

Bestimmung von SARS-CoV-2 in Abwasserproben der Kläranlagen der Landeshauptstadt Wiesbaden

AW 2021-2

Prof. Dr. Susanne Lackner, Dr. rer.nat. Laura Orschler, Dr.-Ing. Shelesh Agrawal



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Schlussbericht

Stand 30.07.2021



Ausführende Stelle:

Technische Universität Darmstadt
Institut IWAR
Fachgebiet Abwasserwirtschaft
Franziska-Braun-Straße 7
64287 Darmstadt

Projektbearbeitung: Prof. Dr. Susanne Lackner
Dr.rer.nat. Laura Orschler
Dr.-Ing. Shelesh Agrawal

Projektlaufzeit: 28.04.2021 – 16.06.2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	iii
1 Zielstellung	1
2 Methodisches Vorgehen.....	1
3 Ergebnisse.....	4
3.1 Status zu Beginn des Projekts	4
3.2 Nachweise der Viren-RNA mittels PCR.....	5
3.3 Genomsequenzierung	7
4 Zusammenfassende Bewertung	11
Referenzen.....	12
Anhang	13

1 Zielstellung

Ziel dieses Projektes war es die Konzentration von SARS-CoV-2 im Zulauf der beiden Kläranlagen in Wiesbaden zu bestimmen, mit spezifischem Fokus auf den Anteil der SARS-CoV-2 Variante B.1.1.7, die sich seit Anfang 2021 auch in Deutschland rasant ausbreitet. Abwasseruntersuchungen können helfen Trends und die Ausbreitung von Varianten frühzeitig nachzuweisen und daraus den Anteil der Variante am Gesamtaufkommen und ihre zeitliche Entwicklung abschätzen zu können. Zusätzlich können grobe Trends zum Infektionsgeschehen aus den Wiesbadener Abwasserproben abgeleitet werden.

Für eine Umsetzung in Wiesbaden wurden zwei Methoden zur Verfügung eingesetzt

- die quantitative Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR), basierend auf dem Nachweis von SARS-CoV-2 Viren durch die Detektion von bestimmten Zielgenen.
- die Genomsequenzierung für einen umfassenden Nachweis der Viren- Mutationen

Die Untersuchungen in Wiesbaden sollen mit beiden Methoden erfolgen und die Zuläufe der beiden Klärwerke der Entsorgungsbetriebe der Landeshauptstadt Wiesbaden (ELW) über einen Zeitraum von 8 Wochen von 28.04.2021 – 16.06.2021 beprobt und auf das Vorkommen von SARS-CoV-2 untersucht.

2 Methodisches Vorgehen

Im Detail wurden folgende Leistungen durchgeführt:

- 1) Bestimmung der Konzentration des SARS-CoV-2 Wildtyps auf Basis der drei Zielgene Orf1ab, N, und S mittels RT-qPCR, in Kombination mit einer mutationsspezifischen PCR für die SARS-CoV-2 Variante B 1.1.7 anhand der Mutationen N501Y, P681H, Del69/70
- 2) Genomsequenzierung zur Detektion aller nachweisbaren Mutationen von SARS-CoV-2 zur Ableitung des Vorkommens weitere Varianten in den Abwasserproben.

Die Probenahme für die RT-qPCR (1) fand einmal wöchentlich statt. Genomanalysen (2) wurden von den Proben der ersten beiden Wochen und von den Wochen fünf und sechs nach Beginn der Messkampagne durchgeführt. Zusätzlich zum Angebot wurden zwei weitere Proben sequenziert.

In diesem Projekt wurden zwischen KW 17 – 24 2021 24-h Mischproben des Rohabwassers genommen und direkt gekühlt an die TU Darmstadt für die weitere Analyse geliefert. SARS-CoV-2 RNA wurde aus 1 Liter Abwasserprobe aufkonzentriert und anschließend extrahiert.

qPCR Analytik:

Die extrahierte RNA wurde mit dem TaqPath COVID-19 RT-PCR Kit (Thermo Fisher Scientific) mit einem QuantStudio 3 Thermal Cycler analysiert. Dieses Kit enthält Primerpaare, die auf die N-, S- und ORF1ab-Gene abzielen und als Multiplex-Assay verwendet wurden. Jeder qPCR-Lauf wurde dreifach mit 50 μ l Volumen, mit 12,5 μ l TaqPath 1-Step Multiplex Master Mix (4X), 2,5 μ l COVID-19 Real Time PCR Assay Multiplex und 25 μ l nukleasefreiem Wasser durchgeführt. Dem Reaktionsgemisch wurden 10 μ l gereinigte und extrahierte virale RNA zugesetzt.

Reaktionen wurden als positiv gewertet, wenn die Zyklusschwelle unter 40 Zyklen lag, ansonsten negativ (d. h. kein Nachweis der SARS-CoV-2-RNA in der Probe). Die Nachweisgrenze lag bei 10 Kopien pro RT-qPCR-Reaktion.

Für die quantitative Analyse der Mutationen wurde das TaqPath™ SARS-CoV-2 Mutation Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) genutzt. Dieses Kit enthält Primerpaare, die auf die Mutationen N501Y, Del69/70 und P681H der VOC B.1.1.7 abzielen. Jeder qPCR-Lauf wurde dreifach mit 10 µl TaqPath 1-Step RT-qPCR Master Mix (4X), 1,0 µl TaqMan SARS-CoV-2 Mutation Panel Assay und 9 µl nukleasefreiem Wasser durchgeführt. Dem Reaktionsgemisch wurden 10 µl gereinigte und extrahierte virale RNA zugesetzt. Die RT-qPCR-Häufigkeitsdaten wurden in R mit ggplot223 (v0.9.3.1) analysiert.

Sequenzierung:

Die extrahierte RNA wurde für die Sequenzanalyse vorverarbeitet. Der wichtigste Vorverarbeitungsschritt umfasst die Amplikon-Generierung, die das komplette SARS-CoV-2-Genom abdeckt. Dazu wurden mehrere Sequenzierungsläufe auf einem Ion S5-Sequenzierer (ThermoFisher Scientific) durchgeführt, um eine hohe Anzahl von Lesevorgängen pro Probe zu erreichen. Anschließend wurden die generierten Sequenzen (Reads) mit dem Referenzgenom (Wuhan-Hu-1-NC_045512/MN908947.3) zum Nachweis der Mutationen verglichen.

