

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

Dieser Leitfaden vermittelt die Grundlagen für das Vorgehen zum quantitativen Nachweis von SARS-CoV-2 Genfragmenten und Fragmenten von Kontrollviren (fäkale Bezugsviren) mittels molekularbiologischer Nachweismethoden und beschreibt die wichtigsten Kontrollparameter, die für eine qualitätsgesicherte Analytik beachtet werden müssen. Ebenso werden für die spätere Normalisierung der SARS-CoV-2 Rohdaten 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. (Technischer Leitfaden Teil 3 – Probenlogistik und Datenübermittlung)

Für Nachweise von SARS-CoV-2 in Abwasserproben gibt es zahlreiche Protokolle, jedoch noch keine genormten Verfahren. Um zuverlässige qualitative Messdaten zu erhalten, müssen daher grundlegende Verfahrensschritte und Kontrollmaßnahmen eingehalten werden. Grundlegend muss immer mit frischen Proben gearbeitet werden, die bei Zwischenlagerung kühl ($5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) gehalten werden müssen, da signifikante Verluste der Viruskonzentration bei gefrorenen Proben bekannt sind.

Der Leitfaden beinhaltet folgende grundlegenden Arbeitsschritte:

1. **Probenhomogenisierung**
2. **Aufkonzentrierung der Viruspartikel**
3. **Extraktion der viralen Nukleinsäuren**
4. **Reverse Transkription des viralen RNA-Genoms
für die nachfolgende Amplifizierung in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**
5. **Amplifizierung, Detektion und Quantifizierung der viralen Gensequenzen
mit Hilfe verschiedener Methoden der PCR: qPCR oder dPCR**
6. **Qualitätskontrolle der PCR Messergebnisse**

Generell müssen die verschiedenen Arbeitsschritte von in Bezug auf Durchführung der PCR und weiteren Laborarbeiten unter mikro- und molekularbiologischen Aspekten geschultem und qualifiziertem Personal durchgeführt werden. Außerdem muss eine räumliche Trennung der Versuchsphasen (Homogenisierung, Aufkonzentrierung und Extraktion 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 moduliert und optimiert werden, dass eine Quantifizierung auch bei niedrigen Viruskonzentrationen in den Abwasserproben möglich ist. Weiterhin müssen auch die Wiederfindungseffizienzen, sowie das Detektions- und Quantifizierungslimit bestimmt werden.

1. Probenhomogenisierung

Im Labor wird eine automatisierte Homogenisierung der Proben durch Überkopfschütteln der 1 L Transportgefäße von 15 min empfohlen. Erst dann sollte eine Subprobe für die weitere Analytik entnommen werden.

2. Aufkonzentrierung der Viruspartikel

Die Aufkonzentrierung von SARS-CoV-2 Viruspartikeln kann durch verschiedene Methoden erfolgen, wobei es eine Vielzahl an unterschiedlichen Protokollen gibt. In Tabelle 1 sind die häufigsten angewendeten Protokolle, sortiert nach Methoden, aufgelistet und zusammengefasst.

Zusätzlich werden Feststoffpartikel aus dem Rohabwasser bei vielen Protokollen durch einen ersten Zentrifugationsschritt (4000-5000 x g) für 15-45 min 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

Methode	Ausgangsvolumen	Optionen
Fällung der Partikel mit Polyethylenglycol (PEG)	40 ml - 1 L	Polyethylenglycol 8000 (PEG 8000) (oder Polyethylenglycol 6000 (PEG 6000)) zusätzlich wird NaCl 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
Ultrazentrifugation	40 ml - 200 ml	verschiedene Rotationsgeschwindigkeiten

Je nach eingesetzter Methode und verwendetem Ausgangsvolumen unterscheiden sich die Nachweisgrenzen und Effizienzen. Jedes Labor muss (auch in Abhängigkeit von der spezifischen Zusammensetzung des Abwassers) eine für sich ideale Strategie entwickeln, um die Proben auch bei geringen Konzentrationen der Viruslast im Abwasser aufzukonzentrieren. Wichtige Parameter für

die Wahl der Aufkonzentrierungsmethode sind (i) das Volumen, welches mit der jeweiligen Methode aufkonzentriert 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.

