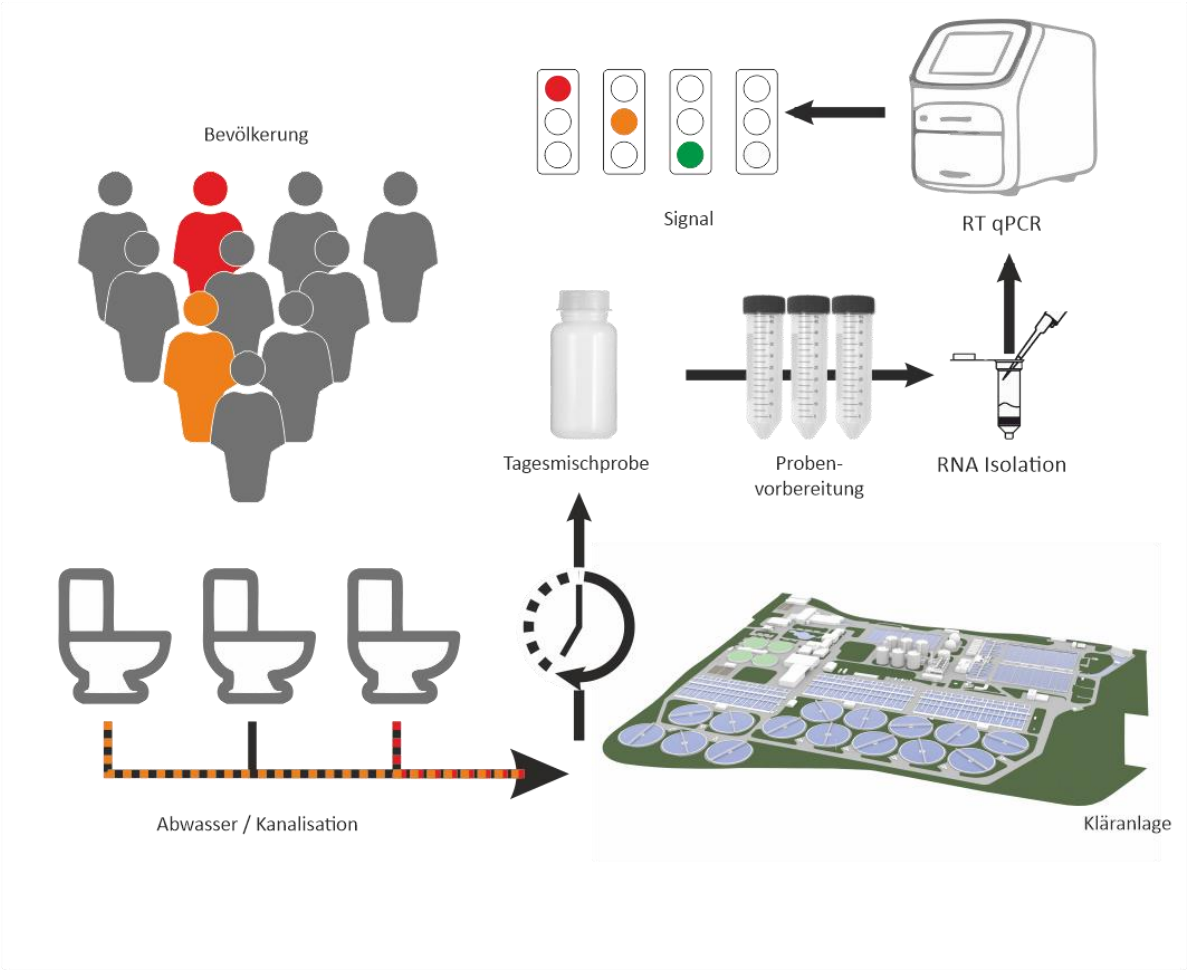
TECHNISCHE UNIVERSITÄT WIEN
Vienna | Austria

SARS-CoV-2 im Abwasser als Gradmesser der Infektionsverbreitung

Aqua Urbanica 2021
13.9.2021 - Innsbruck

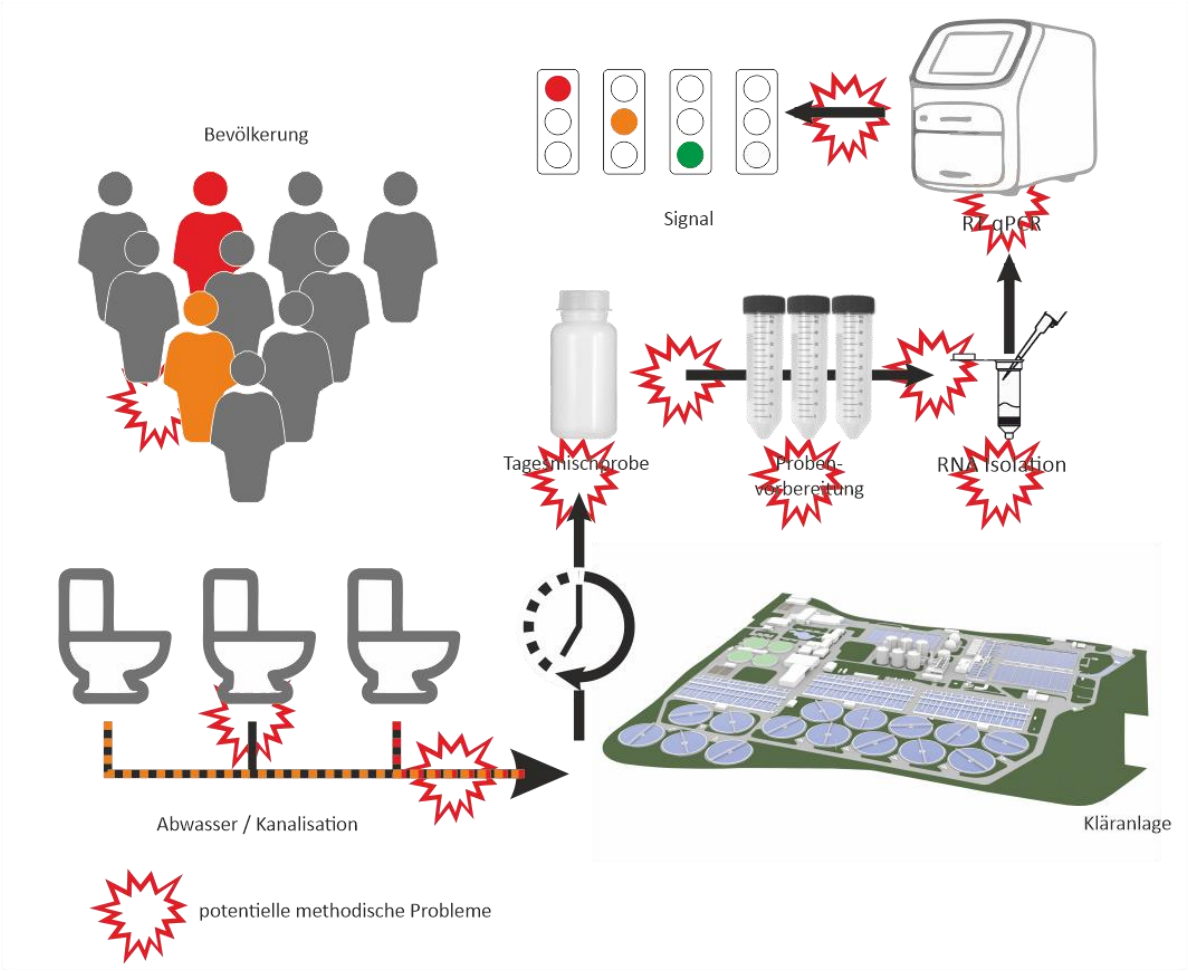
Norbert Kreuzinger
norbkreu@iwag.tuwien.ac.at
Technische Universität Wien
Institut für Wassergüte und Abfallwirtschaft

