

Bericht über die Laborvergleichsuntersuchung: Quantitative Bestimmung von SARS-CoV-2 im Abwasser

Technische Universität Darmstadt

Prof. Dr. Susanne Lackner, Dr.-Ing. Shelesh Agrawal, M.Eng. Kira Zachmann



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT



im Rahmen des Forschungsvorhabens

Das SARS-CoV-2 Genom im Abwasser – Monitoring der Pandemieentwicklung mittels Sequenzierung – SARS-GenA-Seq –

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Dieser Bericht ist Teil des Forschungsvorhabens:

„Das SARS-CoV-2 Genom im Abwasser – Monitoring der Pandemieentwicklung mittels Sequenzierung“

FKZ: 02WRS1602A

Datum: 22.12.2022

Dr.-Ing. Shelesh Agrawal

M.Eng. Kira Zachmann

Prof. Dr. Susanne Lackner

Technische Universität Darmstadt

Fachbereich Bau- und Umweltingenieurwissenschaften

Institut IWAR

Fachgebiet Wasser und Umweltbiotechnologie

Franziska-Braun-Str. 7

64287 Darmstadt

Tel.: 06151/1620301

Fax.: 06151/1620305

Email: s.lackner@iwar.tu-darmstadt.de

<http://www.iwar.bauing.tu-darmstadt.de>

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abbildungsverzeichnis.....	1
1.....Einleitende Bemerkungen.....	1
2.....Methodisches Vorgehen.....	1
3.....Ergebnisse	2
3.1 Vergleich der angewendeten Methoden	2
3.2 Erhaltene Ergebnisse	6
4.....Fazit und Ausblick	9
5.....Literaturverzeichnis	9

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vergleich der angewandten Methoden aller Labore.....	2
Abbildung 2: Vergleich der untersuchten Zielgene von SARS-CoV-2 und der untersuchten Surrogatviren	3
Abbildung 3: Vergleich der angewandten Methoden bei der PCR.....	3
Abbildung 4: Varianz des verwendeten Probenvolumens vor der Aufkonzentrierung je nach Aufkonzentrierungsmethode aller Labore.....	4
Abbildung 5: Varianz des ermittelten Aufkonzentrierungsfaktors je nach Aufkonzentrierungsmethode aller Labore	5
Abbildung 6: Varianz der verwendeten Volumina in allen Methodenschritten	5
Abbildung 7: Nachweis von SARS-CoV-2 in den Proben.....	6
Abbildung 8: Vergleich der ermittelten SARS-CoV-2 Konzentrationen der Probe 1 mit dem E- und N2- Gen als Zielgenen	7
Abbildung 9: SARS-CoV-2 Konzentrationen in Kopien pro Liter Log-Stufen für die Zielgene (E-, N1-, N2- , RdRP-, ORF-, S-Gen) in den Proben 1, 2 und 3 mit Angabe der Bestimmungsgrenze.....	7
Abbildung 10: Konzentrationen der Surrogatparameter (PMMoV und CrAssphagen) in Kopien/Liter in Log-Stufen in den Proben 1, 2 und 3.....	8

1 Einleitende Bemerkungen

Seit Beginn der COVID-19-Pandemie hat die abwasserbasierte Epidemiologie an Interesse und Bedeutung gewonnen. SARS-CoV-2 gelangt über Fäkalien und Speichel in das Abwasser und kann dort zum Beispiel mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen werden. Durch das abwasserbasierte Monitoring kann das Infektionsgeschehen von einem Großteil der Bevölkerung durch nur wenige Abwasserproben abgedeckt und Veränderungen in der Konzentration verfolgt werden. Dadurch können wiederum Rückschlüsse zur aktuellen Lage in den verschiedenen Einzugsgebiete der Kläranlagen gezogen werden und bevölkerungsbezogene Maßnahmen wie z.B. die Pflicht zum Tragen einer Maske in öffentlichen Bereichen abgeleitet werden (RKI, 2022).

Damit die Abwassersurveillance auch langfristig, großflächig implementiert werden kann, sollte ein einheitliches Konzept zum Nachweis von SARS-CoV-2 im Abwasser erstellt werden. Da es viele methodische Unterschiede beim quantitativen Nachweis von SARS-CoV-2 in Abwasser geben kann, die in den Schritten der Probenaufbereitung, der PCR-Analyse und der Auswertung auftreten können, sollten diese näher betrachtet werden.

Ziel dieser Laborvergleichsuntersuchung war es die Schwankungsbreite in den Messungen unterschiedlicher Labore bei der Bestimmung von SARS-CoV-2 RNA in Abwasserproben zu ermitteln.

2 Methodisches Vorgehen

Diese Laborvergleichsuntersuchung wurde zur Zusammenstellung und Betrachtung der Unterschiede hinsichtlich der angewandten Methoden und der PCR-Ergebnisse beim quantitativen Nachweis von SARS-CoV-2 im Abwasser durchgeführt.

