

SARS-CoV-2-Abwassersurveillance in Deutschland im Rahmen des Projekts AMELAG

Einleitung

Die systematische Überwachung von Infektionserregern im Abwasser wird als Abwassersurveillance bezeichnet. Ausgelöst durch die COVID-19-Pandemie wird die Abwassersurveillance inzwischen weltweit im Rahmen des präventiven Gesundheitsschutzes genutzt. Als Ergänzung zu bestehenden Surveillance-Systemen soll mittels der Abwassersurveillance die Verbreitung von Infektionskrankheiten erfasst und Rückschlüsse auf die Infektionsdynamik ermöglicht werden. Aus zahlreichen nationalen und internationalen Studien ist bekannt, dass Krankheitserreger wie SARS-CoV-2 bereits vor dem Auftreten von klinischen Symptomen über die Ausscheidungen infizierter Personen in das Abwasser gelangen und dort nachgewiesen werden können.¹⁻³ Im Vergleich zu individuellen Testungen kann durch die Abwasserbeprobung die Entwicklung des Infektionsgeschehens unabhängig von der aktuellen diagnostischen Teststrategie bzw. der Inanspruchnahme medizinischer Dienstleistungen durch die Bevölkerung verfolgt werden.

Seit Anfang 2020 wird die SARS-CoV-2-Abwassersurveillance in Deutschland in verschiedenen Projekten aufgebaut und umgesetzt, zusammengefasst unter dem Sammelnamen CoroMoni (**Corona-Monitoring**). Diese Projekte wurden vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) finanziert und durch Projekte ergänzt, die von den Bundesländern finanziert wurden. Von November 2021 bis März 2023 erfolgte über das von der Europäischen Union (EU) geförderte Pilotprojekt ESI-CorA (*Emergency Support Instrument* zur Einführung eines nationalen SARS-CoV-2-Abwassermonitorings) ein erstes bundesweites Projekt zur Abwassersurveillance. Die Beprobungen von 20 Modell-Kläranlagen in ESI-CorA zusammen mit den ca. 30 Standorten von CoroMoni waren Grundlage für ein erstes systematisches Monitoring.

Das Projekt AMELAG

Das Projekt „Abwassermonitoring für die epidemiologische Lagebewertung“ (AMELAG) schließt mit einer Laufzeit von November 2022 bis Dezember 2024 an die bisherigen bereits genannten Projekte an. Mit einer durch das Bundesministerium für Gesundheit (BMG) zur Verfügung gestellten Fördersumme von 27 Mio. Euro ist der Umfang der Abwassersurveillance auf mittlerweile 163 Kläranlagen (Stand: 12.06.2024) ausgeweitet worden. Das Projekt verfolgt unter gemeinsamer Leitung von Robert Koch-Institut (RKI) und Umweltbundesamt (UBA) das Ziel, die Viruslast und die zirkulierenden SARS-CoV-2-Varianten im Abwasser zu überwachen, Forschungsfragen zu bearbeiten, Verfahren zur Detektion weiterer Erreger zu etablieren und die gesamte Kette von Probenahme in der Kläranlage bis zur Datenbewertung zu erweitern, zu harmonisieren und zu optimieren. Beteiligt sind unter anderem Kläranlagenbetreibende, Landeslabore, Forschungsinstitute, der Sanitätsdienst der Bundeswehr, die Technische Universität Darmstadt sowie weitere Universitäten und kommerzielle Laborbetriebe. Für die Umsetzung des Projekts wurden Strukturen zur behördenübergreifenden Zusammenarbeit auf Länder- und Bundesebene geschaffen, die Behörden aus dem Abwasser- und Gesundheitsbereich interdisziplinär verknüpfen. Der aufwendige Aufbau des Abwassermonitorings schließt verschiedenste Faktoren der Probenahme, Logistik, Analytik, Datenauswertung und -interpretation ein. Das Abwassermonitoring wird durch zahlreiche Forschungsprojekte begleitet, die in einer Übersicht auf der Webseite des RKI zur Abwassersurveillance zu finden sind.⁴ Mit AMELAG werden somit Strukturen und Netzwerke für die bundesweite Abwassersurveillance aufgebaut und etabliert, damit dem Öffentlichen Gesundheitsdienst zukünftig Daten zum Auftreten und zur Infektionsdynamik von verschiedenen Erregern im Abwasser zur Verfügung stehen.

A. Auswahl der Kläranlagen

Die Kläranlagen wurden von den Bundesländern, dem UBA und dem RKI nach den Kriterien Größe, technische Voraussetzungen, Bereitschaft, Datenkontinuität, Lage, Art und spezielle Einleiter (z. B. Einleitungen aus Industrie und Gewerbe) ausgewählt. Dabei wurde auch auf eine Fortführung der Beprobung von Kläranlagen vorangegangener Projekte geachtet, die zuvor in länderfinanzierten Projekten oder in Forschungsprojekten organisiert waren. Weitere Kläranlagen wurden vertraglich direkt an das Projekt angebunden. Es sind alle Bundesländer bei AMELAG vertreten. An die mittlerweile beprobten 163 Klärwerke (Stand 12.6.2024) ist etwa ein Drittel der Gesamtbevölkerung Deutschlands angeschlossen.

Probeentnahme und Logistik

Die Probeentnahme erfolgt mit Hilfe eines automatischen Probenehmers (s. Abb.1). An einer festgelegten Stelle, in der Regel nach dem Sandfang am Zulauf der Kläranlage, wird zweimal pro Woche

eine Abwasserprobe entnommen. Hier befinden sich bereits weniger Fest- und Grobstoffe im Abwasser. So wird der automatische Probenehmer vor Blockaden geschützt und später die Aufbereitung der Proben im Labor vereinfacht. Die Probenehmer sind temperiert ($5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) und erzeugen über 24 Stunden automatisch konfektionierte Proben, die zunächst in Einzelflaschen abgefüllt werden. Anschließend werden die Proben zusammengeführt, die Mischprobe homogenisiert und insgesamt ein Liter der Probe in eine vorbereitete Probenflasche abgefüllt (s. Abb.1). Es werden pH-Wert, Temperatur und elektrische Leitfähigkeit der Rohabwasserprobe bestimmt. Abschließend erfolgen Kennzeichnung und Transport der Probe in das jeweilige Analyselabor.