3. Extraktion der viralen Nukleinsäuren

Nach der Aufkonzentrierung der Viruspartikel aus der Abwasserprobe muss die virale RNA in guter Qualität extrahiert werden. Die häufigsten dafür verwendeten Techniken beruhen auf der organischen Extraktion mit Phenolen, Wasser und Alkohol sowie Silika-Material und werden von vielen Firmen als Kits angeboten. Die viralen RNA-Moleküle werden dabei meistens in einem Volumen von 50-200 µL eluiert. Die Reinheit der RNA-haltigen Probe kann photometrisch bei Wellenlängen von 230, 260 und 280 nm kontrolliert werden. Die Effizienz der RNA-Extraktionsmethode kann durch das regelmäßige Mitführen von Proben mit Zugabe einer bekannten Kopienanzahl gereinigter RNA eines Kontrollvirus mit RNA-Genom (z.B. RNA des Bakteriophagen MS2) oder einer bekannten Zahl von inaktivierten Viruspartikeln eines ähnlichen bekapselten RNA-Virus überprüft werden. Die extrahierten Nukleinsäuren können ohne Konzentrationseinbußen für ca. 1 Monat bei -20°C gelagert werden, allerdings empfiehlt sich das Einfrieren in für die qPCR- bzw. dPCR-Analyse geeigneten Aliquots, um ein wiederholtes Auftauen und Einfrieren der empfindlichen RNA zu vermeiden. Eine längerfristige Lagerung sollte bei -80°C erfolgen und sollte auch für Rückstellprobe genutzt werden.

4. Reverse Transkription des viralen RNA-Genoms für die nachfolgende Amplifizierung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die enzymatische Umschreibung der viralen RNA in komplementäre doppelsträngige DNA (cDNA) wird als Reverse Transkription (RT) bezeichnet. Bei SARS-CoV-2 wird dieser Schritt häufig direkt mit der nachfolgenden PCR in einem „One-Step“ Verfahren gekoppelt. Die RT ist bei Umweltproben der problematischste Schritt, da dieser sehr anfällig gegenüber inhibitorischen Stoffen ist, welche in Umweltproben noch vorhanden sein können, wenn sie bei der RNA-Extraktion nicht vollständig entfernt werden konnten. 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 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 Reversen Transkription, wird diese bei einer Temperatur von -20 °C zwischengelagert.

5. Amplifizierung, Detektion und Quantifizierung der viralen Gensequenzen mit Hilfe verschiedener Methoden der PCR: qPCR oder dPCR

Für den quantitativen Nachweis der Viren werden keine vollständigen Genomsequenzen benötigt, sondern nur einzelne charakteristische Genbereiche vermehrt. Die häufigsten verwendeten Methoden für die Amplifizierung und Quantifizierung von SARS-CoV-2 Genfragmenten sind die quantitative real time PCR (qPCR) sowie die digitale PCR (dPCR). Sie unterscheiden sich im Hinblick auf das analysierte RNA-Probevolumen (bei dPCR in Partitionen), die benötigten Referenzen und die eigentliche Quantifizierung. Die qPCR wird sehr häufig angewendet, da viele Labore bereits über das System verfügen. Die dPCR als neuere Technik wird aktuell und zukünftig eine immer größere Rolle

einnehmen, da sie sich durch einen deutlich höheren Probendurchsatz und niedrigere Nachweisgrenzen auszeichnet. Beide PCR-Systeme sind geeignet, um SARS-CoV-2 im Abwasser nachzuweisen. In Tabelle 2 sind beide Verfahren einander gegenübergestellt.

Die Amplifizierung der charakteristischen Genbereiche kann durch die Verwendung von Primer/Sonden-Systemen erfolgen, die auch im medizinischen Bereich für den molekularbiologischen Nachweis von SARS-CoV-2 verwendet werden. Zielbereiche dieser Tests liegen in Genabschnitten in denen sich 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) und der Open Reading Frame-Region (ORF). Bereiche im Gen des Spike-Proteins (S) sind dagegen weniger geeignet, da diese Regionen besonders bei Virusvarianten von SARS-CoV-2 eine hohe Zahl an Mutationen aufweisen können, so dass die entsprechenden Primerbindungsstellen ggf. nicht mehr detektiert werden.

Zum eindeutigen Nachweis von SARS-CoV-2 müssen immer mindestens zwei geeignete Genbereiche des Virus nachgewiesen werden.