Insgesamt haben 22 verschiedene Labore an dem Versuch teilgenommen, von denen wiederum vier Labore verschiedene Methoden verwendet haben. Daher wurden insgesamt 27 verschiedene PCR-Analysen durchgeführt. Von diesen 27 verschiedenen Ansätzen wurden jedoch nur 25 PCR-Messergebnisse final zurückgemeldet. Jedem Labor wurde eine Labor-Kennzeichen-Nummer zugewiesen.

Alle Labore haben drei verschiedene Proben zur Analyse erhalten. Diese Proben setzten sich aus 24-Stunden-Mischproben eines Kläranlagezulaufs und Leitungswasser in unterschiedlich starken Verdünnungen zusammen. Probe 1 war die Probe mit der höchsten SARS-CoV-2 Konzentration, und Probe 3 die am stärksten verdünnte Probe mit der niedrigsten SARS-CoV-2 Konzentration. Die Proben wurden so verdünnt, dass die zu erwartende SARS-CoV-2 Konzentration in den Proben in Bereichen der zu erwartenden Bestimmungsgrenzen der Labore lag. Dadurch sollte das Augenmerk besonders auf die Grenzen der abwasserbasierten Epidemiologie gelegt werden. Damit wurden Situationen imitiert, in denen die SARS-CoV-2 Fallzahlen niedrig sind. Selbst dann sollte die Abwassersurveillance noch aussagekräftige Ergebnisse liefern können. Die Labore haben im Voraus keine Informationen zu den Proben erhalten und haben daher die Proben mit dem für sie gängigen methodischen Verfahren analysiert und ausgewertet. Die Ergebnisse der PCR-Analysen und weitere Informationen zur angewandten Methode wurden der TU Darmstadt von den Laboren abschließend zur Auswertung der Laborvergleichsuntersuchung zugeschickt.

3 Ergebnisse

Im Rahmen der Laborvergleichsuntersuchung wurden sowohl die angewandten Methoden durch Datenabfragen an die Labore, als auch die PCR-Messergebnisse der zu analysierenden Proben ausgewertet. Die daraus gewonnenen Daten sind im Folgenden dargestellt.

3.1 Vergleich der angewendeten Methoden

In Abbildung 1 sind die prozentualen Anteile der angewandten Methoden für die Aufkonzentrierung, die Extraktion und die PCR aller Labore dargestellt. Zur Aufkonzentrierung der Abwasserprobe wurden die Methoden Filtration, Ultrafiltration und die PEG-8000 / 6000 Fällung ungefähr gleich häufig verwendet (circa jeweils zu einem Drittel). Als Extraktionsmethode verwendeten circa zwei Drittel der Labore eine Methode basierend auf magnetischen Beads, während ein Drittel der Labore Silica-Säulen-basierte Extraktionen durchführte. Ein Großteil der am Ringversuch teilnehmenden Labore führte den SARS-CoV-2 Nachweis mit einer quantitativen PCR (qPCR) durch (69%). Dennoch nahmen auch Labore an der Laborvergleichsuntersuchung teil, die eine digitale PCR (dPCR) zur Analyse verwendeten (31%).

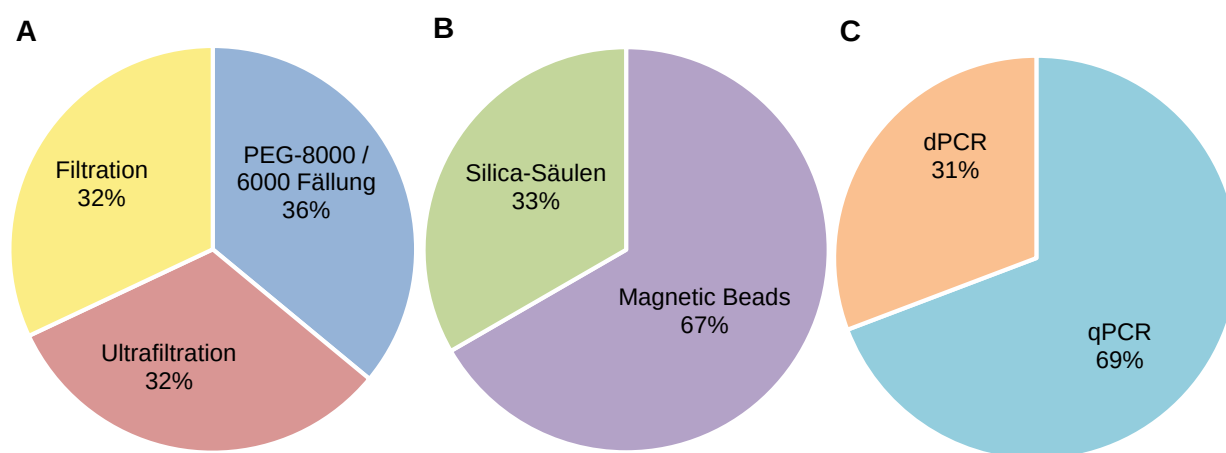


Abbildung 1: Vergleich der angewandten Methoden aller Labore. (A) Prozentuale Anteile der Aufkonzentrierungsmethoden (Filtration, PEG-8000 / 6000 Fällung, Ultrafiltration); (B) Prozentuale Anteile der Extraktionsmethoden (Silica-Säulen-basierte Extraktion und auf magnetischen Beads basierte Extraktionen); (C) Prozentuale Anteile der PCR-Methode (digitale PCR (dPCR) und quantitative PCR (qPCR))