Die 24-Stunden-Mischproben werden in der Regel dienstags und donnerstags bei der Kläranlage abgeholt und temperiert in die zuständigen Analytiklabore geliefert. Essenziell für die Quantifizierung der SARS-CoV-2-Viruslast ist das Einhalten der



Entnahme von Abwasser am Zulauf der Kläranlage



Automatischer Probenehmer



Probe wird über 24 Stunden auf Einzelflaschen verteilt



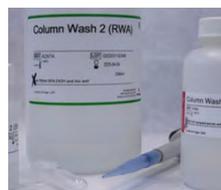
Probe wird vermischt und homogenisiert



Ein Liter der Mischprobe wird abgefüllt und gekühlt versendet



Reinigung und Aufkonzentrierung der Abwasserprobe, z. B. durch vakuumbasiertes Absaugen auf eine Filtersäule



Nukleinsäure-Extraktion mittels gebrauchsfertigem Kit



Fraktionierung der PCR-Reaktion in einzelne Droplets, wenn beispielsweise die digitale PCR eingesetzt wird



Transkription der RNA in cDNA (RT) und Amplifizierung von mindestens zwei SARS-CoV-2-spezifischen Genfragmenten im Thermocycler



Quantifizierung der Genfragmente mittels Droplet-Reader und Analyse-Software für die digitale PCR

Abb. 1 | Probenahme (obere Reihe) und beispielhafter Arbeitsablauf im Labor (untere Reihe)

RT = Reverse Transkriptasen; PCR = Polymerase-Kettenreaktion

Kühlkette, weshalb die Probe bei $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ transportiert wird. Um möglichst aktuelle Daten liefern zu können, wird sichergestellt, dass die Probe spätestens nach 24 Stunden in den zuständigen Laboren eintreffen. Die Anforderungen für die Probenahme sind in einem technischen Leitfaden zur Probenahme für Abwasser zusammengefasst.⁴

B. Probenaufbereitung und Quantifizierung der SARS-CoV-2-Viruslast

Im Labor wird die Probeneingangstemperatur kontrolliert und somit die intakte Kühlkette überprüft. Die Proben werden in einem Überkopfschüttler homogenisiert, bevor ein Probenaliquot (i. d. R. 40–100 mL) für die Aufkonzentrierung der SARS-CoV-2-Fragmente entnommen wird. Die Proben werden zeitnah verarbeitet, denn für möglichst präzise Messergebnisse dürfen diese maximal fünf Tage im Kühlschrank bei $4\text{--}8^{\circ}\text{C}$ zwischengelagert werden. Ein Einfrieren der Proben sollte vermieden werden, da die gemessene Viruslast nach Auftauen im Vergleich zur Ausgangsprobe signifikant abnimmt.

Zur Probenaufbereitung erfolgt bei vielen Methoden ein Zentrifugationsschritt, um Feststoffpartikel abzutrennen. Danach wird durch Fällung mit Polyethylenglykol, druck- oder vakuumbasierter Filtration, zentrifugaler Ultrafiltration oder Ultrazentrifugation die Konzentration der Virusbestandteile erhöht. Die Wahl der Aufkonzentrierungsmethode ist abhängig von Probenvolumen, Effizienz der Methode und Eignung für das untersuchte Virus, aber auch von der jeweiligen Laborausstattung.

Nach der Viruskonzentrierung werden die Nukleinsäuren extrahiert, entweder in Gesamtform (DNA + RNA) oder spezifisch nur die RNA. Hierfür sind kommerzielle Kits erhältlich, die meist auf der organischen Extraktion mit Phenol, Wasser und Alkohol oder silikabasierten Filtersäulen beruhen. Die extrahierten Nukleinsäuren werden in $50\text{--}200\ \mu\text{L}$ nukleasefreiem Wasser aufgenommen und aliquotiert bei -80°C (Langzeitlagerung) oder bei -20°C (stabil für ca. einen Monat) eingefroren.

Zum eindeutigen Nachweis von SARS-CoV-2 wird empfohlen, mindestens zwei unterschiedliche Genabschnitte mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-

Kettenreaktion (qPCR) oder digitaler PCR (dPCR) zu analysieren. Die qPCR ist für diagnostische Laboratorien ein Routineverfahren und der darauf basierende SARS-CoV-2-Nachweis ist vielfach erprobt.⁵ Die Vorteile der neueren dPCR sind Unabhängigkeit von Standardkurven für die Quantifizierung und höhere Präzision der Messwerte. Durch die Partition der PCR in diverse Einzelreaktionen innerhalb des Reaktionsgefäßes sind Sensitivität und Inhibitorenresistenz erhöht.^{6–9}

Die im AMELAG-Projekt ausgewählten Zielgene für die PCR sind die Gene für Nukleokapsid (N₁, N₂), Hüllprotein (E), Polymerase (RdRp), Spikeprotein (S) und Open Reading Frame (ORF). Die Konzentration der SARS-CoV-2-Genfragmente aus der Abwasserprobe wird in der Regel in Genkopien pro Liter angegeben. Jedes Labor soll basierend auf den verwendeten Methoden für Anreicherung, Extraktion und Quantifizierung eine eigene Bestimmungsgrenze (LOQ, *Limit Of Quantification*) für jede detektierte Gensequenz ermitteln.

Zusätzlich zur SARS-CoV-2-Konzentration wird mindestens ein sogenanntes Surrogatvirus quantifiziert, das als Qualitätskontrolle und Normalisierungsparameter dienen kann. Gängige Optionen sind CrAssphage (*Cross-assembly phage*) und PMMoV (*Pepper mild mottle virus*).^{10,11}

Dem Labor stehen verschiedene Protokolle zur Verfügung. Bisher gibt es keine standardisierten Protokolle, mit einem technischen Leitfaden zur molekularbiologischen Analytik sind jedoch Rahmenbedingungen vorgegeben.⁴ Die Labore sind angehalten, gewählte Methoden nach Möglichkeit unverändert beizubehalten, um die Kontinuität der Daten zu gewährleisten. Ein deutschlandweiter Laborvergleich der angewendeten Verfahren ist im Rahmen von AMELAG für Sommer 2024 geplant.

Die Lagerstabilität der Proben, tagesabhängige Variabilität der Zusammensetzung des Rohabwassers an jedem Standort (z. B. potenzielle Starkregenereignisse, Industrieeinleiter, Tourismus-/Pendlerbewegungen) sowie die verwendete Analytik sind mögliche Einflussgrößen für die Bestimmung der Viruslast. Sie beeinflussen Genauigkeit und Vergleichbarkeit standortspezifischer Datensätze und

müssen bei der Datenanalyse berücksichtigt werden. Daher verfolgt das UBA eine Methodenidentifizierung zur potenziellen Harmonisierung der Labormethoden sowie zur Qualitätsbewertung der Labordaten.

