

Abwassersurveillance: der methodische Weg zur Vergleichbarkeit von Messergebnissen am Beispiel Inflenzaviren

Wastewater surveillance: methodological approaches to measurement comparability using influenza viruses as an example

René Kallies, Till Fretschner, Edgar E. Zeisler, Steffi Scheller, Andreas Aurenz, Beate Schneider, Marcus Lukas, Ulrike Braun, Timo Greiner, Jakob Schumacher, Hans Christoph Selinka, Birgit Walther

Kontakt

Dr. René Kallies | Umweltbundesamt | Fachgebiet II 1.4 – Mikrobiologische Risiken | Corrensplatz 1 | 14195 Berlin |
E-Mail: rene.kallies@uba.de

Zusammenfassung

Inflenzaviren stellen durch saisonal wiederkehrende Infektionen verbunden mit ihrem Pandemiepotenzial eine Belastung für die öffentliche Gesundheit dar. Bestehende Überwachungssysteme können durch abwasserbasierte Epidemiologie (ABE) sinnvoll ergänzt werden. ABE hat sich als wertvolles Instrument etabliert, um das Vorkommen von Viren auf Bevölkerungsebene zu erfassen und zu bewerten. Die Detektion viralen Erbmaterials als Indikator für Viren im Abwasser ist herausfordernd, da verschiedene Parameter den jeweiligen Nachweis begrenzen können. Dieser Artikel diskutiert die Auswirkungen unterschiedlicher Methodenkombinationen auf die Analyseergebnisse zum Nachweis von Viren in Abwasser und zeigt, dass methodenabhängige Unterschiede die Nachweis- und Quantifizierungsergebnisse erheblich beeinflussen. Die Arbeit unterstreicht die Notwendigkeit einer kontextbezogenen Interpretation sowie systematischer Methodenvergleiche für eine verlässliche Implementierung der ABE von Inflenzaviren.

Summary

Influenza viruses are a public health concern due to their seasonal infections and their pandemic potential. Existing surveillance systems can be usefully supplemented by wastewater-based epidemiology (WBE). WBE has been proven to be a valuable tool for assessing the prevalence of viruses in a population. However, the detection of viral genetic material in wastewater is challenging because of various parameters that can limit a stable detection. This article discusses how different method combinations can affect the results of influenza virus detection in wastewater and shows that method-dependent differences can significantly influence their detection and quantification. The article emphasizes the need for context-specific interpretation and systematic method comparisons for stable implementation of WBE for influenza viruses.





Quelle: René Kallies / UBA

Abwassermonitoring als komplementäres Instrument der Surveillance von Virusinfektionen

In den vergangenen Jahren hat sich das Monitoring von Krankheitserregern im Abwasser als wichtiges ergänzendes Instrument im öffentlichen Gesundheitsdienst etabliert. Spätestens seit der Coronavirus-Pandemie wird Abwasser regelmäßig als integrierte Bevölkerungsprobe genutzt, um Infektionsdynamiken weitgehend unabhängig vom individuellen Testverhalten abzubilden. Abwasserbasierte Daten können dabei frühzeitig Hinweise auf sich ändernde Infektionsdynamiken liefern und klassische Surveillance-Systeme sinnvoll ergänzen (Selinka, [2021](#); Kramarsky-Winter et al., [2023](#); Carmo dos Santos et al., [2024](#)).

Ein zentraler Vorteil der abwasserbasierten Epidemiologie (ABE) ist ihr populationsbezogener Ansatz. Sie erfasst zum Beispiel auch asymptomatische Infektionen und ist weniger anfällig für Unschärfen durch variierendes Testverhalten oder Meldepraktiken. Gleichzeitig handelt es sich nicht um ein diagnostisches Verfahren im klinischen Sinne, sondern um ein zusätzliches Instrument zur Signal- und Trenderfassung. Die Aussagekraft dieses Instruments wird von verschiedenen Einflussfaktoren bestimmt, darunter unter anderem Wetterbedingungen, Eigenschaften des Kanalisationsnetzes oder erregerspezifische Merkmale. Zudem werden die erzielten Ergebnisse maßgeblich von der eingesetzten Methodik beeinflusst (Boehm et al., [2023](#); Cheshomi et al., [2024](#); Fretschner et al., [2025](#); Maida et al., [2024](#)).

Nach dem erfolgreichen Einsatz der ABE für SARS-CoV-2 wird das Abwassermonitoring sukzessive auf weitere Erreger, darunter Influenzaviren, ausgeweitet (siehe zum Beispiel das deutschlandweite Projekt AMELAG: Abwassermonitoring für die epidemiologische Lagebewertung). Influenzaviren sind aufgrund ihrer saisonalen Dynamik, ihrer hohen Relevanz für das Gesundheitssystem und ihrer potenziellen pandemischen Bedeutung ein naheliegendes Ziel für die Erweiterung bestehender Abwassersurveillance-Programme (Kilaru et al., [2023](#); Li et al., [2024](#); WHO, [2019](#)). Gleichzeitig ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Erfahrungen aus der Überwachung von SARS-CoV-2 nicht ohne Weiteres auf den Nachweis von Influenzaviren übertragbar sind.

In der Regel basiert das Abwassermonitoring auf dem Nachweis viralen Erbmaterials (Nukleinsäuren) als Indikatoren für die jeweiligen Viren. Dazu werden Bestandteile von Krankheitserregern aus den Proben angereichert, die enthaltenen Nukleinsäuren extrahiert und anschließend mittels molekularbiologischer Verfahren, insbesondere der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder der reversen Transkriptions-PCR (RT-PCR), detektiert und quantifiziert (Fretschner et al., [2025](#)). Dabei werden genomische Fragmente (kein infektiöses Virusmaterial) nachgewiesen, die von infizierten Personen ausgeschieden wurden. Während die gemessenen Konzentrationen („Viruslast“) keine Rückschlüsse auf einzelne Personen erlauben, liefern die Daten jedoch wertvolle Informationen zur zeitlichen Entwicklung des Infektionsgeschehens auf Bevölkerungsebene (Marquar et al., [2024](#)).