Zur Charakterisierung sogenannter „Variants of Concern (B.1.1.7, B.1.351, P.1 und B.1.617.2)“ wurde eine eigens generierte Datenbank genutzt. Für diese Datenbank wurden regelmäßig Sequenzen und Mutationsprofile von GISAID heruntergeladen (<https://www.gisaid.org/>). Diese Datenbank enthält nur Informationen von vollständigen SARS-CoV-2-Genomen, die aus klinischen Proben in GISAID gemeldet wurden.

Für die Datenanalyse wurde das SARS-CoV-2 Research Plug-in Package verwendet, welches mit der Ion Torrent Suite Software (v5.12.2) des Ion S5 Sequenzierers installiert ist. Dabei wurde das Plugin SARS_CoV_2_coverageAnalysis (v5.16) verwendet, das die generierten Reads einem SARS-CoV-2-Referenzgenom (Wuhan-Hu-1-NC_045512/MN908947.3) unter Verwendung der in der Torrent Suite enthaltenen TMAP-Software zuordnet. Für die Mutationen wurden zusätzliche Ion-Torrent-Plugins verwendet. Zunächst wurden alle Einzelnukleotidvarianten (SNVs) mit dem Variant Caller (v5.12.0.4) mit den Standardparametern „Generic – S5/S5XL (510/520/530) – Somatic – Low Stringency“ aufgerufen. Anschließend wurde zur Annotation und Bestimmung des Basensubstitutionseffekts COVID19AnnotateSnpEff (v1.3.0.2), ein explizit für SARS-CoV-2 entwickeltes Plugin verwendet.

Die bedenklichen Varianten, (VOCs, hier B.1.1.7, B.1.1351, P.1 und B.1.617.2) wurden basierend auf der Abundanz einer Kombination von Mutationen, die mit der entsprechenden VOC assoziiert sind, charakterisiert. Dazu wurde ein Zwei-Indikator-Ansatz verwendet, um das Vorhandensein der VOCs in den Abwasserproben zu erfassen:

- (1) Mindestens 5 Mutationen jeder Abstammungslinie aus ausgewählten charakteristischen Mutationen sollten in der Abwasserprobe vorhanden sein.
- (2) Unter diesen 5 Mutationen sollte mindestens eine Mutation vorhanden sein, die für die jeweilige VOC charakteristisch ist, d.h. alleinig in dieser VOC vorkommt.

Die Bestimmung der Häufigkeit einer VOC (RA) basiert auf dem Verhältnis der Summe der Read-Häufigkeit der Mutationen (M_s) eines VOC durch die Summe der Read-Häufigkeit aller in einer Probe gefundenen Mutationen (M_a).

$$RA = \frac{M_s}{M_a} \cdot 100$$

mit: RA : Relative Abundanz einer einzelnen VOC
 M_s : Summe der Read-Abundanz der charakteristischen Mutationen einer VOC
 M_a : Summe der Read-Abundanz aller in einer Probe gefundenen Mutationen

3 Ergebnisse

3.1 Status zu Beginn des Projekts

Im Januar 2020 wurde erstmals über ein neuartiges Coronavirus (SARS-CoV-2) als Auslöser einer überwiegend durch Tröpfcheninfektion übertragenen respiratorischen Erkrankung (COVID-19) berichtet (Trimborn et al., 2021). Seitdem die Weltgesundheitsorganisation (WHO) COVID-19 aufgrund von weltweit zunehmenden Fallzahlen zur Pandemie erklärte, stellt das Infektionsgeschehen eine Ausnahmesituation für die gesamte, globale, öffentliche Gesundheit dar (WHO, 2020). Die Krankheit äußert sich in Symptomen wie Fieber, Myalgie, Müdigkeit und trockenem Husten und hat inzwischen praktisch jedes Land der Welt erreicht. Bisher wurden mehr als 150 Millionen bestätigte Fälle gemeldet. Die Pandemie hat in vielen Ländern zu landesweiten Lockdowns und Kontaktbeschränkungen geführt, um die Ausbreitung der Krankheit zu verhindern (Kataki et al., 2021).

Durch die andauernde Ausbreitung von SARS-CoV-2 hat sich das Virus seit den ersten Infektionen genetisch verändert. Denn das Virus hat eine rasche Anpassung an den neuen Wirt und besonders Mutationen in den Bindungsstellen des Spike-Proteins können die Infektiosität des Virus erhöhen (Korber et al., 2020). Die meisten Mutationen verschwinden wieder, einige haben jedoch das Potential, das Verhalten der Viren zu verändern.

Aufgrund von neuen Erkenntnissen in der Molekularbiologie gehört das Sars-CoV-2 Virus schon jetzt zu den genetisch am besten analysierten Krankheitserregern. Auf der Plattform GISAID werden fast täglich die Ergebnisse von Genom-Analysen aus der ganzen Welt hochgeladen. Besonders im Bereich der Humanmedizin werden in Deutschland entsprechend der Inzidenzen ca. 10% der positiv getesteten Proben mit der Genomsequenzierung analysiert (Robert-Koch Institut).

Die Genomsequenzierung von Abwasser hat sich zusätzlich für die Analyse von Humanproben in den letzten Monaten zu einem hilfreichen zusätzlichen Analysetool entwickelt. Dabei werden 24-h Mischproben aus dem Zulauf entnommen und die Virus-RNA extrahiert und anschließend genomsequenziert. Der Vorteil dieser Methode ist, dass dabei ein Querschnitt der Infektionen durch das Stadtgebiet gezogen werden kann und sowohl Personen, die symptomfrei sind und daher nicht detektiert werden können, als auch Personen, die sich nicht testen lassen, mit erfasst werden können (Agrawal et al., 2021b). Als zusätzlichen Vorteil bietet die Genomsequenzierung von Abwasser auch die Möglichkeit, Mutationen frühzeitig zu entdecken und neu auftretende Mutationen nachzuweisen und den Trend von besorgniserregenden Varianten (variants of concern, VOC) zu verfolgen (Agrawal et al., 2021a).

Zum Start der Probenahme in Wiesbaden meldete das Robert-Koch-Institut zur aktuellen Lage einen folgenden Wochenbericht:

Die 7-Tages-Inzidenz lag deutschlandweit bei 153 Fällen pro 100.000 Einwohner und es konnte eine Abschwächung des starken Anstiegs der Fallzahlen festgestellt werden. Der 7-Tage-R-Wert lag unter 1. Die VOCs zum Zeitpunkt Ende April wurden aufgeführt als: B.1.1.7 (alpha-Variante), B.1.351. (beta-Variante) und P.1 (gamma-Variante). Die Variante B.1.1.7 war der vorherrschende COVID-19- Erreger (Robert-Koch Institut).