C. Datenübermittlung

Die Verarbeitung der PCR-Messwerte sowie der Daten der Kläranlage erfolgt in der browserbasierten Webanwendung „Pathogene im Abwasser“ (PiA). Der PiA-Monitor dient als zentrale Plattform für einen praxistauglichen, harmonisierten und transparenten Datenfluss zur Bereitstellung qualitätsgesicherter Daten und wird vom UBA gepflegt.

Erfasst werden unveränderliche Daten (Stammdaten) zu Kläranlagen und Laboren sowie variable Daten zum Probenahmezeitpunkt (Monitoringdaten). Zu den Stammdaten der Kläranlage zählen beispielsweise Ausbaugröße, Trockenwetterabfluss und Probenahmestelle. Die Stammdaten der Labore beinhalten unter anderem Aufkonzentrierungsmethode, verwendetes Extraktionskit, angewandte PCR-Methode und Zielgene.

Als Monitoringdaten müssen von den Kläranlagen Parameter wie Volumenstrom, Leitfähigkeit und pH-Wert erfasst und an das Labor übermittelt werden. Der Datensatz wird laborseitig mit den SARS-CoV-2-PCR-Ergebnissen aus den Rohabwasserproben ergänzt und in den PiA-Monitor hochgeladen.

D. Datenqualitätsprüfung und Normalisierung

Die Datensätze werden einer Qualitätsprüfung, Normalisierung sowie verschiedenen statistischen Analysen unterzogen. Dabei erfolgt auch die Aggregation der gemessenen SARS-CoV-2-Genkopien der Zielgene durch Anwendung des geometrischen Mittels.

Der Volumenstrom einer Kläranlage wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst, die unterschiedlich lange andauern. Beispielsweise können kontinuierliche und diskontinuierliche Abwasserleitungen von Industriebetrieben sowie Fremd- und Niederschlagswasser (z. B. Starkregenereignisse) durch Volumenveränderung die Konzentration der SARS-CoV-2-Genomfragmente im Abwasser beeinflussen.

Deshalb findet eine Normalisierung der gemittelten SARS-CoV-2-Genkopien statt. Diese erfolgt mithilfe des durchschnittlichen Trockenwetterzuflusses (Volumenstrom ohne Berücksichtigung von Niederschlagsereignissen und Tauwetter) der jeweiligen Kläranlage:

$$\text{Gene normalisiert} = \frac{Q_{KA \text{ aktuell}}}{Q_{KA \text{ median}}} \times \text{Gene gemittelt}$$

$Q_{KA \text{ aktuell}}$: Volumenstrom der Kläranlage im Probenahmezeitraum
 $Q_{KA \text{ median}}$: Median des Volumenstroms der Kläranlage

E. Statistische Analyse

Die Daten werden automatisiert an das RKI übermittelt. Am RKI werden die Daten weiter analysiert und grafisch dargestellt.

Zeitreihendarstellung (Ausgleichskurve)

Die gemessenen Viruslasten sind insgesamt und auch für die meisten Standorte linkssteil verteilt, es gibt also häufig niedrige Werte und selten sehr hohe Werte. Deshalb werden die Daten logarithmiert (zur Basis 10), sodass die Verteilung symmetrischer wird. Dadurch wird der Einfluss von Ausreißern im oberen Bereich der Messwerte auf die Schätzung der Ausgleichskurve vermindert und die Schätzung adäquater Konfidenzbänder, welche die Unsicherheit der geschätzten Ausgleichskurve abbilden, ermöglicht.

Zur anschaulicheren Darstellung des Viruslastverlaufs und von Trends eines einzelnen Standorts werden eine Ausgleichskurve und zugehörige Konfidenzbänder berechnet. Die Ausgleichskurve wird mit der lokal gewichteten Regression (LOESS-Methode) geschätzt, sodass sich für jeden Standort eine relativ glatte Kurve und für jeden Zeitpunkt (auch zwischen den Messzeitpunkten) eine vorhergesagte Viruslast ergeben.* Die verwendeten Konfidenzbänder sind punktweise 95%-Konfidenzintervalle (konstruiert mit entsprechendem t-Verteilungsquantil) zu den geglätteten Werten auf der

* Regressionsanalysen untersuchen Zusammenhänge zwischen mehreren Variablen, in diesem Fall der Zeit als unabhängiger und der Viruslast im Abwasser als abhängiger Variable. Dabei wird anhand eines mathematischen Kriteriums eine Funktion bestimmt, die den Zusammenhang für vorliegende Daten bestmöglich beschreibt. Diese Funktion erlaubt gleichzeitig, Werte für die abhängige Variable vorherzusagen, die im Fall einer LOESS-Regression auf einer glatten Kurve liegen.

Kurve. Details zur LOESS-Methode können auf der AMELAG-Webseite nachgelesen werden.⁴

Vorteil der Verwendung eines kreuzvalidierten LOESS-Verfahrens ist, dass immer auf Basis der bisher vorhandenen Daten eine hinsichtlich der Vorhersagefähigkeit optimierte Kurve berechnet wird, die eine leichte visuelle Erfassung der zeitlichen Entwicklungen der Viruslast ermöglicht. Nachteil ist, dass sich die Kurve beim Hinzukommen eines neuen Messwertes zu allen Zeitpunkten verändern kann. Dennoch spiegelt die Kurve immer das beste Wissen zur aktuellen Zeit wider. Ähnliche Glättungsverfahren werden in anderen Ländern, z. B. in Irland und in den USA, verwendet.^{12,13} Andere Darstellungen verzichten hingegen auf Glättungsverfahren.^{14,15}

Abbildung 2 zeigt Ausgleichskurven und Konfidenzbänder exemplarisch für zwei Standorte (Berlin und Jena). Dabei ist zu sehen, dass in Berlin grundsätzlich niedrigere Viruslasten als in Jena gemessen werden.