Influenzaviren im Abwasser – besondere Herausforderungen beim Nachweis

Die Detektion von Influenzaviren im Abwasser ist mit spezifischen methodischen Herausforderungen verbunden. Die Viruslast durch Influenzaviren ist beispielsweise im Vergleich zu SARS-CoV-2 in der Regel durch deutlich geringere Konzentrationen gekennzeichnet. Zudem gelten Influenzaviren als empfindlicher gegenüber Umweltfaktoren und Abwasserbedingungen, was ihre Stabilität und damit ihre Nachweisbarkeit zusätzlich beeinflusst (Cheshomi et al., [2024](#)).

Aufgrund dieser Eigenschaften liegen Influenzavirussignale im Abwasser häufig nahe an den analytischen Nachweisgrenzen. Methodische Unterschiede, die bei robusteren Zielorganismen weniger ins Gewicht fallen, können bei Influenzaviren daher entscheidend dafür sein, ob ein Nachweis überhaupt gelingt. Dies betrifft sowohl die eingesetzten Verfahren zur Anreicherung aus dem Abwasser als auch die anschließende Extraktion der Nukleinsäuren (Fretschner et al., [2025](#); Zafeiriadou et al., [2024](#)). Ein weiterer Aspekt betrifft die Interpretation der gewonnenen Daten. Abwasserkonzentrationen gut nachweisbarer Erreger können Meldezahlen widerspiegeln, doch ist die Übertragbarkeit solcher Interpretationsmuster auf Influenzaviren nicht selbstverständlich. Niedrige oder schwankende Konzentrationen können sowohl durch reale epidemiologische Entwicklungen als auch methodische Effekte bedingt sein (Saravia et al., [2024](#)).

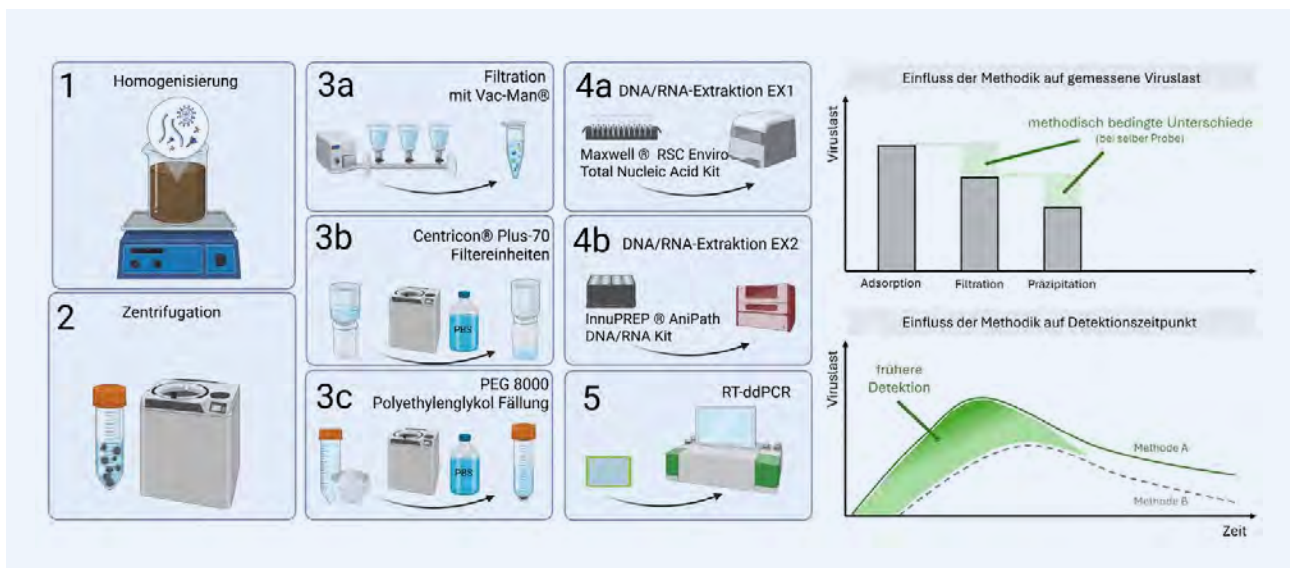
Vor diesem Hintergrund ist eine kritische Betrachtung der eingesetzten Methodenkombinationen und ihrer Leistungsfähigkeit unerlässlich. Für eine belastbare Surveillance von Influenzaviren im Abwasser genügt es nicht, etablierte Verfahren (z.B. aus der klinischen Diagnostik) unverändert zu übernehmen. Vielmehr bedarf es einer systematischen

Evaluierung und Validierung der eingesetzten Methodenkombinationen, um die Aussagekraft der gewonnenen Daten realistisch einschätzen zu können.

Lehren aus dem Methodenvergleich zur Detektion von Inflenzaviren im Abwasser

Vor dem Hintergrund der beschriebenen Herausforderungen wurde ein systematischer Methodenvergleich durchgeführt, um den Einfluss der Probenaufarbeitung in Kombination mit der Nukleinsäure-Extraktion auf den Nachweis von Influenza-A- und -B-Viren im Abwasser zu untersuchen. Der Arbeitsablauf ist in [Abbildung 1](#) dargestellt (Fretschner et al., 2025). Dabei stand nicht die Bewertung einzelner Arbeitsschritte im Fokus, sondern die Leistungsfähigkeit vollständiger Methodenkombinationen unter praxisnahen Bedingungen.

Abbildung 1: Arbeitsschritte zur Aufarbeitung von Abwasserproben und zum Nachweis von Inflenzaviren.