Die Verteilung der untersuchten Zielgene des SARS-CoV-2 Virus und der untersuchten Surrogatparameter aller Labore ist in Abbildung 2 dargestellt. Es wurden das N2-, N1-, E-, RdRP-, ORF- und S-Gen analysiert. Die Labore führten eine PCR-Messung von einem bis zu drei verschiedenen Zielgenen für jeweils eine Probe durch. Die häufigsten Kombinationen von der Analyse von mindestens zwei Zielgenen war die Analyse des N1- und des N2-Gens und des E- und des N2-Gens. Als Surrogatparameter wurden CrAssphagen (28 %) und das Pepper mild mottle-Virus (PMMoV) (56 %) untersucht. 16 % der Labore geben an, keinen Surrogatparameter zu analysieren.

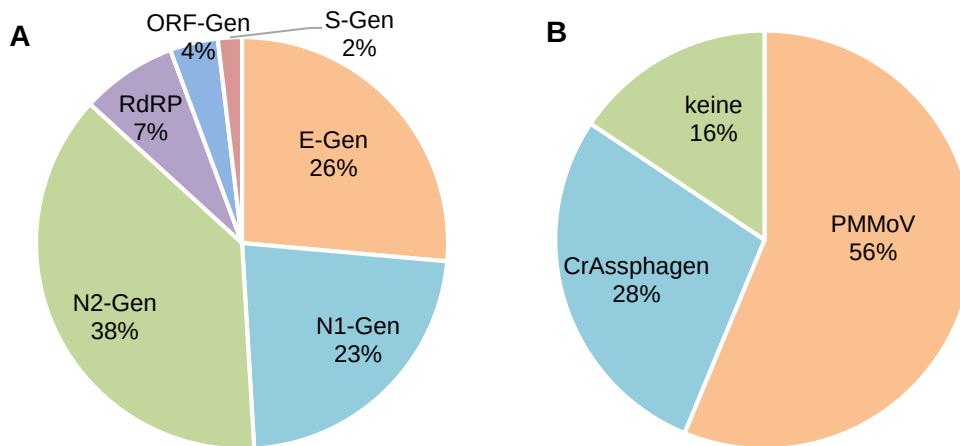


Abbildung 2: Vergleich der untersuchten Zielgene von SARS-CoV-2 und der untersuchten Surrogatviren. (A) Prozentuale Anteile der Zielgene; (B) Prozentuale Anteile der untersuchten Surrogatviren

Ein weiterer relevanter Aspekt bei der Betrachtung und Auswertung der Analyseergebnisse ist die Messgenauigkeit. Dazu können Mehrfachbestimmungen in Form von Duplikaten oder Triplikaten durchgeführt werden. Von allen teilnehmenden Laboren gaben 27 % der Labore an Triplikate, 62 % Duplikate und 11 % keine Mehrfachbestimmungen durchzuführen (vergleiche Abbildung 3).

Des Weiteren können die PCR-Standards in jedem PCR-Lauf mitanalysiert werden oder die Standards werden nicht bei allen Läufen erneut analysiert. 94 % der befragten Labore analysierten die PCR-Standards in jedem PCR-Lauf, während 6 % der Labore die Analyse der Standards nicht in jedem PCR-Lauf erneut durchführten (vergleiche Abbildung 3).

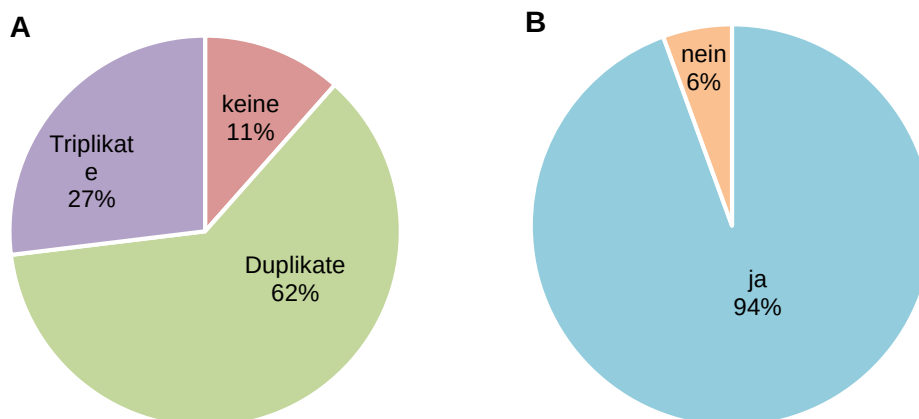


Abbildung 3: Vergleich der angewandten Methoden bei der PCR. (A) Prozentuale Anteile der Mehrfachbestimmungen bei der PCR; (B) Prozentuale Anteile der Analyse der Standards in jedem Lauf