Trotz der genannten Vorteile der logarithmischen Darstellungen ist es für ein umfassendes Bild ratsam, zusätzlich die nicht logarithmierten, d. h. nicht transformierten Datenpunkte darzustellen, wie dies z. B. im AMELAG-Wochenbericht oder im Wochenbericht aus Finnland geschieht.¹⁶

Trendberechnung (Heatmap)

Aus den einzelnen Kurven können Trends errechnet und diese beispielsweise je nach Veränderung eines Wertes zum Vorwochenwert kategorisiert werden (z. B. in steigend, gleichbleibend und fallend). Die errechneten Trends nutzt das RKI zur Erstellung einer Heatmap (s. Abb. 3). Die Heatmap zeigt dabei die Trends über die Zeit für die einzelnen Standorte (sortiert nach Bundesländern). Diese Darstellung ist kompakt und erlaubt auf einen Blick zu sehen, ob sich Trends über viele Standorte hinweg ähnlich verhalten. Die Darstellung als Heatmap birgt allerdings das Problem, dass sich mit Hilfe der Trends nur Veränderungen über die Zeit (hier über eine Woche) abbilden lassen, aber nicht der genaue Wert der Viruslast ablesen lässt. Deshalb ist eine Darstellung der einzelnen Zeitreihen samt Ausgleichskurve (wie in Abb. 2) eine sinnvolle Ergänzung.

Details zur Trendberechnung sind in einem technischen Leitfaden zur Datenverarbeitung zu finden.⁴

Aggregation (aggregierten Kurve)

Neben der Darstellung einzelner Standorte ist auch die Darstellung aller Standorte in einer aggregierten, gemeinsamen Kurve von Interesse, um die Viruslast im Abwasser regional übergreifend einschätzen zu können. Die Höhe der gemessenen Viruslast ist abhängig vom Abwassersystem und kann sich damit von Standort zu Standort unterscheiden. Ebenfalls liegen die Messwerte für ver-

SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser in \log_{10} Genkopien/Liter

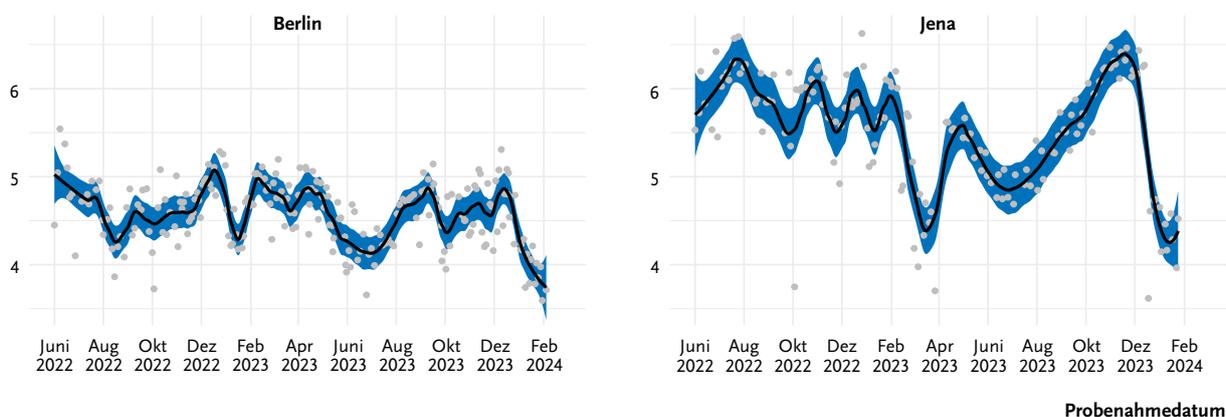


Abb. 2 | SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser über die Zeit (graue Punkte) samt Ausgleichskurve (schwarze durchgezogene Linie) und zugehörigen punktweisen 95%-Konfidenzintervallen (blauer Bereich) für die Standorte Berlin (links) und Jena (rechts). Als Datum der Probenahme wurde jeweils der Tag des Beginns der 24-Stunden-Mischprobe gewählt.

