



Technischer Leitfaden Teil 2 zur Abwassersurveillance – Molekularbiologische Analytik

Der vorliegende Technische Leitfaden ist ein Teil von vier Arbeitsdokumenten. Die Arbeitsdokumente stehen fachlich – technisch in engem Zusammenhang und sind gemeinsam zu betrachten:

- Technischer Leitfaden Teil 1 zur Abwassersurveillance
– Probenahme von Abwasser
- Technischer Leitfaden Teil 2 zur Abwassersurveillance
– Molekularbiologische Analytik
- Technischer Leitfaden Teil 3 zur Abwassersurveillance
– Probenlogistik und Datenübermittlung
- Technischer Leitfaden Teil 4 zur Abwassersurveillance
– Datenverarbeitung

Der vorliegende Leitfaden beschreibt folgende Bereiche:

- 1. Allgemeine Hinweise**
- 2. Probenbehandlung**
- 3. Aufkonzentration und Extraktion**
- 4. Quantifizierung der viralen Genomkopien mittels PCR**
- 5. Qualitätskontrolle der PCR Messergebnisse**

1. Allgemeine Hinweise

Dieser Leitfaden vermittelt die Grundlagen für das Vorgehen zum quantitativen Nachweis spezifischer Genfragmente verschiedener Viren wie z.B. Severe Acute Respiratory Syndrome Virus Typ-2 (SARS-CoV-2), Influenza-A- und Influenza-B-Virus, Respiratorisches Synzytial Virus (RSV)-Gruppe A und B und ubiquitär in Fäkalien nachweisbare Viren (fäkale Bezugsviren) mittels molekularbiologischer Nachweismethoden, d.h. mittels (reverse Transkriptase) Polymerasekettenreaktion ((RT-)PCR). Der Leitfaden beschreibt die wichtigsten Kontrollparameter, die für eine qualitätsgesicherte Analytik beachtet werden müssen. Ebenso werden für die spätere Normalisierung der quantitativen Daten notwendige Informationen aufgelistet, die für die jeweilige Laboranalytik (Stammdatenblatt Labor) kontinuierlich mit der jeweiligen, analysierten Probe (Monitoringdaten) an die Landesstelle/ in die UBA Datenbank zu übermitteln sind (siehe auch Technischer Leitfaden Teil 3 – Probenlogistik und Datenübermittlung).

Die verschiedenen Arbeitsschritte der Probenextraktion und PCR-Analysen müssen von mikro- und molekularbiologisch geschultem und qualifiziertem Personal durchgeführt werden. Außerdem muss eine räumliche Trennung der Versuchsphasen (Homogenisierung, Probenkonzentrierung/ Virusanreicherung und Nukleinsäureextraktion vs. Amplifizierung und Detektion) beachtet werden sowie Fremdkontaminationen durch Verwendung von sterilen, Nuklease- und Nukleinsäure-freien



Verbrauchsmaterialien/Reagenzien und häufige Desinfektion und Handschuhwechsel vermieden werden. Alle Protokolle müssen von den Laboren so optimiert werden, dass eine Quantifizierung auch bei niedrigen Viruskonzentrationen in den Abwasserproben möglich ist. Weiterhin müssen Wiederfindungsraten sowie Detektions- und Quantifizierungslimits für jedes virale Zielgen bestimmt werden.

2. Probenbehandlung (Lagerung, Homogenisierung)

Nach der Probenahme muss die Abwasserprobe möglichst zeitnah bearbeitet werden. Eine gekühlte Zwischenlagerung bei 4°C ist für wenige Tage möglich. Eine Bearbeitung innerhalb von 48 Stunden wird empfohlen. In der Fachliteratur wird bei gekühlten Proben eine Stabilität der Genfragmente von bis zu 9 Tagen beschrieben (Markt et al. 2021). Zu beachten gilt, dass signifikante Verluste der Konzentration bei (tief)gefrorenen Proben bekannt sind.

