inzidenz und Hospitalisierungsinzidenz. Die Kommunikation mit dem ÖGD verlief zunächst auf Ebene der Gesundheitsämter, die sich direkt im Einzugsgebiet der beprobten kommunalen Kläranlagen befinden. Am 30. Juli 2021 erfolgte eine erste Abstimmung mit dem Landeszentrum Gesundheit (LZG.NRW). Weitere Abstimmungen, auch mit dem Ministerium für Arbeit, Gesundheit und Soziales (MAGS.NRW) mündeten in einem regelmäßigen, meist zweiwöchentlichen Austausch, aus dem im späteren Verlauf eine intensive Zusammenarbeit zur Sammlung und Interpretation der Analysendaten, aber auch zur Fortentwicklung von Trendindikatoren und Kommunikation der Ergebnisse etabliert werden konnte. Die Ergebnisse von COVIDready zur Trenddetektion konnten so direkt mit Akteuren aus dem Gesundheitswesen diskutiert und in der Gesamtschau aller vorliegenden Indikatoren einbezogen werden. Wichtige Eckpunkte in der Kommunikation mit dem öffentlichen Gesundheitsdienst sind in der Terminauflistung aus Tabelle I.3 in Kapitel I.3 enthalten.

Mit der Änderung des Infektionsschutzgesetzes im September 2022 wurde das SARS CoV-2-Abwassermonitoring in Deutschland erstmals rechtlich festgeschrieben. In § 13 Abs. 2 ist vorgesehen, dass „das Robert Koch-Institut und die Länder zur Überwachung übertragbarer Krankheiten Sentinel-Erhebungen sowie Testungen an bestimmten Wasserproben in bestimmten Gebietskörperschaften durchführen können. (...) Sentinel-Erhebungen an Abwasserproben können in Zusammenarbeit mit ausgewählten Einrichtungen der Abwasserbeseitigung und -analytik stattfinden“. Ergänzend wurde in § 28b Abs. 7 IfSG neu geregelt, dass die Länder beim Vorliegen einer konkreten Gefahr für die Funktionsfähigkeit des Gesundheitssystems oder der sonstigen kritischen Infrastruktur spezifische Schutzmaßnahmen erlassen können. Ein neuer, ergänzender Indikator für die Einschätzung der Lage im sogenannten „Pandemieradar“ ist das SARS-CoV-2-Abwassermonitoring (Perea et al. 2023).

Rückmeldungen aus den Gesundheitsämtern im Einzugsgebiet der beprobten Kläranlagen zeigten, dass die Etablierung des Abwassermonitorings einen Mehrwert für den öffentlichen Gesundheitsdienst erzielen konnte, aber in früheren Pandemiephasen einen größeren Mehrwert gehabt hätte, aber zu diesem Zeitpunkt noch nicht ausreichend zur Verfügung stand.

Vorwiegend in der Zeit vor dem großangelegten Einsatz der Impfstoffe, also in Zeiten von Lock-down, Kontaktnachverfolgung und möglichst weitgehender Infektionsprävention, hätte das heute etablierte SARS-CoV-2 Abwassermonitoring als zeitiges Instrument geholfen, um schnell und kosteneffizient auf eine sich ändernde Pandemiesituation zu reagieren. Grundsätzlich werden an das System v. a. Erwartungen hinsichtlich Schnelligkeit der Datenbereitstellung in verlässlicher und interpretierter Form gestellt, die das Projektkonsortium in der Weiterverfolgung des dezentralisierten Ansatzes bestärkten.

Auf Basis der im Rahmen von COVIDready in NRW etablierten Abstimmungsrunden zwischen Akteuren aus dem Gesundheitswesen und der Wasserwirtschaft kann abgeleitet werden, dass Abwassermonitoring so fortentwickelt werden muss, dass das System im Bedarfsfall schnell und adaptiv hochgefahren werden kann. Dies umfasst:

- Etablierung technischer Infrastruktur für die Beprobung im Kanalnetz und auf der Kläranlage
- Vorhalten von Analytikkapazitäten für die Bestimmung von RNA/DNA in Abwasserproben
- Etablierung von Melde- und Kommunikationswegen aus der Abwasserreinigung zum Gesundheitsdienst für künftige Monitoring-Targets
- Bereitstellung von Auswertungs- und Darstellungstools

Zur Verstetigung des SARS-CoV-2-Abwassermonitorings, in dem bundesweit bis zu 200 Kläranlagen einbezogen werden sollen, arbeiten RKI und UBA eng im Rahmen des „Abwasser-Monitoring für die epidemiologische Lagebewertung“ (AMELAG) zusammen, welches vom BMG mit ca. 30 Mio. Euro bis Ende 2024 finanziert wird (Perea und Scholz). Ziel dieses Vorhabens ist es, Strukturen und Prozesse für ein bundesweites Netzwerk praxis- und routinegerecht aufzubauen, die es den einzelnen Bundesländern künftig ermöglichen soll, für ihr Bundesland qualitätsgeprüfte, abwasserbasierte Erregernachweise ergänzend zu weiteren Indikatoren für eine epidemiologische Lagebewertung nutzen zu können. Parallel wird weiter erprobt, in welchem Umfang das Abwassermonitoring als Frühwarnsystem und zur Überwachung von Virusmutationen (u. a. auch im Rahmen der Einreise und Beprobung an Flughäfen und Flugzeugen) eingesetzt werden kann (Perea und Scholz).

Parallel dazu wird in dem von der Europäischen Kommission am 26.10.2022 vorgelegten Entwurf zur Revision der Kommunalabwasserrichtlinie das gesundheitsbezogene Abwassermonitoring aufgegriffen. Dazu werden in § 17 Absatz 1 des Entwurfes neben SARS-CoV-2 auch u. a. das Poliovirus und Influenzavirus genannt. Die Mitgliedstaaten sollen u. a. eine Koordinierungsstruktur zwischen den für die öffentliche Gesundheit und die kommunalen Abwässer zuständigen Behörden einrichten, um Abstimmung und Roll-out zwischen den Akteuren auf Bundes-, Landes- und Kommunalebene weiter voranzutreiben.

Das Verbundprojekt COVIDready hat erfolgreich dazu beigetragen, Grundlagen für die Einrichtung eines nationalen Monitoringsystems für das Coronavirus und seine Varianten zu legen und konnte insbesondere in NRW den Roll-out des SARS-CoV-2 Abwassermonitoring maßgeblich mitgestalten und begleiten.