- (1) Die Abwasserprobe wird homogenisiert, um eine möglichst gleichmäßige Verteilung potenzieller Erreger zu gewährleisten und partikelgebundene Bestandteile zu lösen.
 - (2) Grobe, störende Partikel werden durch Zentrifugation entfernt.
 - (3) Konzentration des Abwassers (45 mL → 1 mL) mittels Adsorption an Membranen (3a), Ultrafiltration (3b) oder chemischer Präzipitation (3c).
 - (4) Extraktion viraler Nukleinsäuren entweder magnetpartikelbasiert (4a) oder mittels silica-basierter Membranen (4b).
 - (5) Nachweis und Quantifizierung viraler RNA mittels digitaler RT-PCR.
- Quelle: Eigene Darstellung.

Es wurden mehrere in der Abwassersurveillance etablierte Verfahren untersucht, die sich hinsichtlich des Anreicherungsprinzips und der Nukleinsäure-Extraktion unterscheiden (Fretschner et al., 2025). Die Bewertung erfolgte anhand realer Abwasserproben aus kommunalen Kläranlagen sowie ergänzend durch kontrollierte Spike-Experimente, bei denen definierte Viruskonzentrationen in Abwassermatrizes eingebracht wurden. Ziel war es, Unterschiede in der Nachweiswahrscheinlichkeit, der Quantifizierbarkeit und der Robustheit der Verfahren sichtbar zu machen.

Der Methodenvergleich zielte ausdrücklich nicht auf die Identifikation eines universell „besten“ Verfahrens ab. Vielmehr sollte analysiert werden, in welchem Ausmaß die Wahl

der Methodenkombination die Detektion und Interpretation von Influenzavirus-Signalen im Abwasser beeinflusst und welche methodischen Unsicherheiten dabei zu berücksichtigen sind.

Methodischer Rahmen des Vergleichs

Unterschiedliche Ansätze zur Anreicherung viraler Partikel beziehungsweise von Virusbestandteilen aus Abwasserproben wurden einbezogen, darunter waren sowohl filtrations- als auch präzipitationsbasierte Verfahren, jeweils in Kombination mit verschiedenen kommerziellen Nukleinsäure-Extraktionsmethoden (Ahmed et al., 2021; Antkiewicz et al., 2024; Dumke et al., 2021; Forés et al., 2021; Fretschner et al., 2025; Othman et al., 2023). Die verwendeten Methodenkombinationen sind in [Tabelle 1](#) zusammengefasst.

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Methodenkombinationen

Methodenkombination	Abwasser-Konzentrierung	RNA-Extraktion
PEG/EX1	Präzipitation	Magnetpartikelbasiert
CEN/EX1	Filtration	
PYC/EX1	Adsorption	
PEG/EX2	Präzipitation	Silica-säulenbasiert
CEN/EX2	Filtration	
PYC/EX2	Adsorption	

PEG: Polyethylenglykol-8000-Fällung
 CEN: Centricon™ Plus-70 Filtration (Merck)
 PYC: PureYield™ Filtration (Promega)
 EX1: Nukleinsäure-Extraktion mit Maxwell® RSC Instrument (Promega)
 EX2: Nukleinsäure-Extraktion mit InnuPure® C16 touch (Jena Analytik)

Präzipitation: chemische Fällung zur Anreicherung viraler Partikel aus dem Abwasser.
 Adsorption: Bindung viraler Partikel an eine funktionalisierte Membran mit anschließender Elution.
 Filtration: Größenbasierte Separierung viraler Partikel durch Ultrafiltration.
 Magnetpartikelbasiert: Bindung der Nukleinsäuren an funktionalisierte Magnetpartikel.
 Silica-säulenbasiert: Bindung der Nukleinsäuren an eine Silica-Matrix.

Die Auswahl der Methodenkombinationen orientierte sich einerseits an ihrer praktischen Relevanz für Routinelabore und andererseits an ihrer bisherigen Anwendung in nationalen und internationalen Abwassersurveillance-Programmen (Clark et al., 2023; Marquar et al., 2024). Das Ziel ist nicht, einzelne Methoden isoliert zu bewerten, sondern realistische Prozessketten abzubilden, wie sie unter Alltagsbedingungen eingesetzt werden.

Zentrale Erkenntnisse der Studie

a) Die Nachweiswahrscheinlichkeit in realen Abwasserproben ist methodenabhängig und konzentrations sensitiv.

Um die Nachweiswahrscheinlichkeit von Influenzavirus-RNA durch unterschiedliche Methodenkombinationen zu ermitteln, wurden Rohabwasserproben aus vier kommunalen Kläranlagen untersucht. Dazu wurden zu vier Zeitpunkten während der Wintersaison 2023/2024 sechs Kombinationen aus Anreicherung und Nukleinsäure-Extraktion parallel

getestet (☐ [Tabelle 1](#)). Bewertet wurde die RNA-Detektion von Influenzavirus A (IAV), Influenzavirus B (IBV) sowie Pepper mild mottle virus (PMMoV) als fäkaler Referenzmarker.

Für IAV zeigten sich deutliche methodenabhängige Unterschiede. Die PureYield™-basierte Filtration in Kombination mit einer Magnetbead-basierten Extraktion (PYC/EX1) detektierte IAV-RNA in allen 16 untersuchten Proben (16/16) mit den höchsten Viruslasten. Demgegenüber erzielten andere, weniger sensitive Verfahren auch weniger positive Nachweise mit geringeren Viruslasten (☐ [Tabelle 2](#)). Diese Unterschiede traten insbesondere im niedrigen Konzentrationsbereich auf und verdeutlichen, dass die Wahl der Methodenkombination darüber entscheiden kann, ob ein Signal überhaupt erfasst wird.