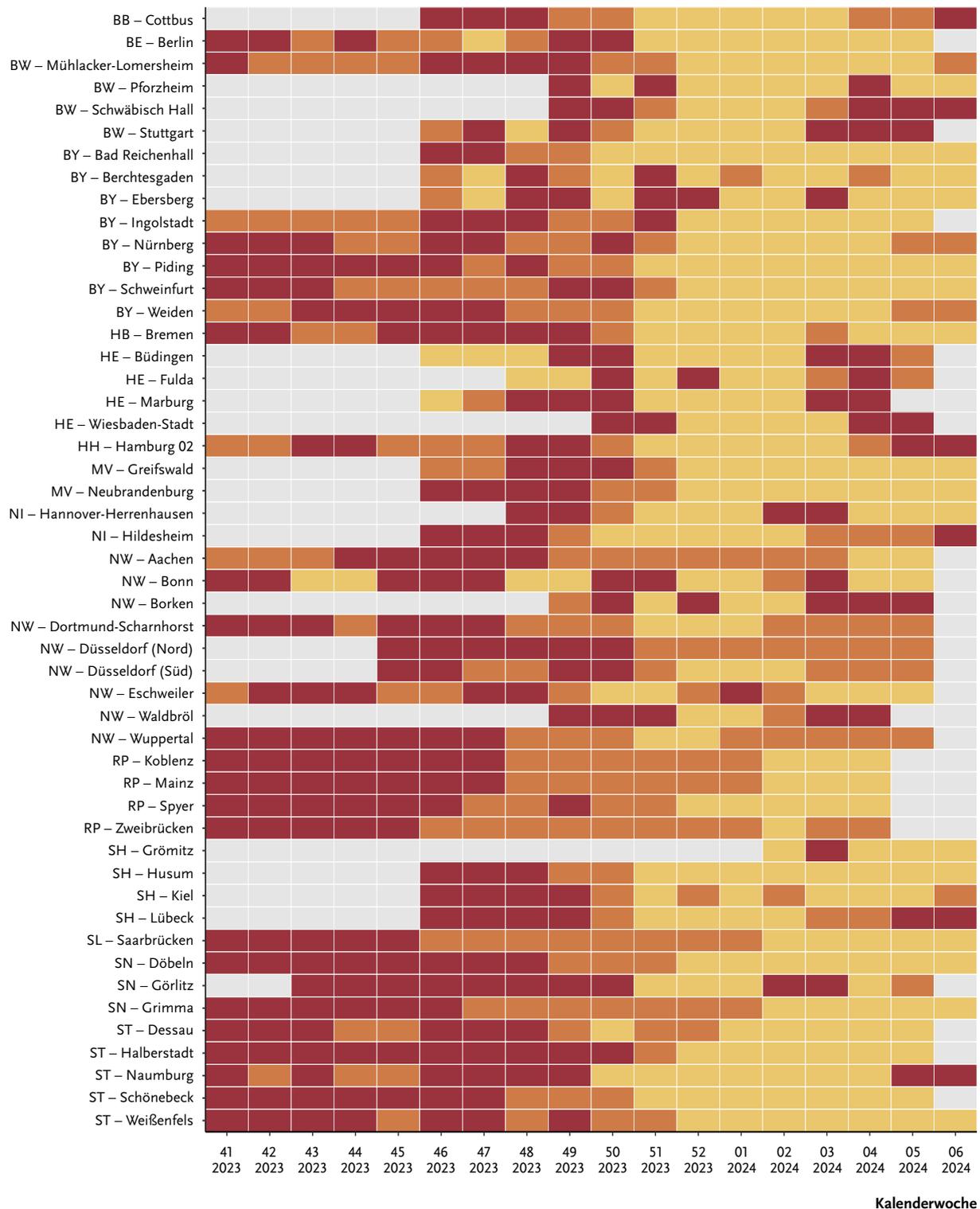


Abb. 3 | Beispiel für eine Heatmap zur Trenddarstellung der SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser für verschiedene Standorte.

schiedene Standorte an verschiedenen Tagen und in unterschiedlichen Zeiträumen vor, weil z. B. einige Kläranlagen verspätet mit der Beprobung angefangen haben.

Werden die Messwerte zwischen verschiedenen Standorten mittels arithmetischem Mittel aggregiert, besteht aufgrund der Unterschiedlichkeit der Standorte das Problem, dass die gemittelten Messwerte von einem Messzeitraum (z. B. Tag oder Woche) zum nächsten recht unterschiedlich aussehen können: Theoretisch wäre es z. B. möglich, dass an Montagen Standorte mit grundsätzlich höheren Viruslasten beprobt werden, wohingegen an Dinstagen Standorte mit durchschnittlich niedrigen Viruslasten beprobt werden. Dadurch steigt die Variabilität in der abzubildenden Zeitreihe der Mittelwerte. Verringert wird dieses Problem der Variabilität durch das Festsetzen einer höheren Mindestanzahl von beprobten Standorten, die in einem Messzeitraum vorliegen müssen, damit ein Mittelwert überhaupt ausgewiesen wird. Je höher diese Mindestanzahl von beprobten Standorten gewählt wird, desto weniger Messzeiträume werden jedoch ausgewertet und desto mehr Daten gehen damit verloren.

Ein anderer Ansatz, um die Variabilität der aggregierten Messwerte zu verringern, mittelt zunächst alle Messwerte jedes Standorts jeweils für einen längeren Zeitraum, z. B. eine Woche, bevor dann diese

Mittelwerte über alle Standorte hinweg erneut gemittelt werden. So bildet sich für die aggregierte Kurve ein Messwert pro Woche. Dieses Verfahren hat den Nachteil, dass die aggregierten Messwerte die einzelnen Messwerte aus einer ganzen (vergangenen) Woche enthalten und deshalb etwas an Aktualität verlieren. Ein Vorteil gegenüber einem kürzeren Messzeitraum (z. B. tageweise Mittelung) ist neben einer geringeren Variabilität der Mittelwerte, dass von keinem Standort Werte verloren gehen, solange die Mindestanzahl der Standorte, die zum aggregierten Wochenwert beitragen müssen, nicht zu groß gewählt wird.** In diesem Fall tragen also alle Standorte mit ihren Messwerten zur aggregierten Kurve bei. Für den vorliegenden Datensatz werden für jeden Standort immer mittwochs die Messwerte aus den vergangenen sieben Tagen (meistens zwei Messwerte) gemittelt, bevor diese Mittelwerte wiederum gemittelt werden. [Abbildung 4](#) zeigt die aggregierte Kurve, die durch dieses Verfahren zustande kommt. Die Mittelwerte weichen wenig von der Ausgleichskurve ab und die LOESS-Kurve wird mit wenig Unsicherheit geschätzt. Aufgrund der genannten Vorteile wird im Folgenden die Sieben-

** Im vorliegenden Datensatz sind jede Woche Werte von mindestens 24 Standorten vorhanden. Für die hier vorgenommenen Analysen wird für die Mindestanzahl der Standorte, die zum aggregierten Wochenwert beitragen müssen, zehn Standorte gewählt. Somit gehen keine Messwerte verloren.

SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser in \log_{10} Genkopien/Liter

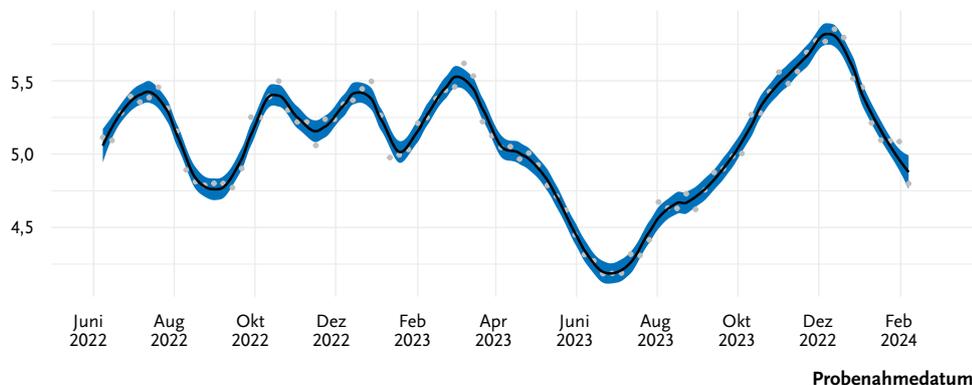


Abb. 4 | Aggregierte SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser über die Zeit (graue Punkte) samt Ausgleichskurve (schwarze durchgezogene Linie) und zugehörigen punktwisen 95%-Konfidenzintervallen (blauer Bereich). Die Daten einzelner Standorte wurden über eine Woche gemittelt und die resultierenden Wochenwerte über alle Standorte ohne Gewichtung gemittelt. Als Datum der Probenahme wurde jeweils der Tag des Beginns der 24-Stunden-Mischprobe gewählt.

Tages-Mittelung der standortspezifischen Daten verwendet.