Besonders für die sondergesetzlichen Wasserverbände in NRW erwächst bei der Anwendung eines regionsorientierten Abwassermonitorings hinsichtlich Umwelt- und Gesundheitsfragen aufgrund ihrer überkommunalen Struktur eine wichtige Rolle in der Unterstützung der städteübergreifenden Zusammenarbeit, z. B. beim Warn- und Meldewesen. Darüber hinaus bieten die erforschten Lösungen Perspektiven für Biotechnologieunternehmen, mit ihren auf Abwasser abgestimmten molekularbiologischen Methoden und Analytiksystemen für SARS-CoV-2 neue Geschäftsfelder in der Abwasserepidemiologie aufzubauen. Das Konsortium COVIDready arbeitet derzeit erweitert um die Universitätsmedizin Essen als weiteren Partner an einem Projektantrag „Abwasserbasierte Epidemiologie und Preparedness: Forschungsbedarf für eine Roadmap zum Aufbau adaptiver Monitoringkapazitäten im Öffentlichen Gesundheitsdienst“ zur Förderung durch das Bundesministerium für Gesundheit. Die übergeordnete Zielsetzung dieses Vorhabens ist die wissenschaftliche Erweiterung einer Roadmap für den Aufbau einer zukunftsweisenden abwasserbasierten Epidemiologie in Deutschland mit adaptiven Monitoring-Kapazitäten im öffentlichen Gesundheitsdienst (ÖGD). Dazu soll das derzeitige Screening neben SARS-CoV-2 um weitere Erreger inklusive zirkulierender und neu auftretender (emerging) humanpathogener Viren als auch um antimikrobielle Resistenzen erweitert werden. Durch die Beantwortung offener Forschungsfragen werden Grundlagen geschaffen, um zielgerichtet und kosteneffizient auf neuartige Anforderungen im ÖGD vorzubereiten (Preparedness).

### III Literatur

- Agrawal, Shelesh; Orschler, Laura; Lackner, Susanne (2021): Long-term monitoring of SARS-CoV-2 RNA in wastewater of the Frankfurt metropolitan area in Southern Germany. In: *Scientific Reports* 11 (1), S. 5372. DOI: 10.1038/s41598-021-84914-2.
- Ahmed, Warish; Bivins, Aaron; Bertsch, Paul M.; Bibby, Kyle; Gyawali, Pradip; Sherchan, Samendra P. et al. (2021): Intraday variability of indicator and pathogenic viruses in 1-h and 24-h composite wastewater samples: Implications for wastewater-based epidemiology. In: *Environmental research* 193, S. 110531. DOI: 10.1016/j.envres.2020.110531.
- Ai, Yuehan; Davis, Angela; Jones, Dan; Lemeshow, Stanley; Tu, Huolin; He, Fan et al. (2021): Wastewater SARS-CoV-2 monitoring as a community-level COVID-19 trend tracker and variants in Ohio, United States. In: *The Science of the total environment* 801, S. 149757. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.149757.
- Ballesté, E.; Pascual-Benito, M.; Martín-Díaz, J.; Blanch, A. R.; Lucena, F.; Muniesa, M. et al. (2019): Dynamics of crAssphage as a human source tracking marker in potentially faecally polluted environments. In: *Water research* 155, S. 233–244. DOI: 10.1016/j.watres.2019.02.042.
- Been, Frederic; Rossi, Luca; Ort, Christoph; Rudaz, Serge; Delémont, Olivier; Esseiva, Pierre (2014): Population normalization with ammonium in wastewater-based epidemiology: application to illicit drug monitoring. In: *Environmental science & technology* 48 (14), S. 8162–8169. DOI: 10.1021/es5008388.
- Cao, Yunlong; Jian, Fanchong; Wang, Jing; Yu, Yuanling; Song, Weiliang; Yisimayi, Ayijiang et al. (2023): Imprinted SARS-CoV-2 humoral immunity induces convergent Omicron RBD evolution. In: *Nature* 614 (7948), S. 521–529. DOI: 10.1038/s41586-022-05644-7.
- Castro-Gutierrez, Victor; Hassard, Francis; Vu, Milan; Leitao, Rodrigo; Burczynska, Beata; Wildeboer, Dirk et al. (2022): Monitoring occurrence of SARS-CoV-2 in school populations: A wastewater-based approach. In: *PLoS ONE* 17 (6). DOI: 10.1371/journal.pone.0270168.
- Cathcart, Andrea L.; Havenar-Daughton, Colin; Lempp, Florian A.; Ma, Daphne; Schmid, Michael A.; Agostini, Maria L. et al. (2021): The dual function monoclonal antibodies VIR-7831 and VIR-7832 demonstrate potent in vitro and in vivo activity against SARS-CoV-2.
- CDC (2023): National Wastewater Surveillance System (NWSS). Data reporting for public health. Hg. v. Center for Disease Control and Prevention. Online verfügbar unter <https://www.cdc.gov/nwss/reporting.html#trends>, zuletzt aktualisiert am 07.06.2023.
- Choi, Phil M.; Tschärke, Benjamin; Samanipour, Saer; Hall, Wayne D.; Gartner, Coral E.; Mueller, Jochen F. et al. (2019): Social, demographic, and economic correlates of food and chemical consumption measured by wastewater-based epidemiology. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (43), S. 21864–21873. DOI: 10.1073/pnas.1910242116.
- Cleveland, William S. (1979): Robust Locally Weighted Regression and Smoothing Scatterplots. In: *Journal of the American Statistical Association* 74 (368), S. 829–836. DOI: 10.1080/01621459.1979.10481038.
- Crank, K.; Chen, W.; Bivins, A.; Lowry, S.; Bibby, K. (2021): Contribution of SARS-CoV-2 RNA shedding routes to RNA loads in wastewater. In: *The Science of the total environment* 806, S. 150376. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.150376.
- Crank, Katherine; Li, Xiang; North, Devin; Ferraro, Giusy Bonanno; Iaconelli, Marcello; Mancini, Pamela et al. (2020): CrAssphage abundance and correlation with molecular viral markers in Italian wastewater. In: *Water research* 184, S. 116161. DOI: 10.1016/j.watres.2020.116161.
- Crits-Christoph, Alexander; Kantor, Rose S.; Olm, Matthew R.; Whitney, Oscar N.; Al-Shayeb, Basem; Lou, Yue Clare et al. (2021): Genome Sequencing of Sewage Detects Regionally Prevalent SARS-CoV-2 Variants. In: *mBio* 12 (1). DOI: 10.1128/mbio.02703-20.
- D'Aoust, Patrick M.; Towhid, Syeda Tasneem; Mercier, Élisabeth; Hegazy, Nada; Tian, Xin; Bhatnagar, Kamyia et al. (2021): COVID-19 wastewater surveillance in rural communities: Comparison of lagoon and pumping station samples. In: *The Science of the total environment* 801, S. 149618. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.149618.
- Duvallet, Claire; Wu, Fuqing; McElroy, Kyle A.; Imakaev, Maxim; Endo, Noriko; Xiao, Amy et al. (2022): Nationwide Trends in COVID-19 Cases and SARS-CoV-2 RNA Wastewater Concentrations in the United States. In: *ACS EST Water* 2 (11), S. 1899–1909. DOI: 10.1021/acsestwater.1c00434.
- DVTA (2022): Mutantenspezifische PCR durch Schmelzkurvenanalyse. Hg. v. DVTA - Dachverband für Technologen/-innen und Analytiker/-innen in der Medizin Deutschland e.V. Online verfügbar unter <https://dvta.de/mutantenspezifische-pcr-durch-schmelzkurvenanalyse>, zuletzt geprüft am 12.06.2023.
- Edwards, Robert A.; Vega, Alejandro A.; Norman, Holly M.; Ohaeri, Maria; Levi, Kyle; Dinsdale, Elizabeth A. et al. (2019): Global phylogeography and ancient evolution of the widespread human gut virus crAssphage. In: *Nature microbiology* 4 (10), S. 1727–1736. DOI: 10.1038/s41564-019-0494-6.
- Feng, Shuchen; Roguet, Adelaide; McClary-Gutierrez, Jill S.; Newton, Ryan J.; Kloczko, Nathan; Meiman, Jonathan G.; McLellan, Sandra L. (2021): Evaluation of Sampling, Analysis, and Normalization Methods for SARS-CoV-2 Concentrations in Wastewater to Assess COVID-19 Burdens in Wisconsin Communities. In: *ACS EST Water* 1 (8), S. 1955–1965. DOI: 10.1021/acsestwater.1c00160.

