



Emergency Support Instrument  
**ESI-CorA**  
Nachweis von SARS-CoV-2 im Abwasser

# **Zusammenfassender Bericht: EU-Projekt Emergency Support Instrument – Nachweis von SARS-CoV-2 im Abwasser (ESI-CorA)**

**Laufzeit: 1. November 2021 bis 31. März 2023**

Dr. Verena Höckele, Dr. Sina Hale, Dr. Ulrike Scherer, Prof. Dr. Harald Horn, Dr. Markus Delay,  
Dr. Simon Frank, Dr. Heiko Schwegmann (Karlsruher Institut für Technologie, KIT)

Michaela Diercke, Dr. Sindy Böttcher, Dr. Timo Greiner, Dr. Katrin Kremer-Flach, Dr. Sophia  
Beyer, Dr. Peter Pütz, Roxana Gieseler, Maria Helmrich (Robert Koch-Institut, RKI)

Prof. Dr. Susanne Lackner, Dr.-Ing. Shelesh Agrawal, Kira Zachmann (Technische Universität  
Darmstadt, TUDa)

Dr. Ulrike Braun, Dr. Claus G. Bannick, Till Fretschner, Alexander Kerndorff, Dr. Marcus Lukas,  
Dr. Beate Schneider, PD Dr. Hans-Christoph Selinka, Michael Marty (Umweltbundesamt, UBA)

ESI-CorA wurde von der Europäischen Kommission im Rahmen des Soforthilfeinstruments (Emergency Support Instrument – ESI) gefördert (No 060701/2021/864650/SUB/ENV.C2).

Der Inhalt dieses Berichts gibt die Meinung der jeweiligen Autoren wieder und stellt in keiner Weise die Meinung der Europäischen Kommission dar. Die Europäische Kommission ist nicht verantwortlich für die Verwendung der in diesem Bericht enthaltenen Informationen. Die für die einzelnen Kapitel verantwortlichen Institutionen sind in den jeweiligen Überschriften angegeben.

# Inhaltsübersicht

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>1 Hintergrund, Ziele und Überblick des Projekts ESI-CorA (KIT)</b> .....	<b>2</b>
1.1 Hintergrund .....	2
1.2 Ziele .....	2
1.3 Überblick .....	2
<b>2 Ergebnisse und Schlussfolgerungen</b> .....	<b>4</b>
2.1 Initiierung und Durchführung des Pilotbetriebs (KIT) .....	4
2.1.1 Helpdesk .....	4
2.1.2 Begleitkreis .....	4
2.2 Probenahme, Begleitparameter und Analytik (UBA) .....	5
2.2.1 Probenahme .....	5
2.3 Digitale Dateninfrastruktur (KIT) .....	6
2.4 Verlauf der SARS-CoV2-Konzentrationen im Abwasser an den Standorten, Vergleich mit Inzidenzen (RKI/UBA) .....	8
2.4.1 Trendberechnung .....	8
2.4.2 Vergleich mit Inzidenzen .....	9
2.4.3 Exemplarische Darstellung der Verläufe und Vergleiche zwischen Abwasserbefunddaten und Inzidenzen .....	10
2.4.4 Eignung des Abwassermonitorings von SARS-CoV-2 als Teil eines infektions-epidemiologischen Surveillancesystems .....	12
2.5 Genomsequenzierung an den Standorten (TUDa) .....	12
2.6 Qualitätssicherung der Ergebnisse (UBA) .....	14
2.6.1 Validierung der PCR-Analytik .....	14
2.6.2 Qualitätssicherung der PCR-Analytik an den Standorten .....	15
2.6.3 Normalisierung .....	16
2.7 Evaluation (RKI) .....	17
2.8 Veranstaltungen und Öffentlichkeitsarbeit (KIT) .....	18
<b>3 Ausblick (UBA und RKI)</b> .....	<b>19</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>19</b>

## Zusammenfassung

Im März 2021 hat die EU-Kommission die Mitgliedstaaten aufgefordert, eine dauerhafte systematische Überwachung von SARS-CoV-2 und seiner Varianten im Abwasser einzuführen. Vor diesem Hintergrund initiierte die Bundesregierung das Projekt „Systematische Überwachung von SARS-CoV-2 im Abwasser“. Die Vorbereitung und Durchführung der bundesweiten Pilotphase erfolgte innerhalb des Vorhabens ESI-CorA (Emergency Support Instrument – Nachweis von SARS-CoV-2 im Abwasser); hierfür hat die EU Fördergelder in Höhe von 3,7 Mio. Euro zur Verfügung gestellt. Koordiniert wurde das Projekt vom Projektträger Karlsruhe (PTKA) am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) in Zusammenarbeit mit dem Engler-Bunte-Institut (EBI) und der Forschungsförderung (FOR) am KIT. Weitere Projektpartner waren das Robert Koch-Institut (RKI), das Umweltbundesamt (UBA) sowie die Technische Universität Darmstadt (TUDa).

Für das Projekt wurden in einem Bewerbungsverfahren 20 Standorte ausgewählt. Hinzu kamen insgesamt 36 weitere Standorte aus BMBF- und ländergeförderten Projekten zum Abwassermonitoring. Im Rahmen von ESI-CorA wurde u.a. analysiert, welche Methoden sich für ein SARS-CoV-2 Abwassermonitoring eignen und welche Daten erhoben werden müssen, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. In einem ersten Schritt zur technischen Umsetzung wurden im Rahmen von ESI-CorA Handreichungen mit Vorgaben für ein weitgehend harmonisiertes Vorgehen bei der Probenahme, der Probenaufbereitung und der analytischen Auswertung der Probe erarbeitet. Diese Beschreibungen bildeten die Grundlage für die Ermittlung der Rohdaten der am Projekt beteiligten Kläranlagen und Laboratorien.

Für die Pilotstandorte wurde eine zentrale digitale Dateninfrastruktur aufgebaut. Diese bündelt alle Schritte von der Datenerfassung bis hin zur Auswertung und Visualisierung in Dashboards. Sie umfasst einheitliche Eingabemasken für Kläranlagen und Analyselabore, eine automatisierte Prozessierung und Normalisierung der Daten sowie die Darstellung der Ergebnisse in standortbezogenen Dashboards.

Zur Qualitätssicherung des Workflows von der Probenahme über die Probenaufbereitung bis zur Analyse erfolgten SARS-CoV-2 Messungen an einer eigens dafür ausgewählten Kläranlage („Validierungskläranlage“) sowie parallele Messungen von Proben aus den Pilotkläranlagen („Zweitproben“). Im Hinblick auf die Probenahme und die Probenahmestrategie wurden im Rahmen des Projekts Fragen der Probenhomogenität, der Homogenisierung und der Methode zur Entnahme von Rohabwasser untersucht. Unterschiede zwischen zeitproportionaler und volumenproportionaler Probenahme konnten nicht festgestellt werden. Es bestätigte sich, dass die Entnahme einer Mischprobe über mehrere Stunden effektiv ist. Untersucht wurden außerdem Aspekte der Lagerung, der Wiederholbarkeit, der Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen sowie verschiedene Konzentrations- und Extraktionsmethoden für RNA mittels RT-PCR (Polymerase-Kettenreaktion mit reverser Transkription der viralen RNA). Beide Methoden, die quantitative RT-PCR (qRT-PCR) und die digitale Tröpfchen-RT-PCR (ddRT-PCR), lieferten vergleichbare Ergebnisse. Unterschiede waren jedoch bei der Probenaufbereitung mit verschiedenen Methoden zu beobachten.

Mit Hilfe der Normalisierung werden Einflüsse berücksichtigt, wie sie z.B. durch Regen- oder Schmelzwasser verursacht werden. Als Methoden zur Normalisierung wurden im Projekt der Abwasserdurchfluss während der Probenahme, chemische Humanmarker und das Auftreten von Surrogatviren (pepper mild mottle virus und CrAssphage) verwendet. An einigen Kläranlagenstandorten führte die Normalisierung der Messwerte zu einer Verbesserung der Ergebnisse im Sinne einer Glättung der Kurven. Ob und nach welcher Methode eine Normalisierung durchgeführt werden sollte, ist derzeit je nach Kläranlagenstandort zu entscheiden. Obwohl die Qualitätsergebnisse von kleinen und großen Kläranlagen häufig mit denen von Kläranlagen ähnlicher Größe korrelieren, sind Vergleiche der Werte einzelner Standorte untereinander nur eingeschränkt möglich.

Für die Genomsequenzierung an den 20 EU-Standorten wurden drei Messkampagnen durchgeführt, die erstmals eine nationale Übersicht zur Variantenentwicklung ermöglichten. Es konnte gezeigt werden, dass das Monitoring der SARS-CoV-2-Varianten, -Sublinien und -Mutationen durch die Sequenzierung von Abwasserproben möglich ist. Während im April 2022 BA.2.X-Sublinien dominierten, waren im September 2022 und Januar 2023 die nachgewiesenen Sublinien deutlich diversifiziert und nicht mehr einer Linie zuzuordnen. So konnten im Januar 2023 viele neue Subvarianten wie zum Beispiel XBF, XBB.1.X oder BQ.1.X detektiert werden. Mit den drei Datenpunkten konnte so eine zeitliche Entwicklung in der Variation der Mutationen und Varianten grob abgeschätzt werden. Die Ergebnisse der abwasserbasierten Sequenzierungen deckten sich mit den klinischen Daten.

Das Abwassermonitoring liefert zusätzliche Informationen zum Infektionsgeschehen im Einzugsgebiet der Kläranlage – unabhängig von Teststrategie bzw. Testverhalten beim Menschen. Die gemessenen bzw. berechneten Viruslasten im Abwasser korrelierten mit verschiedenen Gesundheitsparametern (z.B. Inzidenz), d.h. aus den Abwasserbefunddaten konnte die Infektionsdynamik von SARS-CoV-2 nachvollzogen werden. Die genaue Anzahl der Infizierten kann nach aktuellem Stand jedoch nicht daraus berechnet und auch die Krankheitsschwere kann nicht ermittelt werden. Das Abwassermonitoring hat sich innerhalb des Projekts als wertvolles zusätzliches Werkzeug zur Lagebewertung erwiesen. Es unterstützt die Entwicklung konkreter Vorsorge- und Schutzmaßnahmen – sowohl auf lokaler Ebene als auch auf Landes- und auf Bundesebene.

# 1 Hintergrund, Ziele und Überblick des Projekts ESI-CorA (KIT)

## 1.1 Hintergrund

Im März 2021 hat die EU-Kommission die Mitgliedstaaten aufgefordert, eine dauerhafte systematische Überwachung von SARS-CoV-2 und seinen Varianten im Abwasser einzuführen. Zur Umsetzung dieser Empfehlung in Deutschland haben das Bundesministerium für Gesundheit (BMG), das Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, nukleare Sicherheit und Verbraucherschutz (BMUV) und das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) entschieden, gemeinsam das Projekt „Systematische Überwachung von SARS-CoV-2 im Abwasser“ zu verfolgen. Die Vorbereitung und Durchführung der bundesweiten Pilotphase erfolgte innerhalb des Vorhabens ESI-CorA (Emergency Support Instrument – Nachweis von SARS-CoV-2 im Abwasser); hierfür hat die EU Fördergelder in Höhe von 3,7 Mio. Euro zur Verfügung gestellt.

ESI-CorA (Laufzeit: 01.11.2021 bis 31.03.2023) wurde vom Projektträger Karlsruhe (PTKA) am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) in Zusammenarbeit mit dem Engler-Bunte-Institut (EBI) und der Forschungsförderung (FOR) am KIT koordiniert. Weitere Projektpartner waren:

- das Robert Koch-Institut (RKI),
- das Umweltbundesamt (UBA) sowie
- die Technische Universität Darmstadt (TUDa).

Die Arbeiten in ESI-CorA bauen auf Forschungsaktivitäten von vier Projekten zum Abwassermonitoring auf, die durch das BMBF gefördert wurden: Abwasser Biomarker CoV2 (Förderkennzeichen 02WRS1557A-C), CoroMoni (02WRS1559), SARS-GenASeq (02WRS1602A-B) und COVIDready (02WRS1621A-D) <sup>1</sup>.

## 1.2 Ziele

Die Ziele von ESI-CorA waren:

- Überwachung von SARS-CoV-2 und seiner Varianten im Abwasser
- Harmonisierung von Probenahme / Analyseverfahren, inkl. Qualitätssicherung
- Verknüpfung der Abwasserdaten mit den Gesundheitsdaten, Dateninterpretation
- Aufbau einer digitalen Infrastruktur für Datenmanagement, -weiterleitung und -visualisierung
- Auswertung der Pilotphase
- Zusammenarbeit mit der EU und Mitgliedstaaten
- Prüfung, ob die flächendeckende Einführung eines Abwassermonitorings oder eher ein repräsentatives Monitoring befürwortet werden kann

## 1.3 Überblick

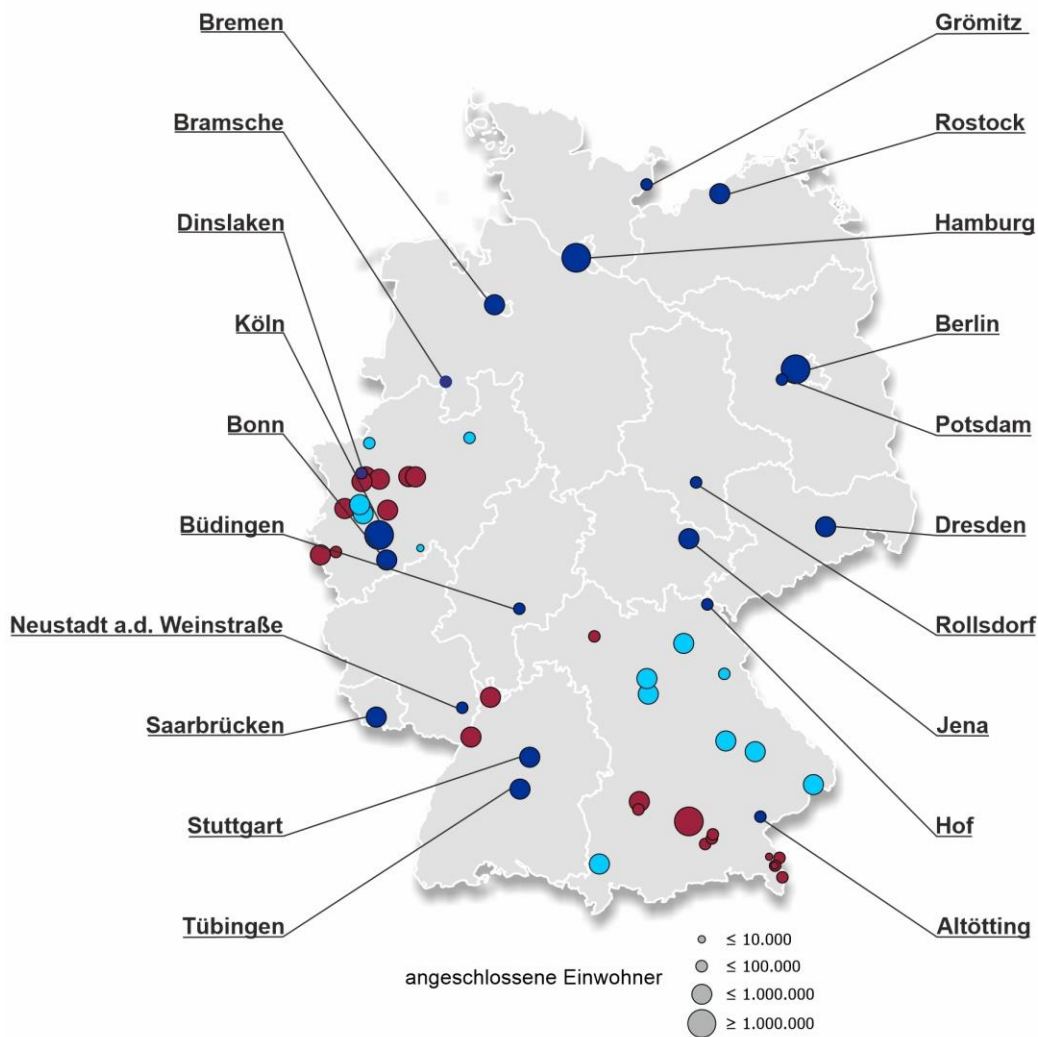
Für die Projektlaufzeit wurden in einem Bewerbungsverfahren 20 Standorte durch den Bund im Einvernehmen mit den Ländern ausgewählt. Die gewählten Standorte unterschieden sich in der Größe ihres Einzugsgebiets und somit der Anzahl an erfassten Einwohnerinnen und Einwohnern. Hinzu kamen weitere Standorte aus den BMBF-geförderten Projekten (24) sowie Standorte, die durch Ländermittel finanziert wurden (NRW: 4, Bayern: 8). Eine Übersichtskarte aller Standorte in ESI-CorA ist in Abbildung 1 dargestellt. Abbildung 2 gibt einen Überblick des zeitlichen Ablaufs des Pilotvorhabens.