Die Nukleinsäureextrakte können bei 4°C gelagert werden, wenn die PCR-Analyse zeitnah erfolgt. Für längere Zeiträume (Rückstellproben) ist eine Lagerung bei -80°C empfohlen. Um mehrmaliges Auftauen zu vermeiden, wird ein Aliquotieren der Proben empfohlen.

Im Labor wird eine automatisierte Homogenisierung der Proben in 1 L Probentransportgefäße im Überkopfschüttler für 15 min empfohlen. Erst dann sollten Teil-Proben für die weitere Analytik entnommen werden.

3. Aufkonzentrierung und Extraktion

Die Aufkonzentrierung von Viruspartikeln bzw. -bestandteilen kann durch verschiedene Methoden erfolgen, wobei es eine Vielzahl an unterschiedlichen Protokollen gibt. In Tabelle 1 sind die drei am häufigsten angewendeten Methoden im Rahmen von AMELAG zusammengefasst.

Feststoffpartikel aus dem Rohabwasser werden bei vielen Protokollen durch einen ersten Zentrifugationsschritt (15-45 min, 4000-5000 x g) abgetrennt (z.B. bei Verwendung von Filtereinheiten, Polyethylenglycol-Fällung oder zentrifugaler Ultrafiltration). Danach wird mit der wässrigen Phase der Probe weitergearbeitet.

**Tabelle 1: Methoden zur Aufkonzentrierung von Viruspartikeln**

| Methoden | Ausgangsvolumen | Optionen |
|---------------------------------------|-----------------|--|
| Fällung mit Polyethylenglycol (PEG) | 40 ml - 1 L | Polyethylenglycol 8000 (PEG 8000) (10 % m/V) (oder Polyethylenglycol 6000 (PEG 6000)) zusätzlich wird NaCl (2,25 % m/V) zugegeben |
| druck- oder vakuumbasierte Filtration | 40 ml - 1 L | negativ oder positiv geladene Filtermembran Porengröße 0,1 µm bis 0,45 µm |
| zentrifugale Ultrafiltration | 40 ml - 200 ml | verschiedene Filtertypen und Rotationsgeschwindigkeiten |

Je nach verwendeter Methode und Ausgangsvolumen unterscheiden sich die Nachweisgrenzen der Zielgene und die Wiederfindungsraten gespikter Kontrollviren (s. u.). Wichtige Parameter für die Wahl der Aufkonzentrierungsmethode sind (i) das Volumen, welches mit der jeweiligen Methode bearbeitet werden kann, (ii) die Effizienz der Methode, (iii) die Eignung der Methode für die zu untersuchenden Viren, (iv) die vorhandene Laborausstattung, sowie (v) eine praxisnahe Durchführbarkeit und Kosteneffizienz.

Nach der Aufkonzentrierung der Viruspartikel aus der Abwasserprobe müssen virale oder Gesamt-Nukleinsäuren in guter Qualität extrahiert werden. Die häufigsten dafür verwendeten Techniken beruhen auf der organischen Extraktion mit Phenol, Wasser und Alkohol sowie Bindung an Silika-Matrices und werden von vielen Firmen als Kits angeboten. Die Nukleinsäuren werden dabei meistens in einem Volumen von 50-200 µL eluiert. Die Reinheit der Probe kann photometrisch bei Wellenlängen von 230, 260 und 280 nm kontrolliert werden oder durch weitere Verfahren wie Fluoreszenzmessungen und Fragmentanalysen. Die Effizienz der Extraktionsmethode kann durch das Mitführen einer bekannten Zahl von inaktivierten Viruspartikeln eines weiteren Virus als Prozesskontrolle, wie z.B. des Bakteriophagen MS2 oder des Murinen Hepatitis Virus (MHV), überprüft werden.

Die extrahierten Nukleinsäuren können ohne Konzentrationsverlust für ca. 1 Monat bei -20°C gelagert werden, allerdings empfiehlt sich das Einfrieren in für die PCR-Analyse geeigneten Aliquots, um ein wiederholtes Auftauen und Einfrieren zu vermeiden. Eine langfristige Lagerung der Nukleinsäuren sollte bei -80°C erfolgen.