- Finkel, Yaara; Mizrahi, Orel; Nachshon, Aharon; Weingarten-Gabbay, Shira; Morgenstern, David; Yahalom-Ronen, Yfat et al. (2021): The coding capacity of SARS-CoV-2. In: *Nature* 589 (7840), S. 125–130. DOI: 10.1038/s41586-020-2739-1.
- Greenwald, Hannah D.; Kennedy, Lauren C.; Hinkle, Adrian; Whitney, Oscar N.; Fan, Vinson B.; Crits-Christoph, Alexander et al. (2021): Tools for interpretation of wastewater SARS-CoV-2 temporal and spatial trends demonstrated with data collected in the San Francisco Bay Area. In: *Water research X* 12, S. 100111. DOI: 10.1016/j.wroa.2021.100111.
- Gundy, Patricia M.; Gerba, Charles P.; Pepper, Ian L. (2008): Survival of Coronaviruses in Water and Wastewater. In: *Food and Environmental Virology* 1 (1). DOI: 10.1007/s12560-008-9001-6.
- Heijnen, Leo; Elsinga, Goffe; Graaf, Miranda de; Molenkamp, Richard; Koopmans, Marion P. G.; Medema, Gertjan (2021): Droplet digital RT-PCR to detect SARS-CoV-2 signature mutations of variants of concern in wastewater. In: *The Science of the total environment* 799, S. 149456. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.149456.
- Hillary, Luke S.; Farkas, Kata; Maher, Kathryn H.; Lucaci, Anita; Thorpe, Jamie; Distaso, Marco A. et al. (2021): Monitoring SARS-CoV-2 in municipal wastewater to evaluate the success of lockdown measures for controlling COVID-19 in the UK. In: *Water research* 200, S. 117214. DOI: 10.1016/j.watres.2021.117214.
- Ho, Johannes; Stange, Claudia; Suhrborg, Rabea; Wurzbacher, Christian; Drewes, Jörg E.; Tiehm, Andreas (2022): SARS-CoV-2 wastewater surveillance in Germany: Long-term RT-digital droplet PCR monitoring, suitability of primer/probe combinations and biomarker stability. In: *Water research* 210, S. 117977. DOI: 10.1016/j.watres.2021.117977.
- Holm, R. H.; Nagarkar, M.; Yeager, R. A.; Talley, D.; Chaney, A. C.; Rai, J. P. et al. (2022): Surveillance of RNase P, PMMoV, and CrAssphage in wastewater as indicators of human fecal concentration across urban sewer neighborhoods, Kentucky. In: *FEMS microbes* 3, S. 1–12. DOI: 10.1093/femsmc/xtac003.
- Hu, Yanmei; Lewandowski, Eric M.; Tan, Haozhou; Zhang, Xiaoming; Morgan, Ryan T.; Zhang, Xiujun et al. (2022): Naturally occurring mutations of SARS-CoV-2 main protease confer drug resistance to nirmatrelvir. In: *bioRxiv : the preprint server for biology*. DOI: 10.1101/2022.06.28.497978.
- Jochmans, Dirk; Liu, Cheng; Donckers, Kim; Stoycheva, Antitsa; Boland, Sandro; Stevens, Sarah K. et al. (2023): The Substitutions L50F, E166A, and L167F in SARS-CoV-2 3CLpro Are Selected by a Protease Inhibitor In Vitro and Confer Resistance To Nirmatrelvir. In: *mBio* 14 (1), e0281522. DOI: 10.1128/mbio.02815-22.
- Kitajima, Masaaki; Iker, Brandon C.; Pepper, Ian L.; Gerba, Charles P. (2014): Relative abundance and treatment reduction of viruses during wastewater treatment processes—identification of potential viral indicators. In: *The Science of the total environment* 488-489, S. 290–296. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.04.087.
- La Rosa, Giuseppina; Bonadonna, Lucia; Lucentini, Luca; Kenmoe, Sebastien; Suffredini, Elisabetta (2020): Coronavirus in water environments: Occurrence, persistence and concentration methods - A scoping review. In: *Water research* 179, S. 115899. DOI: 10.1016/j.watres.2020.115899.
- Langeveld, Jeroen; Schilperoort, Remy; Heijnen, Leo; Elsinga, Goffe; Schapendonk, Claudia E. M.; Fanoy, Ewout et al. (2023): Normalisation of SARS-CoV-2 concentrations in wastewater: The use of flow, electrical conductivity and crAssphage. In: *The Science of the total environment* 865, S. 161196. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.161196.
- LaTurner, Zachary W.; Zong, David M.; Kalvapalle, Prashant; Gamas, Kiara Reyes; Terwilliger, Austen; Crosby, Tessa et al. (2021): Evaluating recovery, cost, and throughput of different concentration methods for SARS-CoV-2 wastewater-based epidemiology. In: *Water research* 197, S. 117043. DOI: 10.1016/j.watres.2021.117043.
- Launay, Marie A.; Dittmer, Ulrich; Steinmetz, Heidrun (2016): Organic micropollutants discharged by combined sewer overflows - Characterisation of pollutant sources and stormwater-related processes. In: *Water research* 104, S. 82–92. DOI: 10.1016/j.watres.2016.07.068.
- Long, Samuel (2021): SARS-CoV-2 Subgenomic RNAs: Characterization, Utility, and Perspectives. In: *Viruses* 13 (10). DOI: 10.3390/v13101923.
- Lorenzo, Maria; Picó, Yolanda (2019): Wastewater-based epidemiology: current status and future prospects. In: *Current Opinion in Environmental Science & Health* 9, S. 77–84. DOI: 10.1016/j.coesh.2019.05.007.
- Maal-Bared, Rasha; Qiu, Yuanyuan; Li, Qiaozhi; Gao, Tiejun; Hruday, Steve E.; Bhavanam, Sudha et al. (2023): Does normalization of SARS-CoV-2 concentrations by Pepper Mild Mottle Virus improve correlations and lead time between wastewater surveillance and clinical data in Alberta (Canada): comparing twelve SARS-CoV-2 normalization approaches. In: *The Science of the total environment* 856 (Pt 1), S. 158964. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.158964.
- Medema, Gertjan; Heijnen, Leo; Elsinga, Goffe; Italiaander, Ronald; Brouwer, Anke (2020): 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. In: *Environ. Sci. Technol. Lett.* 7 (7), S. 511–516. DOI: 10.1021/acs.estlett.0c00357.
- Michael-Kordatou, I.; Karaolia, P.; Fatta-Kassinos, D. (2020): Sewage analysis as a tool for the COVID-19 pandemic response and management: the urgent need for optimised protocols for SARS-CoV-2 detection and quantification. In: *Journal of environmental chemical engineering* 8 (5), S. 104306. DOI: 10.1016/j.jece.2020.104306.