Beim Nachweis von IBV waren die Unterschiede noch ausgeprägter. Die beiden PureYield™-basierten Kombinationen lieferten positive Ergebnisse in 12 beziehungsweise 11 von 16 Proben, während die übrigen Verfahren je nach Kombination nur 3 bis 6 positive Nachweise erzielten. Zusätzlich traten stärkere Schwankungen und Werte unter der Nachweisgrenze bei den weniger sensitiven Methoden auf (☐ [Tabelle 2](#)).

Tabelle 2: Anzahl Influenzavirus-positiver Abwasserproben, gemessene Viruslasten und Wiederfindungsraten (Recovery) im Spike-Experiment

Methodenkombination	Anzahl positiv getesteter Abwasserproben und Viruslasten je Liter mit Standardabweichung				Wiederfindungsrate im Spike-Experiment (%)
	Influenza-A-Virus		Influenza-B-Virus		
PEG/EX1	3/16	4025 ± 1255	3/16	3842 ± 711	14,5 – 30,6
CEN/EX1	10/16	11881 ± 8584	6/16	5689 ± 1768	4,1 – 10,8
PYC/EX1	16/16	103090 ± 46470	12/16	18078 ± 10789	21,3 – 64,4
PEG/EX2	15/16	15433 ± 7529	6/16	5253 ± 3187	1,9 – 15,3
CEN/EX2	16/16	14356 ± 6842	4/16	7481 ± 2192	0 – 7,8
PYC/EX2	16/16	26141 ± 13239	11/16	7631 ± 4595	12,2 – 35,6

Erläuterung zu Spike-Experimenten:

Bei einem Spike-Experiment werden definierte Mengen inaktivierter Viruspartikel gezielt in eine Abwasserprobe gegeben („Spike“). Nach der vollständigen Aufarbeitung wird bestimmt, welcher Anteil der zugesetzten Virusmenge nachgewiesen werden kann (Wiederfindungsrate, Recovery). Dieses Vorgehen erlaubt eine kontrollierte Bewertung methoden- und matrixbedingter Verluste.

Die angegebenen Bereiche (von – bis) ergeben sich aus unterschiedlichen Spike-Konzentrationen (10⁶, 10⁵ und 10⁴ gc/L) sowie technischen Replikaten.

PMMoV wurde als stabiler, in hoher Konzentration vorkommender Marker in allen 16 Proben mit allen Methodenkombinationen nachgewiesen. Die konsistente PMMoV-Detektion bestätigt die grundsätzliche Funktionalität aller getesteten Verfahren und dient als interne Bezugsgröße für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Unterschiede zeigten sich jedoch im Konzentrationsniveau. Die leistungsfähigste Methodenkombination wies zudem die geringste Streuung auf.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die Nachweiswahrscheinlichkeit von Influenzavirus-RNA im Rohabwasser maßgeblich von der eingesetzten Methodenkombination abhängt, insbesondere im unteren Konzentrationsbereich, der für die Surveillance besonders relevant sein kann. Während robuste Referenzmarker wie PMMoV unabhängig von

der Methode zuverlässig detektiert werden, ist der Nachweis von Influenzaviren deutlich sensitiver gegenüber methodischen Unterschieden (Fretschner et al., 2025).

b) Die Methodenkombination beeinflusst sowohl die Quantifizierbarkeit als auch die Höhe der gemessenen Viruskonzentration.

Über die reine Nachweiswahrscheinlichkeit (positiv oder nicht) hinaus zeigte der Methodenvergleich deutliche Unterschiede in der Quantifizierbarkeit (liegt das Signal zuverlässig über der Quantifizierungsgrenze) und in der gemessenen Konzentration (Menge der gemessenen Genomkopien je Liter Abwasser) von Influenzavirus-RNA im Abwasser. Auch bei Proben, die mit mehreren Verfahren positiv detektiert wurden, variierten die berechneten Konzentrationen teils erheblich und waren abhängig von der eingesetzten Methodenkombination.

Mit Ausnahme der leistungsfähigsten Methodenkombination bewegten sich die mittleren Konzentrationen für IAV bei den übrigen Verfahren in einem Bereich von etwa 4.000 bis 26.000 Genomkopien je Liter Abwasser (gene copies per litre wastewater; gc/L). Die Methodenkombination PYC/EX1 erzielte hingegen höhere mittlere Konzentrationen von rund 103.000 gc/L und unterschied sich damit signifikant von den übrigen Verfahren ([□ Tabelle 2](#)). Solche Unterschiede sind besonders für Zeitreihen relevant, da sie die Darstellung und die Interpretation zeitlicher Veränderungen der gemessenen Viruslast beeinflussen können.

Auch für IBV bewegten sich die mittleren Konzentrationen bei allen Methodenkombinationen bis auf PYC/EX1 in einem ähnlichen Bereich von hier etwa 3.000 bis 8.000 gc/L. PYC/EX1 erzielte auch für IBV deutlich höhere Werte mit einer mehr als doppelt so hohen mittleren Viruslast von rund 18.000 gc/L ([□ Tabelle 2](#)). Bei den weniger sensitiven Verfahren lagen die gemessenen Viruslasten häufig im Bereich der Quantifizierungsgrenze oder darunter. Das bedeutet, dass das Virus zwar gelegentlich nachweisbar war, eine verlässliche quantitative Bestimmung jedoch nur eingeschränkt möglich ist.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Wahl der Methodenkombination nicht nur beeinflusst, ob Influenzavirus-RNA detektiert wird, sondern auch in welcher Höhe das Signal gemessen wird. Für die abwasserbasierte Surveillance bedeutet dies, dass absolute Werte und deren zeitliche Veränderungen stets im Kontext mit der eingesetzten Methodenkombination beziehungsweise des Nachweisprozesses interpretiert werden müssen.

c) Prozessverluste und Wiederfindungsraten entstehen durch methodenabhängige Unterschiede entlang der Aufarbeitungskette.