4. Quantifizierung der viralen Genomkopien mittels PCR

Die Quantifizierung von RNA-Viren mittels RT-PCR erfordert die enzymatische Umschreibung von RNA in komplementäre DNA (cDNA) mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase und wird als Reverse Transkription (RT) bezeichnet. Dieser Schritt wird häufig direkt mit der nachfolgenden PCR in einem „One-Step“ Verfahren gekoppelt. Die RT ist bei Umweltproben ein problematischer Schritt, da dieser sehr anfällig gegenüber inhibitorischen Stoffen ist, welche in Umweltproben in der Regel vorhanden sind (Schwermetalle wie z. B. Eisen, Huminstoffe, schwerlösliche Salze etc.) und die bei der Nukleinsäure-Extraktion oft nicht vollständig entfernt werden können. Deshalb sind nicht alle reversen Transkriptasen für die Reaktion geeignet. In manchen Fällen kann die Verwendung einer zweistufigen RT-PCR (d.h. die Synthese der cDNA und ihre Amplifikation / Quantifizierung werden in zwei Einzelschritte aufgeteilt) in einem „Two-Step“ Verfahren dazu beitragen, Probleme aufgrund von Inhibitoren in den RNA-Extrakten zu überwinden. Erfolgt die Quantifizierung der cDNA in der



PCR nicht direkt nach der RT, kann diese kurzfristig bei -20 °C zwischengelagert werden. Um Probleme bei der RT erkennen zu können, sollte grundsätzlich eine Inhibitionskontrolle in Form einer geeigneten RNA mitgeführt werden. Um etwaige Inhibitoren zu entfernen, können serielle Verdünnungen der Nukleinsäuren in der (RT)-PCR eingesetzt werden. Es ist ebenfalls möglich, die extrahierten Nukleinsäuren mittels geeigneter Inhibitor-entfernender Methoden in nachgehenden Schritten zu bearbeiten.

Für den quantitativen Nachweis der relevanten Viren werden keine vollständigen Genome benötigt, es werden nur einzelne spezifische Genbereiche amplifiziert. Die häufigsten verwendeten Methoden für die Quantifizierung von Genfragmenten sind die quantitative real time PCR (qPCR), die eine relative Quantifizierungsmethode anhand eines internen spezifischen Standards ist und die digitale PCR (dPCR) bzw. digital droplet PCR (ddPCR), bei der eine absolute Quantifizierung mittels statistischer Auswertung der Endpunktanalysen erfolgt. Die qPCR wird aktuell noch sehr häufig angewendet, da viele Labore bereits seit langem über die notwendige Technik verfügen. Die dPCR bzw. ddPCR als neuere Techniken werden jedoch zunehmend häufiger eingesetzt, da sie sich durch einen deutlich höheren Probendurchsatz und niedrigere Nachweisgrenzen auszeichnet.

Es sind Positiv- und Negativkontrollen mitzuführen, die die Funktionsfähigkeit der PCR-Reaktion anzeigen und helfen falsch positive oder falsch negative Ergebnisse auszuschließen. Alle Proben (inklusive Positiv- und Negativkontrollen) müssen bei der qPCR mindestens in Duplikaten pro PCR-Platte untersucht werden. Bei der dPCR bzw. ddPCR sind aufgrund der Methode (eine einzelne PCR-Analyse läuft in vielen Tausend Einzelreaktionen ab) keine technischen Replikate erforderlich. Die berechneten Konzentrationen der viralen Gene im Abwasser werden in der Regel in "Genkopien/L" bzw. "Genomkopien/L" angegeben.

4.1 SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 ist ein behülltes RNA-Virus. Das Genom besteht aus einer nicht segmentierten, einzelsträngigen RNA positiver Polarität mit einer Länge von rund 30 kb.