- Mitrancescu, Alexander; Uchaikina, Anna; Kau, Anna-Sonia; Stange, Claudia; Ho, Johannes; Tiehm, Andreas et al. (2022): Wastewater-Based Epidemiology for SARS-CoV-2 Biomarkers: Evaluation of Normalization Methods in Small and Large Communities in Southern Germany. In: *ACS EST Water* 2 (12), S. 2460–2470. DOI: 10.1021/acsestwater.2c00306.
- Norvig, P.; Russell, S. J. (2021): *Artificial Intelligence: A Modern Approach*, Global Edition. 4. Aufl. Harlow: Pearson Education Limited. Online verfügbar unter <http://aima.cs.berkeley.edu/>.
- Okoh, Anthony I.; Sibanda, Thulani; Gusha, Siyabulela S. (2010): Inadequately Treated Wastewater as a Source of Human Enteric Viruses in the Environment. In: *International Journal of Environmental Research and Public Health* 7 (6), S. 2620–2637. DOI: 10.3390/ijerph7062620.
- Perea, I.; Scholz, S.: Das Pandemieradar des Bundes – Umsetzung neuer Ansätze für eine effektive Infektionsvorhersage. 56. Essener Tagung für Wasserwirtschaft, 07.-09.03.2023. GEWÄSSERSCHUTZ – WASSER – ABWASSER Band 255.
- Philo, Sarah E.; Keim, Erika K.; Swanstrom, Rachael; Ong, Angelo Q. W.; Burnor, Elisabeth A.; Kossik, Alexandra L. et al. (2021): A comparison of SARS-CoV-2 wastewater concentration methods for environmental surveillance. In: *The Science of the total environment* 760, S. 144215. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.144215.
- Rauch, Wolfgang; Schenk, Hannes; Insam, Heribert; Markt, Rudolf; Kreuzinger, Norbert (2022): Data modelling recipes for SARS-CoV-2 wastewater-based epidemiology. In: *Environmental research* 214, S. 113809. DOI: 10.1016/j.envres.2022.113809.
- Roßmann, Katalyn; Großmann, Gerd; Frangoulidis, Dimitrios; Clasen, Rüttger; Münch, Manuel; Hasenknopf, Manfred et al. (2022): Innovatives SARS-CoV-2-Krisenmanagement im öffentlichen Gesundheitswesen: Corona-Dashboard und Abwasserfrühwarnsystem am Beispiel Berchtesgadener Land. In: *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 65 (3), S. 367–377. DOI: 10.1007/s00103-021-03425-7.
- Sakarovitch, Charlotte; Schlosser, Olivier; Courtois, Sophie; Proust-Lima, Cécile; Couallier, Joanne; Pétrau, Agnès et al. (2022): Monitoring of SARS-CoV-2 in wastewater: what normalisation for improved understanding of epidemic trends? In: *Journal of water and health* 20 (4), S. 712–726. DOI: 10.2166/wh.2022.012.
- Service, Robert F. (2022): Bad news for Paxlovid? Resistance may be coming. In: *Science (New York, N. Y.)* 377 (6602), S. 138–139. DOI: 10.1126/science.add8037.
- Symonds, E. M.; Nguyen, Karena H.; Harwood, V. J.; Breitbart, M. (2018): Pepper mild mottle virus: A plant pathogen with a greater purpose in (waste)water treatment development and public health management. In: *Water research* 144, S. 1–12. DOI: 10.1016/j.watres.2018.06.066.
- Toptan, Tuna; Hoehl, Sebastian; Westhaus, Sandra; Bojkova, Denisa; Berger, Annemarie; Rotter, Björn et al. (2020): Optimized qRT-PCR Approach for the Detection of Intra- and Extra-Cellular SARS-CoV-2 RNAs. In: *International journal of molecular sciences* 21 (12). DOI: 10.3390/ijms21124396.
- Vadde, Kiran Kumar; Al-Duroobi, Haya; Phan, Duc C.; Jafarzadeh, Arash; Moghadam, Sina V.; Matta, Akanksha; Kapoor, Vikram (2022): Assessment of Concentration, Recovery, and Normalization of SARS-CoV-2 RNA from Two Wastewater Treatment Plants in Texas and Correlation with COVID-19 Cases in the Community. In: *ACS EST Water* 2 (11), S. 2060–2069. DOI: 10.1021/acsestwater.2c00054.
- van der Avoort, H. G.; Reimerink, J. H.; Ras, A.; Mulders, M. N.; van Loon, A. M. (1995): Isolation of epidemic poliovirus from sewage during the 1992-3 type 3 outbreak in The Netherlands. In: *Epidemiology and Infection* 114 (3), S. 481–491.
- VanBlargan, Laura A.; Errico, John M.; Halfmann, Peter J.; Zost, Seth J.; Crowe, James E.; Purcell, Lisa A. et al. (2022): An infectious SARS-CoV-2 B.1.1.529 Omicron virus escapes neutralization by therapeutic monoclonal antibodies. In: *Nature medicine* 28 (3), S. 490–495. DOI: 10.1038/s41591-021-01678-y.
- Weber, F.-A. (2023): Dezentrales SARS-CoV-2 Monitoring im Abwasser: Entwicklung einer validierten Analyse-methode für abwassertechnische Labore auf Kläranlagen. ESI-CorA Abschlussveranstaltung. Karlsruhe, 22.03.2023.
- Westhaus, Sandra; Weber, Frank-Andreas; Schiwy, Sabrina; Linnemann, Volker; Brinkmann, Markus; Widera, Marek et al. (2020): Detection of SARS-CoV-2 in raw and treated wastewater in Germany - Suitability for COVID-19 surveillance and potential transmission risks. In: *The Science of the total environment* 751, S. 141750. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.141750.
- Whitney, Oscar N.; Kennedy, Lauren C.; Fan, Vinson B.; Hinkle, Adrian; Kantor, Rose; Greenwald, Hannah et al. (2021): Sewage, Salt, Silica, and SARS-CoV-2 (4S): An Economical Kit-Free Method for Direct Capture of SARS-CoV-2 RNA from Wastewater. In: *Environmental science & technology* 55 (8), S. 4880–4888. DOI: 10.1021/acs.est.0c08129.
- Widera, Marek; Wilhelm, Alexander; Hoehl, Sebastian; Pallas, Christiane; Kohmer, Niko; Wolf, Timo et al. (2021): Limited Neutralization of Authentic Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Variants Carrying E484K In Vitro. In: *The Journal of infectious diseases* 224 (7), S. 1109–1114. DOI: 10.1093/infdis/jiab355.
- Wikipedia (2008): Basenpaar Guanin Cytosin (GT). Hg. v. Wikipedia. Online verfügbar unter [https://en.wikipedia.org/wiki/Hydrogen\\_bond#/media/File:Base\\_pair\\_GC.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Hydrogen_bond#/media/File:Base_pair_GC.svg), zuletzt geprüft am 12.06.2023.
- Wilder, Maxwell L.; Middleton, Frank; Larsen, David A.; Du, Qian; Fenty, Ariana; Zeng, Teng et al. (2021): Co-quantification of crAssphage increases confidence in wastewater-based epidemiology for SARS-CoV-2 in low prevalence areas. In: *Water research X* 11. DOI: 10.1016/j.wroa.2021.100100.