3.2 Nachweise der Viren-RNA mittels PCR

Während der acht-wöchigen Beprobung des Hauptklärwerks Wiesbaden (Abbildung 1) und des Klärwerks Wiesbaden-Biebrich (Abbildung 2) wurden Messungen zur Detektion der Viren RNA und zur anteiligen Bestimmung der Alpha-Variante (B.1.1.7) durchgeführt und den Meldezahlen des RKI und des Gesundheitsamts Wiesbaden gegenübergestellt. Die Beprobung startete bei einer Inzidenz von ca. 160 und lag am Ende der acht Wochen bei 11. Die Konzentration von SARS-CoV-2 lag am 28.04.2021 bei 10^5 Genkopien / L für das HKW und $2 \cdot 10^5$ Genkopien / L für das KWB.

Während des Probenahmezeitraums blieben die Werte für das HKW und KWB bis zum 12.05.2021 weitest gehend konstant und sanken dann leicht auf 10^4 Genkopien / L ab. In der darauffolgenden Woche konnte dann wieder ein Anstieg gemessen werden bevor die Werte bis zum 09.06.2021 auf 10^3 Genkopien / L absanken. Bei der letzten Probenahme am 16.6.2021 lagen die Werte im HKW schon unter der Bestimmungsgrenze und im KWB bei $6 \cdot 10^3$ Genkopien / L. Der Anteil an AA Mutationen lag im HKW dabei durchgehend im Bereich zwischen 90 und 99%, jedoch konnte auch hier im Juni ein deutliches Absinken der Viruslast festgestellt werden. Dagegen konnten im KWB größere Schwankungen zwischen 85% und 100% nachgewiesen werden und ebenfalls ein deutliches Absinken der Viruslast seit Anfang Juni. Zum letzten Probenahmezeitpunkt lagen die PCR Bestimmungen für die Varianten unter der Bestimmungsgrenze.

Diese Ergebnisse entsprechen auch den Erwartungen, da der Lagebericht des Robert-Koch Instituts zu diesem Zeitpunkt eine deutschlandweite Inzidenz von 10 Fällen pro 100.000 Einwohner vermeldete und ebenfalls einen deutlichen Rückgang mit einem stark abflachenden Trend. Allerdings hat das RKI über den gesamten Zeitraum der Probenahme eine weitere VOC festgelegt, dabei handelt es sich um die Variante B.1.617.2 (delta-Variante), die aus diesem Grund dann auch in die Analysen miteingeflossen ist.

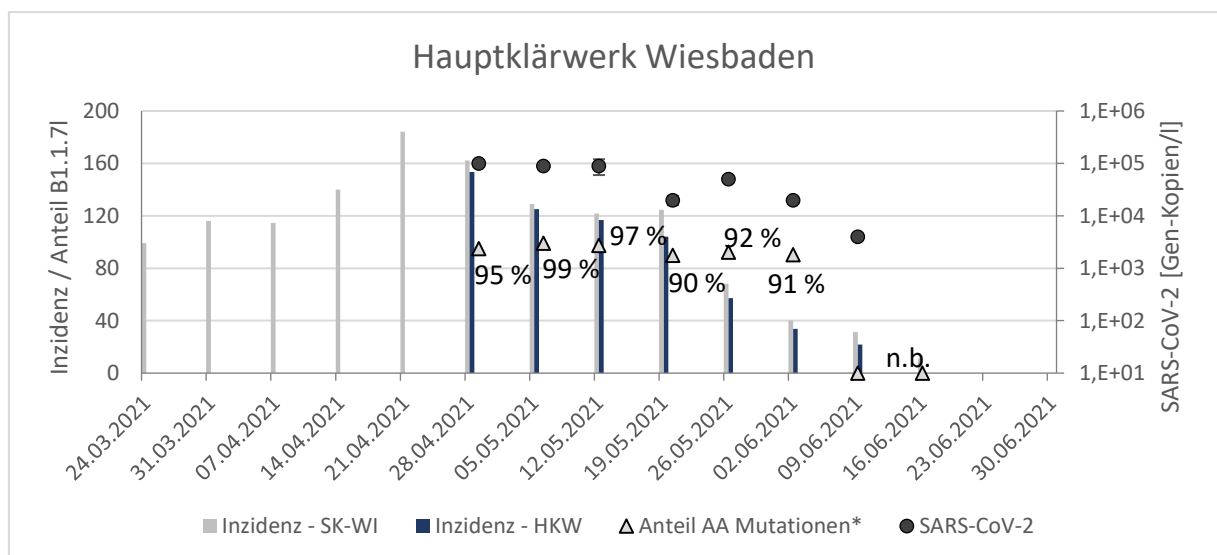


Abbildung 1: Inzidenzen des Stadtkreises Wiesbaden (RKI, <https://survstat.rki.de/Content/Query/Create.aspx>), Inzidenzwerte des Einzugsgebietes des Hauptklärwerks Wiesbaden (Daten Gesundheitsamt Wiesbaden), Konzentrationen von SARS-CoV-2 im Rohabwasser und prozentualer Anteil der *Alpha*-Variante B.1.1.7 anhand der drei Mutationen N501Y, P681H und Del69/70. (n.b.: nicht bestimmbar)