Unter Prozessverlusten ist der Verlust von nachweisbarem Virusmaterial während der einzelnen Schritte der Probenaufarbeitung zu verstehen. Solche Verluste entstehen während der Bearbeitung der Proben in der Prozesskette durch zum Beispiel Verluste bei molekularbiologischen Arbeitsschritten oder Adsorption an Oberflächen von Labormaterial sowie durch Inhibitoren. Die eingesetzten Methodenkombinationen beeinflussen das Ausmaß dieser Verluste und können untereinander stark variieren.

Zur Quantifizierung methodenbedingter Prozessverluste wurden gezielte Spike-and-Recovery-Experimente mit inaktivierten IAV und IBV durchgeführt. Zu Rohabwasserproben wurden dabei drei definierte Virus-Konzentrationen (10^6 , 10^5 und 10^4 gc/L) zugesetzt und anschließend mit allen getesteten Methodenkombinationen bearbeitet. Diese Versuche erlauben eine realitätsnahe Abschätzung der Wiederfindungsraten (Recovery) unter praxisrelevanten und genau definierten Bedingungen, ohne auf natürlich vorkommende Influenzaviren im Abwasser angewiesen zu sein.

Die Ergebnisse zeigen eine sehr große Spannweite der Recovery-Werte zwischen den Verfahren. Je nach Methodenkombination und eingesetzter Viruskonzentration reichten die Wiederfindungsraten von unter 1 Prozent (z.B. bei Zentrifugation-basierten Kombinationen und niedrigen Spike-Konzentrationen) bis zu über 60 Prozent bei der leistungsfähigsten Kombination (PYC/EX1) bei hohen Spike-Leveln (10^6 gc/L). Insgesamt erzielte PYC/EX1 für beide Influenzaviren und über alle Konzentrationsstufen hinweg die höchsten und stabilsten Wiederfindungsraten, gefolgt von PEG/EX1 und PYC/EX2 (□ [Tabelle 2](#)).

Besonders ausgeprägt war die methodenabhängige Variabilität im niedrigen Konzentrationsbereich (10^4 gc/L). Hier gelang bei einzelnen Kombinationen kein zuverlässiger Nachweis, obwohl die eingesetzte Virusmenge oberhalb der theoretischen Nachweisgrenze lag. Für die leistungsfähigste Methodenkombination wurde eine praktische Quantifizierungsgrenze (LOQ) von 2.261 gc/L bestimmt, was ihre Eignung für die sensitive Detektion und Quantifizierung geringer Influenzavirus-Konzentrationen im Abwasser unterstreicht.

Für die Interpretation abwasserbasierter Influenzavirus-Nachweise bedeutet dies, dass niedrige gemessene Konzentrationen nicht zwangsläufig eine geringe Viruszirkulation widerspiegeln, sondern zumindest teilweise methodisch bedingt sein können.

d) Matrixeffekte schränken den Nachweis im Abwasser ein.

Abwasser ist eine sehr komplexe Matrix und enthält unter anderem inhibierende Stoffe, die die Wiederfindungsrate erheblich beeinflussen können. Um den Einfluss dieser Probenmatrix bewerten zu können, wurden ergänzend Spike-Experimente in Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) durchgeführt – einer im Vergleich zu Abwasser Inhibitorarmen Matrix. Die Ergebnisse wurden denen aus Rohabwasser gegenübergestellt.

In PBS erzielte die leistungsfähigste getestete Methodenkombination (PYC/EX1) Wiederfindungsraten von etwa 67–84 Prozent für IAV beziehungsweise IBV. Demgegenüber lagen die Recovery-Werte der PEG/EX1 Kombination in PBS durchgehend unter 20 Prozent. Diese Ergebnisse zeigen, dass bereits unter einfachen Labor-Bedingungen deutliche methodenabhängige Unterschiede auftreten können.

Die Wiederfindungsraten von Influenzavirus-RNA in realem Rohabwasser waren deutlich geringer (siehe voriger Abschnitt). Selbst leistungsfähige Methodenkombinationen erreichten hier nur einen Bruchteil der unter PBS gemessenen Recovery-Werte. Dieser Unterschied unterstreicht den starken Einfluss der Abwassermatrix, die durch Feststoffe, organische Substanzen und Inhibitoren die Anreicherung und Extraktion viraler Nukleinsäuren erheblich beeinträchtigen kann.

Für die abwasserbasierte Surveillance von Influenzaviren haben diese Ergebnisse Konsequenzen. Ergebnisse aus Spike-Experimenten unter Modellbedingungen (in z.B. PBS) können systematisch die tatsächliche Leistungsfähigkeit von Methoden im Feld beziehungsweise in realen Abwasserproben überschätzen. Werden solche Werte unkritisch zur Ableitung von Nachweisgrenzen, Sensitivität oder Modellparametern herangezogen, kann dies zu einer Fehleinschätzung der realen Nachweisfähigkeit des jeweiligen Nachweisprozesses führen. Die Ergebnisse zeigen daher ebenso, dass die Evaluierung von Methoden zwingend mit realen Abwasserproben erfolgen muss, um belastbare Aussagen für die Praxis der ABE zu ermöglichen. Laborexperimente hingegen können die Abstände zu Nachweismöglichkeiten in der jeweiligen Zielmatrix (hier: Abwasser) beziffern.

e) Robustheit und Variabilität sind Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse.

Neben Nachweiswahrscheinlichkeit und mittlerer gemessener Viruslast unterschieden sich die getesteten Methodenkombinationen deutlich in ihrer Robustheit, verstanden als Fähigkeit, über Proben, Zeitpunkte und Konzentrationsbereiche hinweg konsistente Ergebnisse zu liefern. Diese Unterschiede sind für die praktische Surveillance und darauf aufbauende Entscheidungsfindung relevant.