- Wilhelm, Alexander; Agrawal, Shelesh; Schoth, Jens; Meinert-Berning, Christina; Bastian, Daniel; Orschler, Laura et al. (2022a): Early Detection of SARS-CoV-2 Omicron BA.4 and BA.5 in German Wastewater. In: *Viruses* 14 (9). DOI: 10.3390/v14091876.
- Wilhelm, Alexander; Schoth, Jens; Meinert-Berning, Christina; Agrawal, Shelesh; Bastian, Daniel; Orschler, Laura et al. (2022b): Wastewater surveillance allows early detection of SARS-CoV-2 omicron in North Rhine-Westphalia, Germany. In: *The Science of the total environment* 846, S. 157375. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.157375.
- Wilhelm, Alexander; Toptan, Tuna; Pallas, Christiane; Wolf, Timo; Goetsch, Udo; Gottschalk, Rene et al. (2021): Antibody-Mediated Neutralization of Authentic SARS-CoV-2 B.1.617 Variants Harboring L452R and T478K/E484Q. In: *Viruses* 13 (9). DOI: 10.3390/v13091693.
- Wilhelm, Alexander; Widera, Marek; Grikscheit, Katharina; Toptan, Tuna; Schenk, Barbara; Pallas, Christiane et al. (2022c): Limited neutralisation of the SARS-CoV-2 Omicron subvariants BA.1 and BA.2 by convalescent and vaccine serum and monoclonal antibodies. In: *EBioMedicine* 82, S. 104158. DOI: 10.1016/j.ebiom.2022.104158.
- Wu, Fuqing; Xiao, Amy; Zhang, Jianbo; Moniz, Katya; Endo, Noriko; Armas, Federica et al. (2021): SARS-CoV-2 RNA concentrations in wastewater foreshadow dynamics and clinical presentation of new COVID-19 cases. In: *The Science of the total environment* 805, S. 150121. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.150121.
- Wurzbacher, C.; Drewes, J. E.; Ho, J.; Agrawal, S.; Lackner, S.; Schoth, J. et al. (2023): SARS-CoV-2 Monitoring – Gesamtheitliche Datenauswertung von mehrjährigen Messreihen aus drei BMBF-Vorhaben. In: *Gewässerschutz Wasser Abwasser*, Bd. 256. Unter Mitarbeit von T. Wintgens. Aachen: Gesellschaft zur Förderung des Instituts für Siedlungswasserwirtschaft an der RWTH Aachen e.V. (*Gewässerschutz Wasser Abwasser*, 256), 51/1-11.
- Zhan, Qingyu; Babler, Kristina M.; Sharkey, Mark E.; Amirali, Ayaaz; Beaver, Cynthia C.; Boone, Melinda M. et al. (2022): Relationships between SARS-CoV-2 in Wastewater and COVID-19 Clinical Cases and Hospitalizations, with and without Normalization against Indicators of Human Waste. In: *ACS EST Water* 2 (11), S. 1992–2003. DOI: 10.1021/acsestwater.2c00045.
- Zhang, Tao; Breitbart, Mya; Lee, Wah Heng; Run, Jin-Quan; Wei, Chia Lin; Soh, Shirlena Wee Ling et al. (2005): RNA Viral Community in Human Feces: Prevalence of Plant Pathogenic Viruses. In: *PLoS Biology* 4 (1). DOI: 10.1371/journal.pbio.0040003.