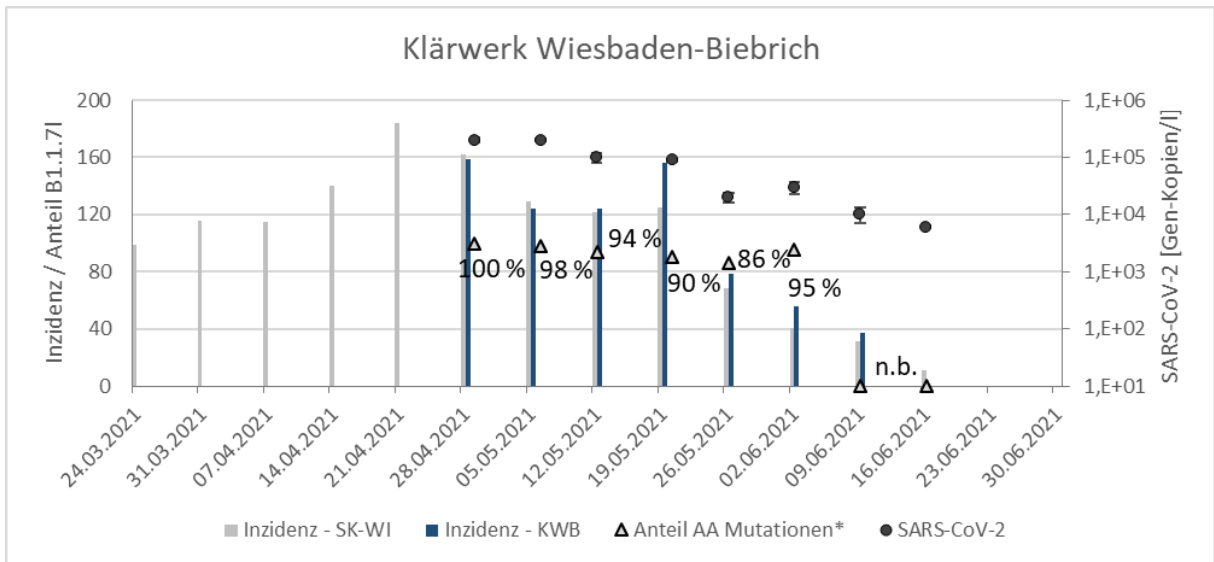


Abbildung 2: Inzidenzen des Stadtkreises Wiesbaden (RKI, <https://survstat.rki.de/Content/Query/Create.aspx>), Inzidenzwerte des Einzugsgebietes des Klärwerks Wiesbaden-Biebrich (Daten Gesundheitsamt Wiesbaden), Konzentrationen von SARS-CoV-2 im Rohabwasser und prozentualer Anteil der *Alpha*-Variante B.1.1.7 anhand der drei Mutationen N501Y, P681H und Del69/70. (n.b.: nicht bestimmbar)

In Abbildung 3 und Abbildung 4 sind die PCR Daten korrigiert mit dem Kläranlagenzulauf als Tagesfracht an SARS-CoV-2 Genkopien / d dargestellt. Die Trends zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf im Vergleich zur Konzentration-basierten Darstellung. Die Frachten von SARS-CoV-2 lagen am 28.04.2021 bei je 10^{13} Genkopien / Tag für das HKW und KWB. Diese Fracht-basierte Darstellung zeigt für das HKW deutlichere Schwankungen über den gesamten Probezeitraum als die Konzentrationen. Während am 19.05.2021 der Wert auf 10^{12} Genkopien / Tag absank, stieg er in der darauffolgenden Woche wieder auf 10^{13} Genkopien / Tag an und sank dann erneut konstant im Juni 2021 auf 10^{11} Genkopien / Tag. Dagegen blieben die Werte für das KWB bis zum 12.05.2021 konstant, sanken dann leicht auf 10^{12} Genkopien / Tag und fielen stetig weiter über die gesamte Zeit der Probenahme auf 10^{11} Genkopien / Tag. Von den acht Probennahmetagen war an zwei Tagen (12.05. und 26.05.2021) Regenwetterzufluss und die Zulaufmenge lag ca. bei der 2-3 fachen Abwassermenge im Vergleich zu den Trockenwetterzuflüssen an den anderen Tagen.

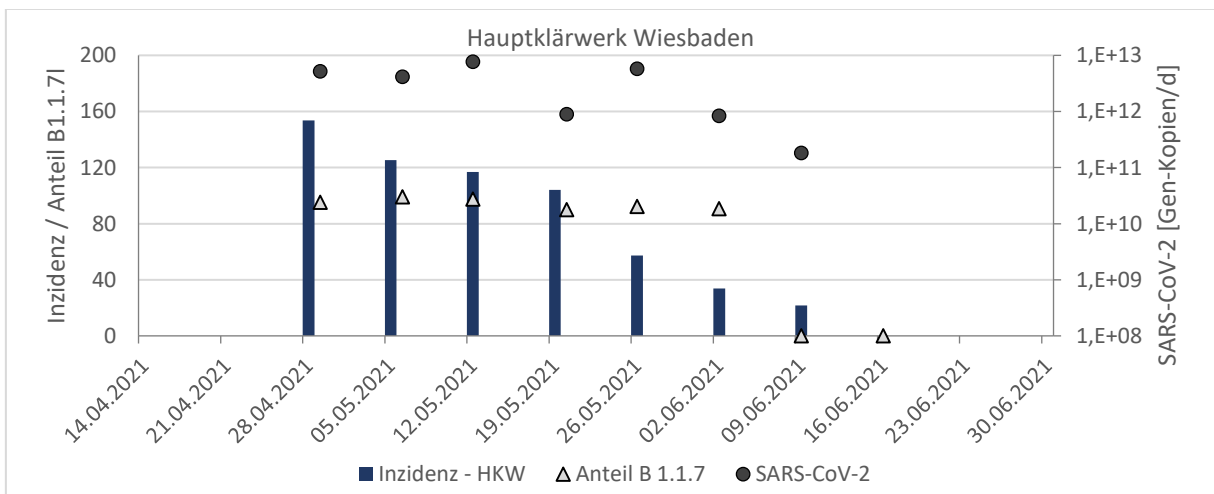


Abbildung 3: Inzidenzwerte des Einzugsgebietes des Hauptklärwerks Wiesbaden (Daten Gesundheitsamt Wiesbaden), Fracht an SARS-CoV-2 im Rohabwasser und prozentualer Anteil der *Alpha*-Variante B 1.1.7.