Die Idee



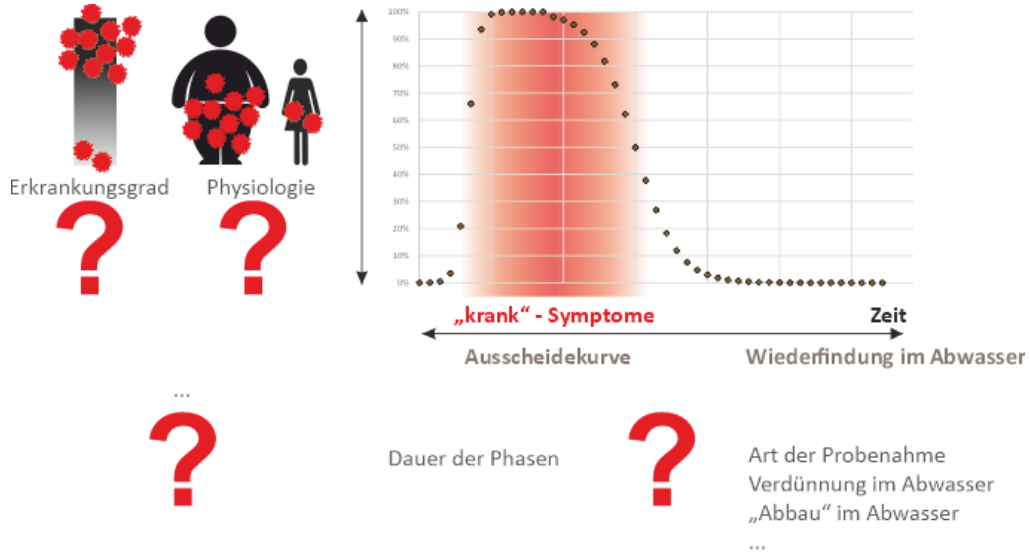
- Abwasser als „Spiegel“ der Gesellschaft
- Abwasser integriert alle Ausscheider und Virusvarianten im Kanaleinzugsgebiet
- Inzidenzen
  - Problematik 7/14t Inzidenzen
  - Zuordnung zu Hauptwohnsitz
  - Abhängig von „Testmoral“ (ungeimpft & geimpft)
- Erhaltene Daten unabhängig von der Teststrategie
- Ansatz sensitiv (~ 1 aus 10.000)
- Zahlen bilanzierbar
- Zahlreiche Einflussfaktoren
  - Siehe später

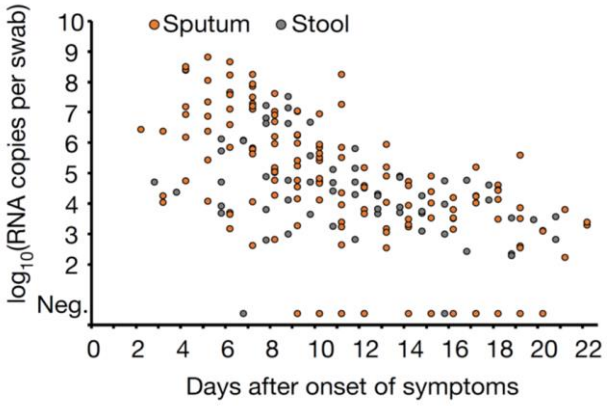
Die Herausforderung



- Über den gesamten Weg von Ausscheidung bis hin zum Messsignal zahlreiche potentielle methodische „Probleme“:
  - Ausscheidungsseitig
  - Abwasseranfall (zB. Wasserverbrauch, Fremdwasser)
  - Verhalten im Kanal (zB. „Abbau“)
  - Probenahme (volumenproportional vrs. zeitproportional)
  - Probenlagerung (zB. T; Dauer Teilprobe bis Analytik)
  - Untersuchte Matrix (fest / flüssig)
  - Probenaufbereitung (Methode; Ausbeute)
  - RNA Extraktion (Methode; Ausbeute)
  - qPCR (zB. verwendete Primer; Inhibitoren; Standards)
- Viele dieser Punkte durch QM „beherrschbar“
- (+/- konstanter) methodischer Fehler bleibt
- Vergleichbarkeit Daten
  - Selbe Probe, unterschiedliche Labore
  - Unterschiedliche Proben, selbes Labor