Zu Beginn des Projekts wurden zunächst die für die Durchführung des Pilotbetriebs notwendigen Strukturen geschaffen: Als zentrale Anlaufstelle für die Standorte während des Pilotvorhabens wurde ein „Helpdesk“ am KIT eingerichtet; ferner wurde ein „Begleitkreis“ ins Leben gerufen, um die Projektaktivitäten zu unterstützen und die Expertise externer Expertinnen und Experten auf dem Gebiet der Abwasserüberwachung einzubinden (ausführliche Beschreibungen in Abschnitt 2.1). Die Probenahme startete im Februar 2022. An allen Standorten wurden zweimal wöchentlich Mischproben über einen Zeitraum von 24 Stunden entnommen und auf SARS-CoV-2 analysiert. Zusätzlich wurden Begleitparameter wie Durchfluss, elektrische Leitfähigkeit etc. erhoben. Im Rahmen der Projektlaufzeit haben die Forschenden u.a. analysiert, welche Methoden sich für ein flächendeckendes Monitoring eignen und welche Daten erhoben werden müssen, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten (siehe Kapitel 2.1.2 und 2.2).

---

<sup>1</sup> Nähere Informationen im Förderkatalog des Bundes: <https://foerderportal.bund.de/foekat/jsp/SucheAction.do?actionMode=searchmask>

## EU-Standorte



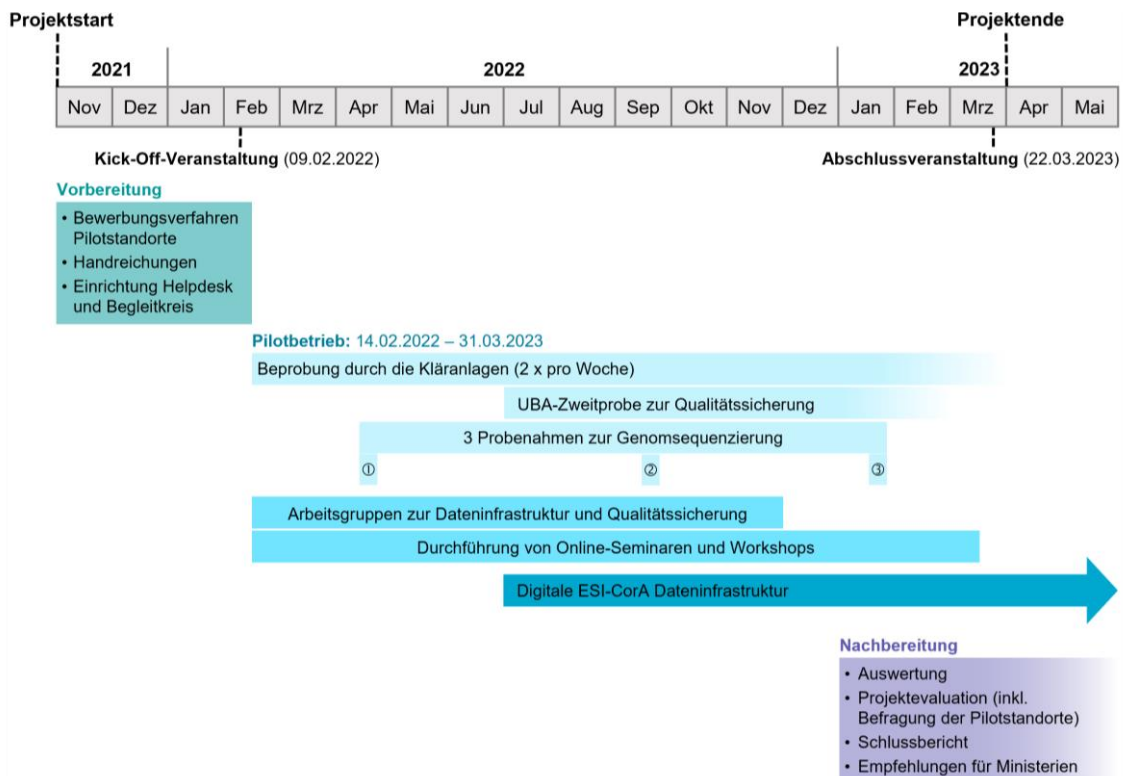
### BMBF-Standorte

Aachen	Ebersberg-Grafring
Anger/Piding	Emschermündung
Augsburg (Landkreis)	Eschweiler
Augsburg (Stadt)	Freilassing
Bad Reichenhall	Heidelberg
Berchtesgaden	Karlsruhe
Bottrop	Mönchengladbach
Dortmund-Deusen	München
Dortmund Scharnhorst	Schweinfurt
Duisburg Alte Emscher	Teisendorf
Ebersberg	Wuppertal
Ebersberg-Glonn	

### Länder-Standorte

<b>Bayern</b>	<b>Nordrhein-Westfalen</b>
Bayreuth	Borken
Erlangen	Düsseldorf Süd
Kempten	Düsseldorf Nord
Nürnberg	Gütersloh
Passau	Waldbröl
Regensburg	
Straubing	
Weiden	

**Abbildung 1:** Übersicht aller an ESI-CorA beteiligten Standorte. Die Bezeichnungen EU-Standorte, BMBF-Standorte und Länder-Standorte beziehen sich auf die unterschiedlichen Fördermittelgeber.



**Abbildung 2:** Überblick des zeitlichen Ablaufs des Pilotvorhabens ESI-CorA.

## 2 Ergebnisse und Schlussfolgerungen

### 2.1 Initiierung und Durchführung des Pilotbetriebs (KIT)

#### 2.1.1 Helpdesk

Der Helpdesk am KIT wurde vor dem Start des Probenahmebetriebs als zentrale Anlaufstelle für die beteiligten Standorte eingerichtet. Er war ab dem 1. Februar 2022 über eine Hotline und eine E-Mail-Adresse erreichbar. Der Helpdesk diente dem Informationsaustausch zwischen allen Projektbeteiligten, der Durchführung von Abfragen und der Beantwortung organisatorischer, technischer und inhaltlicher Fragen. Vom Helpdesk wurden die Kick-off-Veranstaltung (9. Februar 2022, online) und die öffentliche Abschlussveranstaltung des EU-Projekts ESI-CorA (22. März 2023) organisiert; darüber hinaus hat der Helpdesk Videosprechstunden sowie Workshops und Seminare (online) für die Standorte (mit-)organisiert (siehe Abschnitt 2.8).

#### 2.1.2 Begleitkreis

Zur Unterstützung des fachlichen Austauschs der Projektbeteiligten untereinander sowie zum Erfahrungsaustausch mit den BMBF-Projekten zum Abwassermonitoring wurde der „Begleitkreis“ eingerichtet. Neben den Konsortialpartnern waren die Projektleiterinnen und Projektleiter der vom BMBF geförderten Projekte zum Monitoring von SARS-CoV-2 im Abwasser sowie Vertreterinnen und Vertreter des Sanitätsdienstes der Bundeswehr aktiv eingebunden. Insgesamt fanden während der Projektlaufzeit 23 Sitzungen statt (online). Die Hauptziele des Begleitkreises waren der Austausch von Fachwissen zu wissenschaftlichen und technischen Fragen und die Klärung von Fragen, die sich an den Pilotstandorten ergaben. Zu Projektbeginn wurden im Begleitkreis drei Handreichungen erarbeitet:

- „Handreichung zur Probenahme von Rohabwasser für das SARS-CoV-2-Monitoring in ESI-CorA auf Kläranlagen“
- Handreichung „Begleitparameter von Kläranlagen zur Normierung von SARS-CoV-2-Daten“
- „Handreichung zur Probenaufbereitung und molekularbiologischen Analytik von SARS-CoV-2 Genfragmenten und Surrogatviren im Abwasser“

In den Handreichungen werden Verfahren für die Abwasserprobenahme, den Probentransport, die Probenaufbereitung und die Analyse im Labor erläutert. Für jeden Schritt werden verschiedene gängige Verfahren vorgestellt. Darüber hinaus werden Empfehlungen gegeben, welche Methoden und Parameter für den Nachweis von SARS-CoV-2 im Abwasser geeignet sind. Die Handreichungen stehen auf der Homepage des PTKA zum Download zur Verfügung <sup>2</sup>.

<sup>2</sup> <https://www.ptka.kit.edu/AbschlussPilotbetrieb.html>

## 2.2 Probenahme, Begleitparameter und Analytik (UBA)

Zunächst wurden in Zusammenarbeit mit den Expertinnen und Experten im Begleitkreis Handreichungen mit Vorgaben für ein weitgehend harmonisiertes Vorgehen bei der Probenahme, der Probenaufbereitung und der analytischen Auswertung der Probe erarbeitet (siehe Abschnitt 2.1.2). Diese Beschreibungen bildeten die Grundlage für die Ermittlung der Rohdaten der am Projekt beteiligten Kläranlagen und Laboratorien. Die Anwendung dieser harmonisierten Ansätze hat sich im Projekt grundsätzlich bewährt.

Darüber hinaus wurden Untersuchungen zur Qualitätssicherung hinsichtlich Probenahme, Vorbereitung und Nachweisverfahren von SARS-CoV-2 durchgeführt. Dazu wurden Untersuchungen zur Robustheit der Analytik (einschließlich Probenahme und Probenvorbereitung) exemplarisch an Proben einer ausgewählten Kläranlage (definiert als „Validierungskläranlage“) durchgeführt. Zusätzlich wurden durch die Bereitstellung von regelmäßigen Proben („Zweitprobe“) der jeweiligen Pilotstandorte des Projekts Untersuchungen zur Harmonisierung der Analytik ausgeführt. Zu diesem Zweck haben die Pilotstandorte parallel zu ihren eigenen Probenahmen regelmäßig (ab August 2022) eine zweite Probe zur Qualitätskontrolle an die Labore des UBA gesandt.

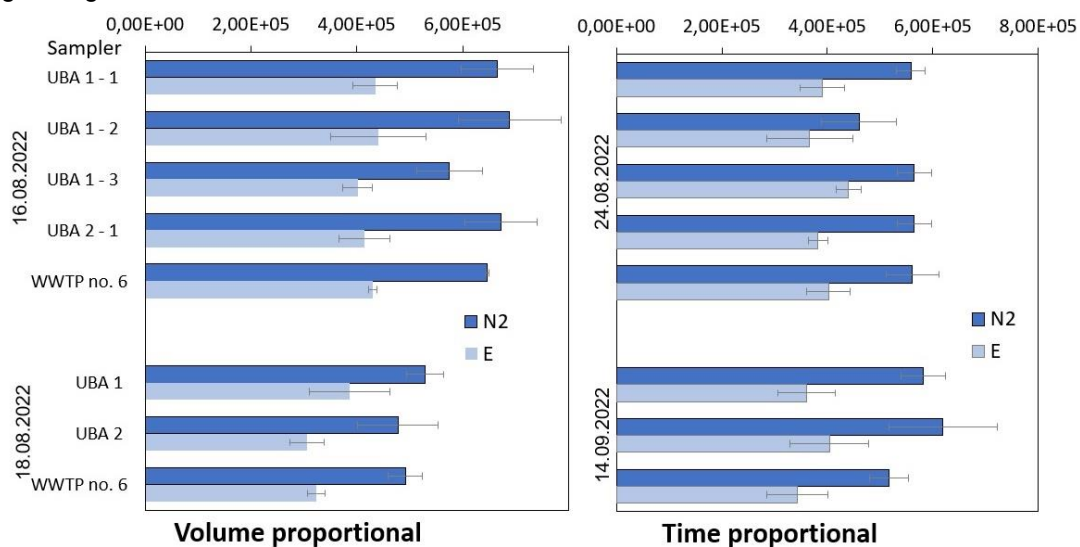
Unregelmäßige Ereignisse wie Regenwetter oder diskontinuierliche industrielle Abwassereinleitungen können die Konzentration von SARS-CoV-2 Genfragmenten im Abwasser beeinflussen. Eine Normalisierung der Daten mit Hilfe von Parametern, die den Anteil häuslichen Abwassers am Zulauf der Kläranlage widerspiegeln, kann dabei helfen, Verdünnungseffekte herauszurechnen und Trendergebnisse zu verbessern. Hierfür wurden im Rahmen dieses Arbeitspaketes verschiedene Verfahren angewendet und deren Eignung bewertet (z.B. Normalisierung auf Basis des Abwasservolumens und weiterer im Abwasser nachweisbarer Viren (Surrogatviren) oder charakteristischer chemischer Stoffe mit anthropogenem Ursprung (Humanmarker)). Die Messungen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR, RT-PCR<sup>3</sup>), die Bestimmung von zusätzlichen Abwasserdaten (u.a. Ammonium, Feststoffe, etc.) erfolgten im UBA, die humanbezogenen Stoffe (z.B. Koffein und Diclofenac) wurden von der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) analysiert.

### 2.2.1 Probenahme

Auf der Validierungskläranlage wurde der Einfluss unterschiedlicher Vorgehensweisen bei der Probenahme untersucht. Neben der Betrachtung von Faktoren wie Ort, Zeitpunkt und Häufigkeit der Probenahme stand insbesondere der Vergleich von volumen- und zeitproportionalen Mischproben im Fokus.