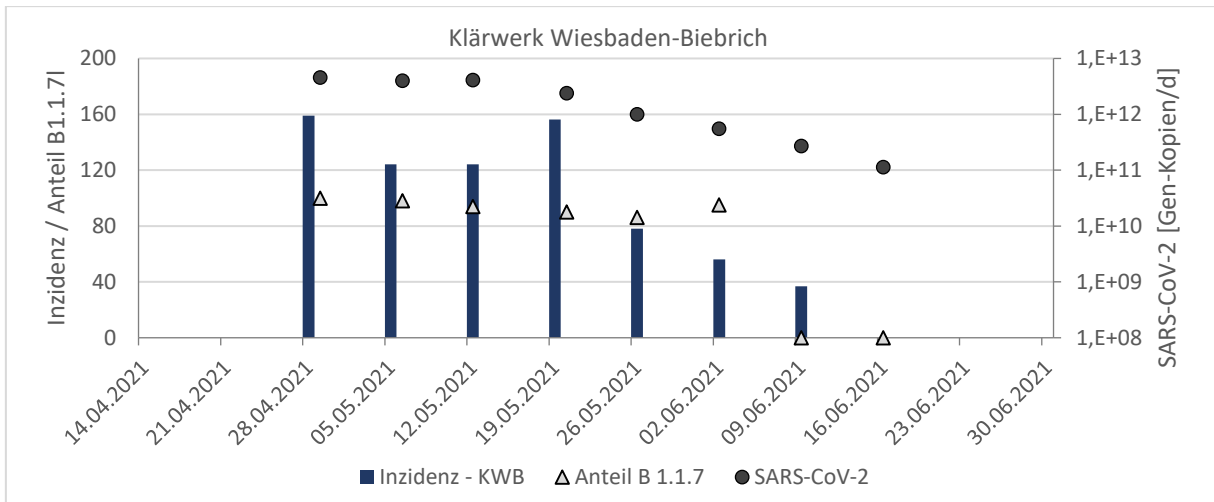


Abbildung 4: Inzidenzwerte des Einzugsgebietes des Klärwerks Wiesbaden-Biebrich (Daten Gesundheitsamt Wiesbaden), Fracht an SARS-CoV-2 im Rohabwasser und prozentualer Anteil der *Alpha*-Variante B.1.1.7.

3.3 Genomsequenzierung

Zusätzlich zu der konventionellen qPCR, wurde im Rahmen des Projekts auch Genomanalysen von SARS-CoV-2 in den Proben durchgeführt. Hierbei ist das Ziel, die jeweiligen Mutationen und VOCs in den Proben zu bestimmen um anschließend die Trends in der prozentualen Verteilung der Mutationen und VOCs frühzeitig zu erkennen.

Abbildung 5 fasst die Daten der Genomsequenzierung zusammen. Der Fokus lag darauf, die Anteile der Variant of Concern (VOCs) anteilig zu bestimmen. Für das HKW zeigte sich, dass der Anteil der Delta-Variante am 12.05. schon bis zu 25 % auszumachen schien. Dieser Trend bestätigte sich für die Messung am 16.06.2021 mit einem Anteil der Delta-Variante von ca. 60 %. Zu beachten ist jedoch, dass es aufgrund der niedrigen Inzidenzwerte und damit der geringen Virenlast im Abwasser zu Unsicherheiten bei der Sequenzierung und der Datenauswertung kommen konnte. Auch in den Proben des KWB ließ sich ein ansteigender Trend bzgl. der Delta-Variante erkennen, jedoch ist auch hier auf die Problematik der niedrigen Inzidenz und damit Viruslast hinzuweisen. Eine Einschätzung zu den Wahrscheinlichkeiten des Auftretens der VOCs findet sich in Abbildung 7.

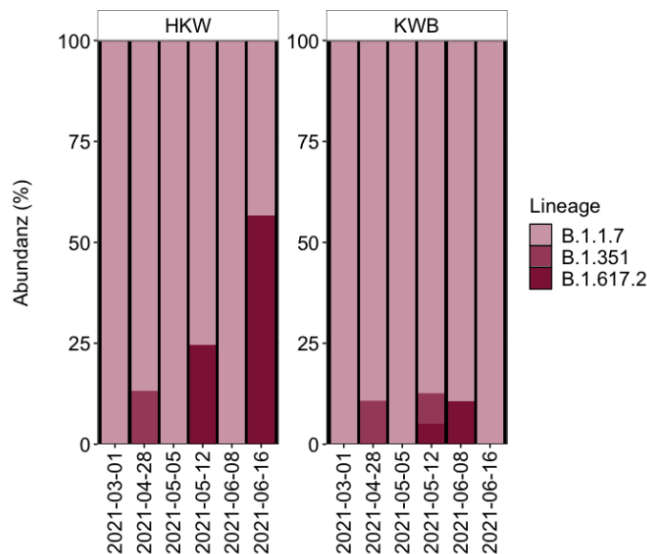


Abbildung 5: Relative Häufigkeit der Virus-Varianten *Alpha* (B.1.1.7), *Beta* (B.1.351) und *Delta* (B.1.617.2)

Eine detaillierte Aufschlüsselung des Vorkommens der Spike-Proteinmutationen ist dem Anhang zu entnehmen (Abbildung-A 2).

Zusätzlich wurden am 17.06.2021 Schöpfproben aus dem Kanalnetz und KWB entnommen, um eine zusätzliche Aussage für einen Teilbereich in Wiesbaden treffen zu können, da hier kurz zuvor vom Gesundheitsamt ein vermehrtes Auftreten der Delta-Variante beobachtet wurde. Die Auswertung der Schöpfproben aus dem Kanal zeigt sehr deutlich einen Anteil von 100% der Delta-Variante und unterstreicht damit den Trend, der bereits in den Proben seit Anfang Juni festgestellt werden konnten (Abbildung 6). Für die korrespondierende Zulaufprobe des KWB lag der Anteil der Delta-Variante bei ca. 20 %. Hier zeigt sich auch der Vorteil einer sehr punktuellen Analyse im Kanalnetz für zukünftiges SARS-CoV-2 Monitoring im Abwasser. Während in der Humanmedizin nur ein Bruchteil der Proben gemessen werden, können durch die Analyse von nur einer Probe aus dem Kanalnetz bereits ein bedeutender Teil der Einwohner dieses Gebiets abgedeckt werden und dadurch frühzeitig in das Infektionsgeschehen eingegriffen werden.

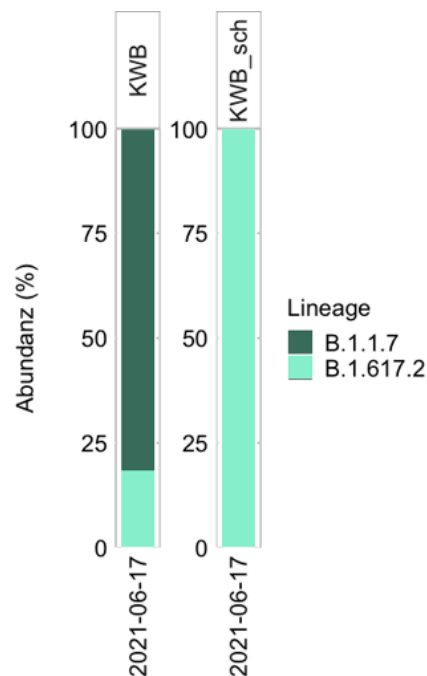


Abbildung 6: Schöpfproben aus dem Kanal und dem Zulauf des KWB vom 17.06.2021

In Abbildung 7 sind die jeweiligen Mutationen bezogen auf die jeweiligen VOCs entsprechend ihrer Prävalenz aufgezeigt. Dabei versteht man unter Prävalenz die Anzahl der Mutationen, die charakteristisch für die jeweilige VOC sind, in Relation zu der Anzahl aller gefundenen Mutationen. Je höher der Wert ist, desto höher ist die Prävalenz der jeweiligen VOC, aufgrund einer höheren Anzahl an Mutationen in der Probe.