## IV Anhang

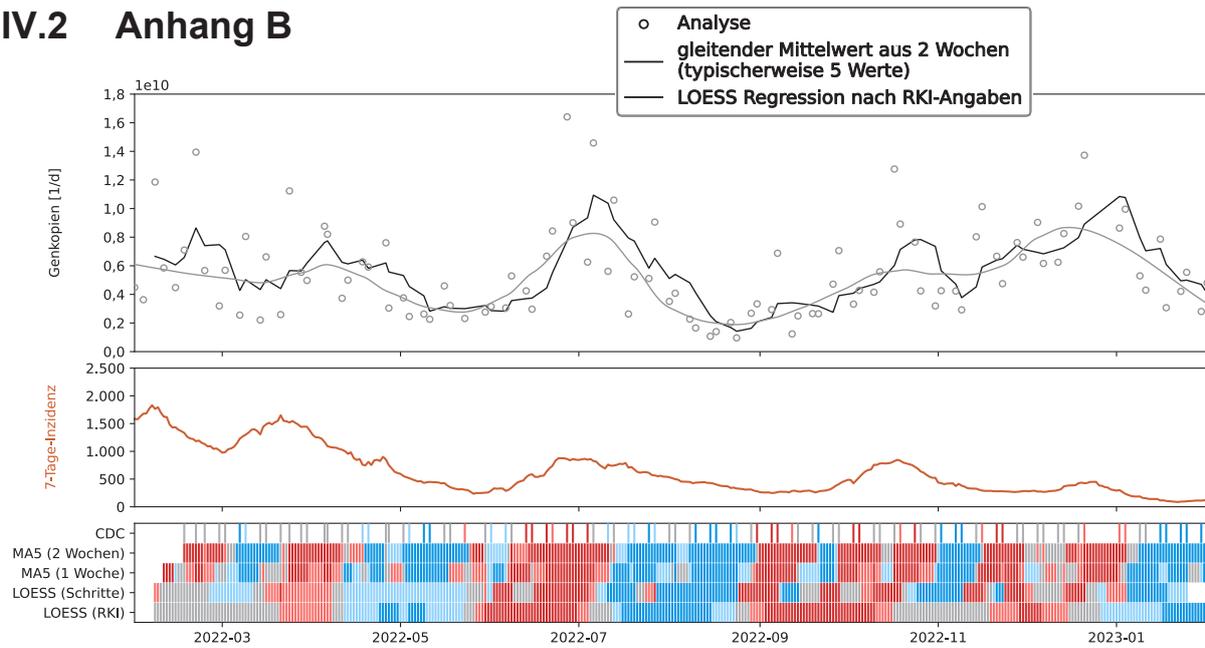
### IV.1 Anhang A

**Tabelle IV.1: Zeitlicher Ablauf von Pandemie und Maßnahmen nach Zusammenstellung des LZG.NRW**

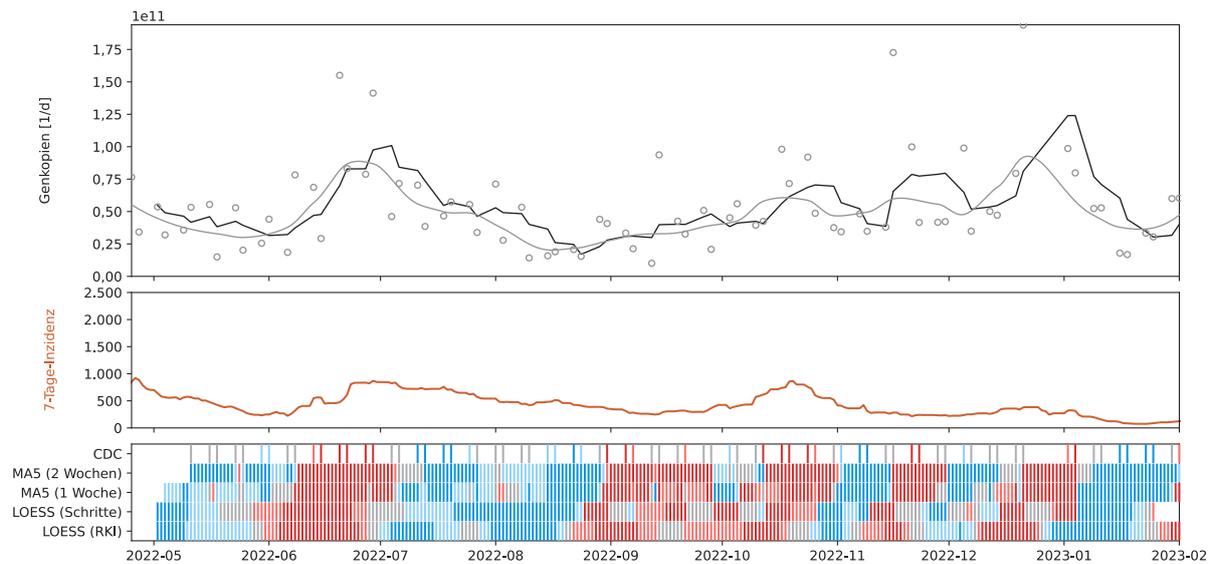
<b>Datum</b>	<b>Ereignis</b>	<b>Erläuterung/Bemerkung</b>
27.01.2020	Corona in D	Ein Mann aus dem Landkreis Starnberg in Bayern hat sich infiziert
25.02.2020	Corona in NRW	Eine Person aus dem Kreis Heinsberg, Gangelt ist nach Karneval an Corona erkrankt.
11.03.2020	Pandemiebeginn	Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) erklärt den COVID-19-Ausbruch zu einer Pandemie
13.03.2020	Coronaschutzverordnung	Erste Veröffentlichung und Umsetzung von Corona-Schutzmaßnahmen
16.03.2020	1. Lockdown	Mit der Verordnung vom 16.03.2020 tritt ein Lockdown in Kraft. Das öffentliche Leben wird zur Reduzierung der Kontakte und zur Eindämmung der Infektionszahlen heruntergefahren. Beginn der Kontaktsperre. Der Lockdown gilt bis zum 19.04.2020.
20.04.2020	Lockerungen	Beginn von ersten Lockerungsmaßnahmen (Einkaufen in Geschäften bis 800 m, z. T. Wiederaufnahme des Schulbetriebs)
20.04.2020	Reiseverbot	Um die Ausbreitung des Coronavirus zu verlangsamen, hat das Bundeskabinett entschieden, dass nicht notwendige Reisen zu vermeiden sind
24.04.2020	Maskenpflicht	Beginn der Maskenpflicht in NRW.
30.04.2020	Lockerungen	Weitere sukzessive Lockerung der Kontaktbeschränkungen (Öffnung von Spielplätzen, Museen, Zoos und Gotteshäusern)
16.06.2020	Start Corona-App	Aufzeichnung von Risikobegegnungen zur Eindämmung der Infektionsketten und zur Kontaktpersonennachverfolgung
01.08.2020	Kostenloser Test für Reisrückkehrer	Jeder, der aus dem Ausland nach Deutschland einreist, kann sich binnen 72 Stunden kostenlos im Testzentrum (z. B. Flughafen, Bahnhof) oder durch einen niedergelassenen Arzt auf das Coronavirus SARS-CoV-2 testen lassen.
01.09.2020	Grenzwerte	Einführung von Grenzwerten
15.09.2020	Einreiseverordnung	Aufhebung pauschale Reisewarnung. Nach Aufenthalt im Risikogebiet, Quarantänepflicht nach Einreise nach Deutschland
17.10.2020	Corona-Hotspots	Regelungen für Corona-Hotspots in NRW
02.11.2020	2. Lockdown ("Light")	Zweiter Lockdown in einer leichteren Version. Das gesellschaftliche Leben wird zur Reduzierung der Kontakte und zur Eindämmung der Infektionszahlen heruntergefahren. Anders als beim 1. Lockdown im März ist der Besuch von Schulen, Kitas, Friseuren, gesundheitlichen Dienstleistungen, von Angehörigen in Gesundheits- und Pflegeeinrichtungen möglich. Alles unter Beachtung der AHA+L+A-Regeln (insbesondere der Maskenpflicht) Der Lockdown-Light gilt vom 02.11.2020 bis zum 30.11.2020
01.12.2020	Kontaktsperre	Die Kontaktbeschränkungen wurden noch einmal verschärft. Private Treffen im öffentlichen Raum sind auf den eigenen und einen weiteren Haushalt zu reduzieren. Ma-

<b>Datum</b>	<b>Ereignis</b>	<b>Erläuterung/Bemerkung</b>
		ximal dürfen sich aber fünf Personen treffen, wobei Kinder bis einschließlich 14 Jahren bei der Berechnung der Personenzahl nicht mitzählen.
16.12.2020	Lockdown	Inkrafttreten des bundesweiten Lockdowns mit z. T. verschärften Regelungen und weiterhin Kontaktsperre (Verschärfung des "Lockdown-Light" und besonderer Schutz vulnerabler Personengruppen)
18.12.2020	Neue Varianten	neuen SARS-CoV-2-Virusvariante (B.1.1.7), die sich seit September 2020 in Großbritannien ausbreitet und Variante N501Y.V2 (alias B.1.351) und die Mutation N501Y, die in Südafrika entdeckt wurde.
28.12.2020	Corona-Schutzimpfung	Bundesweiter Start der Impfkation: Impfstart gegen COVID-19 in Pflegeheimen in NRW
25.01.2021	Maskenpflicht (medizinische)	Es gilt die Verpflichtung zum Tragen einer medizinischen Maske
04.02.2021	Start Impfzentren	Inbetriebnahme der 53 Impfzentren in NRW
26.03.2021	Notbremse	Notbremse ab Inzidenz von 100
17.06.2021	Maskenpflicht (Aufhebung im Freien)	Aufhebung der Maskenpflicht im Freien
17.08.2021	3G-Nachweis	Für das Betreten von öffentlichen Einrichtungen (Friseuren, Fitness-Studios, medizinische Einrichtungen, Veranstaltungen und Festen) muss entweder ein Nachweis der Genesung, Impfung oder neg. Testergebnis vorliegen.
24.11.2021	Auftreten von Omikron	Omikron tritt erstmals in Südafrika auf
26.11.2021	10 % Booster	10 % der Bevölkerung sind geboostert
18.12.2021	Impfstart für Kinder	Bundesweiter Impfstart für die 5- bis 11-Jährigen Kinder
21.12.2021	ControlCOVID	ControlCOVID – Strategie-Ergänzung zur Bewältigung der beginnenden pandemischen Welle durch die SARS-CoV-2-Variante Omikron
10.01.2022	Omikron dominant	Omikron dominiert
11.02.2022	PCR-Tests nur bei pos. Schnelltest	Angepasste Teststrategie - PCR Tests nur bei positivem Schnelltest und Priorisierung
18.02.2022	Höhepunkt überwunden	Höhepunkt der Omikron Welle ist überwunden
20.03.2022	Neues IfSG	Neue Regeln des Infektionsschutzgesetzes (Hotspot-Regelungen)
25.03.2022	Impfappell	Dringender Impfappell an die Bevölkerung
02.05.2022	Isolationspflicht verkürzt	Isolation kann nach fünf Tagen beendet werden
17.06.2022	7-Punkte-Plan	7-Punkte-Plan für den Herbst: 1. Impfkampagne 2. Testkonzept 3. Behandlungskonzept 4. Schutz vulnerabler Gruppen 5. Datenfluss 6. Schulen und Kitas 7. Infektionsschutzgesetz (IfSG)
24.08.2022	Herbst-Regelungen	Bundesweit soll ab Oktober Maskenpflicht im Fern- und Flugverkehr sowie eine Masken- und Testpflicht in Krankenhäusern und Pflegeeinrichtungen gelten
01.09.2022	Omikron-Impfstoff	EMA Zulassung: Omikron-Impfstoffe freigegeben
12.10.2022	Länder in der Verantwortung	Länder sollen Möglichkeiten für Schutzmaßnahmen nutzen
03.02.2023	RKI senkt Corona-Risiko herab	RKI senkt Corona-Risiko herab
14.02.2023	Aufhebung Test- und Maskenpflicht	Es besteht keine Verpflichtung mehr in Räumen und im ÖPNV eine Maske zu tragen. Nur für Arzt, Krankenhaus- und Pflegeheimbesuche besteht weiterhin Maskenpflicht.