Ausscheider und -mengen



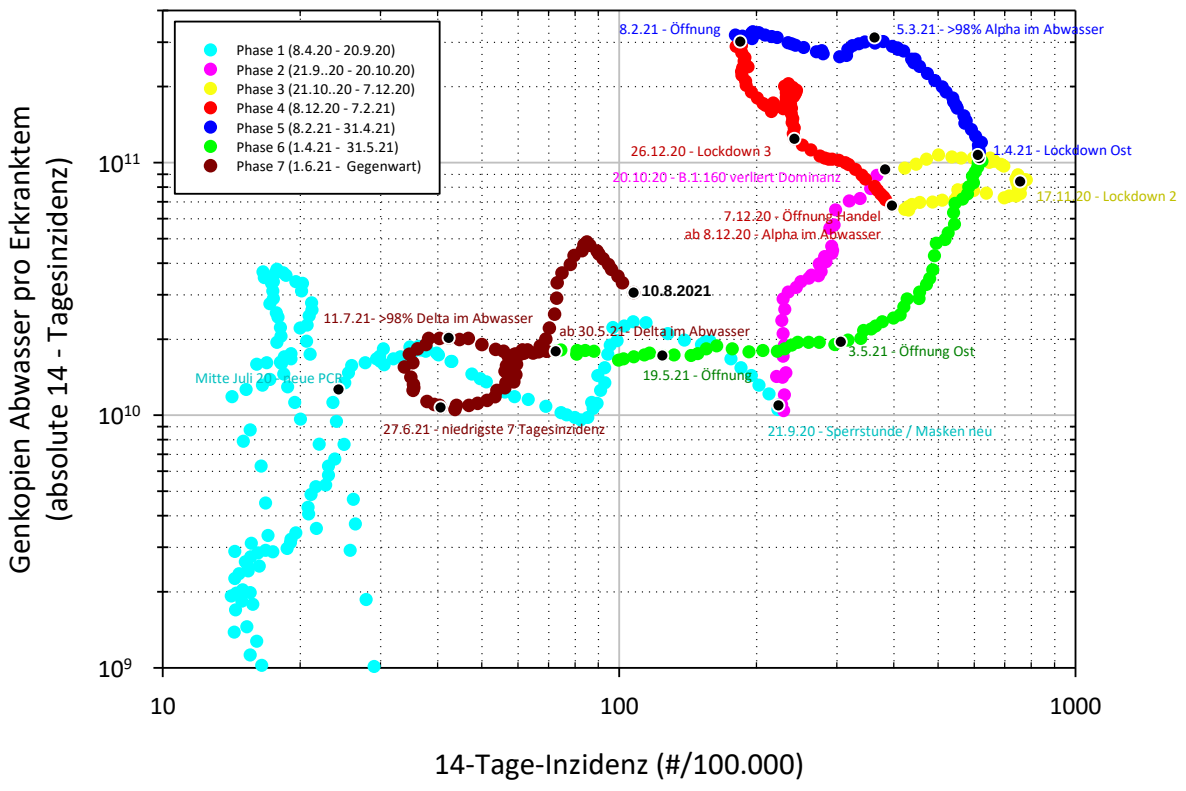


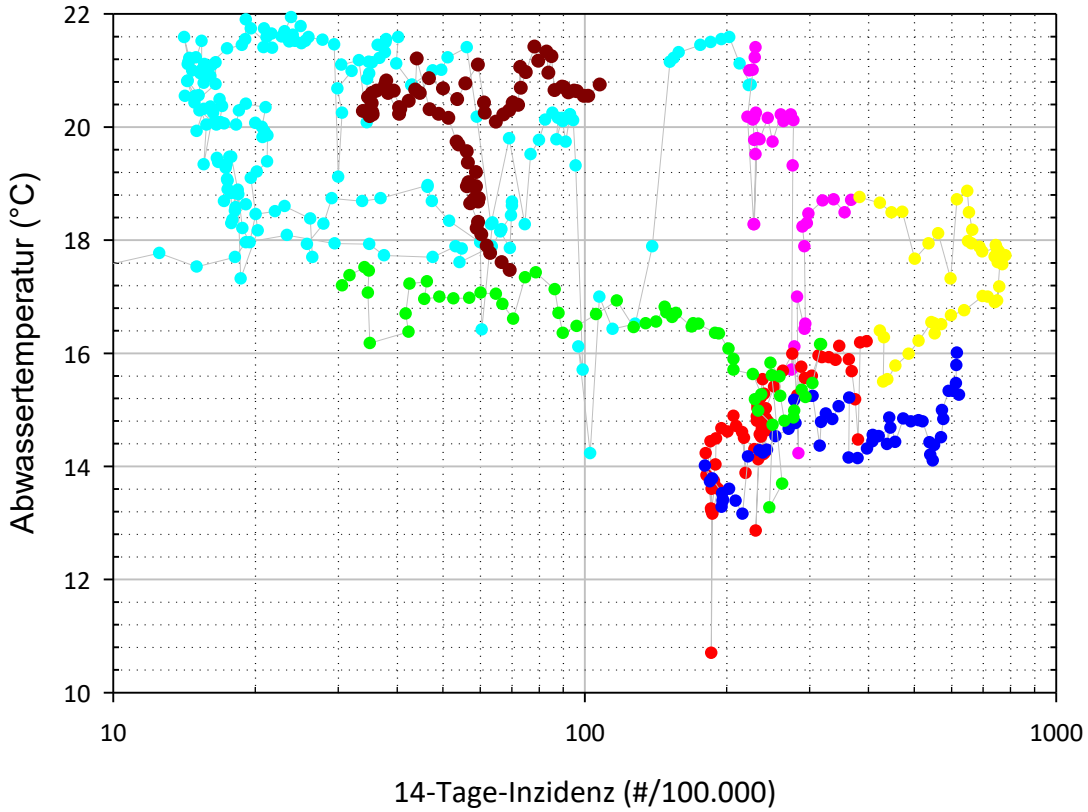
Wölfel, R., Corman, V.M., Guggemos, W. *et al.* Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019
Nature **581,** 465–469 (2020) https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x

- Wann werden im Krankheitsverlauf welche Viren-Mengen ausgeschieden?
- Wann beginnt; wann endet Ausscheidung?
- Wie unterscheidet sich das Ausscheideverhalten bei unterschiedlichen Patienten?
- Wie hängt Ausscheidung mit der Schwere der Erkrankung zusammen?
- Wie unterscheidet sich das Ausscheideverhalten bei unterschiedlichen Virus-Varianten?

- Zentrale Fragen für Bewertung der Aussage aus Ergebnissen

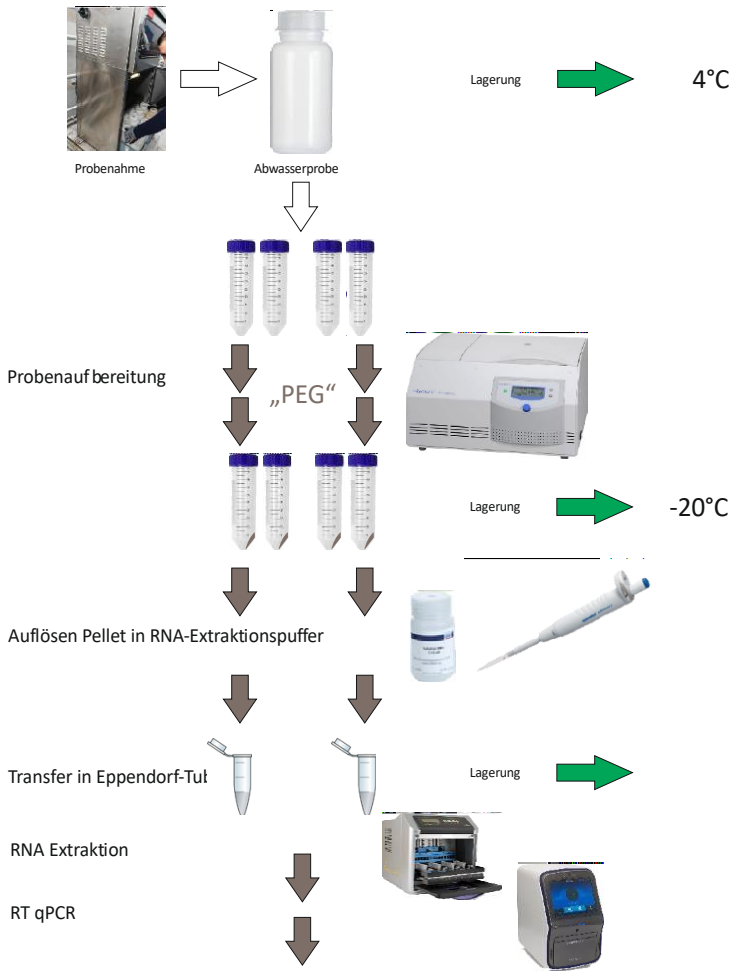
Ausscheider und -mengen





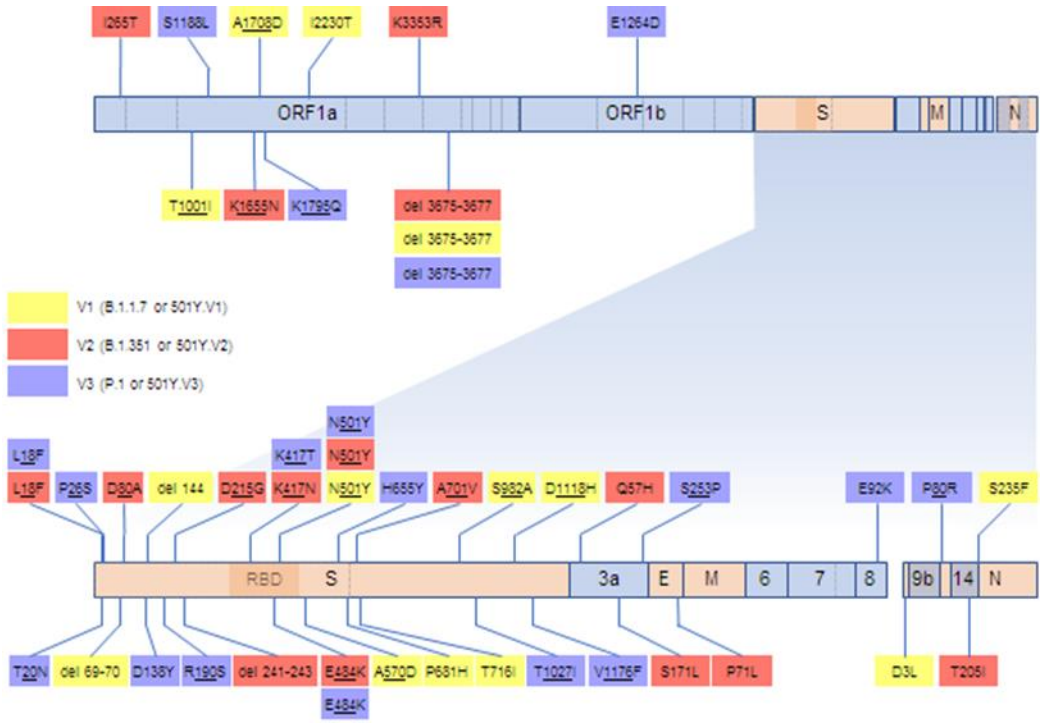
Unpublished own data

Analytik - workflow



- **Probenahme**
  - mengenproportionale Tagesmischprobe
  - “Routineprobe” auf Kläranlage
- **Probenaufbereitung - PEG – Zentrifugation**
  - Zeitintensiv (Summe ~ 4h)
  - 1,5h bei 12.000g
- **RNA Extraktion**
  - Int Standard für Extraktionskontrolle
- **RT qPCR Amplifikation**
  - Analog Humantestung
  - Quantifizierung mit Standard
- **Quantifizierung**
- **Data Processing**
  - Umrechnung auf [# Genom / mL]
  - Normierung um „klassische“ Abwasserparameter