Die Ergebnisse der Proben des HKW zeigen, dass die Beta-Variante Ende April lediglich eine untergeordnete Rolle spielt, wohingegen die Alpha-Variante konstant vorherrschte. Erst als die Delta-Variante als neue VOC Mitte Juni nachgewiesen wurde, verschob sich dieser Faktor von der Alpha-Variante zur Delta-Variante. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei den Ergebnissen der Proben des KWB, bei denen ebenfalls im gesamten Zeitraum die Alpha-Variante konstant eine vorherrschende Rolle einnahm. Nur am 28.04. und 12.05 zeigte sich eine geringe

Prävalenz für die Beta-Variante und sowie am 12.05. und 08.05. für die Delta-Variante. Es ist wahrscheinlich, dass sich die Prävalenz im Zeitraum Juni bis Juli deutlich zur Delta-Variante verschoben hat.

Ein Vergleich mit den gemeldeten Fällen des Gesundheitsamtes (Abbildung-A 1) konnte das Auftreten der Delta Variante ca. 2-3 Wochen vor den ersten klinischen Meldungen im Abwasser bereits detektiert werden.

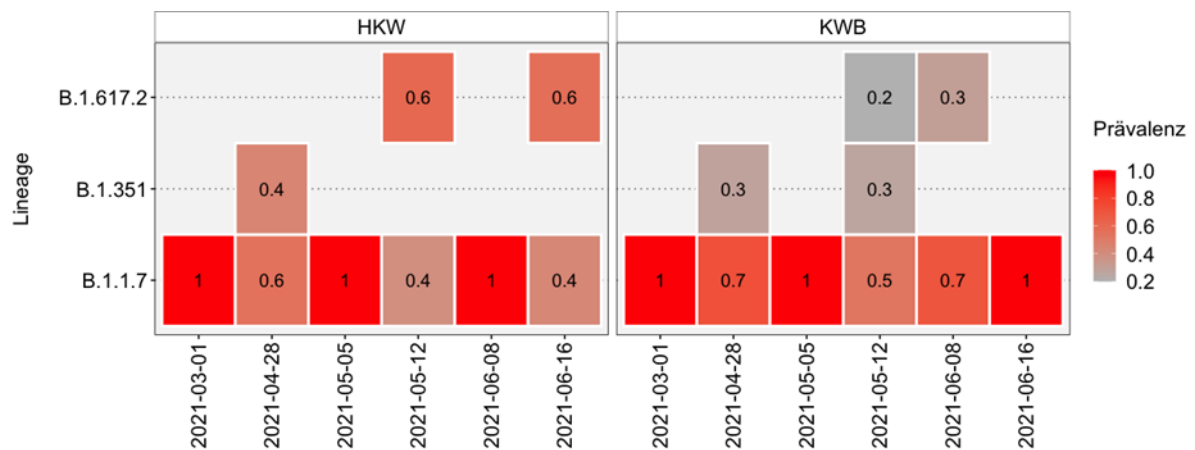


Abbildung 7: Übersicht über die Wahrscheinlichkeit der Prävalenzen der jeweiligen Mutationen der VOCs in den Proben des HKW (links) und KWB (rechts); eine starke Prävalenz ist durch die Farbe dunkelrot gekennzeichnet und eine sehr geringe Prävalenz durch die Farbe grau.

Coronaviren sind membranumhüllte RNA-Viren und bilden Virionen, die große (20-25 nm lange) Oberflächenproteine (Spikes) besitzen. Das S (Spike)-Protein ist für den Eintritt in die Wirtszelle zuständig und besteht aus zwei Untereinheiten: die S1-Untereinheit enthält die receptor binding domain (RBD), die an den Wirtszellrezeptor bindet; die S2-Untereinheit vermittelt danach die Fusion von Virushülle und Zellmembran (Laue et al., 2021). Gerade die VOC B.1.1.7 zeichnet sich durch eine hohe Anzahl an Mutationen im Spike Protein aus und zeigt dadurch eine höhere Übertragbarkeit des Virus, eine höhere Rate an infizierten Kontaktpersonen, eine erhöhte Fallsterblichkeitsrate sowie eine 1.5-fach erhöhte Reproduktionszahl dieser Variante (Robert-Koch Institut). In Abbildung 8 ist daher die Abundanz aller Mutation im S-Protein dargestellt, die charakteristische Mutationen für die Alpha-Variante B.1.1.7 sind (Deletion H69/V70; Deletion 144; N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H). Diese Daten sind ergänzend zu der qPCR Analyse, die im Rahmen dieses Projekts für B.1.1.7 durchgeführt wurden.

Dabei zeigt sich für beide Kläranlagen über den gemessenen Zeitraum eine deutliche Abnahme der Abundanz, die am 16.06.2021 kaum noch messbar ist. Das entspricht auch den Ergebnissen, die mit der qPCR erzielt wurden.