Bereits bei den methodischen Schritten der Probenaufbereitung zeigten sich viele Unterschiede zwischen den teilnehmenden Laboren. In Abbildung 4 ist dafür exemplarisch das verwendete Volumen der Abwasserprobe, welches im Schritt der Aufkonzentrierung eingesetzt wird, sortiert nach den unterschiedlichen Aufkonzentrierungsmethoden graphisch dargestellt. Besonders auffällig ist dabei die große Spannweite der verwendeten Volumina bei der Ultrafiltration. Dabei wurden beispielsweise zwischen 40 mL bis 200 mL der Abwasserprobe aufkonzentriert.

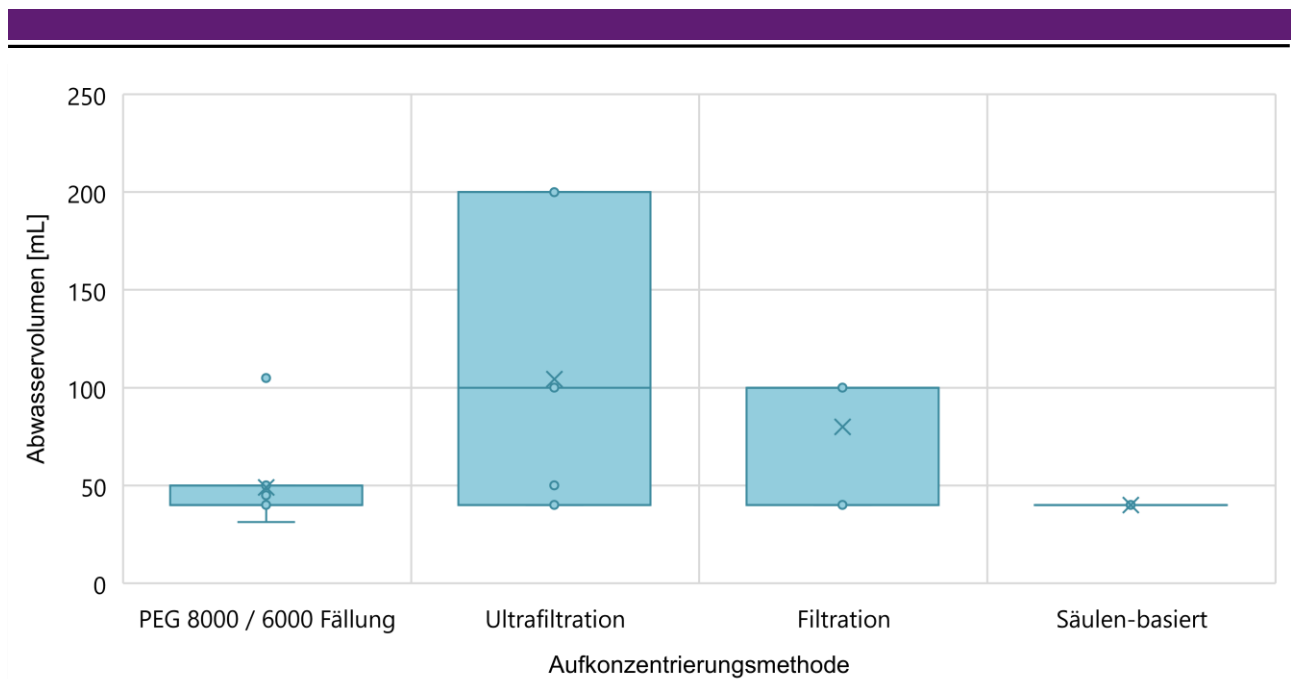


Abbildung 4: Varianz des verwendeten Probenvolumens vor der Aufkonzentrierung je nach Aufkonzentrierungs-methode (PEG 8000 / 6000 Fällung, Ultrafiltration, Filtration, säulen-basierte Aufkonzentrierung) aller Labore

Nicht nur das Volumen vor der Aufkonzentrierung, sondern auch das Volumen auf welches die Probe aufkonzentriert wird ist entscheidend. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurde ein Aufkonzentrierungsfaktor ermittelt. Dieser ergibt sich aus dem Volumen der aufkonzentrierten Probe bezogen auf das Volumen der Abwasserprobe vor der Aufkonzentrierung. Wird beispielsweise ein Volumen von 200 mL auf ein Volumen von 5 mL aufkonzentriert ergibt sich ein Aufkonzentrierungsfaktor von 40. Dies bedeutet, dass die Probe 40fach aufkonzentriert wurde.