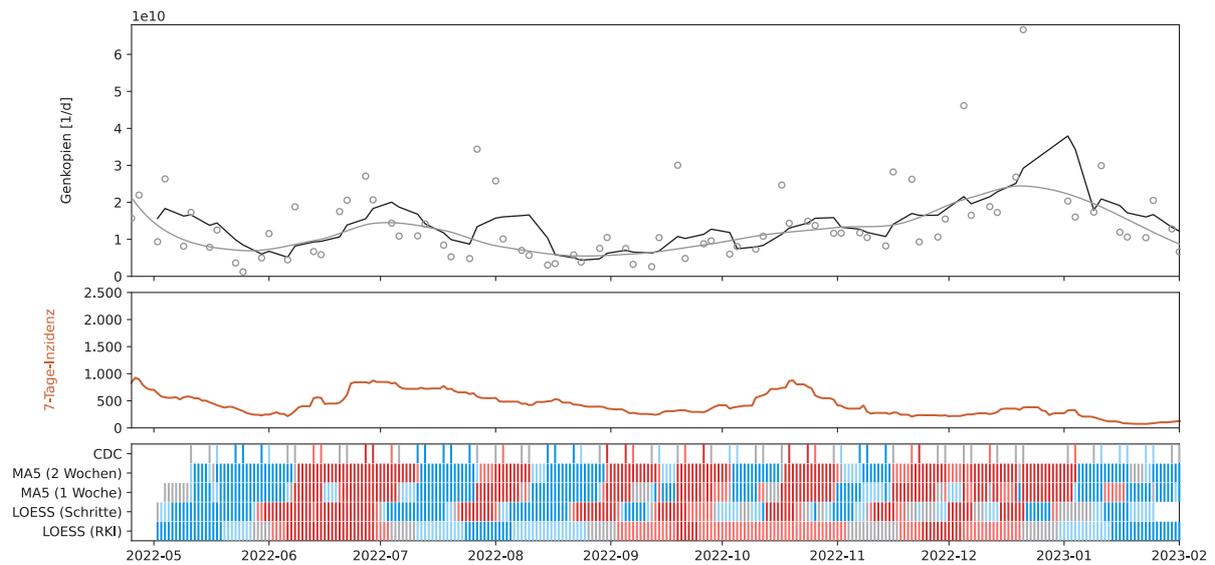
## IV.2 Anhang B



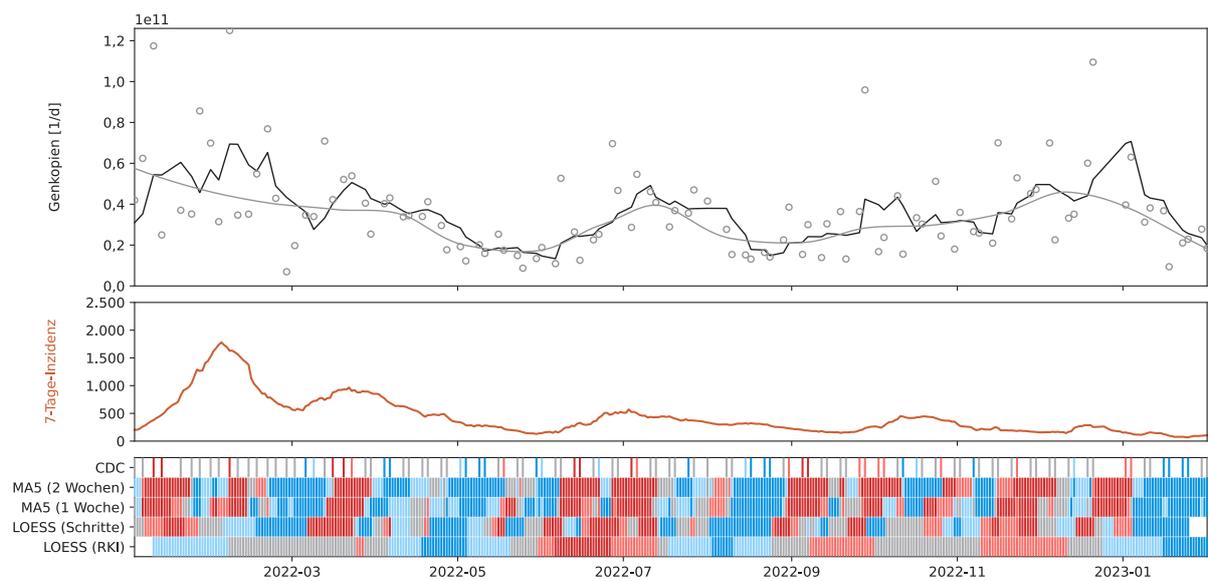
**Abbildung IV.1: Vergleich von Trendindikatoren des SARS-CoV-2 Abwassersignals anhand von Daten der Kläranlage Dinslaken**