In den Rohabwasserproben zeigten leistungsfähige Methodenkombinationen für IAV durchgehend quantifizierbare Konzentrationen in allen untersuchten Proben (16/16), mit Mittelwerten im Bereich von etwa 1×10^4 bis $2,5 \times 10^4$ gc/L. Weniger robuste Verfahren lieferten dagegen deutlich geringere Mittelwerte (teilweise $< 5 \times 10^3$ gc/L) und wiesen zugleich häufige Ausfälle auf, mit positiven Nachweisen in nur 3 bis 10 von 16 analysierten Proben. Diese Unterschiede führten dazu, dass identische Abwasserproben je nach Methode entweder als klar positiv oder als nicht nachweisbar (unter der Nachweisgrenze) eingestuft wurden.

Für IBV war dieses Muster noch ausgeprägter. Während leistungsstarke Verfahren IBV-RNA in 11 beziehungsweise 12 von 16 Proben zuverlässig nachwies und quantifizierte, erreichten andere Methodenkombinationen lediglich 3 bis 6 positive Proben, häufig mit Werten nahe der Quantifizierungsgrenze. In der Praxis resultiert daraus eine eingeschränkte Vergleichbarkeit zwischen Proben und Zeitpunkten.

Die Ergebnisse der Spike-Experimente bestätigen diese Beobachtungen. Methodenkombinationen mit hohen Wiederfindungsraten zeigten über alle Spike-Stufen hinweg reproduzierbare Messwerte, während Verfahren mit niedriger Wiederfindungsrate in Bereichen mit niedrigen Konzentrationen inkonsistente Ergebnisse bis hin zu vollständigen Ausfällen zeigten. Die Kenntnis solcher potenzieller Ausfälle ist für die Überwachung entscheidend, da hierdurch reale zeitliche Veränderungen überdeckt oder verzerrt werden können.

Für abwasserbasierte Nachweise von Influenzavirus-RNA bedeutet dies, dass Leistungsstärke und Robustheit primär über die Vergleichbarkeit und Ausfallsicherheit der Ergebnisse definiert werden müssen. Methoden, die zwar gelegentlich hohe Konzentrationen liefern, aber auch Ergebnisse unter der Nachweisgrenze produzieren, sind für die zuverlässige Trendanalyse nur eingeschränkt geeignet.

f) Methodische Unterschiede beeinflussen den Zeitpunkt der Influenzavirus-Detektion im Abwasser.

Die zuvor beschriebenen Unterschiede in Sensitivität, Quantifizierbarkeit und Leistungsstärke haben direkte zeitliche Konsequenzen für die Influenzavirus-ABE. Um diese Effekte anschaulich darzustellen, wurde eine deskriptive Anpassung der gemessenen Konzentrationsverläufe vorgenommen. Dabei wurden die durchschnittlichen Konzentrationsunterschiede zwischen der sensitivsten Methodenkombination und den übrigen Verfahren genutzt, um alternative Nachweisverläufe darzustellen. Es wurde also gezeigt, zu welchem jeweiligen Zeitpunkt Proben aus Rohabwasser mit den vergleichsweise weniger sensitiven Methodenkombinationen Influenzavirus-positiv gemessen worden wären.

Wie die Darstellung zeigt, erreichen weniger sensitive Methodenkombinationen die Quantifizierungsgrenze später als leistungsfähigere Verfahren, sodass mit der sensitivsten Methodenkombination etwa ein bis zwei Wochen früher quantifizierbare Messergebnisse erzielt werden als mit der nächstbesten Alternative. Bei weiteren, weniger sensitiven Verfahren hätte der Nachweiszeitpunkt nochmals verzögert gelegen oder wäre in der Frühphase ganz ausgeblieben.

Diese zeitlichen Unterschiede ergeben sich nicht aus veränderter Viruszirkulation, sondern allein aus der methodischen Abschwächung des Signals, da jeweils die gleichen Proben untersucht worden sind. Je nach eingesetzter Methodenkombination kann der Beginn einer Influenzaviruswelle im Abwasser daher mehrere Tage bis zu ein bis zwei Wochen später erkannt werden.

Für die Praxis der ABE bedeutet dies, dass die Methodenkombinationswahl nicht nur die Höhe gemessener Konzentrationen beeinflusst, sondern auch den Zeitpunkt der erst- oder letztmaligen Detektion des jeweiligen Zielparameters im Abwasser. Hochsensitive und robuste Verfahren bieten hier einen klaren Vorteil, da sie frühe, noch schwache Signale zuverlässiger erfassen und damit das Potenzial des Abwassermonitorings besser ausschöpfen.

Bedeutung für die Praxis

Die Ergebnisse des Methodenvergleichs am Beispiel von Influenzaviren zeigen deutlich, dass die Wahl der Methodenkombination einen wesentlichen Einfluss auf Aussagekraft, Vergleichbarkeit und zeitliche Einordnung abwasserbasierter Nachweise für Infektionserreger-Indikatoren hat.

Insbesondere bei Zielorganismen mit geringer Abundanz und eingeschränkter Stabilität können methodische Unterschiede darüber entscheiden, ob ein Signal detektiert und quantifiziert werden kann oder nicht. Dies kann dazu führen, dass identische Abwasserproben – abhängig von der verwendeten Methodenkombination – unterschiedlich bewertet werden. Für Entscheidungstragende ist daher entscheidend, ob ein Nichtnachweis epidemiologisch oder methodisch bedingt ist.

Derzeit sind absolute Konzentrationsmesswerte nur eingeschränkt zwischen unterschiedlichen Standorten, Zeiträumen oder Programmen vergleichbar, da eine Vielzahl

unterschiedlicher Methoden beziehungsweise Kombinationen in der Abwasseruntersuchung eingesetzt werden. Für die Praxis spricht dies dafür, den Fokus stärker auf relative Veränderungen innerhalb eines konsistenten methodischen Rahmens zu legen, anstatt absolute Werte unterschiedlicher Systeme direkt gegenüberzustellen.