Zusätzlich zu den Proben der Validierungskläranlage erhielt das UBA zusammen mit der Zweitprobe alle notwendigen Angaben zu den Begleitparameter wie z.B. die Dauer der Beprobung, Anfang und Ende der Beprobung, das Volumen der Mischprobe sowie die Zulaufmengen der Kläranlage (siehe Abschnitt 2.3). Die Abwasserproben wurden im Labor aufbereitet. Dies beinhaltete die Homogenisierung und das konfektionierte Abfüllen für die verschiedenen Untersuchungen, u.a. die PCR-Messung, die Bestimmung der gesamten suspendierten Feststoffe, von Ammonium und anderen humanbezogenen Stoffen. Im Rahmen des Projektes wurden mehr als 1.000 Abwasserproben zu jeweils 1 L bearbeitet und in mehr als 12.000 Teilproben aufgeteilt.

Exemplarisch werden die vergleichende Untersuchung von volumen- und zeitproportionaler Probenahme in Abbildung 3 dargestellt.



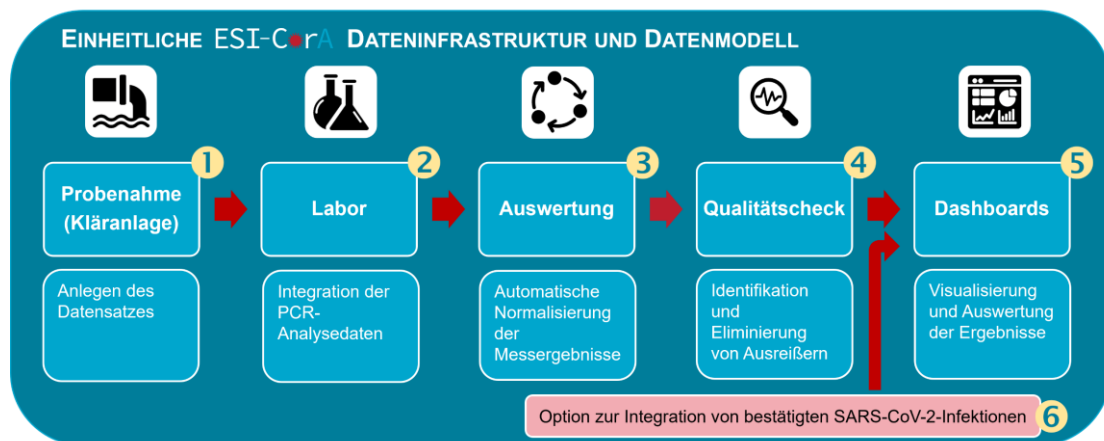
**Abbildung 3:** Vergleich von volumenproportionalen (100 mL/50 m<sup>3</sup>) und zeitproportionalen (100 mL/6 min) Mischproben. Verwendet wurden drei parallel betriebene Probennehmer (UBA1, UBA2, WWTP no.6). Im oberen Bereich werden die Teilproben aus dem Probennehmer UBA 1 dargestellt (UBA 1-1 bis UBA 1-3). Die X-Achse beschreibt die Genkonzentration in Anzahl/L von zwei spezifischen Genen E und N2.

<sup>3</sup> PCR: Polymerase Chain Reaction; RT-PCR: Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction; siehe Abschnitt 2.6.

Während eine volumenproportionale Probenahme in Abhängigkeit des Volumenstroms erfolgt, entnimmt die zeitproportionale Probenahme über den gesamten Zeitraum gleichmäßig Proben. Höhere Volumenströme wie die morgendliche Toilette oder Regenereignisse werden so potenziell unterrepräsentiert. Der Untersuchungszeitraum für alle Probenahmen zu dieser Fragestellung betrug 24 h, die Proben wurden mit Hilfe von drei parallel laufenden Probenehmer (UBA1, UBA2, WWTP no.6) entnommen. Alle Probenehmer wurden mit dem gleichen Durchflusssignal verbunden und ständig auf 4 °C gekühlt. Nach Abschluss der Probenahme wurden die Mischproben homogenisiert und je 3 x 1 L Teilprobe entnommen. Nach dem Transport ins Labor und einer Homogenisierung erfolgte die Abfüllung der Proben (3 Röhrchen pro 1-L-Flasche) und Analyse mittels PCR. Die PCR-Messergebnisse zeigen, dass es keinen statistisch relevanten Unterschied zwischen den Teilproben und den Probenehmern gibt. Ebenso zeigen die beiden unterschiedlichen Probenahmemethoden keine deutlichen Unterschiede.

## 2.3 Digitale Dateninfrastruktur (KIT)

Für das Datenmanagement und die Datenweiterleitung wurde im Rahmen des Pilotvorhabens ESI-CorA eine digitale Dateninfrastruktur für die Standorte aufgebaut, die auf dem Geoinformationssystem ArcGIS basiert. Diese Dateninfrastruktur bündelt alle Schritte von der Datenerfassung bis hin zur Visualisierung der Ergebnisse. Sie umfasst einheitliche Eingabemasken für Kläranlagen und Analyselabore, eine automatisierte Prozessierung und Normalisierung der Daten sowie die Darstellung der Ergebnisse in standortbezogenen Dashboards. Die Administratorrechte liegen bei PTKA. Abbildung 4 veranschaulicht den Workflow mit den verschiedenen Eingabe- und Visualisierungskomponenten sowie der automatisierten Datenverarbeitung. Die einzelnen Schritte des dargestellten Workflows werden im Folgenden näher erläutert.



**Abbildung 4:** Visualisierung der ESI-CorA-Dateninfrastruktur. Alle Schritte des dargestellten Workflows werden innerhalb der gesicherten Cloud abgewickelt.

**Schritt 1:** Nach der Probenahme am Zulauf der Kläranlage wird zunächst ein Probenahme-Datensatz mithilfe der ArcGIS Survey123-App erstellt (siehe Abbildung 5A). Die App ist sowohl für Mobilgeräte als auch für PC verfügbar. Bei der Eingabe wird eine Probennummer zugewiesen, um die Probe im System eindeutig zu identifizieren.

**Schritt 2:** Die verantwortliche Person des PCR-Anyselabors ruft den bereits vorhandenen Probendatensatz über eine browserbasierte Eingabemaske auf (siehe Abbildung 5B). Anschließend werden die PCR-Analysedaten hinzugefügt. Nach diesem Schritt ist der Probendatensatz komplett und kann im System weiterverarbeitet werden.

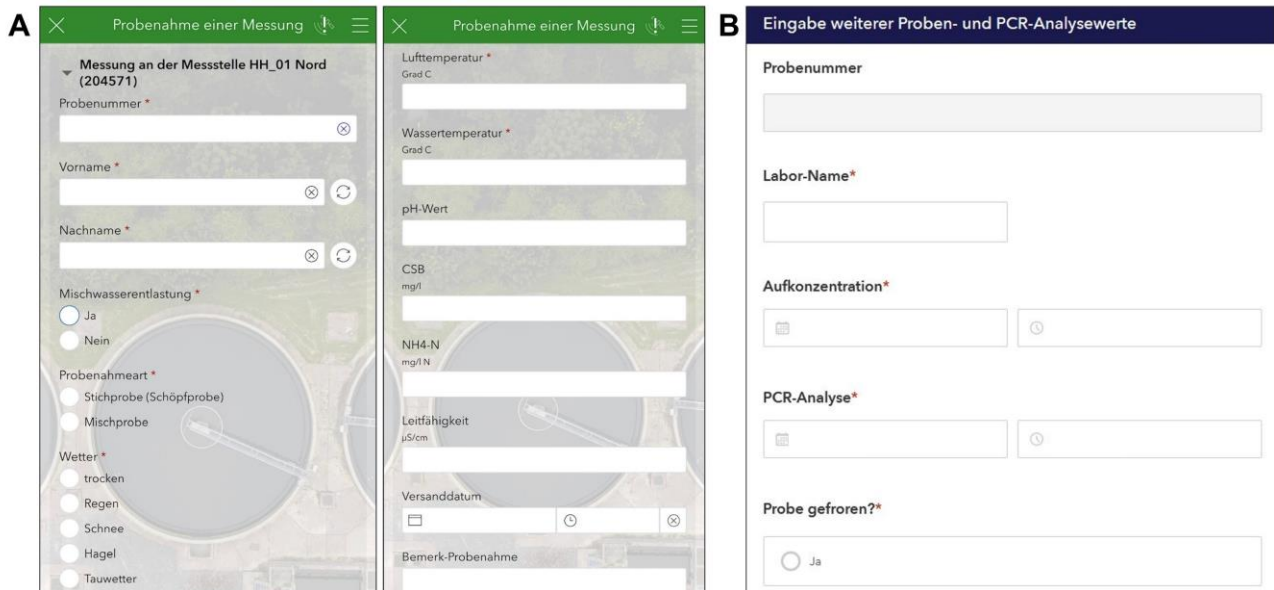
**Schritt 3:** In einem ersten Schritt der Datenverarbeitung wird die mittlere Biomarker-Konzentration der SARS-CoV2-Genbereiche auf der Grundlage aller verfügbaren Biomarker-Konzentrationen für verschiedene Zielgene berechnet. Anschließend wird die mittlere Biomarker-Konzentration durch einen Algorithmus normalisiert, um Verdünnungseffekte des Abwassers zu berücksichtigen. Fünf verschiedene Normalisierungsalgorithmen sind in der ESI-CorA-Dateninfrastruktur implementiert<sup>4</sup>:

- „Abfluss“: Normalisierung mit dem Abwasserdurchfluss während der Probenahme
- „PMMoV“: Normalisierung mit dem Surrogatvirus PMMoV
- „CrAssphage“: Normalisierung mit dem Surrogatvirus CrAssphage
- „Ammonium“: Normalisierung mit NH<sub>4</sub>-N (Ammonium-Stickstoff)
- „Mixed fecal indicator (MFI)“: Normalisierung mit gemischtem Fäkalindikator auf Basis der Surrogatviren PMMoV und CrAssphage.

<sup>4</sup> Mitranescu, A. et al. [2022]: Wastewater-Based Epidemiology for SARS-CoV-2 Biomarkers: Evaluation of Normalization Methods in Small and Large Communities in Southern Germany. ES&T Water, 2 (12), 2460-2470, <https://doi.org/10.1021/acsestwater.2c00306>



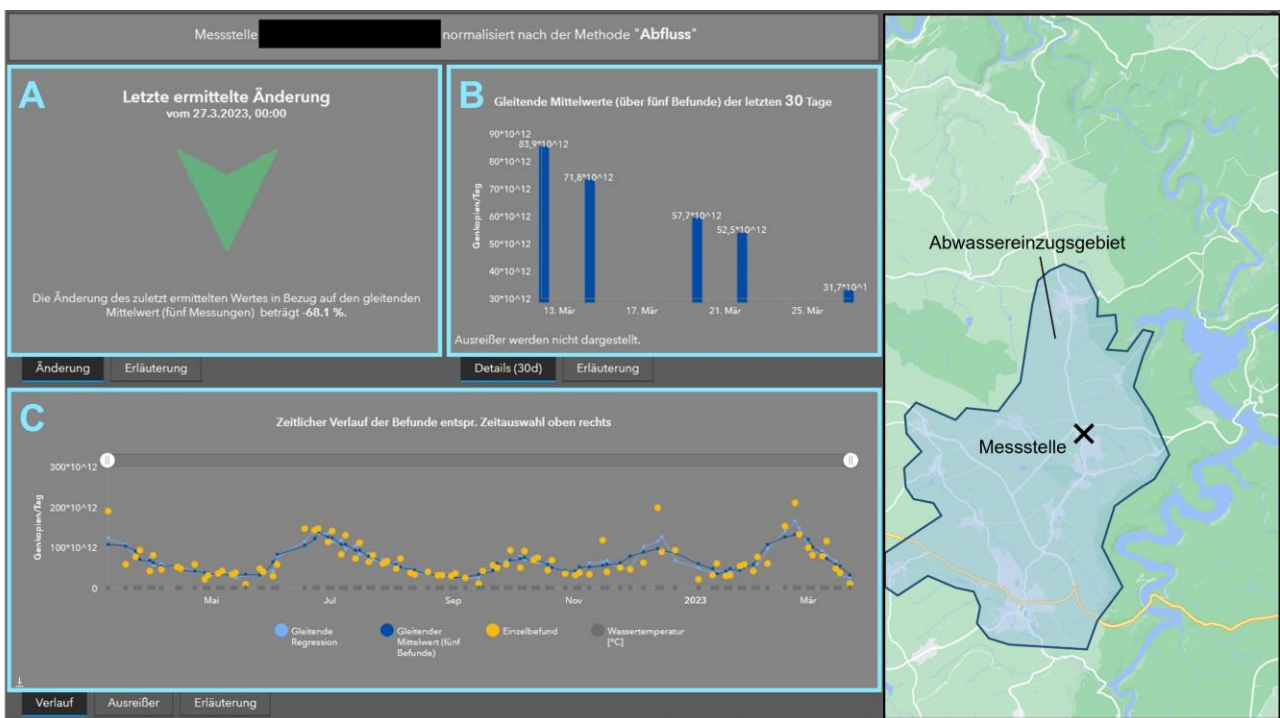
Während der Projektlaufzeit wurde für alle Pilotstandorte der Normalisierungsalgorithmus „Abfluss“ verwendet.



**Abbildung 5:** Ausschnitte aus der Eingabemaske für die Kläranlagen in der ArcGIS Survey123-App (A) und der browserbasierten Eingabemaske für die PCR-Analyselabore (B). Das Sternchen (\*) kennzeichnet Pflichtfelder.

**Schritt 4:** In diesem Schritt werden Ausreißer identifiziert, um sie von den nachfolgenden Schritten der Datenverarbeitung auszuschließen. Probandensätze bedürfen einer Qualitätskontrolle, z.B. bei starken Regenfällen oder Besonderheiten bei der Probenahme oder PCR-Analyse.

**Schritt 5:** In einem letzten Schritt werden die normalisierten und qualifizierten Biomarker-Konzentrationen in einem standortspezifischen Dashboard „Abwasser-Monitoring“ visualisiert (siehe Abbildung 6). Zur Glättung der Biomarker-Konzentrationsdaten wird ein gleitender Mittelwert über drei und fünf Befunde berechnet. Alle Rohdaten und verarbeiteten Daten können aus dem Dashboard exportiert werden.