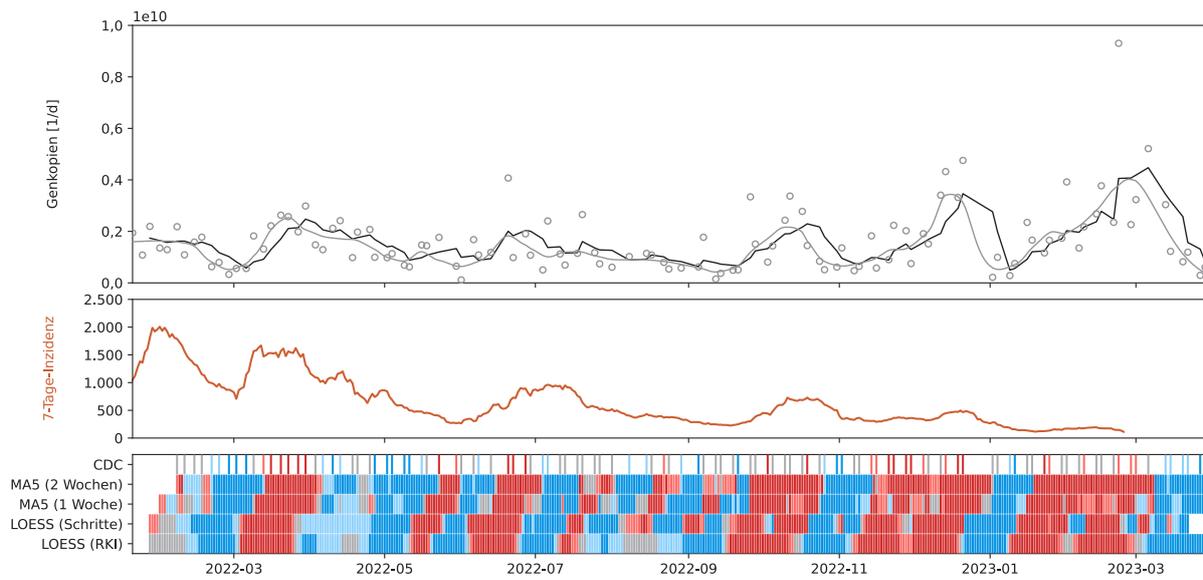
**Abbildung IV.2: Vergleich von Trendindikatoren des SARS-CoV-2 Abwassersignals anhand von Daten der Kläranlage Dortmund-Deusen**



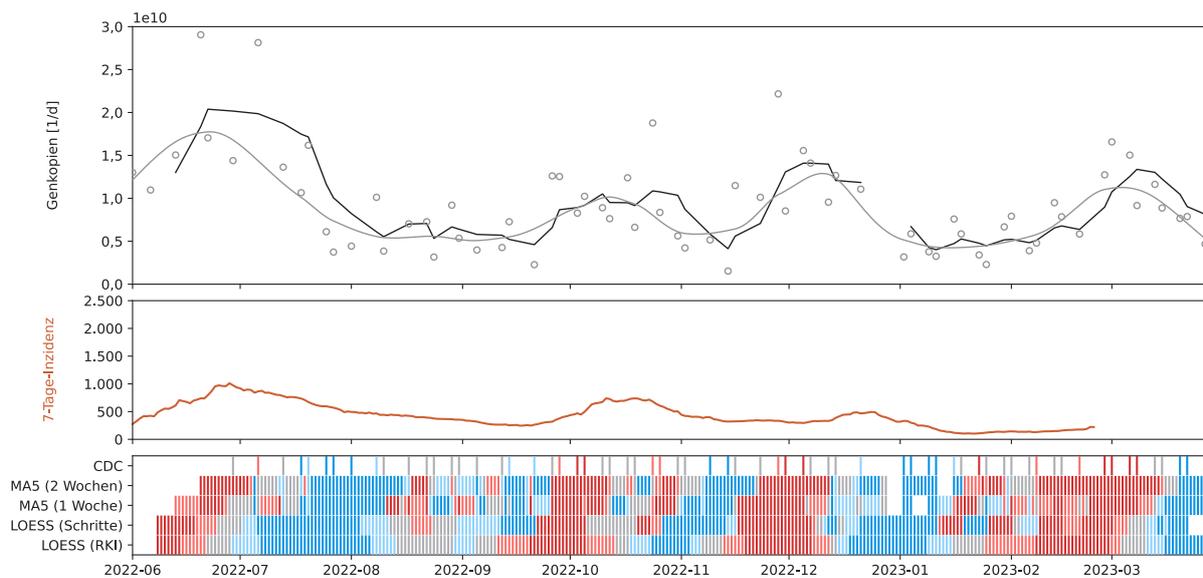
**Abbildung IV.3: Vergleich von Trendindikatoren des SARS-CoV-2 Abwassersignals anhand von Daten der Kläranlage Dortmund-Scharnhorst**



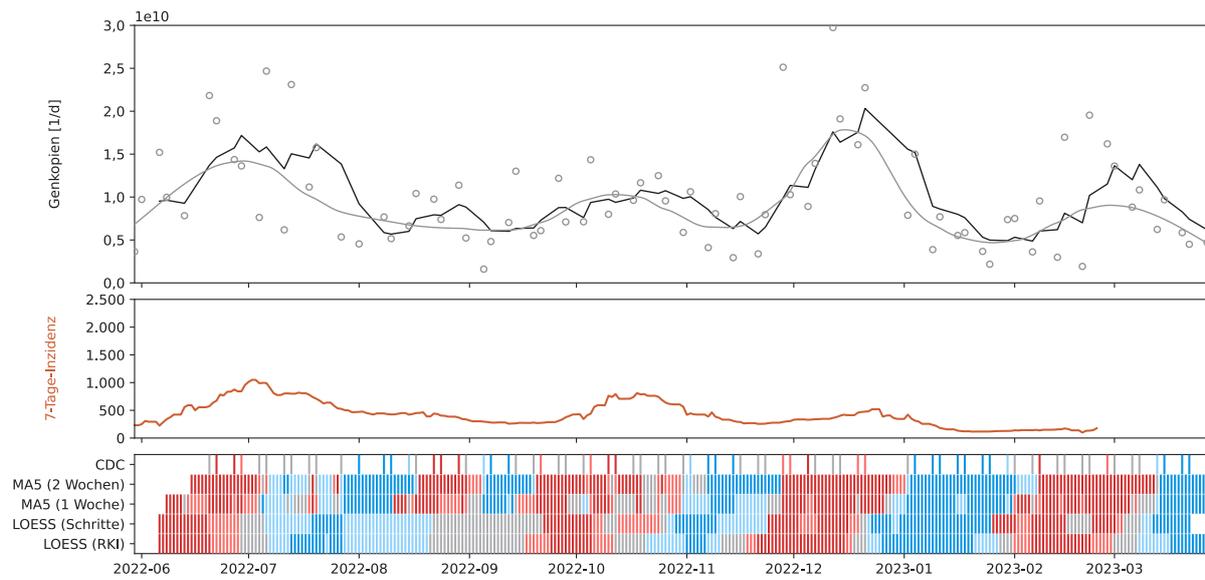
**Abbildung IV.4: Vergleich von Trendindikatoren des SARS-CoV-2 Abwassersignals anhand von Daten der Kläranlage Duisburg Alte Emscher**



**Abbildung IV.5: Vergleich von Trendindikatoren des SARS-CoV-2 Abwassersignals anhand von Daten der Kläranlage Eschweiler-Weisweiler**



**Abbildung IV.6: Vergleich von Trendindikatoren des SARS-CoV-2 Abwassersignals anhand von Daten der Kläranlage Mönchengladbach-Neuwerk**



**Abbildung IV.7: Vergleich von Trendindikatoren des SARS-CoV-2 Abwassersignals anhand von Daten der Kläranlage Wuppertal-Buchenhofen**



Projektpartner



© FiWe.V.



Dezentrales SARS-CoV-2 Monitoring im Abwasser:  
Entwicklung einer validierten Analyseverfahren für  
abwassertechnische Labore auf Kläranlagen