Ein weiterer praktischer Aspekt betrifft die Trendanalysen und Frühindikatoren. Hochsensitive und robuste Methodenkombinationen ermöglichen es, schwache Signale früher zu erfassen und stabil abzubilden. Weniger leistungsfähige Verfahren können dagegen zu einem verzögerten oder lückenhaften Bild führen. Dieser Zeitgewinn kann von besonderer Relevanz sein, da er den Handlungsspielraum für vorbereitende Maßnahmen beeinflussen kann.

Aus methodischer Sicht zeigen die Ergebnisse, dass Evaluierung und Validierung zielorganismenspezifisch erfolgen müssen. Prozess- oder Referenzmarker eignen sich hingegen zur grundlegenden Funktionskontrolle, erlauben jedoch keine direkten Rückschlüsse auf die Leistungsfähigkeit eines Verfahrens für die Erfassung von Indikatoren für andere Zielorganismen. Methoden sollten daher nicht pauschal als „geeignet“ oder „ungeeignet“ bewertet werden, sondern stets in Bezug auf den jeweiligen Anwendungszweck.

Über die unmittelbaren Ergebnisse hinaus lässt sich vorsichtig ableiten, dass Abwassermonitoring künftig stärker als integratives Entscheidungshilfesystem verstanden werden könnte: weniger als exaktes Abbild von Fallzahlen, sondern als sensibles Instrument zur Erkennung von Veränderungen und Dynamiken. Voraussetzung dafür ist jedoch, dass methodische Unsicherheiten transparent gemacht, bei der Interpretation explizit berücksichtigt und zukünftig umfassend validiert und gegebenenfalls standardisiert werden.

Für die Praxis lassen sich daraus klare Handlungsempfehlungen ableiten. Die Wahl der Methodenkombination sollte sich konsequent am Untersuchungsziel orientieren und vor der Anwendung zielorganismenspezifisch evaluiert werden. Die Grenzen der Methodik (Nachweiswahrscheinlichkeit, Quantifizierbarkeit, Variabilität) müssen bekannt sein und transparent kommuniziert werden. Für die Dateninterpretation ist zu berücksichtigen, dass die Aussagekraft einzelner Messungen stark vom Erreger und Überwachungsziel abhängt: Während bei hochpathogenen oder eliminationsrelevanten Erregern bereits ein qualitativer Nachweis von Bedeutung sein kann, sind Einzelwerte bei endemischen oder saisonalen Erregern nur eingeschränkt interpretierbar. Hier liegt der Fokus auf konsistenten zeitlichen Trends und relativen Veränderungen.

Für Entscheidungsprozesse ergibt sich daraus, dass Abwassermonitoring keine unmittelbaren Handlungsanweisungen, sondern kontextabhängige Entscheidungsgrundlagen liefert. Die Daten können zur Identifikation neuer Signale, zur Einordnung laufender Entwicklungen, zur Priorisierung weiterer Untersuchungen sowie zur Bewertung bestehender Maßnahmen beitragen. Je nach Fragestellung kann Abwassermonitoring damit Hinweise auf eine Lageänderung liefern. Voraussetzung für eine belastbare Nutzung in Entscheidungsprozessen ist eine methodisch konsistente Datenerhebung sowie eine transparente Kommunikation der damit verbundenen Unsicherheiten.


Einordnung und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der Nachweis von Influenza-A- und -B-Viren im Abwasser grundsätzlich möglich ist, jedoch höhere methodische Anforderungen stellt als die Überwachung robusterer oder hochkonzentrierter Zielorganismen. Die vergleichsweise niedrigen Konzentrationen, die Beschaffenheit viraler RNA sowie ausgeprägte Matrixeffekte führen dazu, dass die Aussagekraft abwasserbasierter Daten bei Influenzaviren besonders stark von der eingesetzten Methodik abhängt.

Der Methodenvergleich verdeutlicht, dass Methodenwahl die Aussagekraft beeinflusst: Identische Proben können – je nach Methodenkombination – zu unterschiedlichen quantitativen Ergebnissen und sogar zu unterschiedlichen Nachweisaussagen führen. Die Wahl und Qualität der Methodik ist damit keine rein technische Frage, sondern eine Voraussetzung für belastbare Interpretation und verantwortungsvolle Nutzung der Daten.

Gleichzeitig zeigt die Studie, dass Influenzavirus-ABE bei sachgerechter Umsetzung einen relevanten ergänzenden Informationsgewinn liefern kann. Ihre Stärke liegt weniger in der punktuellen Bewertung einzelner Messwerte als in der konsistenten Beobachtung von Veränderungen über die Zeit. Trends gewinnen Aussagekraft, wenn sie auf stabil validierten Verfahren beruhen.

Für die Weiterentwicklung der Influenzavirus-Überwachung im Abwasser besteht daher ein klarer Bedarf an systematischer Evaluierung, Harmonisierung und transparenter Kommunikation methodischer Grenzen. Vergleichsstudien über unterschiedliche Abwasser-matrizes hinweg, die den Einfluss standortspezifischer Abwasserzusammensetzungen berücksichtigen, die Einbindung mehrerer weiterer Zielorganismen sowie gemeinsame Qualitätskriterien sind zentrale Bausteine, um die Vergleichbarkeit und Verlässlichkeit zukünftiger Daten zu erhöhen.