Es sind Positiv- und Negativkontrollen mitzuführen, die die Funktionsfähigkeit der PCR-Reaktion anzeigen und um falsch positive Ergebnisse auszuschließen. Alle Proben (inklusive Positiv- und Negativkontrollen) müssen bei der qPCR in einer Dreifachbestimmung pro PCR-Platte untersucht werden, bei der dPCR sind aufgrund der Methode (PCR läuft in bis zu 20 000 Einzelreaktionen ab) keine technischen Replikate erforderlich. Die berechnete Konzentration der SARS-CoV-2 Gene im Abwasser wird in der Regel in Genkopien/L angegeben.

Tabelle 2: Unterschiede zwischen q-PCR und dPCR

	quantitative PCR (q-PCR)	digitale PCR (dPCR)
Prinzip	Relative Quantifizierung der Zielsequenz in Echtzeit nach jedem Zyklus, bspw. mittels Fluoreszenzmessung in exponentieller Phase	Verteilung der Probe auf viele kleine Partitionen, in denen jeweils eine separate PCR-Reaktion stattfindet; absolute Quantifizierung der Zielsequenz durch Auszählen der Fluoreszenz-positiven und -negativen Einheiten in jeder einzelnen Partition und Bezug der Daten auf die Poisson-Verteilung
Ausgangsmaterial	Fluoreszenzfarbstoffe oder FRET-Sonden	Fluoreszenzfarbstoffe oder FRET-Sonden
Endpunktbestimmung	Nein	Ja
Standard/Referenz	Ja	Nein
Standardkurve	Standardkurve für jedes Zielgen in jedem qPCR-Lauf mit mindestens 4 verschiedenen Konzentrationen der internen Standards	Keine
Quantifizierung	Die Quantifizierung der amplifizierten Nukleinsäuren erfolgt durch den Vergleich der Proben mit einem internen spezifischen Standard, d.h. Gensequenzen des SARS-CoV-2 Virus mit bekannten Konzentrationen über einen Bereich von 4 bis 6 Zehnerpotenzen, die von den jeweiligen Primer/Sonden-Systemen erkannt werden (solche Standards werden kommerziell angeboten).	Die Konzentrationen der Gensequenzen werden durch statistische Analysen der Endpunktmessungen mittels Software berechnet.

6. Qualitätskontrolle der PCR Messergebnisse

Bewährt hat sich der Vergleich der ermittelten SARS-CoV-2-Konzentrationen mit den parallel gemessenen Konzentrationen anderer, in der jeweiligen Abwasserprobe enthaltenen Viren, welche nachweislich aus humanen Fäkalien stammen (z.B. der Bakteriophage CrAssphage oder das Pflanzenvirus Pepper-Mild-Mottle Virus (PMMoV)). Die Konzentrationen dieser Kontrollviren müssen dabei über die gleiche Methode (qPCR bzw. dPCR) bestimmt werden wie die RNA-Konzentrationen von SARS-CoV-2.

Beide detektierten Kontrollviren können auch in der Normalisierung als fäkale Bezugsviren verwendet werden



Im Rahmen einer Messreihe für einen Kläranlagenstandort dürfen sowohl die Probenahme, die Aufkonzentrierungsmethoden und die nachfolgenden Detektionsmethoden nicht signifikant verändert werden, um die einzelnen Messwerte der Kläranlage über die Zeit vergleichen zu können (essentiell für das Abwassermonitoring von SARS-CoV-2).

Kontakt	Umweltbundesamt, sarscov2@uba.de Robert Koch-Institut, abwassersurveillance@rki.de	
Finanzierung	Das BMG fördert das Abwassermonitoring bis Ende 2024 im Rahmen des Vorhabens "Abwassermonitoring für die epidemiologische Lagebewertung (AMELAG)"	
	Der technische Leitfaden bezieht Informationen/Erkenntnisse ein, die im Rahmen des Projekts ESI-CorA erarbeitet wurden. ESI-CorA wurde von der Europäischen Kommission im Rahmen des Soforthilfeinstruments (Emergency Support Instrument – ESI) gefördert (No 060701/2021/864650/SUB/ENV.C2).	
Weitergehende Literatur	<ul style="list-style-type: none"> • Handreichung zur Analytik, ESI-CorA Dokument • Norm ISO/WD 7014:2022 "SARS-CoV-2 in wastewater" 	