Analytik

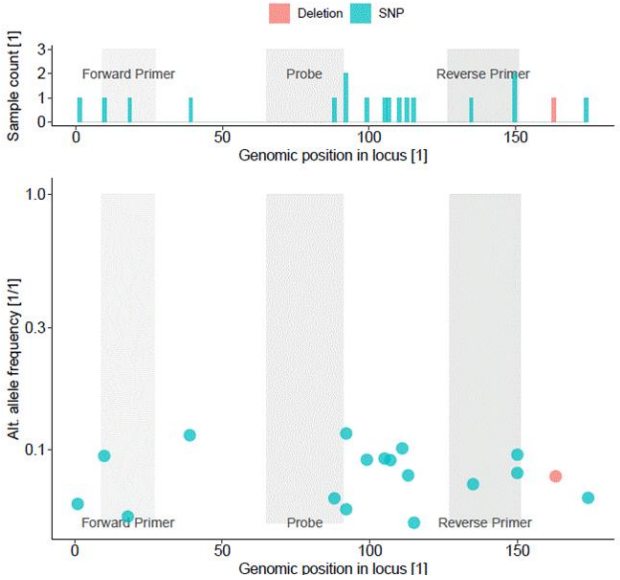


- Eingesetzte Methoden abhängig von Fragestellung
  - Konventionelle Quantifizierung
  - RT qPCR
  - Verschiedene Targets und Systeme
- Variantenanalyse
  - ddPCR
  - Schmelzkurvenanalysen
- Sequenzierung
  - „Targetanalysen“ – Variants of Concearn
  - „nontarget“ – HG Sequenzanalysen

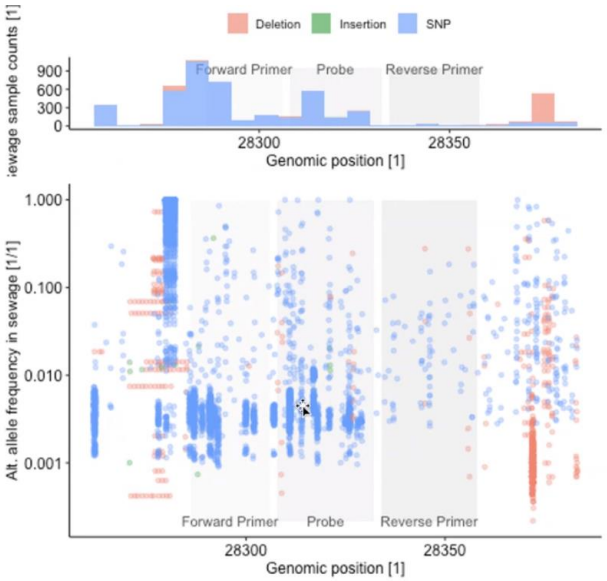
Analytik

Check PCR Primersystem mittels Sequenzierung aus Abwasserproben

Primer-/Sondenset A

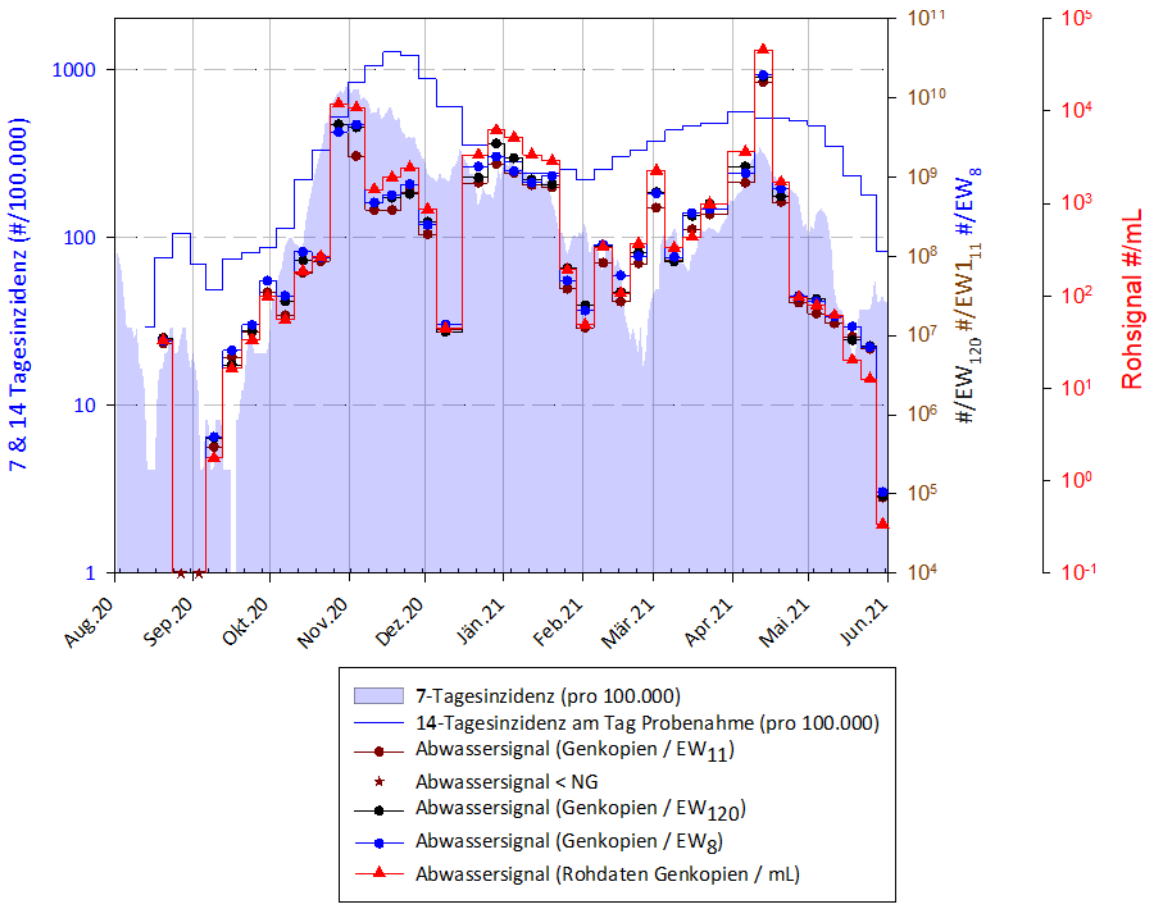


Primer-/Sondenset B



- Eingesetzte Methoden abhängig von Fragestellung
  - Konventionelle Quantifizierung
  - RT qPCR
  - Verschiedene Targets und Systeme
- Variantenanalyse
  - ddPCR
  - Schmelzkurvenanalysen
- Sequenzierung
  - „Targetanalysen“ – Variants of Concearn
  - „nontarget“ – HG Sequenzanalysen