Insgesamt macht diese Arbeit deutlich: Influenzavirus-ABE ist weder trivial noch automatisch übertragbar, sondern erfordert eine bewusste, zielgerichtete methodische Auslegung. Wird diese konsequent berücksichtigt, kann das Abwassermonitoring einen stabilen und einordnenden Beitrag zur epidemiologischen Bewertung leisten – als informierende Ergänzung bestehender Systeme. [\[UBA\]](#) 

Danksagung

Diese Arbeit wurde vom Bundesministerium für Gesundheit im Rahmen des Projekts „Abwassermonitoring für die epidemiologische Lagebewertung“ (AMELAG) finanziert und unterstützt. Wir bedanken uns herzlich bei den Betreibern und Mitarbeitenden der Kläranlagen für die Bereitstellung der Abwasserproben und sprechen unseren besonderen Dank den Abwasserentsorgungsunternehmen in Mecklenburg-Vorpommern aus: der Nordwasser GmbH Rostock, der Schweriner Abwasserentsorgung (Eigenbetrieb der Landeshauptstadt Schwerin), den Neubrandenburger Wasserbetrieben GmbH und dem Abwasserwerk Greifswald (Eigenbetrieb der Universitäts- und Hansestadt Greifswald).

Darüber hinaus danken wir dem gesamten AMELAG-Team für die Unterstützung.

Literatur

- [1] Ahmed, W., Bivins, A., Simpson, S. L. et al. (2021). Comparative analysis of rapid concentration methods for the recovery of SARS-CoV2 and quantification of human enteric viruses and a sewage-associated marker gene in untreated wastewater. *Sci. Total Environ.*, 799, 149386. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149386>
- [2] Antkiewicz, D. S., Janssen, K. H., Roguet, A. et al. (2024). Wastewater-based protocols for SARS-CoV-2: insights into virus concentration, extraction, and quantitation methods from two years of public health surveillance. *Environ. Sci. Water Res. and Technol.*, 10, 1766–1784. <https://doi.org/10.1039/D3EW00958K>
- [3] Boehm, A. B., Hughes, B., Duong, D. et al. (2023). Wastewater concentrations of human influenza, metapneumovirus, parainfluenza, respiratory syncytial virus, rhinovirus, and seasonal coronavirus nucleic-acids during the COVID-19 pandemic: a surveillance study. *Lancet Microbe*, 4, e340–e348. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(22\)00386-X](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(22)00386-X)
- [4] Carmo dos Santos, M., Cerqueira Silva, A. C., dos Reis Teixeira, C. et al. (2024). Wastewater surveillance for viral pathogens: a tool for public health. *Heliyon*, 10, e33873. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e33873>
- [5] Cheshomi, N., Alum, A., Smith, M. F. et al. (2024). Viral concentration method biases in the detection of viral profiles in wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* 0, e01339-24–24. <https://doi.org/10.1128/aem.01339-24>
- [6] Clark, J. R., Terwilliger, A., Avadhanula, V. et al. (2023). Wastewater pandemic preparedness: toward an end-to-end pathogen monitoring program. *Front. Public Health*, 11, 1137881. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1137881>
- [7] Dumke, R., de la Cruz Barron, M., Oertel, R. et al. (2021). Evaluation of two methods to concentrate SARS-CoV-2 from untreated wastewater. *Pathogens*, 10, 195. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020195>
- [8] Forés, E., Bofill-Mas, S., Itarte, M. et al. (2021). Evaluation of two rapid ultrafiltration-based methods for SARS-CoV2 concentration from wastewater. *Sci. Total Environ.*, 768, 144786. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144786>
- [9] Fretschner, T., Zeisler, E. E., Scheller, S. et al. (2025). Comparative assessment of combined concentration and extraction methods for Influenza A and B virus detection in wastewater. *Front. Environ. Sci.*, 13:1586893. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2025.1586893>
- [10] Kilaru, P., Hill, D., Anderson, K. et al. (2023). Wastewater surveillance for infectious disease: a systematic review. *Am. J. Epidemiol.*, 192, 305–322. <https://doi.org/10.1093/aje/kwac175>
- [11] Kramarsky-Winter, E., Yaniv, K. & Kushmaro, A. (2023). Editorial: wastewaterBased epidemiology as a tool for monitoring public health. *Front. Water*, 5, 1283810. <https://doi.org/10.3389/frwa.2023.1283810>
- [12] Li, Z., Meng, F., Wu, B. et al. (2024). Reviewing the progress of infectious disease early warning systems and planning for the future. *BMC Public Health*, 24, 3080. <https://doi.org/10.1186/s12889-024-20537-2>
- [13] Maida, C. M., Mazzucco, W., Priano, W. et al. (2024). Detection of influenza virus in urban wastewater during the season 2022/2023 in Sicily, Italy. *Front. Public Health*, 12, 1383536. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2024.1383536>
- [14] Marquar, N., Pütz, P., Buchholz, U. et al. (2024). SARS-CoV-2-Abwassersurveillance in Deutschland im Rahmen des Projekts AMELAG. <https://doi.org/10.25646/12208>

- [15] Othman, I., Helmi, A. & Slama, I. (2023). Evaluation of three viral concentration methods for detection and quantification of SARS-CoV-2 in wastewater. *J. Water Health*, 21, 354–360.
<https://doi.org/10.2166/wh.2023.264>
- [16] Saravia, C. J., Pütz, P., Wurzbacher, C. et al. (2024). Wastewater-based epidemiology: deriving a SARS-CoV-2 data validation method to assess data quality and to improve trend recognition. *Front. Public Health*. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2024.1497100>
- [17] Selinka, H.-C. (2021). Überwachung der Pandemieviren SARS-CoV-2 über Abwasseranalysen. *UMID 01/2021*, 61–68.
- [18] WHO – World Health Organization. (2019). Ten health issues WHO will tackle this year. <https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019>
- [19] Zafeiriadou, A., Kaltsis, L., Thomaidis, N. S. et al. (2024). Simultaneous detection of influenza A, B and respiratory syncytial virus in wastewater samples by onestep multiplex RT-ddPCR assay. *Hum. Genomics*, 18, 48. <https://doi.org/10.1186/s40246-024-00614-8>