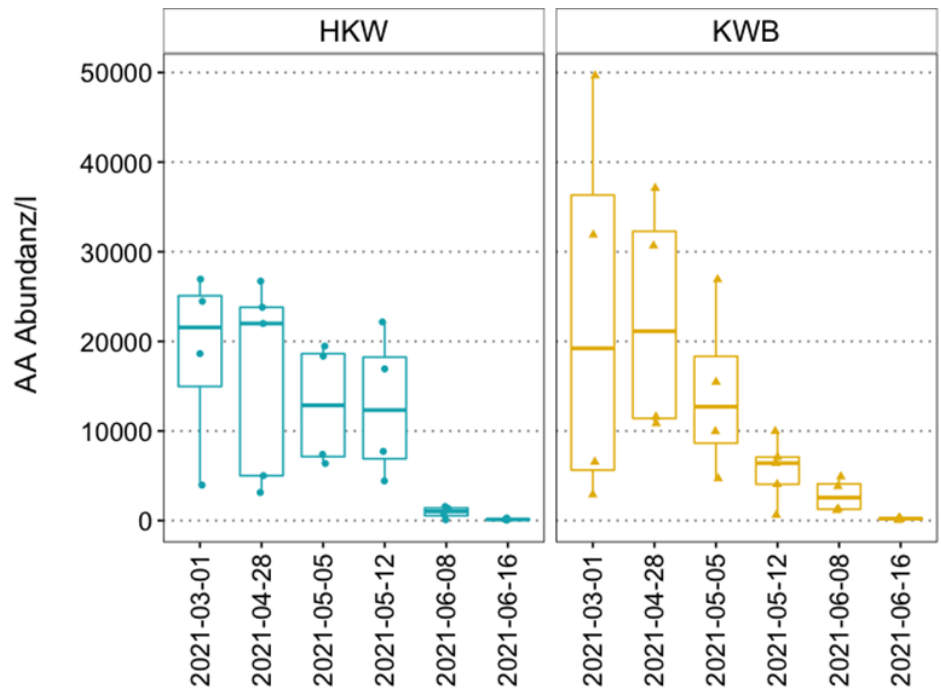


Abbildung 8: Abundanz aller Mutation im S-Protein, die charakteristische Mutationen für die VOC B.1.1.7 darstellen für das HKW (links) und KWB (rechts).

4 Zusammenfassende Bewertung

Das Projekt in Zusammenarbeit mit den Entsorgungsbetrieben der Landeshauptstadt Wiesbaden (ELW), die die Proben in den Zuläufen ihrer beiden Kläranlagen (HKW und KWB), und der TU Darmstadt lieferte der Stadt und dem Gesundheitsamt Wiesbaden Analysen von SARS-CoV-2 aus Abwasserproben im Zeitraum von Ende April bis Mitte Juni 2021. Dabei konnten sowohl mittels qPCR der Trend der SARS-CoV-2 RNA über den zu untersuchenden Zeitraum detektiert, als auch eine erfolgreiche Genomanalyse mittels Next Generation Sequencing durchgeführt werden. Die Vorteile des abwasserbasierten Monitorings haben sich zum einen durch die schnelle Analyse eines punktuellen Ausbruchs im Stadtgebiet Wiesbadens gezeigt, sowie durch den frühzeitigen Nachweis der delta-Variante als diese erst sehr vereinzelt in Humanproben nachgewiesen werden konnte. Im Vergleich zu klinischen Daten wurde eine 2 Wochen frühere Zunahme des Anteils der Delta-Variante basierend auf der Abwassergenomsequenzierung beobachtet (Abbildung 5, Abbildung-A 1).

Der potenzielle Vorteil der Umweltüberwachung in abwasserbasiertem Monitoring besteht darin, dass sie den Gesamtzustand eines bestimmten Einzugsgebiets mit viel weniger Aufwand als die klinische Überwachung vorhersagen kann. Durch die zeitnahe Untersuchung der Abwasserproben kann die WBE einen Einblick in die Ausbruchssituation im gesamten Einzugsgebiet geben. Im Gegensatz dazu erfordert die klinische Überwachung mehr Zeit und Kosten für die Probenentnahme und das Testen. Ein weiterer großer Vorteil der WBE ist die Erfassung von Personen mit asymptomatischen und präsymptomatischen Infektionen, die möglicherweise nicht in die klinische Überwachung einbezogen werden.

Die europäische Kommission empfiehlt Städten über 150.000 Einwohner bis Anfang Oktober ein funktionierendes abwasserbasiertes Monitoring zu etablieren. In diesem Projekt konnten deutlich die Vorteile eines solchen Konzepts herausgearbeitet werden und verdeutlichen auch, dass eine enge Zusammenarbeit zwischen Gesundheitsamt, Stadtverwaltung und Kläranlage die Möglichkeit bietet, frühzeitig auf neue VOCs oder punktuelle Hotspots zu reagieren und dabei auch bei sinkenden Fallzahlen, Lockerungen für die Bevölkerung schneller zu ermöglichen.

Referenzen

- Agrawal, S., Orschler, L., & Lackner, S. (2021a). Metatranscriptomic Analysis Reveals SARS-CoV-2 Mutations in Wastewater of the Frankfurt Metropolitan Area in Southern Germany. *Microbiology Resource Announcements*, 10(15).
- Agrawal, S., Orschler, L., & Lackner, S. (2021b). Long-term monitoring of SARS-CoV-2 RNA in wastewater of the Frankfurt metropolitan area in Southern Germany. *Scientific Reports*, 11(1), 5372. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84914-2>
- Kataki, S., Chatterjee, S., Vairale, M. G., Sharma, S., & Dwivedi, S. K. (2021). Concerns and strategies for wastewater treatment during COVID-19 pandemic to stop plausible transmission. *Resources, Conservation and Recycling*, 164, 105156. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2020.105156>
- Korber, B., Fischer, W., Gnanakaran, S., Yoon, H., Theiler, J., Abfalterer, W., Foley, B., Giorgi, E., Bhattacharya, T., Parker, M., Partridge, D., Evans, C., Freeman, T., de Silva, T., on behalf of the Sheffield COVID-19 Genomics Group, LaBranche, C., & Montefiori, D. (2020). Spike mutation pipeline reveals the emergence of a more transmissible form of SARS-CoV-2 [Preprint]. *Evolutionary Biology*. <https://doi.org/10.1101/2020.04.29.069054>
- Laue, M., Kauter, A., Hoffmann, T., Möller, L., Michel, J., & Nitsche, A. (2021). Morphometry of SARS-CoV and SARS-CoV-2 particles in ultrathin plastic sections of infected Vero cell cultures. *Scientific Reports*, 11(1), 3515. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82852-7>
- Trimborn, A., Gerigk, M., Heininger, A., Santhanam, N., Walter, T., & Lange, B. (2021). Evaluation einer SARS-CoV-2-Teststrategie zu Beginn der COVID-19-Pandemie in einem südwestdeutschen Universitätsklinikum. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 64(3), 353–359. <https://doi.org/10.1007/s00103-021-03287-z>
- WHO. (2020). Naming the Coronavirus Disease(COVID-19) and the Virus That Causes It. [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it) (2020)