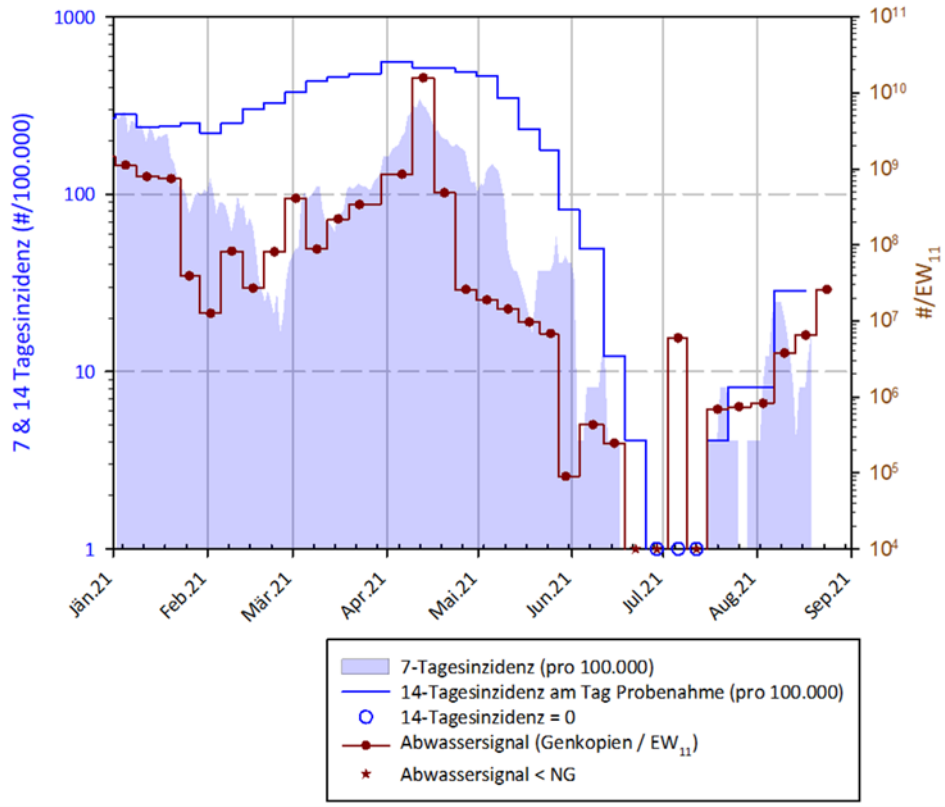
Bezugsgrößen Messignal

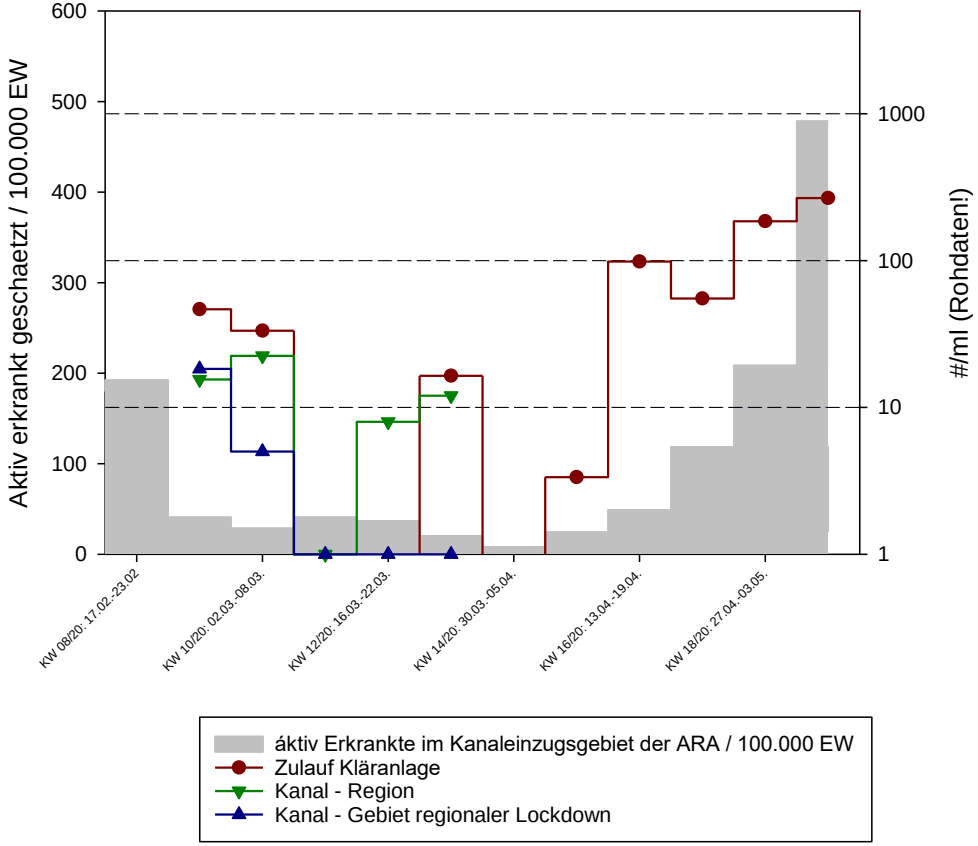


- Rohsignal aus qPCR in GC#/mL
- Idente Thematik zu konventionellen Parametern (C/N/P)
  - Abhängig vom Kanalystem
  - Verdünnung durch Mischwasserereignisse
  - Abhängigkeit vom Wasserverbrauch im EZG
- Fracht vrs. Konzentration

- „Normierung“ auf Bezugsgrößen
  - routinemäßige abwasserchemische Parameter zB. CSB / TN / NH_4 (Indirekteinleiter!)
  - chemische Anthropogenmarker zB. Cotinin (Abbauprodukt Nikotin); Koffein
  - mikrobielle humane Fäkalmarker zB. PMMoV (Pepper mild mottle virus); CrAssphage (cross-assembly phage)

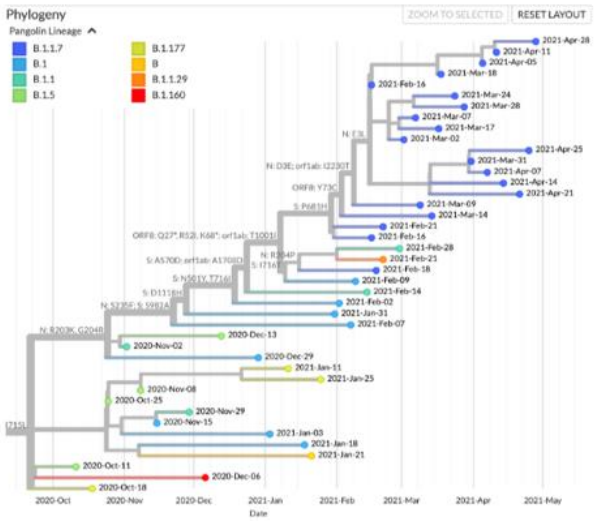
Beispiele Ergebnisse konventionelle qPCR