Die ermittelten Aufkonzentrierungsfaktoren aller Labore sind in Abbildung 5 sortiert nach der Aufkonzentrierungsmethode dargestellt.

Die Problematik der Varianz der Volumina zeigt sich in allen Methodenschritten. In Abbildung 6 sind die verwendeten Volumina aller Labore für das verwendete Probenvolumen, das aufkonzentrierte Probenvolumen, das Extraktionsvolumen, das gesamte Volumen für die PCR-Messung, das Volumen des Assays und das Volumen des in der PCR eingesetzten RNA-Extraktes dargestellt. Bei jedem dieser methodischen Schritte waren hinsichtlich der verwendeten Volumina Unterschiede zwischen den verschiedenen Laboren zu erkennen.

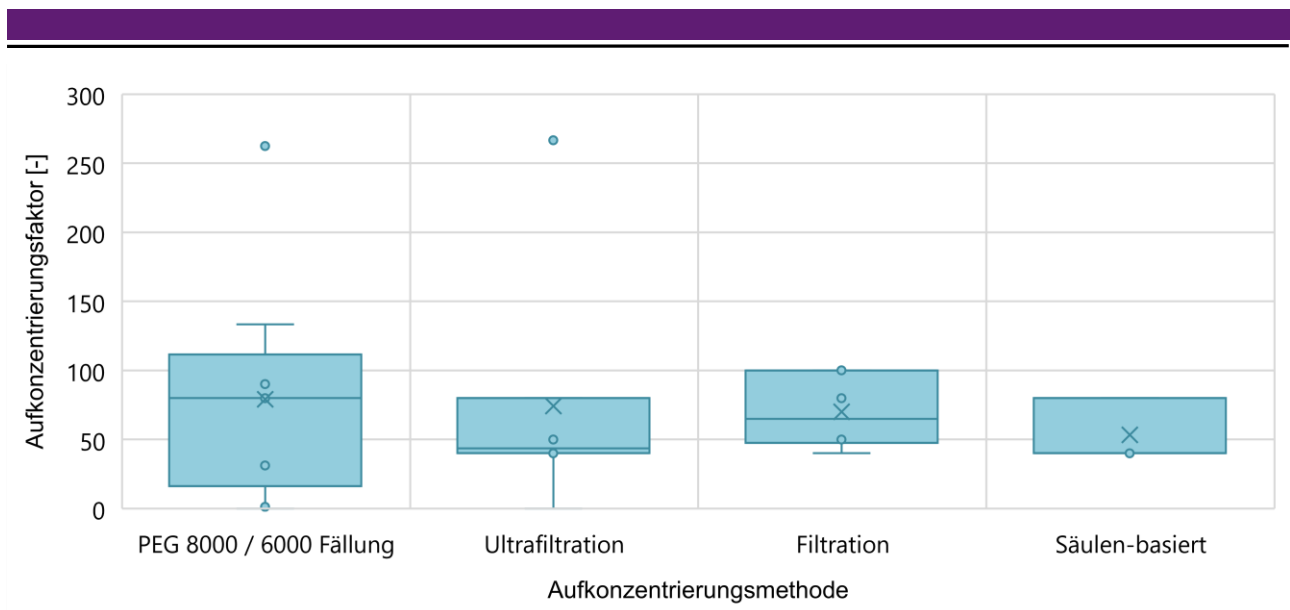


Abbildung 5: Varianz des ermittelten Aufkonzentrierungsfaktors je nach Aufkonzentrierungsmethode (PEG 8000 / 6000 Fällung, Ultrafiltration, Filtration, säulen-basierte Aufkonzentrierung) aller Labore. Aufkonzentrierungsfaktor = Probenvolumen vor der Aufkonzentrierung / Probenvolumen nach der Aufkonzentrierung