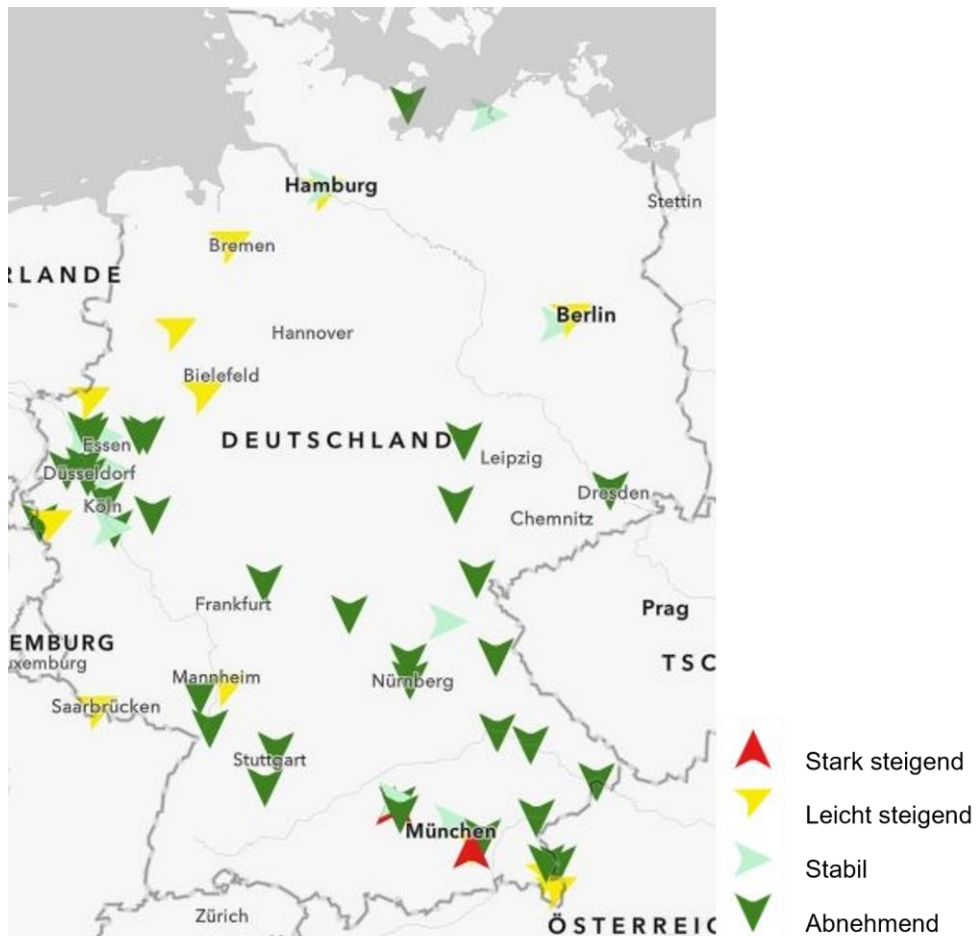


**Abbildung 6:** Ansicht des Dashboards „Abwasser-Monitoring“ am Beispiel eines anonymisierten Pilotstandorts. Es zeigt den relativen Trend für die normalisierte Biomarker-Konzentration (A), den gleitenden Mittelwert (über fünf Befunde) der normalisierten SARS-CoV-2-Biomarker-Konzentration für die letzten 30 Tage (B) und die vollständige Zeitreihe der normalisierten SARS-CoV-2-Biomarker-Konzentrationen (orangefarbene Punkte), einschließlich eines gleitenden Mittelwerts über drei (hellblau) und fünf (dunkelblau) Befunde (C).

**Schritt 6 – optional:** Um zusätzlich die im Gesundheitsamt dokumentierten bestätigten Infektionen an einem Pilotstandort in die Dateninfrastruktur zu importieren, werden die Adressdaten der Infizierten zunächst mittels Georeferenzierung in Punkte auf einer digitalen Karte umgewandelt. Anschließend werden diese Punkte mit

den Polygonen des jeweiligen Abwassereinzugsgebiets verschnitten. Dieser Vorgang geschieht im jeweils zuständigen Gesundheitsamt und liefert eine aggregierte Anzahl an Infektionen pro Abwassereinzugsgebiet für einen bestimmten Stichtag. Zum Schluss wird die aggregierte Anzahl an Infektionen in die Dateninfrastruktur eingespielt und im standortspezifischen Dashboard „Human-Monitoring“ visualisiert.

Zusätzlich zu den standortspezifischen Dashboards wurden im Pilotvorhaben ESI-CorA Informationen über den aktuellen Trend der normalisierten Biomarker-Konzentration aus dem Abwassermonitoring an allen Pilotstandorten in Kartenform visualisiert (siehe Abbildung 7).

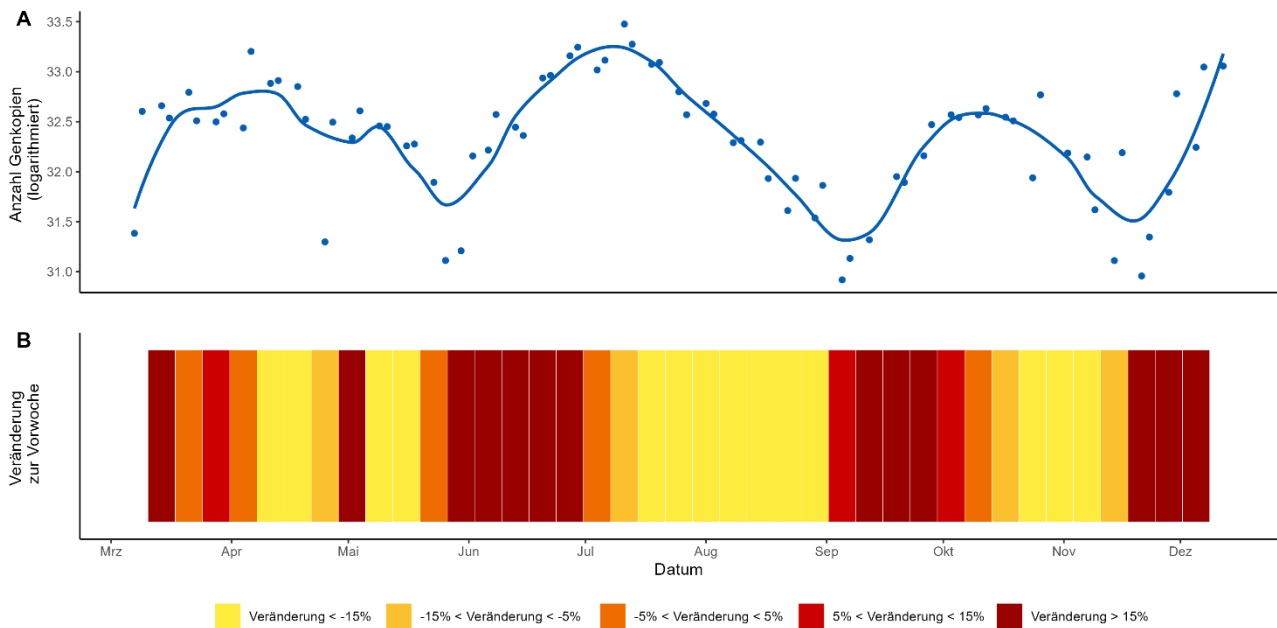


**Abbildung 7:** Kartendarstellung der aktuellen Trends an den einzelnen Pilotstandorten (Beispiel vom 11. April 2023). Der dargestellte Trend wird aus dem Verhältnis zwischen der letzten normalisierten mittleren Biomarker-Konzentration und dem zugehörigen gleitenden Mittelwert über fünf Befunde berechnet. Stark steigender Trend: > 50 %; leicht steigender Trend: > 10 % und < 50 %; stabiler Trend: > - 10 % und < 10 %; abnehmender Trend: < - 10 %.

## 2.4 Verlauf der SARS-CoV2-Konzentrationen im Abwasser an den Standorten, Vergleich mit Inzidenzen (RKI/UBA)

### 2.4.1 Trendberechnung

Ziel der Auswertung war es zu überprüfen, ob aus den untersuchten Abwasserbefunddaten die Infektionsdynamik nachvollzogen werden konnte, d. h. ob Korrelationen mit gesundheitlichen Indikatoren wie beispielsweise der Inzidenz oder dem Testpositivenanteil festzustellen waren. Der Prozess, in dem die einzelnen Messwerte aus den Abwasserproben aufgetragen wurden und die daraus entstehenden Kurven miteinander verglichen wurden, wird im Folgenden beschrieben. Es konnte generell eine Ähnlichkeit zwischen den Kurven festgestellt werden und die Infektionsdynamik wurde für einige Standorte gut abgebildet. Eine Trendberechnung, die zeigte, ob die Viruslast anstieg, fiel oder unverändert blieb, wurde durchgeführt. Am Beispiel eines Standorts ist das Vorgehen in der folgenden Abbildung 8 dargestellt.



**Abbildung 8:** Beispiel für die Umsetzung der Trendberechnung wie im Wochenbericht des RKI<sup>5</sup> dargestellt.

In Abbildung 8A sind die normalisierten Messwerte für die SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser zu sehen.<sup>6</sup> Diese Werte wurden mit Hilfe einer LOESS-Regression (locally estimated scatterplot smoothing), welche die Variabilität der Messwerte etwas ausgleicht, geglättet (blaue Kurve). Für die Berechnung des wöchentlichen Trends wird der auf der Kurve geschätzte Wert für einen bestimmten Tag (in diesem Fall Mittwoch) mit dem Vorwochenwert auf der Kurve verglichen und die prozentuale Veränderung berechnet. Abbildung 8B zeigt diese wöchentlichen Veränderungen, wobei die prozentualen Änderungen in fünf Kategorien zusammengefasst werden: fallend, leicht fallend, gleichbleibend, leicht ansteigend, ansteigend. Durch diese Visualisierung lassen sich Trends einfach ablesen. Allerdings muss beachtet werden, dass sich insbesondere die neuesten Trends durch Hinzufügen eines neuen Messwertes ändern können, da die Kurve durch den neuen Wert neu berechnet wird. Wie stark der Berechnung der Trends vertraut werden kann, hängt von der Qualität der Messdaten und der Häufigkeit der Beprobung ab.

Zur Trendberechnung wurden verschiedene Methoden miteinander verglichen. Trotz einer gewissen Unsicherheit in der oben beschriebenen Methode wurde festgestellt, dass sich diese besser als andere gängige Methoden, wie zum Beispiel ein gleitender Mittelwert über drei oder fünf Befunde, eignet. Bei der Berechnung des gleitenden Mittelwerts werden alle Werte im betrachteten Zeitfenster gleich gewichtet, sodass einzelne Datenpunkte einen großen Einfluss auf die Schätzung haben können. Beim LOESS-Verfahren nimmt die Gewichtung der Punkte mit größerer Entfernung zum aktuellen Schätzwert ab und ist damit ein geeigneteres Verfahren. Auch ist der gleitende Mittelwert verzögert gegenüber der LOESS-Schätzung und die Kurve unruhiger (weniger glatt) und damit schlechter zur Trenderkennung geeignet. Alternativ zur LOESS-Schätzung kann auch ein robustes generalisiertes additives Modell (GAM) verwendet werden.

#### 2.4.2 Vergleich mit Inzidenzen

Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser und bestätigten Infektionen im Einzugsgebiet (Inzidenzen) wurden für jeden Standort die jeweiligen Zeitreihen grafisch gegenübergestellt und Kreuzkorrelationen durchgeführt. Hierbei wurden die beiden Zeitreihen bei unterschiedlichen Zeitverschiebungen (-20 Tage bis 20 Tage) miteinander korreliert. Eine auf Rängen basierende Berechnung von Korrelationen, die Spearman-Korrelation, ist wenig sensibel gegenüber Ausreißern und wurde aufgrund der variablen SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser als Methode ausgewählt. Ebenso war es aufgrund der hohen Variabilität vorteilhaft, die SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser über die letzten sieben Tage zu mitteln. Bei zumeist zwei Messungen pro Woche pro Standort bedeutete dies, dass die meisten gemittelten Werte aus dem aktuellsten Messwert und dem zuletzt gemessenen Messwert bestanden. Dieses Vorgehen erlaubte auch eine bessere Vergleichbarkeit mit der Inzidenz und anderen Indikatoren wie der Hospitalisierungsinzidenz und dem Testpositivenanteil, die ebenfalls mit der SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser in Bezug gesetzt wurden und ebenfalls aus Mittelwerten über die letzten sieben Tage bestanden. Für die nur wöchentlich erscheinenden Testpositivenanteile wurde angenommen, dass der aktuellste Wert ein Siebtel der in dieser Woche durchgeführten Tests entspricht, und dann wurde über die letzten sieben Tage gemittelt. In der Praxis ist der Wochenwert des Testpositivenanteils aber erst am Anfang der nächsten Woche bekannt. Wie auch bei allen

<sup>5</sup> [https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges\\_Coronavirus/Situationsberichte/Wochenbericht/Wochenberichte\\_Tab.html](https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Situationsberichte/Wochenbericht/Wochenberichte_Tab.html)

<sup>6</sup> Auf die normalisierten Werte wurde zusätzlich der natürliche Logarithmus angewendet.

anderen Indikatoren muss bedacht werden, dass die Datumsangaben nicht zwangsläufig dem Veröffentlichungsdatum der zugehörigen Datenpunkte entsprechen.

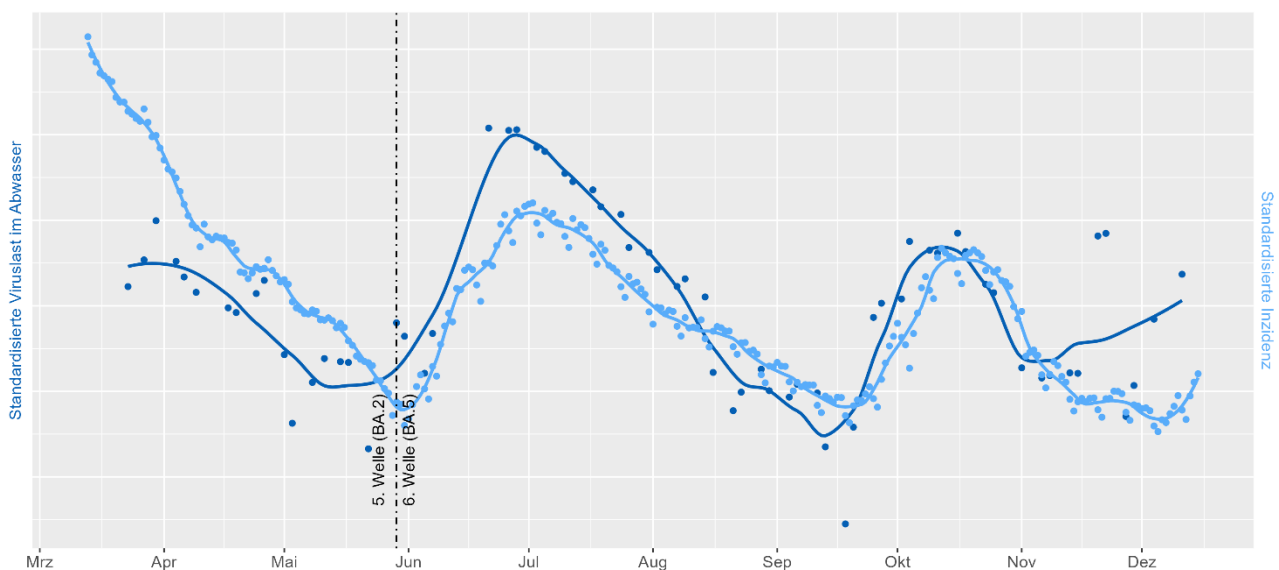
Alle Zeitreihen wurden standardisiert, indem der jeweilige Mittelwert abgezogen und durch die jeweilige Standardabweichung geteilt wurde. Dieses Vorgehen ermöglichte insbesondere einen sinnvollen grafischen Vergleich von zwei oder mehr Zeitreihen und die Aggregation verschiedener Zeitreihen.