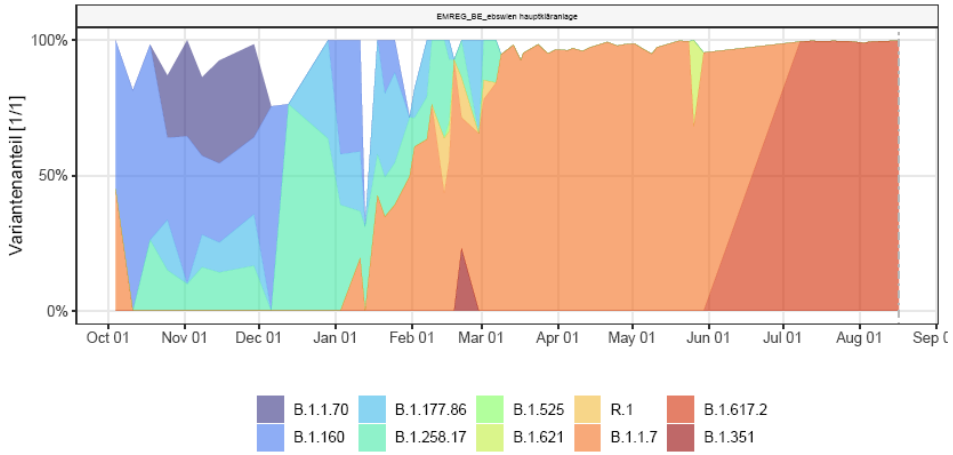


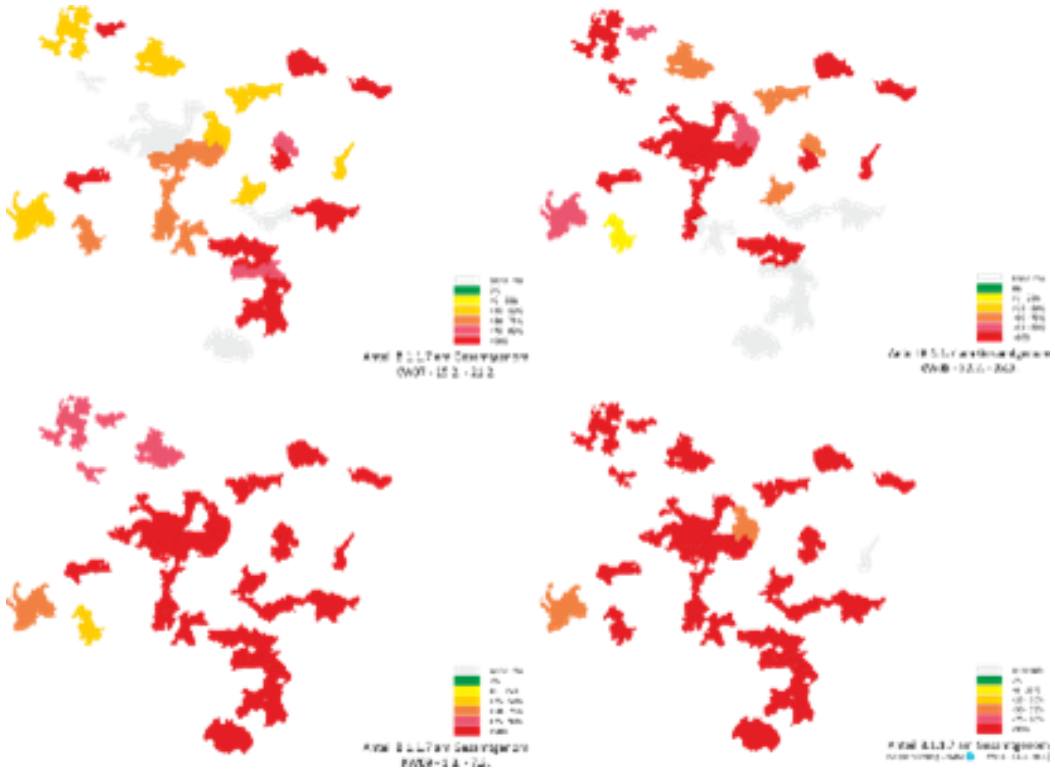


Unpublished own data

Beispiele Ergebnisse Sequenzierung

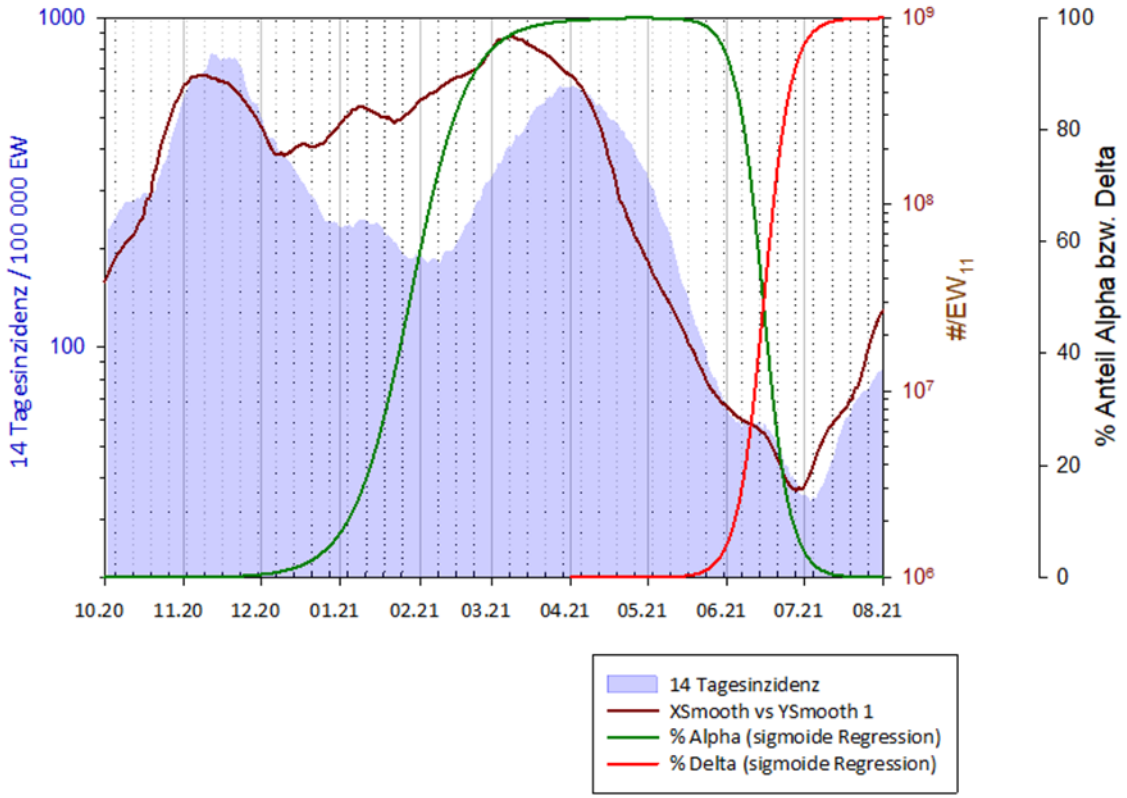


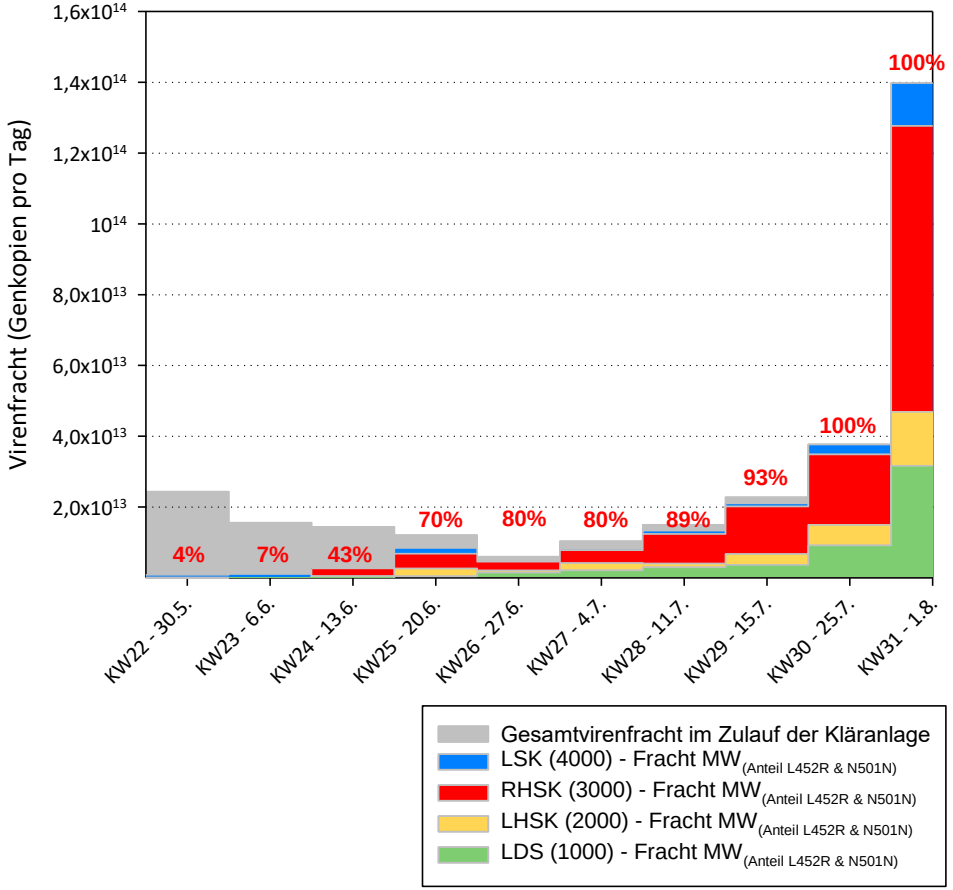




Unpublished own data

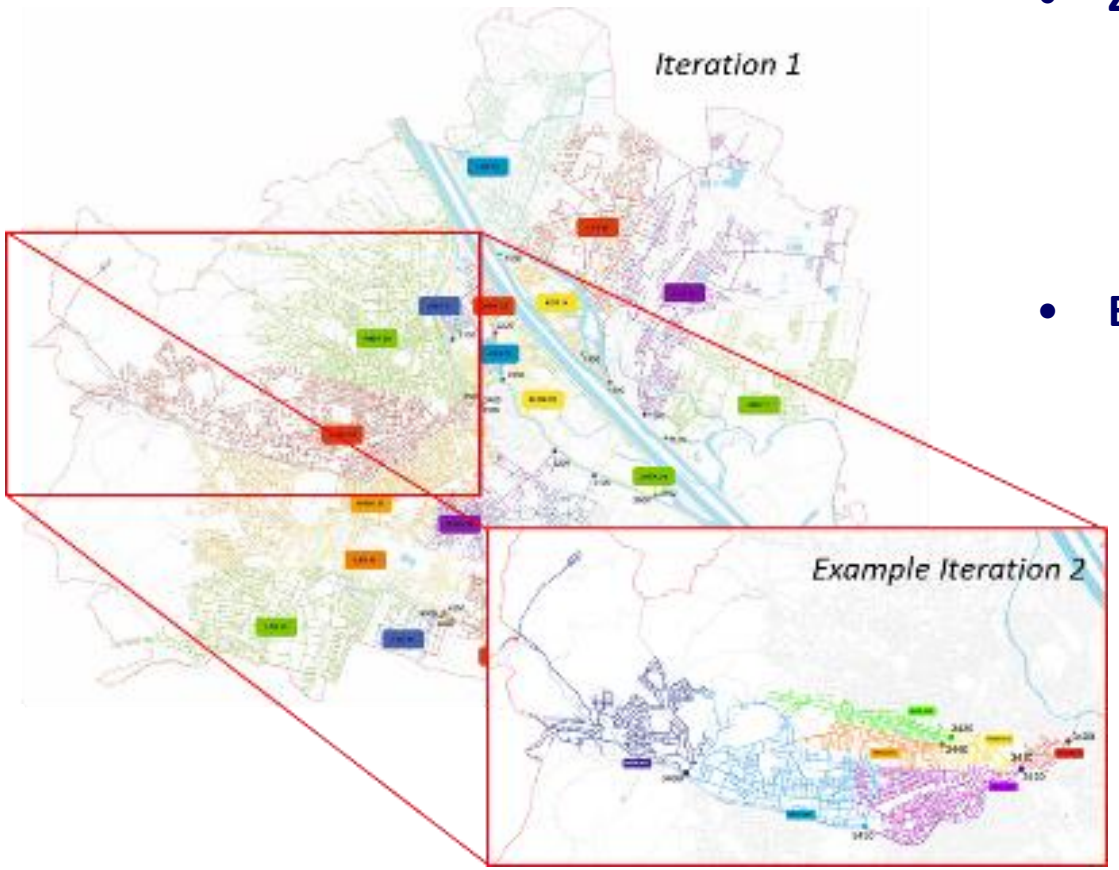
Beispiele Ergebnisse Sequenzierung





Unpublished own data

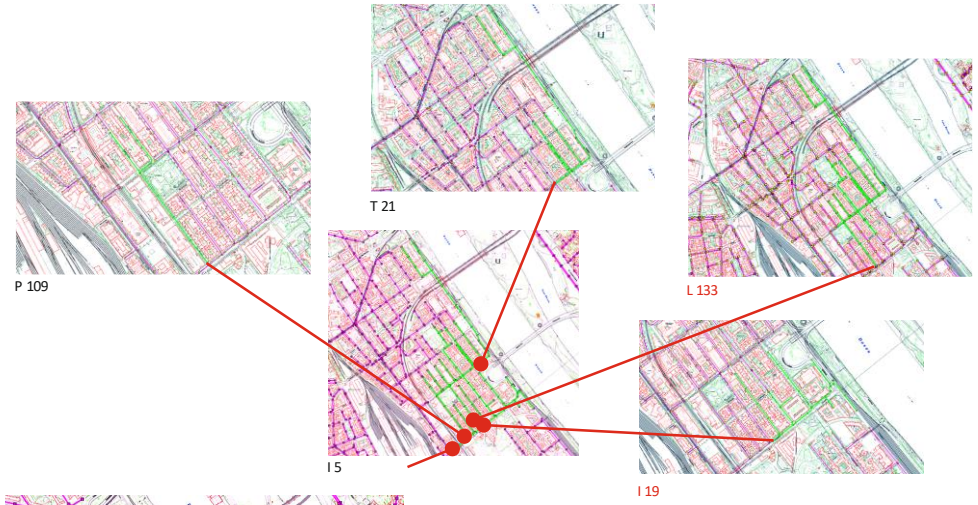
Untersuchung Kanal-Teileinzugsgebiete

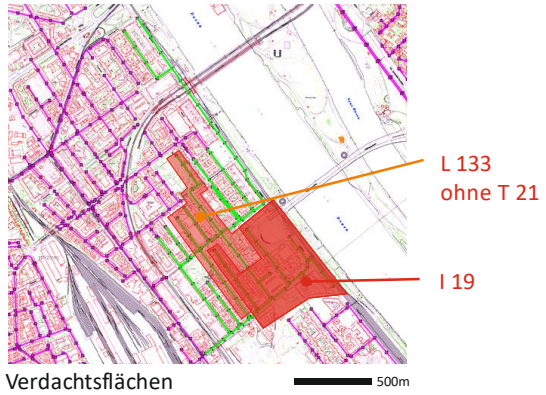


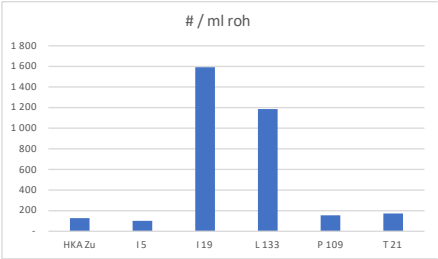
- **Ziele**
  - Identifikation von „hot spots“
  - „Clustertracing“ in Situation niedriger Prävalenz / Inzidenz
  - Überprüfung „sensibler“ Bereiche bzw. interessierender Punkte
  - Für WT und einzelne Varianten
- **Beispiel Wien**
  - Beprobungen
    - Iteration 0
      - 1x pro Woche seit August 2020
      - Endpunkte 4 Hauptsammler
    - Iteration 1
      - 1 x pro Woche seit Februar 2021
      - 9-22 Teileinzugsgebiete („Iteration1“)
      - 1x pro Woche seit August 2020
    - Iteration 2-x
      - Mit Gesundheitsbehörde abgestimmte Detailuntersuchungen
  - Analytik
    - RT qPCR
    - „Mutantenscreening“
    - Ganzgenomsequenzierung