Alternativ zur bisher erläuterten Mittelwertbildung auf Basis der (logarithmierten) Messwerte bzw. deren Sieben-Tage-Mittelwerte der einzelnen Standorte könnte eine vorherige Standardisierung der einzelnen Zeitreihen vorgenommen werden. Wird beispielsweise die Minimum-Maximum-Standardisierung gewählt, ist dadurch garantiert, dass die Werte eines Standortes immer zwischen Null und Eins liegen und systematische Unterschiede in der Höhe der Viruslast zwischen Standorten (wie in Abb. 2) verschwinden.¹⁷ Ein standardisierter Messwert wird somit im Vergleich zum gesamten Wertebereich des Standortes interpretiert. Ähnliche Wege zur Standardisierung von Viruslasten im Abwasser werden beispielsweise vom Bundesamt für Gesundheit in der Schweiz und den US-amerikanischen Centers for Disease Control and Prevention (CDC) verwendet.^{13,18}

Ein Nachteil dieser Art der Berechnung und Darstellung der aggregierten Kurve ist die schwierigere Interpretierbarkeit im Vergleich zu einem Wert in der ursprünglichen Einheit, d. h. (logarithmierte) Genkopien pro Liter. Ein anderer Nachteil liegt in den unterschiedlichen Beprobungszeiträumen der Standorte begründet. Es kommen über die Zeit

neue Standorte hinzu, die nach ihren ersten Beprobungen immer einen Minimal- und Maximalwert haben und unabhängig von der aktuellen Erregerdynamik neben Null und Eins standardisierte Werte dazwischen erhalten. Selbst in einer Phase ohne nennenswertes Infektionsgeschehen könnten dann z. B. vornehmlich hohe Werte angezeigt werden, weil keine Messungen in vergangenen Hochzeiten der Pandemie durchgeführt wurden.

Wird keine Standardisierung verwendet, sind grundsätzliche Unterschiede zwischen den Standorten weniger problematisch, solange die Anzahl der Standorte groß genug ist und die Annahme stimmt, dass sich neu aufgenommene Standorte nicht systematisch in ihrer Viruslast im Abwasser von den Standorten unterscheiden, die schon länger beprobet werden. Deshalb wird auf die Standardisierung der Messwerte auf Standortebene verzichtet.

Eine Mittelung der Messwerte zwischen den Standorten berücksichtigt nicht die unterschiedliche Größe der teilnehmenden Kläranlagen. Es bietet sich deshalb eine Gewichtung nach der Anzahl der an Kläranlagen angeschlossenen Einwohner an. So wird eine bessere Abbildung der Gesamtbevölkerung in Deutschland erreicht. Da die Anzahl der teilnehmenden Standorte über die Messzeitpunkte schwankt, unterscheidet sich zudem die Unsicher-

SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser in \log_{10} Genkopien/Liter

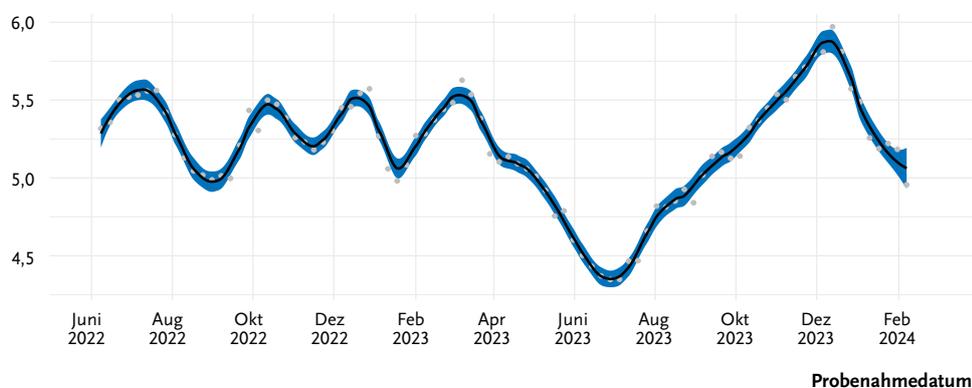


Abb. 5 | Aggregierte SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser über die Zeit (graue Punkte) samt Ausgleichskurve (schwarze durchgezogene Linie) und zugehörigen punktwisen 95%-Konfidenzintervallen (blauer Bereich). Die Daten einzelner Standorte wurden über eine Woche gemittelt und die resultierenden Wochenwerte über alle Standorte gemittelt. Im Gegensatz zu Abbildung 4 wurden sowohl die Mittelung über alle Standorte als auch die Schätzung der Ausgleichskurve gewichtet durchgeführt. Als Datum der Probenahme wurde jeweils der Tag des Beginns der 24-Stunden-Mischprobe gewählt.

heit in der Schätzung der Mittelwerte. Dementsprechend sollte die Schätzung der LOESS-Kurve gewichtet erfolgen, sodass Mittelwerte mit großer Unsicherheit weniger Einfluss haben.¹⁹ [Abbildung 5](#) zeigt die aggregierte Kurve mit den beschriebenen Gewichtungen.

Zwischen [Abbildung 4](#) und [Abbildung 5](#) ist eine große Ähnlichkeit zu erkennen, Unterschiede existieren aber beispielsweise in der Höhe der Viruslasten im Juli 2022.

F. Bewertung und Kommunikation

Aktuell werden Daten aus AMELAG im [Wochenbericht zur Abwassersurveillance](#) veröffentlicht. Zusätzlich sind Teilergebnisse im [Infektionsradar des BMG](#), [ARE-Wochenbericht](#) und im [GrippeWeb-Wochenbericht](#) zu finden. Durch die Zusammenschau mit den anderen Daten, z. B. aus der syndromischen Surveillance, erfolgt die Einschätzung der epidemiologischen Lage. [Die Daten stehen zudem öffentlich zur Verfügung.](#)

Neben der Darstellung der Daten bietet AMELAG weitere Möglichkeiten für Information und Austausch. RKI und UBA veröffentlichen Informationen über Abwassersurveillance im Allgemeinen, das Vorhaben [AMELAG](#) und zugehörige Forschungsprojekte sowie Details zu den Methoden. Einmal im Monat findet das AMELAG-Kolloquium statt, bei dem es Gastvorträge und Zeit für den fachlichen Austausch gibt. Über aktuelle Neuigkeiten wird im AMELAG-Newsletter berichtet.