Zusätzlich wurde über alle Standorte die aggregierte SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser mit anderen aggregierten Gesundheitsindikatoren verglichen. Für die Aggregation wurden für den jeweiligen Indikator die Medianwerte für jeden Tag mit mindestens zehn Messungen berechnet. Neben einer Gesamtbetrachtung des Verlaufs einzelner Indikatoren erlaubte dieses Vorgehen auch den Einbezug von Gesundheitsindikatoren wie den Intensivbettenerstaufnahmen und den Sterbefällen, die für einzelne Standorte teilweise über Wochen konstant oder sehr variabel (aufgrund des starken Einflusses eines neuen Falls) waren und damit keinen sinnvollen Vergleich mit der SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser zugelassen hätten. Ebenso wurde durch die Aggregation die hohe Variabilität in der SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser gemindert. Bei der Aggregation über verschiedene Standorte muss bei der Interpretation darauf geachtet werden, dass nicht direkt Rückschlüsse auf alle Messstellen in Deutschland oder die Gesamtbevölkerung gezogen werden können, da es dafür eine geeignete Stichprobe aus allen Standorten (z.B. eine Zufallsstichprobe) bräuchte. Als Robustheitscheck für die vorliegenden Analysen wurden jedoch Standorte mit dem Einwohnerwert im Abwasser-einzugsgebiet (SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser), der Anzahl an Einwohnern im Landkreis (7-Tage-Inzidenzen, Hospitalisierungsinzidenzen, Todesfällen) und der Anzahl an Einwohnern im Bundesland (Anzahl Tests, Testpositivenanteil) gewichtet.

Zur grafischen Darstellung einzelner Zeitreihen wurden Ausgleichskurven mittels LOESS-Regression bestimmt. Das LOESS-Verfahren schätzt auf der Basis der Daten in einem kleinen Zeitraum um jeden Tag im beobachteten Gesamtzeitraum herum eine (quadratische) Regression und bestimmt somit für jeden Tag einen geschätzten Wert. Alle geschätzten Werte zusammen ergeben dann eine Ausgleichskurve. Als Zeitraum für jede Regressionsschätzung wurde ein Zeitraum mit den 15 zeitnächsten Beobachtungen für die SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser und 20 zeitnächsten Daten für die anderen Gesundheitsindikatoren ausgewählt, wenn einzelne Standorte betrachtet wurden. Für über mehrere Standorte aggregierte Daten betragen die Anzahl an ausgewählten zeitnächsten Daten 40 für die SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser und 25 für die anderen Gesundheitsindikatoren. Es wurden normalisierte Abwasserbefunddaten für die Analysen verwendet. Die Normalisierung erfolgte auf Basis des Trockenwetterabflusses.

### 2.4.3 Exemplarische Darstellung der Verläufe und Vergleiche zwischen Abwasserbefunddaten und Inzidenzen

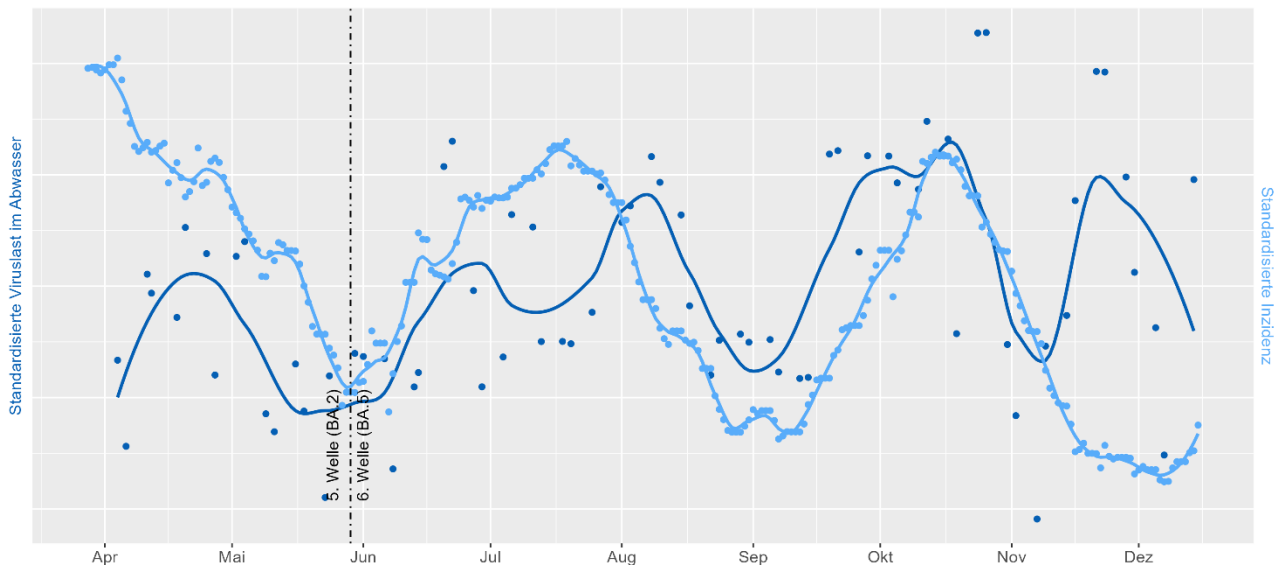
Als Beispiel für eine wenig variable SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser und eine hohe Korrelation mit der 7-Tage-Inzidenz ist in Abbildung 9 ein Standort exemplarisch dargestellt. Die Wellen im pandemischen Verlauf werden von beiden Kurven ähnlich erfasst, wobei die Kurven am Ende des Jahres etwas auseinanderlaufen.



**Abbildung 9:** Vergleich zwischen der Viruslast im Abwasser (dunkelblau) und der Inzidenz (hellblau) für einen Beispielstandort mit eher höherer Ähnlichkeit der beiden Zeitreihen. Die beiden Zeitreihen sind standardisiert, sodass sie jeweils den Mittelwert 0 und die Standardabweichung 1 aufweisen (Darstellungszeitraum: März – Dezember 2022).

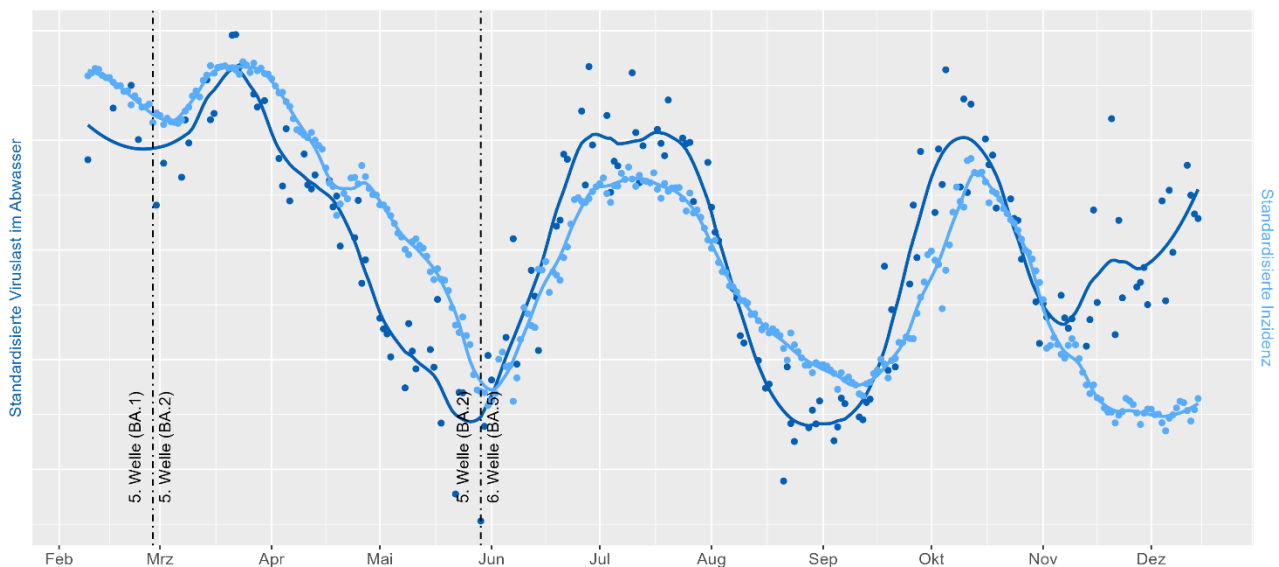
In Abbildung 10 ist ein Standort dargestellt, bei dem die SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser im Gegensatz zur 7-Tage-Inzidenz eine hohe Variation aufweist und die Kurven weniger ähnlich verlaufen, wenn auch nicht

komplett unterschiedlich. Beachtet werden muss dabei, dass die Ausgleichskurven in den nachfolgenden Abbildungen nur zur verbesserten Anschaulichkeit dargestellt werden, die (Kreuz-)Korrelationen jedoch zwischen den Datenpunkten (7-Tage-Mittelwerte der Viruslast im Abwasser und 7-Tage-Inzidenzen) berechnet wurden. Für die abgebildeten Standorte ergaben sich die höchsten Korrelationen bei einem Vorlauf der Abwasserwerte von 2 Tagen bzw. 5 Tagen und betragen 0,674 bzw. 0,122. Insgesamt gab es starke Unterschiede zwischen den Standorten. Für viele Standorte, bei denen die höchsten Korrelationen für die unterschiedlichen Zeitverzögerungen größer als 0,5 waren, betrug der zugehörige Vorlauf des Abwassers maximal wenige Tage. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich, wenn statt der Inzidenz die Hospitalisierungsinzidenz oder der Testpositivenanteil mit der Viruslast im Abwasser in Bezug gesetzt wurden.



**Abbildung 10:** Vergleich zwischen der Viruslast im Abwasser (dunkelblau) und der Inzidenz (hellblau) für einen Beispielstandort mit eher geringer Ähnlichkeit der beiden Zeitreihen. Die beiden Zeitreihen sind standardisiert, sodass sie jeweils den Mittelwert 0 und die Standardabweichung 1 aufweisen (Darstellungszeitraum: April – Dezember 2022).

Wurden die SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser und Inzidenzen über alle Standorte aggregiert, wichen die erhaltenen Datenpunkte weniger stark von den zugehörigen LOESS-Kurven ab. Abbildung 11 zeigt zudem einen weithin ähnlichen Verlauf der Viruslast im Abwasser und der Inzidenz.



**Abbildung 11:** Vergleich zwischen der Viruslast im Abwasser (dunkelblau) und der Inzidenz (hellblau) der über alle Standorte aggregierten Zeitreihen. Die beiden Zeitreihen sind standardisiert, sodass sie jeweils den Mittelwert 0 und die Standardabweichung 1 aufweisen (Darstellungszeitraum: Februar – Dezember 2022).

Der Anstieg der Viruslast im Abwasser war in den Abwasserproben in der Regel vor dem Anstieg der Inzidenzen sichtbar. Durch eine geringere Inanspruchnahme der Testmöglichkeiten am Jahreswechsel 2022/2023 war der Anstieg in der Inzidenz auf niedrigerem Niveau sichtbar als in den Vormonaten. Auch für den Zusammenhang der Viruslast im Abwasser mit anderen Gesundheitsindikatoren (Hospitalisierungsinzidenz, Testpositivenanteil, Testanzahl, Todesfälle, Intensivbettenneuaufnahmen) ergaben sich qualitativ ähnliche

Ergebnisse. Insbesondere wurde ein starker Zusammenhang zwischen SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser und Hospitalisierungsdaten mit einem leichten Vorlauf der SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser gefunden. Dabei sei aber noch einmal darauf hingewiesen, dass das Probenahmedatum zugrunde gelegt wurde, nicht das Datum des Erhalts der Daten.

Eine Gewichtung der Zeitreihen nach Anzahl an Einwohnerinnen und Einwohnern bzw. Einwohnerwerten veränderte die Ergebnisse nicht substanziell und wird hier nicht weiter ausgeführt. Durch die Robustheit der Ergebnisse kann angenommen werden, dass die aggregierten Analysen einen gewissen Grad an Übertragbarkeit auf die Entwicklungen in ganz Deutschland haben.

#### **2.4.4 Eignung des Abwassermonitorings von SARS-CoV-2 als Teil eines infektions-epidemiologischen Surveillance-systems**

Insgesamt wurde eine große Variabilität der SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser für einzelne Standorte und zwischen den Standorten beobachtet. Durch Aggregation über verschiedene Standorte (siehe Abschnitt 2.4.2) ließen sich die Schwankungen und Unterschiede der einzelnen Zeitreihen etwas ausgleichen, sodass Aussagen über die aktuelle Entwicklung von Viruslasten auf aggregierter Ebene möglich waren. Die Verallgemeinerung auf andere Gebiete, z.B. ganz Deutschland, erfordert jedoch weitere Annahmen und Gewichtungen. Grundsätzlich würde eine entsprechende Auswahl der Standorte (z.B. per Zufallsstichprobe) diese Verallgemeinerung erleichtern. Inzidenzen, Hospitalisierungen und andere Indikatoren konnten zumindest im Beobachtungszeitraum auf aggregierter Ebene gut durch die SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser abgebildet werden. Wenn die Analysen der Abwasserproben und die Übermittlung der Ergebnisse schnell geschehen, z.B. innerhalb von zwei Tagen, können Abwasseranalysen einen zeitlichen Vorsprung von ein paar Tagen haben, wenn es um das Erkennen von Dynamiken im Infektionsgeschehen geht. Wie schnell ausgewertete Abwasserproben und andere Indikatoren in der Praxis verfügbar sind, ist also entscheidend dafür, wie und ob dieser Vorlauf genutzt werden kann, um auf Basis der SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser Dynamiken im Infektionsverlauf frühzeitig zu erkennen. Damit könnten Zeitreihen von Viruslasten im Abwasser nicht nur als Teil eines Surveillance-systems verwendet werden, sondern auch in Modellen zur Vorhersage von Erkrankungen, Krankenhausauslastungen und Ähnlichem ergänzt werden. Wie genau dieser Einbau aussieht und wie hilfreich er ist, wird aber durch die Verfügbarkeit von Daten (SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser und andere Daten) und das Ziel der Modellierung bestimmt.

Auf Ebene von einzelnen Standorten kann bereits eine geringere Variabilität der Daten dazu führen, dass auf Basis der letzten Werte vermutete Infektionsdynamiken sich stark ändern, wenn nur ein neuer Messwert hinzukommt (siehe Abschnitt 2.4.1). Häufigere Probenahmen wären ein Mittel, um stabilere Ergebnisse zu erhalten.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die abwasserbasierte Surveillance von SARS-CoV-2 ein von der Teststrategie und vom Testverhalten der Bevölkerung unabhängiges Werkzeug ist, das bei der Erkennung der Zirkulation eines Infektionserregers wertvolle Zusatzinformationen liefert. Zu beachten ist, dass auf Grund der Abwasserdaten nicht auf die Krankheitsschwere geschlossen werden kann und der Einbezug weiterer Gesundheitsindikatoren notwendig ist, da infektionsepidemiologische Surveillance-systeme bei einer Kombination verschiedener Werkzeuge besonders gut wirken.