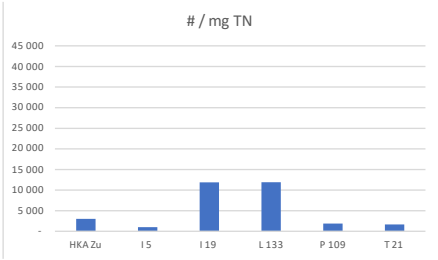
Untersuchung Kanal-Teileinzugsgebiete

- Beispiel Hot-Spot Identification mit qPCR



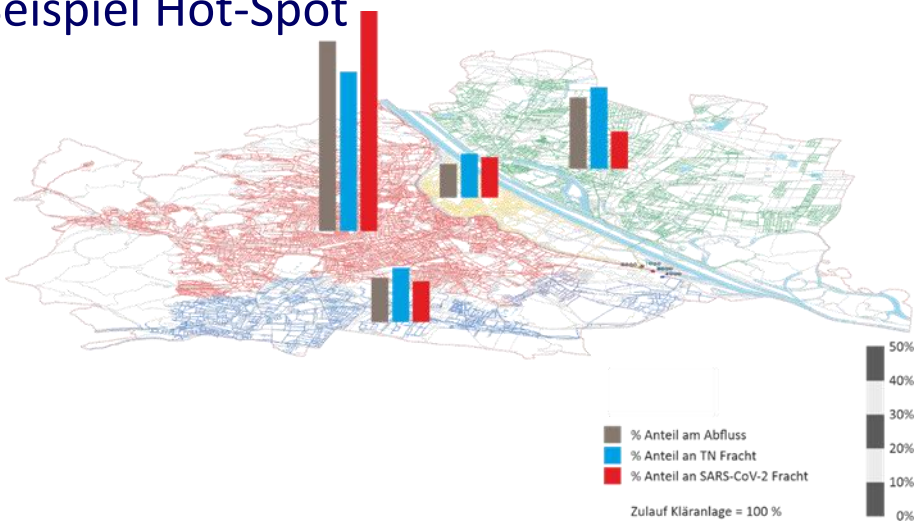






Untersuchung Kanal-Teileinzugsgebiete

- Beispiel Hot-Spot

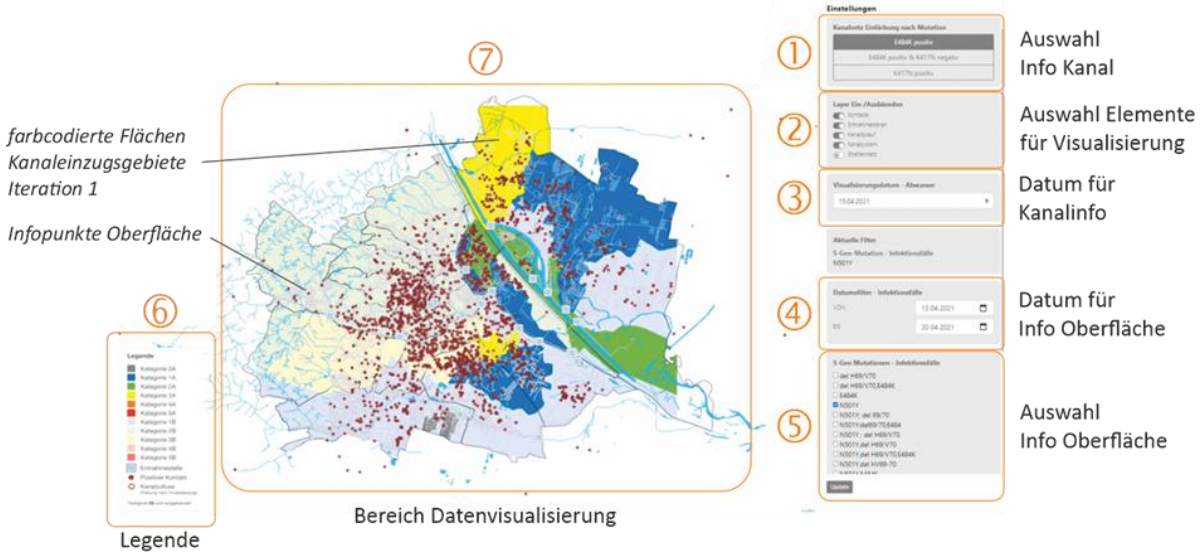


- Mittlerweile weitergehende Auswertungen
- Frachtbetrachtungen zur Bilanzierung eines (Teil-) Einzugsgebiets
  - Validierung / Plausibiliserung Messwerte / Berechnung Bilanzfehler für N & CoV
  - Identifikation Anteil Abwasseranfall und Anteil Virenmenge im (Teil-)EZG bezogen zur Systemgrenze (Zulauf Kläranlage oder
  - Berechnung eines Faktors ($F_{V/A}$):

    Anteil Virenfracht im (Teil-)EZG / Anteil Abwasseranfall
    Bezugsgröße = Systemgrenze
    - **Faktor > 1**: Mehr Virenanfall im EZG als im Mittel innerhalb der Systemgrenzen
    - **Faktor = 1**: Virenanfall im System entspricht mittlerem Anfall im System
    - **Faktor < 1**: Weniger Virenanfall im EZG als im Mittel innerhalb der Systemgrenzen

Beispiel Datennutzung

- Beispiele Darstellung Kanalinfo bei Gesundheitsbehörde



Bewußte „nonsense“ Darstellung …

① Bereich Auswahl Kanal-Information

- E484K positiv
- E484K positiv und N417 negativ
- K417N positiv
- …

② Bereich Elemente für die Visualisierung

- Kontakte (Datenpunkte der Oberfläche)
- Entnahmestellen
- Kanalsystem
- Straßennetz

③ Datum für Kanalinfo

④ Datum für Oberflächeninfo

⑤ Auswahl Info Oberfläche

⑥ Legende für Farbcodierung

⑦ Bereich Datendarstellung

Zusammenfassung Erfahrungen

- Trotz zahlreicher methodischer Einschränkungen funktioniert das Abwassermonitoring sehr gut
- Zentraler Vorteil ist Unabhängigkeit von Teststrategie an der Oberfläche und Darstellung einer „realen“ Situation
- Zunahme / Abnahme Signal im Abwasser zwischen 4 und 10 Tagen vor Signaländerung an der Oberfläche
- Potential und Aussagekraft unter den jetzigen pandemischen Bedingungen und im Herbst besonders hoch
- Auch mit Untersuchungen 1x pro Woche zahlreiche Aussagen möglich, wenn Info rasch verfügbar.
- Auch Mutanten / Varianten gut nachweisbar und quantifizierbar
- Einstellung der Gesundheitsbehörden
  - ambivalent von extrem angetan bis „reserviert“ = Funktion einer gemeinsamen Diskussion
  - rasche Info und Bereitstellung neuer Informationen hilft für Akzeptanz
- Anfängliche Aufregung (zB. Auftreten B.1.1.7) zum Thema hat sich gelegt.
- Detailbeschäftigung mit Abwassersignalen offenbart Problematik der Oberflächendaten (Datenhandling; Zahlen; Auswertungen, …)
- Abwasserreinigung hat nachhaltig eine zusätzliche Bedeutung erlangt

Zusammenfassung Erfahrungen

- Probleme
  - Oberflächendaten werden als „richtig“ postuliert
  - Zuordnung von Infektionsfällen (zu Hauptwohnsitz) ist nicht notwendiger Weise ident mit Ort der Ausscheidung
  - Die „offiziellen“ Prävalenzen (Erkrankte pro 100.000) führen bei kleinen Anlagen zu massiven Sprüngen in Zahlen (Oberfläche und Abwasser)
  - Nicht linearer Zusammenhang zwischen Kopien im Abwasser und Anzahl der Ausscheider
  - „gelöst / gesamt“ Thematik
  - Länge/Aufenthaltsdauer Kanal und Verhalten im Kanal haben deutlichen Einfluss auf Signal
  - Beprobung kleinerer Anlagen (wird Signal erwischt?)
- Mut zu methodischen Unzulänglichkeiten und pragmatischer Ansatz gefordert
- Fragestellungen, Themen und Inhalte haben sich in den Monaten deutlich erweitert
  - Beginn
    - #/mL im zeitlichen Verlauf
    - Frühwarnfunktion
  - Heute zusätzlich
    - Verständnis der Pandemieentwicklung
    - Überprüfung epidemiologischer Kenndaten
    - Varianten und Mutationen
    - POI Monitoring und Detailfragestellungen
    - Überwachung Maßnahmen

Danke für die Aufmerksamkeit

und ..

- Den Finanzgebern für die finanzielle Unterstützung
- Dem Coron-A Team für die Zusammenarbeit
- Den beteiligten Anlagenbetreibern für die Unterstützung!
- Meinem Team für die immense Laborarbeit

Norbert Kreuzinger – TU Wien
Technische Universität Wien
Institute for Water Quality and Ressources Management
Karlsplatz 13/ 226-1
1040 Vienna - Austria

norbkreu@iwag.tuwien.ac.at