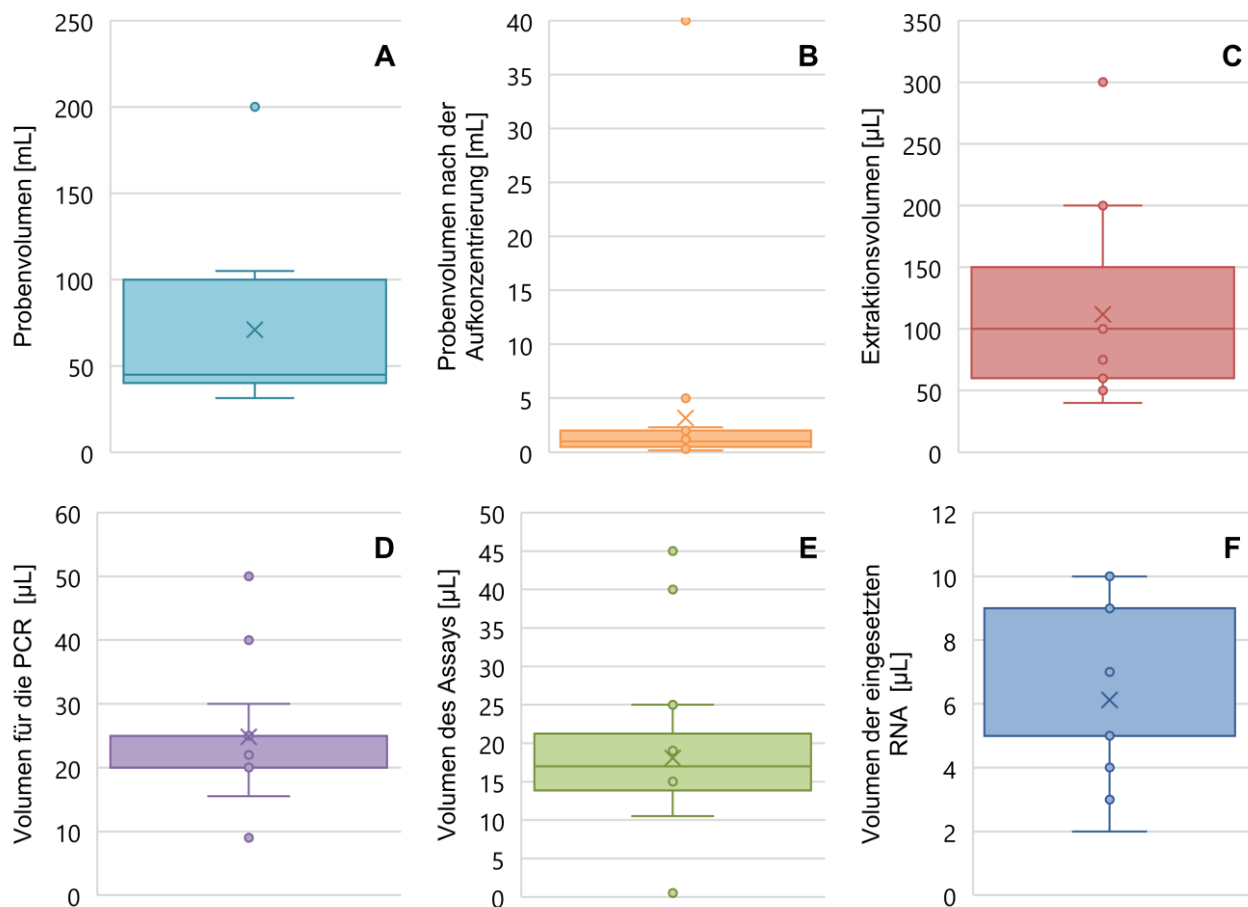


Abbildung 6: Varianz der verwendeten Volumina in allen Methodenschritten. (A) verwendetes Probenvolumen; (B) Probenvolumen nach der Aufkonzentrierung; (C) Extraktionsvolumen; (D) Probenvolumen für die PCR-Messung; (E) Volumen des Assays; (F) Volumen der in der PCR eingesetzten RNA

3.2 Erhaltene Ergebnisse

Im Fokus der Laborvergleichsuntersuchung stand neben dem methodischen Vergleich die Untersuchung der PCR-Messergebnisse der SARS-CoV-2 Konzentration. Durch die unterschiedlichen Verdünnungsstufen der zu analysierenden Proben war es möglich die von den Laboren angegebenen Bestimmungsgrenzen einzuordnen.

In Abbildung 7 ist für alle Labore dargestellt, bei welcher der drei Proben ein SARS-CoV-2 Nachweis ungeachtet der gemessenen SARS-CoV-2-Konzentration überhaupt möglich war. Bei Ihrem Labor handelt es sich um das Labor mit der Nummer 13. Bei der Probe 1 konnten 18 von 25 Laboren bzw. methodischen Ansätzen SARS-CoV-2 nachweisen. Der Nachweis in Probe 2 war dagegen nur noch bei 9 von 25 Laboren und in Probe 3 bei 5 von 25 Laboren möglich. Bei 2 von 27 Datensätzen lagen keine PCR-Messergebnisse vor.