## **2.5 Genomsequenzierung an den Standorten (TUDa)**

Neben der Quantifizierung des Virus in Abwasserproben mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) zur Ermittlung des Virustiter ermöglicht das Next Generation Sequencing (NGS) zudem den Nachweis von SARS-CoV-2-Varianten und -Mutationen im Abwasser mit einer hohen Genauigkeit. Im Rahmen dieses Projekts wurde die Eignung der Genomsequenzierung als zusätzliches Instrument für die abwasserbasierte Epidemiologie erprobt und bewertet. Insgesamt 59 Abwasserproben von den 20 Pilotstandorten aus drei verschiedenen Zeiträumen im April 2022, September 2022 und Januar 2023 wurden sequenziert. Ziel war es, klinisch bekannte Mutationen, zirkulierende Varianten und Sublinien zu identifizieren und neue Mutationen und Varianten zu entdecken, über die noch nicht klinisch berichtet wurde. Bei allen Proben konnte bei der Sequenzierung eine Genomabdeckung (Target base coverage at 500x) von min. 95 % erzielt werden.

Abbildung 12 zeigt die Anteile der im Abwasser nachgewiesenen Varianten für jeden einzelnen Standort, sortiert nach Probenahmedatum. Varianten mit einem Anteil von weniger als 6 % wurden unter "Others" zusammengefasst. Zum Zeitpunkt der ersten Beprobung im April 2022 war die Omikron-Sublinie BA.2.5 an allen Standorten mit einem Anteil von bis zu 75 % dominant. Darüber hinaus wurden die Sublinien BA.2.7, BA.2.30 und gelegentlich BA.2, BA.2.17, BA.2.13 und BA.2.18 an 11 bzw. 13 der 20 Pilotstandorte und in einigen wenigen Fällen mit einem Anteil von mehr als 6 % nachgewiesen. Alle diese Sublinien gehören zur Omikron-Variante BA.2\*, der zu diesem Zeitpunkt in Deutschland dominierenden Variante. Im September 2022 wurde im Abwasser eine Diversifizierung der SARS-CoV-2-Sublinien im Vergleich zur ersten Beprobung im April 2022 festgestellt. Die meisten nachgewiesenen Sublinien konnten jedoch weiterhin der Omikron-Variante BA.5\* zugeordnet werden. Darüber hinaus wurden in den Abwasserproben vom September 2022 die

Sublinien BF.7\* und BE.1\* nachgewiesen. Im Januar 2023 wurden im Vergleich zu den vorangegangenen Probenahmen mehr verschiedene Varianten nachgewiesen, wobei die Anteile vieler dieser Varianten unter 6 % lagen und daher in der Grafik nicht separat aufgeführt sind. Infolgedessen machte die Kategorie "Others" im Januar bis zu 90 % der einzelnen Proben aus. Die Varianten mit den höchsten Anteilen waren BA.5\*, BF.7\*, XBB.1\*, BQ.1\* und CH.1\*.

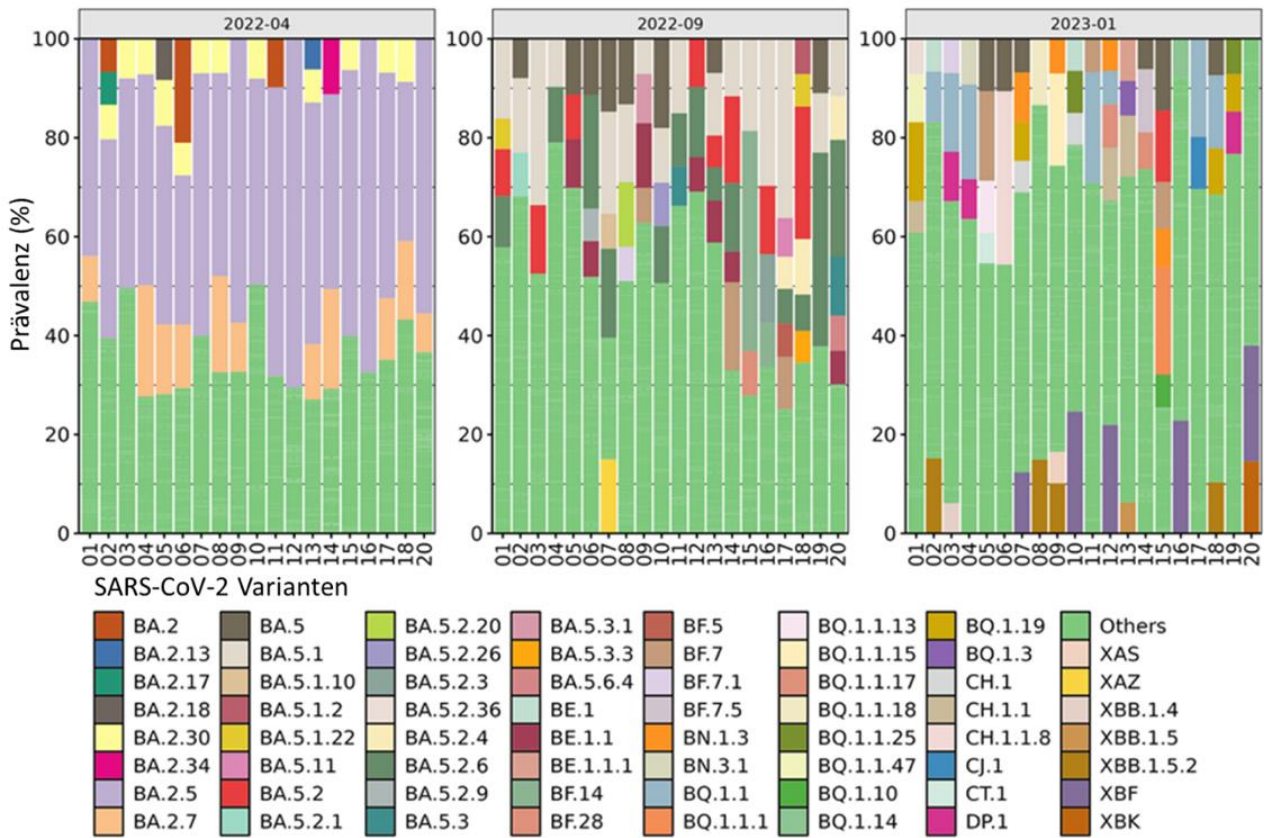


Abbildung 12: Zirkulierende Varianten der drei Probenahmen aus allen Pilotstandorten sortiert nach Datum (anonymisiert).

In Abbildung 13 sind die nachgewiesenen Mutationsprofile aller Pilotstandorte im Laufe der Zeit mithilfe eines nicht metrischen multidimensionalen Skalierungsansatzes (NMDS) dargestellt.

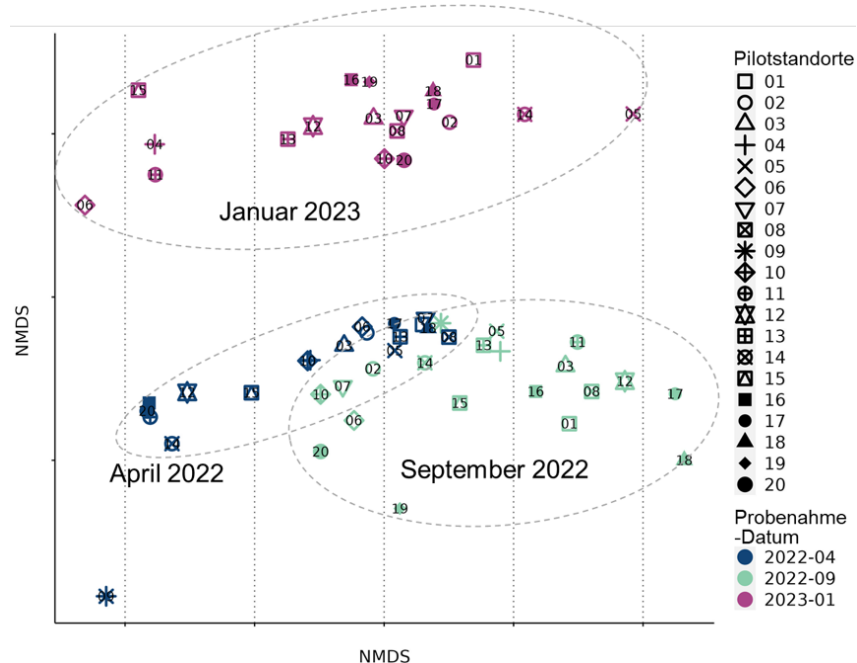


Abbildung 13: Zeitliche Dynamik – Verschiebung der zirkulierenden Varianten in Deutschland von April 2022 bis Januar 2023 in einem Nicht-metrischen-multidimensionalen Skalierungs-Plot (NMDS-Plot); Cluster für jedes Probenahmedatum (April 2022, September 2022, Januar 2023) an den 20 Standorten.

Die Daten in Abbildung 13 können wie folgt interpretiert werden: Je näher zwei Punkte beieinander liegen, desto ähnlicher sind sich die entsprechenden Proben in Bezug auf das entdeckte Mutationsprofil. Für jedes Probenahmedatum wurden Cluster beobachtet, die alle Pilotstandorte umfassen. Im Allgemeinen zeigte sich eine Verschiebung der Cluster von Probenahmedatum zu Probenahmedatum. Dies deutet darauf hin, dass sich die Mutationsprofile im Laufe der Zeit kontinuierlich veränderten. Während im April 2022 alle Proben eng beieinander lagen, verteilten sie sich im September 2022 weiter und das Cluster wurde größer. Dies deutet darauf hin, dass die nachgewiesenen Mutationen und ihre Häufigkeiten im April 2022 bei allen Pilotstandorten sehr ähnlich waren und dass im September 2022 einige geringfügige Unterschiede festzustellen waren. Im Januar 2023 wurde das Cluster noch größer und die Punkte desselben Probenahmedatums lagen je nach Standort weiter auseinander. Dies zeigt die Diversifizierung der vorkommenden Varianten in weitere Sublinien. Während im April 2022 vor allem BA.2\* als dominante Variante in allen Proben nachgewiesen wurde, waren im Januar 2023 die dominanten Varianten nicht mehr ganz so eindeutig. Im Januar 2023 waren die Sublinien BQ.1\*, BF.7 und XBB\* die Sublinien mit den höchsten Abundanzen.

Das Projekt zeigte, dass durch die Genomsequenzierung von SARS-CoV-2 im Abwasser die Überwachung von SARS-CoV-2-Varianten und -Sublinien möglich ist. Die nachgewiesenen Sublinien variierten im Laufe der Zeit, wobei verschiedene Sublinien in verschiedenen Zeiträumen dominierten. Im Rahmen dieses Projekts wurden die Verdrängung der Omikron-Sublinie BA.2\*, die Ausbreitung der BA.5\*-Sublinien und die Diversifizierung in zahlreiche weitere Sublinien beobachtet. Obwohl der kleine Datensatz die Bewertung der zeitlichen Dynamik einschränkte, war eine grobe Abschätzung der zeitlichen Entwicklung von Mutationen und Varianten anhand der drei Zeitpunkte möglich. Die Genomsequenzierung von Abwasser ermöglicht damit die Verfolgung verschiedener Varianten und Sublinien, einschließlich klinisch relevanter Varianten. Sie ermöglicht auch den Nachweis asymptomatischer Fälle und bietet eine Überwachung der Infektionsrate auf Bevölkerungsebene, wenn klinische Tests nur begrenzt möglich sind. Durch die Abwasserüberwachung mittels Genomsequenzierung können signifikante Veränderungen im SARS-CoV-2-Genom ohne klinische Referenzdaten festgestellt werden. Diese Daten können als Frühwarnsystem genutzt werden, wodurch dann weitere klinische Sequenzierungen und Tests veranlasst werden können, um die klinische Relevanz der viralen Veränderungen zu untersuchen. Insgesamt bietet die Abwasserüberwachung durch Genomsequenzierung einen wertvollen Ansatz für die Überwachung von SARS-CoV-2, der ein umfassenderes Verständnis der Dynamik auf Gemeindeebene ermöglicht und eine frühzeitige Erkennung potenzieller Bedrohungen erlaubt.

## **2.6 Qualitätssicherung der Ergebnisse (UBA)**

### **2.6.1 Validierung der PCR-Analytik**

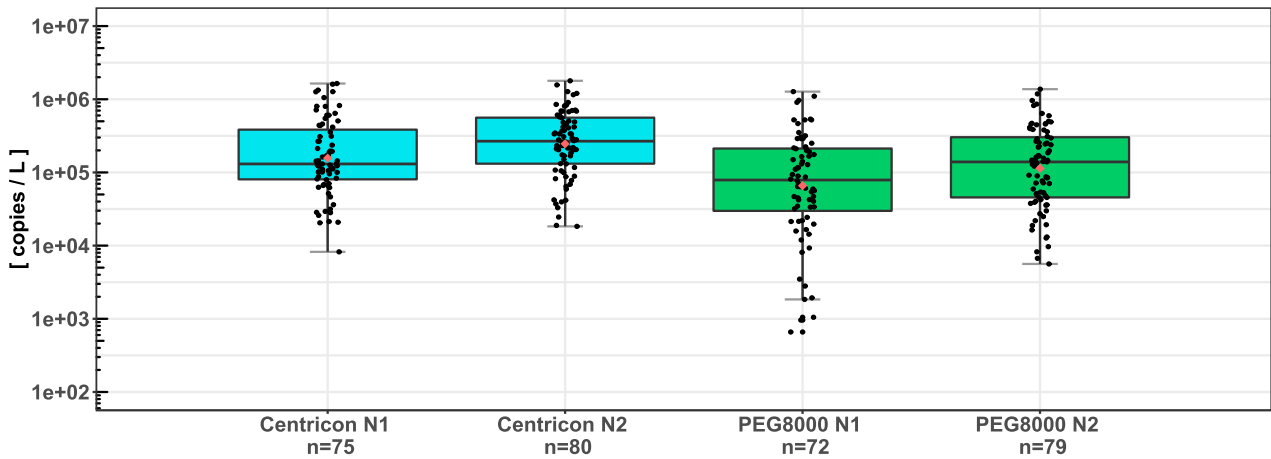
Anhand der Proben aus der Validierungskläranlage wurden Fragestellungen zu Probenlagerungstemperatur, Lagerungsdauer, der Wiederholbarkeit von zeitgleich entnommenen Proben sowie der unterschiedlichen Aufkonzentrierungs- und Extraktionsmethoden für RNA untersucht. Darüber hinaus wurde die Vergleichbarkeit verschiedener PCR-Methoden (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) und Digital Droplet Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (ddRT-PCR)) und deren Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ermittelt.

Es zeigte sich, dass SARS-CoV-2-Genfragmente in Proben, gelagert bei 4 °C, bis zu sechs Tage nach der Probenahme quantitativ nachzuweisen sind. Erst danach erfolgt eine signifikante Abnahme der nachgewiesenen Genfragmente. Eine Lagerung der Rohwasserproben im gefrorenen Zustand bei -20 °C oder -80 °C ist nicht zu empfehlen, da dies zu hohen Verlusten in den Gennachweisen führt. Eine Langzeit-Lagerung (> 1 Monat) bei -80 °C ist jedoch für bereits aufbereitete Proben-RNA möglich (Daten ohne Abbildung).