Zusammenfassung

Das Projekt AMELAG ist durch die enge Zusammenarbeit von UBA und RKI mit Behörden, Laboren und Kläranlagen deutschlandweit erfolgreich angelaufen. Der Arbeitsablauf für die SARS-CoV-2-Abwassersurveillance ist gut etabliert und eine funktionsfähige Infrastruktur wurde aufgebaut. Durch die Untersuchung der Rohabwasserproben aus mittlerweile 163 Klärwerke in 25 Laboren (Stand: 12.5.2024), die am Projekt AMELAG teilnehmen, wird rund ein Drittel der Bevölkerung in Deutschland abgedeckt. Die Abwassersurveillance ist unabhängig von Teststrategie und -verhalten und deckt große Populationen ab. Die Probe einer Kläranlage

stellt eine Poolprobe aller an die Kläranlage angeschlossenen Haushalte dar.

Die aus den Kläranlagen gewonnenen Daten lassen sich für einzelne Standorte und aggregiert auf verschiedene Arten darstellen, die jeweils mit Herausforderungen behaftet sind. Das gilt besonders für aggregierte Darstellungen, mit denen z. B. deutschlandweite Aussagen über die SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser getroffen werden. Da die Kläranlagen keiner Zufallsauswahl aus allen Kläranlagen in Deutschland unterliegen, ist es grundsätzlich ohne weitere Annahmen nicht möglich, die Ergebnisse aus der Stichprobe auf ganz Deutschland zu übertragen. Weil sich alle Bundesländer beteiligen, die Standorte über ganz Deutschland verteilt sind und einen relevanten Teil der Gesamtbevölkerung abdecken, kann jedoch von einer guten Annäherung an den bundesweiten Mittelwert ausgegangen werden. Unterschiedliche Messzeiträume sowie teilweise nicht vergleichbare Messwerte zwischen den Standorten erschweren eine akkurate Berechnung von aggregierten Indikatoren. Grundsätzlich ist es ratsam, verschiedene Methoden und Darstellungsformen zu verwenden und deren Stärken und Limitationen zu beschreiben. Eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse lässt insgesamt auf eine Robustheit der Verfahren schließen, die sich auch im hier diskutierten Anwendungsfall von SARS-CoV-2 in Deutschland beobachten lässt. Die Aggregation reduziert zudem die Variabilität zwischen den einzelnen Datenpunkten, sodass Trends sicher erkannt werden können. Bei der Interpretation muss jedoch darauf geachtet werden, dass absolute Viruslasten insbesondere über längere Zeiträume nicht direkt verglichen werden können, da sich die ausgeschiedenen Virusmengen z. B. zwischen verschiedenen Virusvarianten unterscheiden können.

Abwasserdaten erlauben Rückschlüsse auf die Infektionsdynamik, aber nicht auf die Krankheitsschwere oder die Belastung des Gesundheitssystems. Für die epidemiologische Lagebewertung sollten die Daten daher immer in Zusammenschau mit anderen Indikatoren, z. B. aus der syndromischen Surveillance, betrachtet werden. Aus Abwasserdaten kann nach aktuellem Stand nicht präzise auf die Inzidenz bzw. Prävalenz oder die Untererfassung geschlossen werden.

Ausblick

Die EU-Kommission hatte im März 2021 eine Empfehlung zum Aufbau der SARS-CoV-2-Abwasser-surveillance in den Mitgliedstaaten verabschiedet. Diese Empfehlung ist in den aktuellen Legislativvorschlag zur Neufassung der EU-Kommunalabwasserrichtlinie (91/271/EWG) übernommen worden. In Ergänzung zum §13 Abs. 2 Infektionsschutzgesetz sieht der Vorschlag ein Monitoring von relevanten Krankheitserregern im Abwasser vor. Zukünftig sollen deshalb Protokolle erarbeitet werden, die den Nachweis von Influenzaviren der

Gruppen A und B für die Routine etablieren. Für weitere Erreger oder Krankheitsindikatoren (z. B. Respiratorisches Synzytial-Virus, Antibiotikaresistenz, Noroviren, Rotaviren) werden im UBA, am RKI und in den an AMELAG angeschlossenen Forschungsprojekten derzeit Detektionsmethoden etabliert und möglichst validiert. Zusätzlich werden Abwasserproben sequenziert, um einen Überblick über den Anteil der aktuell vorhandenen Virusvarianten zu erhalten.²⁰ Dadurch können frühzeitig besorgniserregende Virusvarianten erkannt werden.²¹

Literatur

- 1 Symonds EM, Griffin DW, Breitbart M: Eukaryotic Viruses in Wastewater Samples from the United States. *Applied and Environmental Microbiology* 2009, 75(5):1402-1409.
- 2 Bisseux M, Colombet J, Mirand A, Roque-Afonso A-M, Abravanel F, Izopet J, Archimbaud C, Peigue-Lafeuille H, Debros D, Bailly J-L, Henquell C: Monitoring human enteric viruses in wastewater and relevance to infections encountered in the clinical setting: a one-year experiment in central France, 2014 to 2015. *Eurosurveillance* 2018, 23(7):17-00237.
- 3 Lowry SA, Wolfe MK, Boehm AB: Respiratory virus concentrations in human excretions that contribute to wastewater: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Water and Health* 2023, 21(6):831-848.
- 4 AMELAG: Abwassermonitoring für die epidemiologische Lagebewertung [<https://www.rki.de/abwassersurveillance>]
- 5 Bustin S, Kirvell S, Huggett JF, Nolan T: RT-qPCR diagnostics: The “Drosten” SARS-CoV-2 assay paradigm. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 22(16):8702.
- 6 Tan C, Fan D, Wang N, Wang F, Wang B, Zhu L, Guo Y: Applications of digital PCR in COVID-19 pandemic. *VIEW* 2021, 2(2):20200082.
- 7 Ahmed W, Smith WJM, Metcalfe S, Jackson G, Choi PM, Morrison M, Field D, Gyawali P, Bivins A, Bibby K, Simpson SL: Comparison of RT-qPCR and RT-dPCR Platforms for the Trace Detection of SARS-CoV-2 RNA in Wastewater. *ACS ES&T Water* 2022, 2(11):1871-1880.
- 8 Dong L, Zhou J, Niu C, Wang Q, Pan Y, Sheng S, Wang X, Zhang Y, Yang J, Liu M et al: Highly accurate and sensitive diagnostic detection of SARS-CoV-2 by digital PCR. *Talanta* 2021, 224:121726.
- 9 Ishak A, AlRawashdeh MM, Esagian SM, Nikas IP: Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Value of Droplet Digital PCR (ddPCR) in COVID-19 Patients: A Systematic Review. *Journal of Clinical Medicine* 2021, 10(23):5712.
- 10 Sabar MA, Honda R, Haramoto E: CrAssphage as an indicator of human-fecal contamination in water environment and virus reduction in wastewater treatment. *Water Research* 2022, 221:118827.
- 11 Dhakar V, Geetanjali AS: Role of pepper mild mottle virus as a tracking tool for fecal pollution in aquatic environments. *Archives of Microbiology* 2022, 204(8):513.
- 12 National SARS-CoV-2 Wastewater Surveillance Programme [https://www.hpsc.ie/a-z/nationalwastewatersurveillanceprogramme/2024wastewatersurveillanceprogrammereports/nwsp_main_public_week_7_2024.html]
- 13 COVID Data Tracker [<https://covid.cdc.gov/covid-data-tracker/#wastewater-surveillance>]
- 14 Amount of SARS-CoV-2 in wastewater [https://www.pathogens.se/dashboards/wastewater/covid_quantification/covid_quant_gu/]
- 15 Abwassermonitoring für Berlin [<https://hygiene-monitor.de/dashboard/corona>]