Anhang

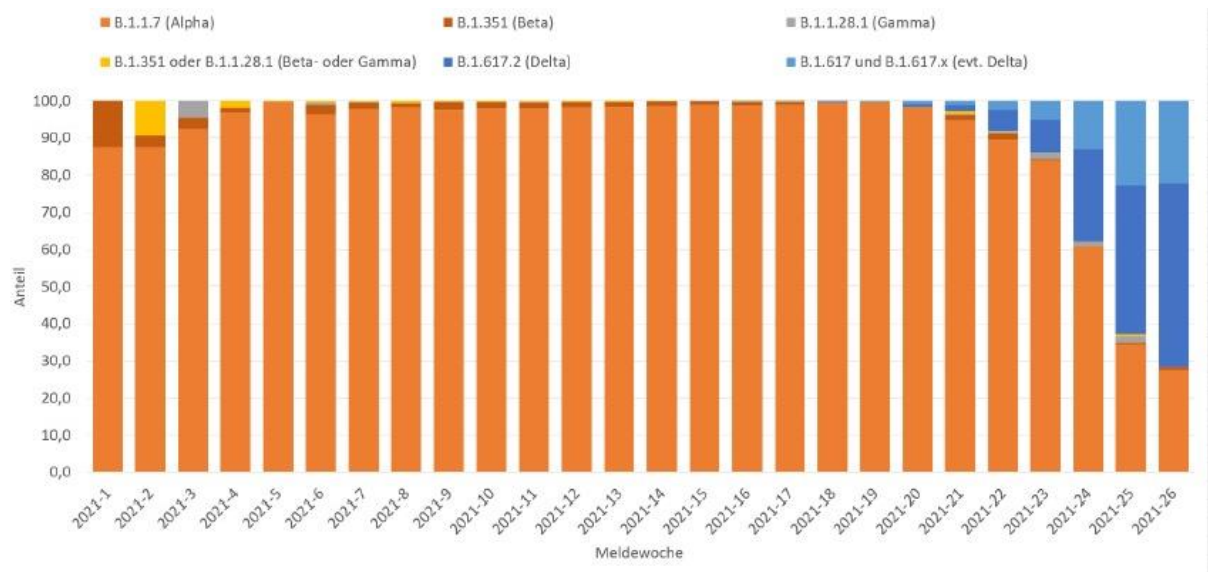


Abbildung-A 1: Anzahl ausgewählter Varianten von SARS-CoV-2 nach Meldewoche 2020 in Wiesbaden, Daten des Gesundheitsamts Wiesbaden. (Stand 09.07.2021)

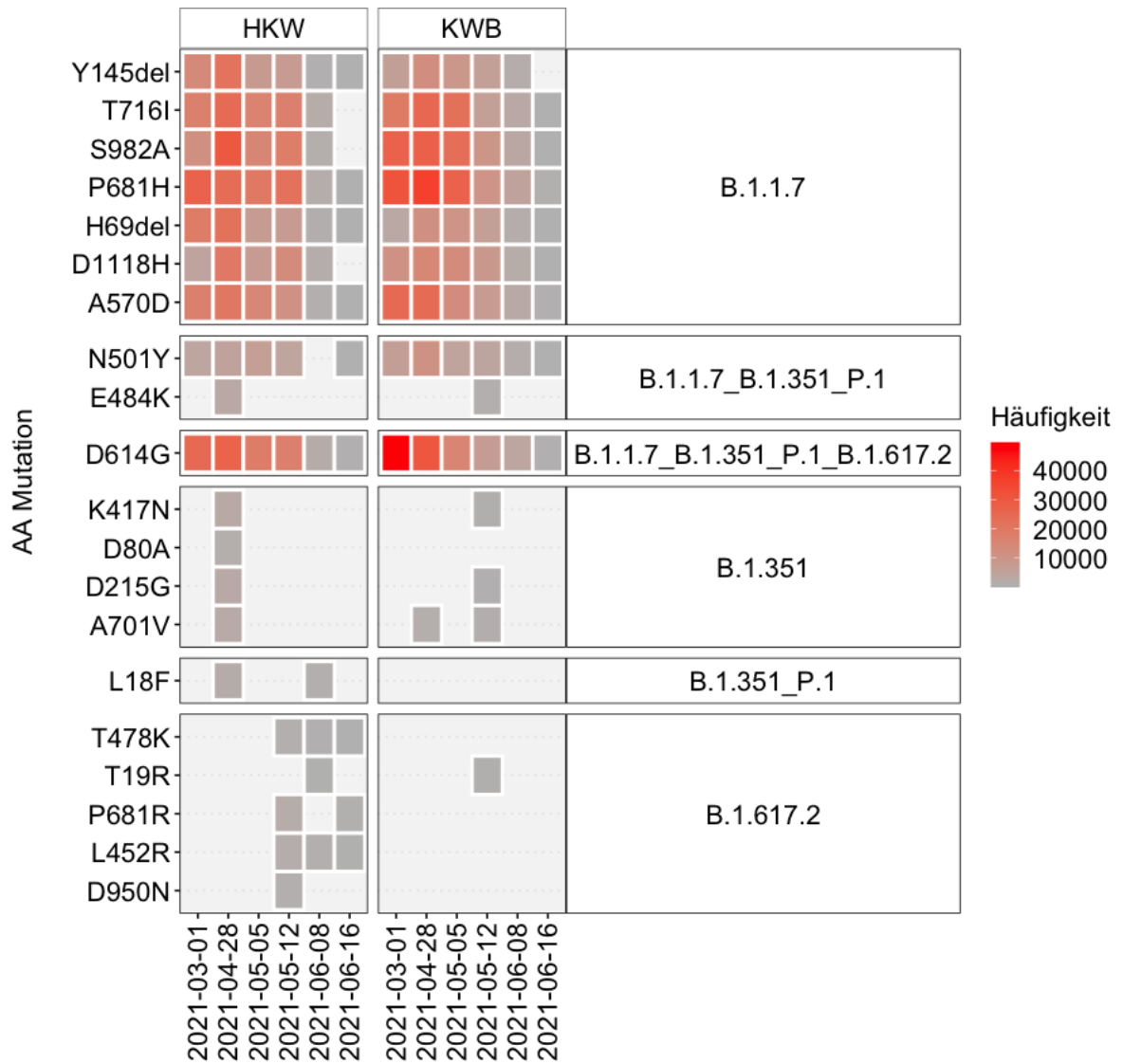


Abbildung-A 2: Heat-Map der Häufigkeit ausgewählter, charakteristischer AA Mutationen (der Spike-Proteinmutationen) und deren Zuordnung zu den entsprechenden VOCs. Diese Mutationen werden von der ECDC als charakteristische Mutationen für die Bestimmung der VOCs auch in den Abwasserproben genutzt. Es ist wichtig zu beachten, dass einige gemeinsame Mutationen für mehrere VOCs charakteristisch sind.