Die Aufbereitung umfasst die Anreicherung sowie die Extraktion der RNA Genfragmente aus den Rohabwasserproben. Hierfür stehen verschiedene spezifische Verfahren zur Verfügung (u.a. Zentrifugation, Filtration, Fällung). Es wurden im Rahmen der Arbeiten zwei unterschiedliche Methoden zur Aufkonzentrierung von Virus-Nukleinsäuren (DNA/RNA) eingesetzt, eine Ultrafiltrationsmethode (Filter: Centricon 70-Plus) und die klassische Fällung mittels Polyethylenglykol (PEG8000-Fällung). Anschließend wurden DNA und RNA extrahiert und die Genfragmente N1 und N2 des Nukleokapsidgens des SARS-CoV-2 Virus durch quantitative PCR mit reverser Transkription (RT-qPCR) amplifiziert.

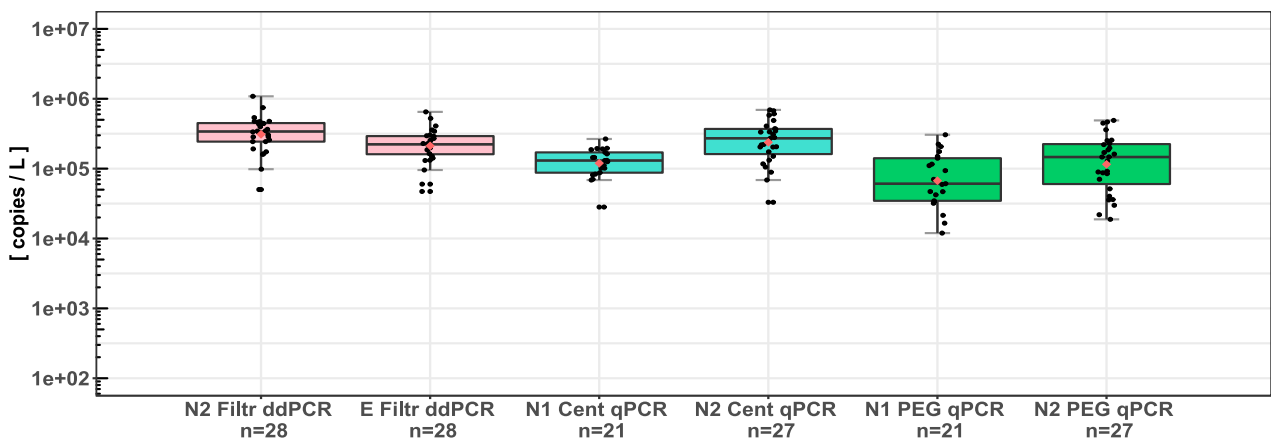
Wie in Abbildung 14 gezeigt wird, erreichen beide Methoden durchaus vergleichbare Messergebnisse. Im direkten Vergleich wurde festgestellt, dass durch Einsatz der Centricon 70-Plus Filtereinheiten um ca. 0,1 Log-Stufen höhere Ergebnisse erzielt werden können. Die Streuung der Messwerte (Kopienzahl / L Abwasser) ist zudem bei der PEG8000 Fällung etwas breiter (größere Interquartilsabstände und eine erhöhte Anzahl an Ausreißern).





**Abbildung 14:** Vergleich von qPCR Ergebnissen der SARS-CoV-2 Genfragmente N1 und N2 aus 80 Proben von 9 Kläranlagen (Zweitproben, Proben Validierungskläranlage). Dargestellt sind die Ergebnisse in Abhängigkeit von der Methode der Aufkonzentrierung der Virus-RNA mittels Centricon 70-Plus Filtereinheiten (türkis, links) und PEG8000 Fällung (rechts, grün).

Den Handreichungen entsprechend war es den Standorten freigestellt, ihre Proben mittels der quantitativen PCR (qPCR) oder der digitalen droplet PCR (ddPCR) zu analysieren. Anhand von Proben aus 5 Kläranlagen wurden die Messverfahren verglichen (siehe Abbildung 15). Beide Verfahren sind gut geeignet zur Bestimmung der SARS-CoV-2-Zielgene.

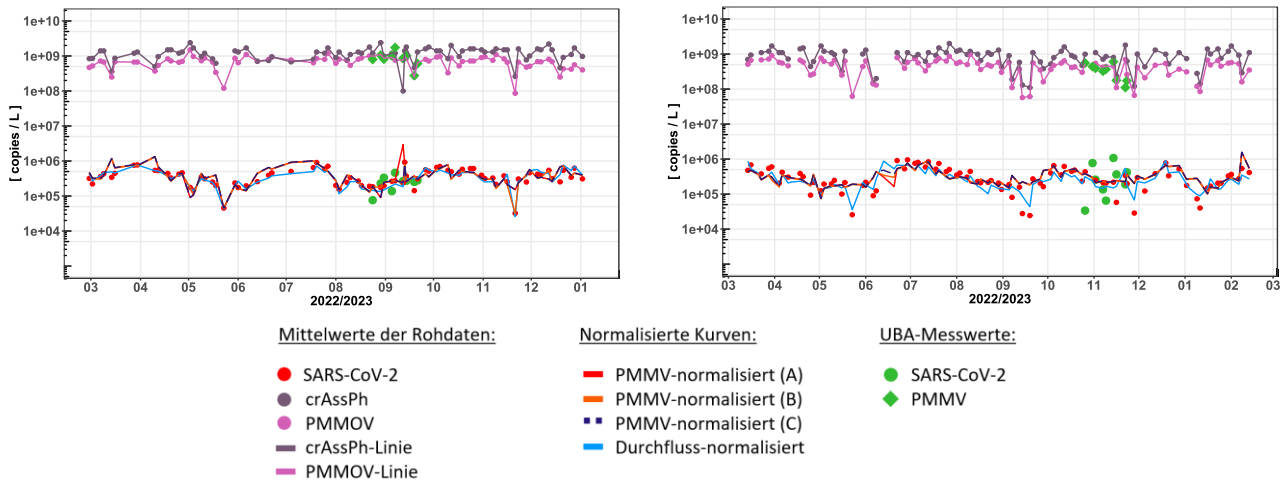


**Abbildung 15:** Vergleich von SARS-CoV-2 Konzentrationen aus 28 Proben von 5 Kläranlagen, gemessen mit qPCR und ddPCR. Mindestens zwei Genregionen sind für eine eindeutige Bestimmung des SARS-CoV-2 Virus erforderlich. Dargestellt sind die ddPCR Messungen (rot, Gebereiche N2 und E) und die qPCR Nachweise (türkis und grün, Gebereiche N1 und N2). ddPCR und qPCR Ergebnisse für den Gebereich N2 ergaben vergleichbare Konzentrationen.

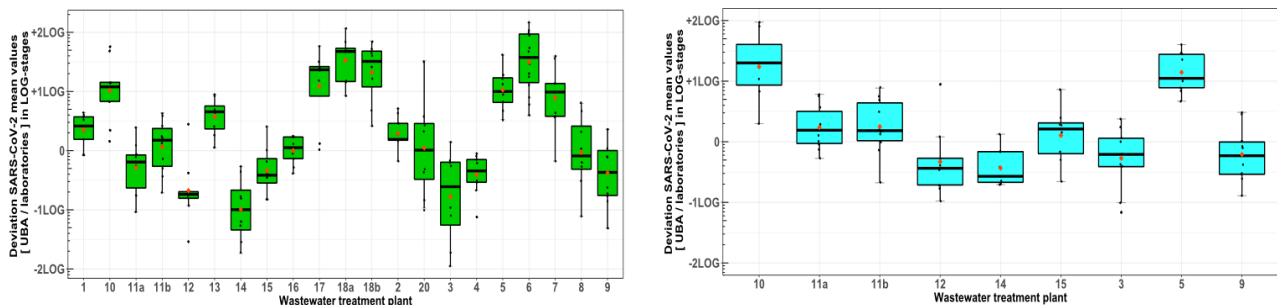
Die Ergebnisse der Proben der Validierungskläranlage und der Zweitproben zeigten auch, dass die Detektionsmethoden der qPCR und der ddPCR vergleichbare Ergebnisse liefern. Die Quantifizierungsgrenzen der PCR liegen zwischen 5 und 10 Genkopien pro Milliliter.

## 2.6.2 Qualitätssicherung der PCR-Analytik an den Standorten

Im Rahmen der Qualitätssicherung der Standorte wurden 21 Kläranlagenzuläufe der ESI-CorA EU-Standorte stichprobenartig über einen Zeitraum von ungefähr einem Monat (8 bis 10 Proben) zusätzlich unabhängig durch das UBA analysiert. An vielen Standorten lagen die Messwerte in einer ähnlichen Größenordnung wie die Ergebnisse der externen Labore (siehe Abbildung 16). Andere Ergebnisse wiesen deutlich höhere Abweichungen (bis zu 2-Log-Stufen) und größere Schwankungen zu den Standortdaten auf (siehe Abbildung 17). Zusätzlich sind in Abbildung 16 die gemessenen SARS-CoV-2 Konzentrationen mit unterschiedlichen Normalisierungsmethoden dargestellt, die aber zu ähnlichen Ergebnissen führten.



**Abbildung 16:** Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen an SARS-CoV-2 Genfragmenten und Surrogatviren in zwei Kläranlagen der Größenklasse 5. Die gemessenen Rohdaten sind durch kleine Punkte dargestellt. Die großen grünen Punkte repräsentieren die für jeden Standort bestimmten neun aufeinanderfolgenden Messdaten der Zweitproben zur Verifizierung der Messergebnisse durch das UBA. Farbige Linien repräsentieren die Verläufe der Messdaten nach Normalisierung über vier verschiedene Methoden.



**Abbildung 17:** Links: Abweichung UBA-Messwerte zu Labormesswerten (PEG8000-Fällung). Rechts: Abweichung UBA-Messwerte zu Labormesswerten (Centricon-Ultrafiltration).

Die Gründe für die teilweise hohen Abweichungen (bis zu 2 Log-Stufen) und Schwankungen (Interquartilsabstände bis zu einer Log-Stufe) haben u.a. folgende Ursachen: Es wurden für die Untersuchungen verschiedene Messverfahren zugelassen. Dies war auch im Rahmen der Pandemie-bedingten Umstände erforderlich, um möglichst umfassende Laborkapazitäten bereitzustellen. Unterschiedliche Messwerte können insbesondere bei unterschiedlichen Aufbereitungsmethoden (Aufkonzentrierung, DNA/RNA-Extraktion) die Folge sein (siehe Streuung der Daten in Abbildung 15). Zudem hat das Ausgangsvolumen der Probe Einfluss auf die Nachweisgrenze der Methode. Verschiedene Zielgene liefern außerdem unterschiedlich hohe Werte, was bei einer Mittelung der Konzentrationen von zwei Zielgenen (z.B. N1, N2, E usw.) die Vergleichbarkeit der Daten senkt. Damit sind die Daten zwischen den Standorten nicht direkt vergleichbar. Bei einem Wechsel der Methode im Labor sind die Messdaten mit den Daten der bisherigen Methoden nicht immer vergleichbar.

Größere Messwertschwankungen waren zu beobachten bei tendenziell kleineren Kläranlagen, bei niedrigeren SARS-CoV-2 Konzentrationen (im Bereich der zu erwartenden Nachweisgrenzen) und bei einzelnen Laboren. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Messergebnisse müssten die Vorgaben weitergehend präzisiert werden. Dazu zählen u.a. das Ausgangsvolumen, die Methode zur Aufkonzentrierung und die zu bestimmenden SARS-CoV-2 Genfragmente (z.B. N1, N2, E oder RdRP).

### 2.6.3 Normalisierung

Die Darstellung der PCR-Rohdaten unterlag starken Schwankungen, weshalb eine Normalisierung zur Glättung bzw. Verbesserung der Datenqualität durchgeführt wurde. Für die Normalisierung wurde in der ESI-CorA Dateninfrastruktur der Abwasserdurchfluss während der Probenahme verwendet. Weiterhin wurden für die Normalisierung der PCR-Daten verschiedene Surrogatviren und chemische Humanmarkerverbindungen, bzw. deren Stoffwechselprodukte bestimmt und deren Eignung geprüft. Der Vergleich der Daten mit den bestimmten Ammoniumgehalten der Pilotstandorte (Zweitprobe) führte jedoch bei diesen Untersuchungen zu keiner deutlichen Verbesserung der Datenqualität.

Zur Normalisierung mit Surrogatviren wurden Untersuchungen mit dem pepper mild mottle virus und dem CrAssphagen durchgeführt, die in kommunalem Abwasser regelmäßig in hohen Konzentrationen vorkommen und dadurch ebenfalls bei Veränderungen der Kläranlagenbedingungen durch Niederschläge oder Industrieemissionen in ihren Konzentrationen beeinflusst werden. Die Messkurven der mit Surrogatviren

normalisierten Konzentrationen an SARS-CoV-2-Genfragmenten zeigten bei der Mehrzahl der Kläranlagen einen ähnlichen Verlauf wie die Kurven der normalisierten SARS-CoV-2-Konzentrationen berechnet mit dem Abwasserdurchfluss während der Probenahme.

Weiterhin wurden in ca. 300 Zweitproben der Pilotstandorte mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) als Hochdurchsatzverfahren verschiedene Spurenstoffe (Diclofenac, Carbamazepin, Koffein, Isolithocholsäure) bestimmt. Hier zeigten sich Unterschiede zwischen den Spurenstoffen, die deren Eignung als Humanmarker einschränken. Zum Beispiel zeigte sich, dass Koffein problematisch war, wenn eine Indirekteinleitung von Kaffeeröstereien ortsnahe zur Kläranlage erfolgte, oder dass die Isolithocholsäure-Konzentrationen sehr starke Schwankungen aufwiesen und derzeit nicht als Humanmarker geeignet ist. Mittels Diclofenac und Carbamazepin als Humanmarker konnten an einzelnen Standorten die Schwankungen der PCR-Daten ausreichend ausgeglichen werden.

Hinsichtlich der Normalisierung der Daten zeigte sich, dass die Normalisierung der PCR-Daten in der Regel zu einer Verbesserung des Datenverlaufs führt. In Abhängigkeit von Kläranlagengröße, möglichen Indirekteinleitern und Eigenschaften des Normalisierungsparameters war dies in Einzelfällen jedoch nicht der Fall. Deshalb wird vorläufig die Normalisierung der PCR-Daten via Abwasserdurchfluss weiterverfolgt. Eine Normalisierung via Surrogatviren/ chemischen Humanmarkern erscheint grundsätzlich zielführend, bedarf jedoch, je nach Kläranlagenstandort, einer differenzierten Prüfung und Auswertung.

## 2.7 Evaluation (RKI)

Im Frühjahr 2023 wurde eine Evaluation des in ESI-CorA etablierten Pilot-Surveillancesystems zur abwasserbasierten Überwachung von SARS-CoV-2 und dessen Varianten durchgeführt. Das System wurde dahingehend bewertet, ob und in welcher Form (flächendeckend oder als Sentinel; mit der ESI-CorA Dateninfrastruktur oder einer anderen Dateninfrastruktur) und mit welchen Anforderungen eine Verstärkung der abwasserbasierten Surveillance von SARS-CoV-2 und dessen Varianten zur Vervollständigung bestehender SARS-CoV-2-Surveillancesysteme mit Schwerpunkt auf Variantenerkennung beiträgt. Des Weiteren wurde geprüft, ob die abwasserbasierte Überwachung eine verbesserte Einschätzung der epidemischen Lage (auf lokaler, Länder- und Bundesebene) ermöglicht und ob die Nutzung in Deutschland empfohlen werden kann.