Die Amplifizierung der charakteristischen Genbereiche erfolgt durch die Verwendung spezifischer Primer und Sonden, die auch im medizinischen Bereich für den molekularbiologischen Nachweis von SARS-CoV-2 verwendet werden. Zielbereiche dieser Tests liegen in Genabschnitten in denen sich das SARS-CoV-2 von anderen Coronaviren unterscheidet, z.B. im Bereich des Nukleokapsidgens (N1, N2, N3), der Genbereiche für das Hüllprotein E, der Polymeraseregion (RdRp), anderen Bereichen des Open Reading Frame-Bereichs (ORF 1a/b) oder Bereiche im für das Spike-Proteins (S) kodierende Gen. Allerdings ist letztere Region häufig von Mutationen betroffen, so dass im Anwendungsfall die eingesetzten Primer und Sonden regelmäßig validiert werden müssen.

Für eine ausreichende Validität des Nachweises von SARS-CoV-2 müssen immer mindestens zwei geeignete Genbereiche des Virus nachgewiesen werden.

4.2 Influenza-A- und B-Viren

Influenza-A- und B-Viren sind behüllte RNA-Viren mit einzelsträngiger, in acht Segmente aufgeteilte RNA negativer Polarität.

Die acht verschiedenen RNA-Segmente kodieren für ein Hämagglutinin (HA), eine Neuraminidase (NA), ein Nukleoprotein (NP), zwei Matrixproteine (M1) und (M2), eine RNA-Polymerase (PA), meist zwei Polymerase-bindende Proteine (PB1, PB2) und zwei Nichtstrukturproteine (NS1 und NS2). Die



virusinternen Matrixproteine M1 und M2 und die Nichtstrukturproteine NS1 und NS2 sind hoch konserviert und eignen sich daher zur Detektion und Differenzierung der beiden Influenzavirus-Gattungen A und B.

Aus den bisherigen Laborerfahrungen hat sich ergeben, dass Influenzaviren der Gattungen A und B in denselben Nukleinsäure-Extrakten nachgewiesen werden können, die für die Quantifizierung des SARS-CoV-2 gewonnen werden. Die Amplifizierung der charakteristischen Genbereiche kann auch hier durch die Verwendung von Primer/Sonden-Systemen erfolgen, die im medizinischen Bereich für den molekularbiologischen Nachweis einer Influenzavirusinfektion eingesetzt werden und die den Empfehlungen von WHO und CDC folgen.

In der Regel sind die meisten angegebenen Influenza-A-Virus Primer/Sonden universell und somit für den Nachweis verschiedener Subtypen geeignet. Zur weiteren Differenzierung bzw. dem spezifischen Nachweis aviärer Influenzaviren (insb. H5N1 und H5N2) sollte bei Bedarf ein weiteres Assay genutzt werden.

4.3 RSV Gruppe A und B

Das humanpathogene Respiratorische Synzytial-Virus (RSV) ist ebenfalls ein behülltes Virus. Das Genom dieses Virus besteht aus einer nicht segmentierten, einzelsträngigen RNA negativer Polarität mit einer Länge von etwa 15,2 kb. Es kodiert für 11 Proteine: zwei Nichtstrukturproteine (NS1, NS2), ein Nukleoprotein (N) ein Phosphoprotein (P), ein Matrixprotein (M), drei transmembrane Oberflächenproteine (SH, G, F), zwei Transkriptions-relevante Proteine (M2-1, M2-2) und eine Polymerase (L).

RSV hat einen einzigen Serotyp, der in zwei Hauptuntergruppen unterteilt ist, RSV A und RSV B, die jeweils mehrere Genotypen umfassen und deren Zuordnung auf der hochvariablen C-terminalen Region des G-Gens (HVR2) beruht. RSV verschiedener Genotypen können während einer einzigen Epidemie innerhalb derselben Gemeinschaft zirkulieren.