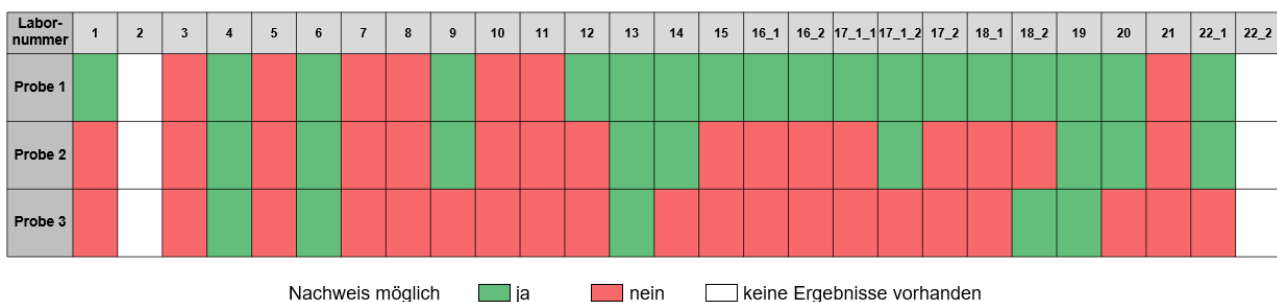


Abbildung 7: Nachweis von SARS-CoV-2 in der Probe 1, 2 und 3. Die Heatmap zeigt den Nachweis von SARS-CoV-2 in den Proben (grün), den nicht möglichen Nachweis (rot) und das Nichtvorhandensein von Messergebnissen (weiß) für alle Labore und alle angewandten Methoden mit der jeweiligen zugewiesenen Labornummer für die Proben 1, 2 und 3

Bei sechs der teilnehmenden Labore, die die Zielgene E und N2 untersuchten, war ein Nachweis von SARS-CoV-2 bei beiden Genen für die Probe 1 möglich. In Abbildung 8 sind die ermittelten Konzentrationen für die beiden Gene gegenübergestellt. Bei den meisten Laboren (Labornummer 9, 5, 17_1_1, 17_1_2 und 17_2) fällt auf, dass die ermittelten SARS-CoV-2-Konzentrationen bei dem N2-Gen höher waren als beim E-Gen. Nur bei dem Labor mit der Nummer 12 waren die nachgewiesenen Konzentrationen für beide Zielgene annähernd gleich (E-Gen: 3,85E+03 und N2-Gen: 3,78E+03).

Die Mittelwerte der ermittelten SARS-CoV-2-Konzentrationen der drei Proben für die untersuchten Zielgene aller Labore und die Ergebnisse des jeweiligen Labors sind in Abbildung 9 in Kopien pro Liter Abwasser in Log-Stufen dargestellt. Zudem sind die niedrigste angegebene Bestimmungsgrenze (Minimum), das höchste angegebene Bestimmungsgrenze (Maximum) und die Mittelwerte der angegebenen Bestimmungsgrenzen und auch die Bestimmungsgrenze des Labors abgebildet. Die Bestimmungsgrenze wurde von 12 von 27 Laboren angegeben. Die Bestimmungsgrenze des Labors mit der niedrigsten Bestimmungsgrenze liegt bei 2,50E+01 Kopien/Liter und die höchste Bestimmungsgrenze liegt bei 6,42E+05 Kopien/Liter. Der Mittelwert der Bestimmungsgrenzen aller Labore liegt bei 6,52E+04 Kopien/Liter.

Während bei Probe 1 die Mittelwerte der gemessenen SARS-CoV-2 Konzentrationen für die Zielgene N1 und N2 noch über der mittleren Bestimmungsgrenze lagen, waren sie bei den Probe 2 und 3 bereits unter der mittleren Bestimmungsgrenze. Die Mittelwerte der SARS-CoV-2-Konzentrationen der Zielgene E, RdRP, ORF und S lagen bei allen Proben unter der mittleren Bestimmungsgrenze. Bei Probe

1 und Probe 2 waren die Mittelwerte der SARS-CoV-2-Konzentrationen des N1- und des N2-Gens am höchsten mit einem Unterschied von ca. 1,5 Log-Stufen im Vergleich zu den anderen Zielgenen.

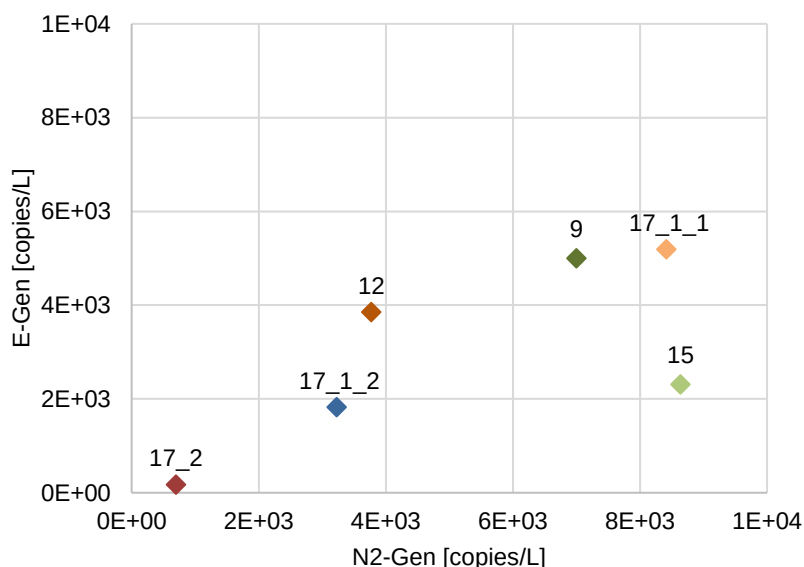


Abbildung 8: Vergleich der ermittelten SARS-CoV-2 Konzentrationen der Probe 1 mit E- und N2-Gen als Zielgenen. Darstellung der Messwerte in Kopien pro Liter Abwasser der Labore, welche die Zielgene E und N2 untersucht haben und ein Nachweis von SARS-CoV-2 bei mindestens einem dieser Gene möglich war (SARS-CoV-2-Konzentration > 0 Kopien/Liter); Jeder in der Grafik dargestellte Punkt steht für das jeweilige Labor bzw. die angewandte Methode des Labors mit Angabe der Labornummer