Für die Evaluation des Systems wurden die Leitlinien der US-amerikanischen Centers for Disease Control and Prevention (CDC) für die Bewertung von Surveillancesystemen im Bereich der öffentlichen Gesundheit herangezogen<sup>7</sup>. Das Pilotsystem wurde auf Grundlage der folgenden Leistungskriterien bewertet: Grad der Nützlichkeit, Einfachheit, Flexibilität, Datenqualität, Akzeptanz, Zeitnähe, Repräsentativität und Kosten/Nutzen. Zur Bewertung der Attribute wurde eine Befragung der teilnehmenden Pilotstandorte herangezogen. Diese thematisierte folgende Themenbereiche: Kooperationen, Finanzierung, Personal, Training/Schulung, Zeitaufwand, Zeitnähe, Dateneingabe/Datendarstellung/Datennutzung und zukünftige Nutzung.

Die Ergebnisse der Evaluation zeigten bezüglich des Grades der Nützlichkeit, dass das über das Meldesystem beobachtete SARS-CoV-2-Infektionsgeschehen auch im Abwasser abgebildet werden konnte: Die SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser korrelierte bei einzelnen Standorten gut mit verschiedenen Gesundheitsindikatoren wie Inzidenz, Hospitalisierung und Testpositivenanteil. Im Vergleich zu vorherigen Virusvarianten, wo der Vorlauf der SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser bei ca. zwei Wochen lag, wurde in ESI-CorA, während dessen Projektlaufzeit überwiegend die Omikron-Variante und zugehörige Sublinien zirkulierten, bei einzelnen Standorten ein Vorlauf von nur wenigen Tagen beobachtet. Bei der Bewertung der rechtzeitigen Erkennung ist zu beachten, dass es sich um eine retrospektive Auswertung handelt und die Zeitnähe sehr stark von der Datenlieferung abhängt. Außerdem unterliegt die SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser zum Teil einer hohen Variabilität. Dennoch werden Trends der Virusverbreitung erkannt und vor allem in Phasen einer geringen Inanspruchnahme der SARS-CoV-2-Testung kann das System einen Zusatznutzen liefern.

Das System hat aufgrund der vielen im Prozess beteiligten Institutionen und Organisationen sowie des hohen Umfangs an erhobenen Daten eine gewisse Komplexität. Weiterhin unterschieden sich die Standorte zum Beispiel im Tourismus- bzw. Pendlerverhalten, Einzugsgebietsgröße oder Art des Abwassers (häuslich, städtisch, industriell) was zusätzlich zur Komplexität beitrug.

Laut der durchgeführten Befragung wären zusätzliche Schulungen im Bereich Dateneingabe und Dateninterpretation an den Standorten wünschenswert gewesen. Zudem sind klar definierte Zuständigkeiten bei den vielen beteiligten Institutionen wichtig. Da für die Interpretation der SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser und die epidemiologische Einschätzung Fachkenntnisse erforderlich sind, sollten mehr Schulungen v. a. auf kommunaler Ebene angeboten werden, um die Stakeholder in die Lage zu versetzen, die zur Verfügung stehenden Daten optimal zu nutzen und Fehlinterpretationen vorzubeugen.

---

<sup>7</sup> Centers for Disease Control and Prevention (U.S.) [2001]: Updated Guidelines for Evaluating Public Health Surveillance Systems. Recommendations from the Guidelines Working Group. MMWR, V. 50, No. RR-13, <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/13376>

Die Flexibilität wurde hier als Anpassung des Systems auf SARS-Cov-2-Varianten, andere Krankheitserreger oder Stoffe (z. B. Drogen, Medikamente) interpretiert. In ESI-CorA wurde ausschließlich für SARS-CoV-2 pilotiert. Die perspektivische Nutzung für andere gesundheitsbezogene Ereignisse wurde theoretisch betrachtet. Prinzipiell sollte das pilotierte System für andere Erreger und Stoffe nutzbar sein. Unter Umständen sind dafür je nach Erreger oder Stoff Anpassungen in einzelnen Prozessschritten notwendig, wie z. B. der Analysemethode, des Probenvolumens oder der Probenahmefrequenz.

Bezüglich der Datenqualität gab es in den Bereichen Probenahme und Analytik Optimierungspotenzial. Eine Erhöhung der Probenahmefrequenz von zwei auf drei bis vier Probenahmen pro Woche würde durch die erhöhte Anzahl der Datenpunkte für eine höhere Präzision in den statistischen Analysen sorgen und die Bedeutung von Ausreißern verringern. Dies könnte in Abhängigkeit von der epidemiologischen Situation geschehen, ginge jedoch mit erhöhten Kosten und erhöhtem Aufwand einher. Das Entwickeln von Standardverfahren und Einführen regelmäßiger Ringversuche als externe Qualitätssicherung würde die gleichbleibende Qualität der Laborergebnisse und deren Vergleichbarkeit über die diversen Labore hinweg sicherstellen. Die Überwachung der SARS-CoV-2-Varianten benötigt eine höhere Probenfrequenz, um in der regelmäßigen Überwachung nützliche Informationen zu liefern (im Rahmen von ESI-CorA wurde lediglich zu drei Zeitpunkten während der gesamten Projektlaufzeit eine Genomsequenzierung über alle Pilotstandorte hinweg durchgeführt). Da ein Wechsel der Varianten innerhalb von zwei bis drei Wochen geschehen kann, ist mindestens eine wöchentliche Varianten-Sequenzierung nötig, um den Trend zu erkennen, bevor er in der Vergangenheit liegt<sup>8</sup>.

Bezüglich der Sensitivität konnte das System den Verlauf der Infektionsdynamik gut widerspiegeln.

Während es – nach aktuellem Stand – nicht möglich ist, aus der SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser die Anzahl an Infizierten sowie die Krankheitsschwere zu ermitteln, bildet das Abwassermonitoring grundsätzlich die Infektionsdynamik in Form von Trends gut ab. Dabei erfasst es auch asymptomatische Infizierte und ist unabhängig von der aktuellen Teststrategie und der Compliance der Bevölkerung. Da die Beprobung im Sinne einer Poolprobe nahezu die gesamte Bevölkerung eines Standorts erfasst, kann das System für den Standort als repräsentativ eingestuft werden. Um epidemiologisch stichhaltige Aussagen auf Landes- und Bundesebene treffen zu können, wäre eine Erhöhung der Standortanzahl sinnvoll. Hierbei sollte auf eine adäquate Abdeckung der jeweiligen Bevölkerung geachtet werden.

Die Ergebnisse der Befragung zeigten ein sehr inhomogenes Bild bezüglich der Zeitnähe zwischen den einzelnen Prozessschritten. Generell gab es an einzelnen Standorten Optimierungsbedarf, während die Prozesse an anderen, bereits erfahreneren Standorten gut eingespielt waren. Hier sollten Nachfolgeprojekte ansetzen und im engen Dialog v. a. mit den Kläranlagen und Laboratorien erörtern, welche Bedürfnisse vorliegen. Eine schnelle Prozessierung von der Beprobung bis zum analytischen Ergebnis sowie eine schnelle Verfügbarkeit der Daten in den Einrichtungen des ÖGD ermöglichen eine wertvolle Unterstützung der epidemiologischen Lageeinschätzung und verstärken eventuelle Früherkennungseffekte.

Trotz Einschränkungen in der Bewertbarkeit ist jedoch der ergänzende und unterstützende Informationsgehalt der SARS-CoV-2-Ergebnisse aus den Abwasserproben hervorzuheben, da hiermit eine solide, von der Inanspruchnahme des Testangebots unabhängige Möglichkeit der Überwachung des SARS-CoV-2-Infektionsgeschehens ermöglicht werden kann. Für die Bewertung der epidemiologischen Lage und der Maßnahmen im Hinblick auf die öffentliche Gesundheit (z. B. Belastung der Krankenhäuser usw.) kann jedoch auf die anderen Surveillancesysteme nicht verzichtet werden, da nur hier Erkenntnisse zur Krankheitsschwere und weiteren relevanten Parametern für den ÖGD gewonnen werden können.

## 2.8 Veranstaltungen und Öffentlichkeitsarbeit (KIT)

Die Kick-off-Veranstaltung fand vor Beginn des Pilotbetriebs am 9. Februar 2022 in einem Online-Format statt, da zum damaligen Zeitpunkt eine Präsenzveranstaltung aufgrund der Pandemie nicht vertretbar gewesen wäre. Die Veranstaltung war zweigeteilt: Am Vormittag wurden nach einer Begrüßung durch die beteiligten Ministerien das Projekt und die EU-geförderten Pilotstandorte vorgestellt. Weiterhin wurde als Praxisbeispiel über das bereits laufende Abwassermonitoring im Berchtesgadener Land berichtet. Der Nachmittag diente dem Kennenlernen und dem Austausch der Pilotstandorte mit den Projektbeteiligten.

Bei der öffentlichen Abschlussveranstaltung des EU-Projekts ESI-CorA am 22. März 2023 in Karlsruhe haben die Projektbeteiligten ihre aktuellen Ergebnisse vorgestellt. Die Vortragsfolien der Abschlussveranstaltung sowie das Projektblatt zu ESI-CorA stehen auf der Projektwebseite unter Downloads zur Verfügung<sup>9</sup>.

---

<sup>8</sup> Schilling, J. et al. [2022]: Zweite Aktualisierung der Retrospektiven Phaseneinteilung der COVID-19-Pandemie in Deutschland. Epid. Bull., Vol. 10, <https://edoc.rki.de/bitstream/handle/176904/9483/EB-10-2022-Phaseneinteilung.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

<sup>9</sup> <https://www.ptka.kit.edu/AbschlussPilotbetrieb.html>

Darüber hinaus wurden vom Helpdesk folgende Videosprechstunden, Workshops und Seminare (online) für die Pilotstandorte (mit-)organisiert:

- Online-Seminar zur Probennahme und Analytik von SARS-CoV-2 im Abwasser (21. März 2022 und 6. April 2022)
- Online-Seminar zur ESI-CorA-Dateninfrastruktur (29. Juni 2022 und 14. Juli 2022)
- Online-Workshop zum Nachweis von SARS-CoV-2 Virusvarianten durch Genomsequenzierung (26. Oktober 2022)
- Videosprechstunde zur Nutzung der Dateninfrastruktur im Projekt ESI-CorA (5. Dezember 2022)

### **3 Ausblick (UBA und RKI)**

Im Rahmen des Pilotprojekts ESI-CorA konnte gezeigt werden, dass eine abwasserbasierte Surveillance von SARS-CoV-2 grundsätzlich ein ergänzendes Instrument für die epidemiologische Lagebewertung im Rahmen der COVID-19-Pandemie darstellt. Die zur Verfügung stehenden Verfahren der Probennahme, der Probenaufbereitung und der Detektion liefern im Hinblick auf die Häufigkeit und die Qualität der erhobenen Daten gute bis sehr gute Ergebnisse. Es treten jedoch immer wieder einzelne Ausreißer oder auch schwankende Werte innerhalb einzelner Standorte auf, die durch technische Aspekte der Analytik nicht erklärbar sind und einer zusätzlichen Qualitätskontrolle bedürfen.

Als Methoden zur Normalisierung wurden im Projekt der Abwasserdurchfluss während der Probenahme, chemische Humanmarker und Surrogatviren (z.B. PMMoV) verwendet. An einigen Kläranlagenstandorten führten die verschiedenen angewandten Normalisierungsmethoden zu einer deutlichen Verbesserung der Ergebnisse im Sinne einer Glättung der Kurven. An anderen Kläranlagenstandorten führte die Normalisierung jedoch sogar zu einer leichten Verschlechterung der Trenderkennung. Ob und mit welcher Methode eine Normalisierung durchgeführt wird, könnte daher in Zukunft je nach Kläranlagenstandort zu entscheiden sein. Diese Frage als auch die weitere Optimierung sowie Harmonisierung der Verfahrensabläufe zur Probenahme und Analytik sind zentrale Fragestellungen für die Zukunft.

Noch innerhalb der Projektlaufzeit ging das Pilotvorhaben aufgrund der gesammelten Erkenntnisse und der guten Funktionalität des Gesamtsystems fließend in eine weiterführende abwasserbasierte Surveillance über. Seit Oktober 2022 ist die Viruslast im Abwasser neben 7-Tage-Inzidenz, Testpositivenanteil und Arztbesuchen als weiterer Indikator des Infektionsgeschehens auf dem Pandemieradar des RKI/BMG zu sehen. Seitdem sind stetig mehr Standorte bzw. Kläranlagen dazugekommen. Im November 2022 begann das bundesweite Vorhaben AMELAG (Abwassermonitoring für die Epidemiologische Lagebewertung), welches dank der etablierten Netzwerke und (IT-)Strukturen in ESI-CorA schnell umgesetzt werden konnte. Ziele von AMELAG sind die Erweiterung bzw. Etablierung eines bundesweiten Abwassermonitorings, zunächst für SARS-CoV-2. Weitere Public-Health-relevante Erreger sollen in AMELAG pilotiert werden.

RKI und UBA sind gemeinsam an einer Joint-Action der EU beteiligt. Dabei handelt es sich um das Projekt EU Wastewater Integrated Surveillance for Public Health (EU-WISH). Ziel des Projektes ist das Verbessern, Erweitern und Verstetigen von Abwassersurveillance und den zugehörigen Kompetenzen und Prozessen in allen beteiligten Mitgliedsstaaten. Zu diesem Zweck wird ein Status quo der Abwassersurveillance über alle Mitgliedsstaaten erhoben und die Integration in bestehende Gesundheitssysteme evaluiert. Weiterhin werden in mehreren Arbeitspaketen diverse epidemiologische und diagnostische Fragestellungen zu SARS-CoV-2, aber auch anderen respiratorischen Krankheitserregern, antimikrobiellen Resistenzen, Polioviren und potentiellen neu auftretenden Krankheitserregern bearbeitet, wirtschaftliche Aspekte beleuchtet und Kommunikationsstrategien erarbeitet.

Das Projekt EU-WISH läuft voraussichtlich im Oktober 2023 an und läuft für drei Jahre bis September 2026.

### **Danksagung**

Die Beteiligung der Kolleginnen und Kollegen an dem Projekt in den einzelnen Häusern geht weit über die aufgezählte Autorenschaft hinaus.

Am KIT wird den Mitarbeiterinnen der Forschungsförderung (FOR) gedankt: Dr. Nicole Gärtner, Stefanie Glassman und Dr. Sabine Müller.

Im RKI wird insbesondere gedankt: Dr. Adine Marquis, Alexander Schattschneider, Dr. Nicole Giard und Dr. Alexander Ullrich.

Die TU Darmstadt bedankt sich bei Janina Mattersdorf, Sofie Wängler, Anja Förster, Aron Klein und Johanna Abel für die tatkräftige Unterstützung bei der Probenlogistik und Probenaufbereitung.

Im UBA wird insbesondere gedankt Gunnar Bachem, Lisa Isernhinke, Jan-Christopher Kullwatz, Natalie Marquar, Steffi Scheller und Fanni Szep-Kis. An der BAM danken wir Zoltán Konthur und Rudolph Schneider für Ihre Beteiligung am Projekt.