In der Literatur finden sich Primer/Sonden-Systeme die auf den Nachweis von konservierten Genen wie Polymerase (L), Nukleoprotein (N) oder Matrixprotein (M) gerichtet sind. Einige Systeme ermöglichen nur eine gemeinsame Erfassung der zwei Hauptuntergruppen, während andere eine Differenzierung nach RSV A und RSV B erlauben.

Abwasserproben, die mit RSV A- und RSV B-Viruspartikeln gespikkt wurden, zeigten bei Anwendung etablierter Extraktionsmethoden akzeptable Wiederfindungsraten. Im Vergleich zur wässrigen Phase konnten in Extrakten der entsprechenden partikulären Phasen der mit RSV A bzw. RSV B gespikkten Abwasserproben nur sehr geringe Virus-Konzentrationen bestimmt werden, sodass die Eignung der routinemäßig für den SARS-CoV-2-Nachweis aus der Flüssigphase gewonnenen Extrakte auch für eine RSV A und RSV B Quantifizierung gegeben sein dürfte.

Weitere Validierungen sind noch nötig und in Bearbeitung, um ein eindeutiges Verfahren beschreiben zu können.

5. Qualitätskontrolle der PCR Messergebnisse

Als geeignetes Verfahren hat sich der Vergleich der ermittelten Virusgenom-Kopien (SARS-CoV-2, Influenzaviren, RSV) mit den parallel gemessenen Konzentrationen anderer, in der jeweiligen Abwasserprobe enthaltenen Viren, welche nachweislich aus humanen Fäkalien stammen, bewährt



(z.B. der Darm-assoziierte Bakteriophage CrAssphage oder das Pflanzenvirus Pepper-Mild-Mottle Virus (PMMoV), das über die Nahrung aufgenommen wird). Die Genom-Kopien dieser Kontrollviren müssen dabei mit der gleichen Probenaufbereitung (Aufkonzentrierung, Extraktion) und der gleichen Nachweismethode (qPCR bzw. dPCR oder ddPCR) bestimmt werden wie die zu analysierenden pathogenen Viren.

Die quantifizierten Kontrollviren können neben der internen Kontrolle auch in der Normalisierung als alternative Normalisierungs-Parameter für ermittelte Daten verwendet werden.



Im Rahmen einer Messreihe für einen Kläranlagenstandort dürfen sowohl die Probenahme, die Aufkonzentrierungsmethoden als auch die nachfolgenden Detektionsmethoden nicht signifikant verändert werden, um die einzelnen Messwerte der Kläranlage über die Zeit vergleichen zu können.

| | | |
|--------------------------------|---|--|
| Kontakt | Umweltbundesamt, abwassersurveillance@uba.de Robert Koch-Institut, abwassersurveillance@rki.de | |
| Finanzierung | Das BMG fördert das Abwassermonitoring bis Ende 2025 im Rahmen des Vorhabens "Abwassermonitoring für die epidemiologische Lagebewertung (AMELAG)" | |
| Danksagung | Die Inhalte des Technischen Leitfadens entstanden in Zusammenarbeit mit den beteiligten Laboren und Expertinnen und Experten des AMELAG Projektes. | |
| Weitergehende Literatur | <p>Markt R, Mayr M, Peer E, Wagner AO, Lackner N, Insam H. Detection and Stability of SARS-CoV-2 Fragments in Wastewater: Impact of Storage Temperature. <i>Pathogens</i>. 2021 Sep 18;10(9):1215. doi: 10.3390/pathogens10091215.</p> <p>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, Walter B, Braun U., Schumacher J (2024). SARS-CoV-2-Abwassersurveillance in Deutschland im Rahmen des Projekts AMELAG. <i>Epidemiologisches Bulletin</i> 34:16-26.</p> <p>Schattschneider A, Greiner T, Beyer S, Hans J, Correa Martinez C, Eckmanns T, Diercke M, Schumacher J (2024). Abwasser enthält Informationen für die öffentliche Gesundheit: Mögliche Anwendungen für eine Abwassersurveillance. <i>Epidemiologisches Bulletin</i> 34:3-15.</p> | |