- 16 Coronavirus wastewater monitoring weekly report [https://www.thl.fi/episeuranta/jatevesi/wastewater_weekly_report.html]
- 17 Mohamad IB, Usman D: Research Article Standardization and Its Effects on K-Means Clustering Algorithm. Research Journal of Applied Sciences, Engineering and Technology 2013, 6(17):3299-3303.
- 18 Covid-19 Schweiz: Informationen zur aktuellen Lage [<https://www.covid19.admin.ch/de/epidemiologic/waste-water/>]
- 19 Fahrmeir L, Kneib T, Lang S, Marx B: Regression models: Springer; 2013.
- 20 Agrawal S, Orschler L, Schubert S, Zachmann K, Heijnen L, Tavazzi S, Gawlik BM, de Graaf M, Medema G, Lackner S: Prevalence and circulation patterns of SARS-CoV-2 variants in European sewage mirror clinical data of 54 European cities. Water Research 2022, 214:118162.
- 21 Wilhelm A, Agrawal S, Schoth J, Meinert-Berning C, Bastian D, Orschler L, Ciesek S, Teichgräber B, Wintgens T, Lackner S: Early detection of SARS-CoV-2 Omicron BA. 4 and BA. 5 in German wastewater. Viruses 2022, 14(9):1876.

Autorinnen und Autoren

- ^{a)} Natalie Marquar | ^{b)} Dr. Peter Pütz | ^{c)} Dr. Udo Buchholz | ^{a)} Thomas Exner | ^{d)} Till Fretschner | ^{b)} Dr. Timo Greiner | ^{b)} Maria Helmrich | ^{a)} Dr. Marcus Lukas | ^{e)} Michael Marty | ^{f)} Dr. Nathan Obermaier | ^{f)} Cristina Saravia Arzabe | ^{b)} Alexander Schattschneider | ^{a)} Dr. Beate Schneider | ^{d)} Dr. PD Hans-Christoph Selinka | ^{e)} Antje Ullrich | ^{d)} Dr. PD Birgit Walther | ^{a)} Ulrike Braun | ^{b)} Dr. Jakob Schumacher
- ^{a)} FG Abwasseranalytik und Überwachungsverfahren, Umweltbundesamt, Berlin, Deutschland
- ^{b)} FG 32 Surveillance und elektronisches Melde- und Informationssystem (DEMIS) | ÖGD-Kontaktstelle, Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland
- ^{c)} FG 36 Respiratorisch übertragbare Erkrankungen, Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland
- ^{d)} FG Mikrobiologische Risiken, Umweltbundesamt, Berlin, Deutschland
- ^{e)} Abt Nachhaltige Produktion, Ressourcenschonung und Stoffkreisläufe, Dessau, Deutschland
- ^{f)} FG Abwassertechnikforschung, Abwasserentsorgung, Umweltbundesamt, Berlin, Deutschland
- ^{e)} FG Binnengewässer, Umweltbundesamt, Dessau, Deutschland

Korrespondenz: puetzp@rki.de

Vorgeschlagene Zitierweise

Marquar N, Pütz P, Buchholz U, Exner T, Fretschner T, Greiner T, Helmrich M, Lukas M, Marty M, Obermaier N, Saravia Arzabe C, Schattschneider A, Schneider B, Selinka H-C, Ullrich A, Walther B, Braun U, Schumacher J: SARS-CoV-2-Abwasser-surveillance in Deutschland im Rahmen des Projekts AMELAG

Epid Bull 2024;34:16-26 | DOI 10.25646/12208

Interessenkonflikt

Alle Autorinnen und Autoren geben an, dass kein Interessenkonflikt vorliegt.

Förderung und Danksagung

Das BMG fördert das AMELAG-Vorhaben bis Ende 2024. Die genannten technischen Leitfäden beziehen Informationen/Erkenntnisse ein, die im Rahmen des Projekts ESI-CorA erarbeitet wurden. ESI-CorA wurde von der Europäischen Kommission im Rahmen des Soforthilfeinstruments (Emergency Support Instrument – ESI) gefördert (No 060701/2021/864650/SUB/ENV.C2).

Die Autorinnen und Autoren bedanken sich für die labortechnische sowie administrative Unterstützung bei Mohammed Abdelbary, Susan Abunijela, Eva Aßmann, Jennifer Bartz, Sophia Beyer, Christian Blumenscheit, Sindy Böttcher, Michaela Diercke, Martina Fischer, Stephan Fuchs, Sebastian Haller, Jörg Hans, Jennifer Hocke, Martin Hölzer, Christopher Irrgang, René Kallies, Alexander Kerndorff, Kai Keßler, Georg Kissner, Roxana Kolb, Jan Kullwatz, Michael Möhl, Michaela Nase, Ines Perea, Andrea Rakers, Ute Rexroth, Heike Schulze, Eric Siegmund, Simon Steschulat, Andrea Thürmer, Luzie Verbeek, Guido Werner, Dagmar Winkelmann, Ronny Wischer, Hannes Wünsche und Kyanoush Yhosseini und bei allen Beteiligten Kläranlagen, Laboren, ÖGD-Partnern und Forschungspartnern für die erfolgreiche und vertrauensvolle Zusammenarbeit.