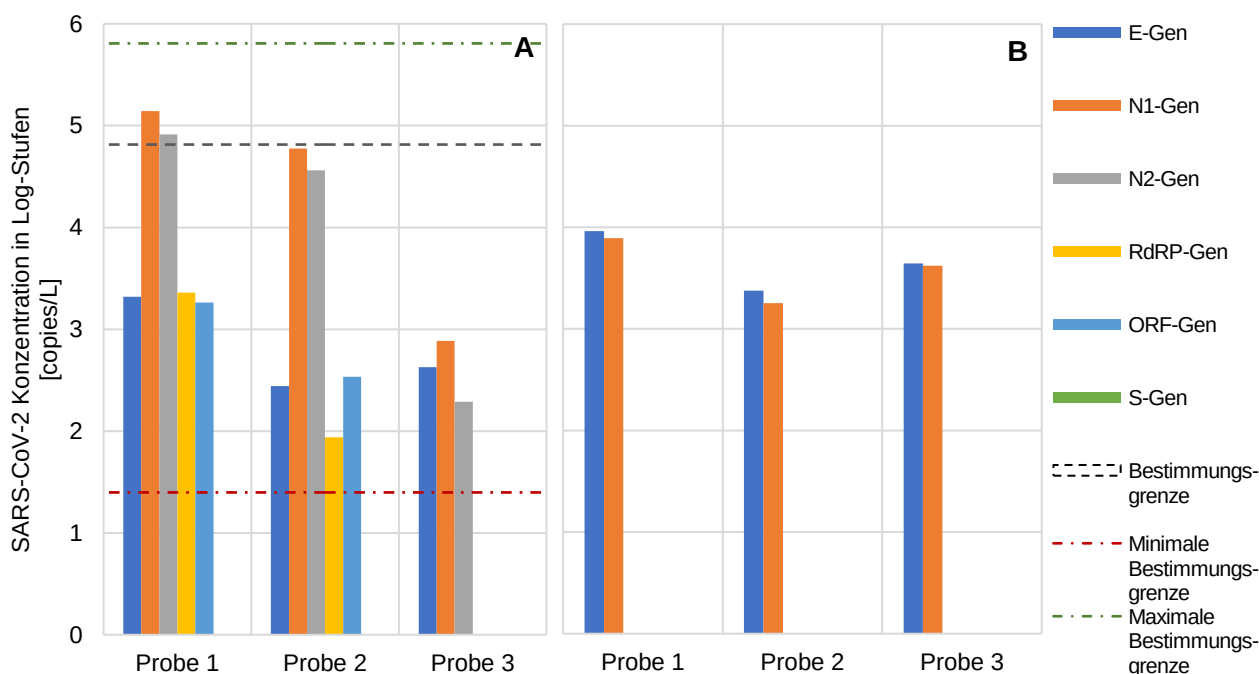


Abbildung 9: SARS-CoV-2 Konzentrationen in Kopien pro Liter in Log-Stufen für die Zielgene (E-, N1-, N2-, RdRP-, ORF-, S-Gen) in den Proben 1, 2 und 3 mit Angabe der Bestimmungsgrenze. (A) Mittelwerte der SARS-CoV-2 Konzentrationen und Bestimmungsgrenzen (niedrigste und höchste angegebene Bestimmungsgrenze und der Mittelwert aller angegebenen Bestimmungsgrenzen) aller Labore; (B) Ermittelte SARS-CoV-2 Konzentration des Labors mit der angegebenen Bestimmungsgrenze

Es gaben 18 der 21 Labore an, mindestens einen der beiden Surrogatparameter PMMoV oder CrAssphagen zu bestimmen. In Abbildung 10 sind sowohl die Varianz der gemessenen Konzentrationen für PMMoV und CrAssphagen aller Labore als auch die Messwerte des Labors mit der Labornummer 13 in Kopien pro Liter Abwasser mit logarithmischer Skalierung dargestellt. Während für Probe 1 10 von 12 Laboren PMMoV nachweisen konnten, war der Nachweis in Probe 3 nur noch bei 6 von 12 Laboren möglich. CrAssphagen wurden nur von 5 Laboren bestimmt. Dabei war der Nachweis in Probe 3 nur noch bei drei Laboren möglich.

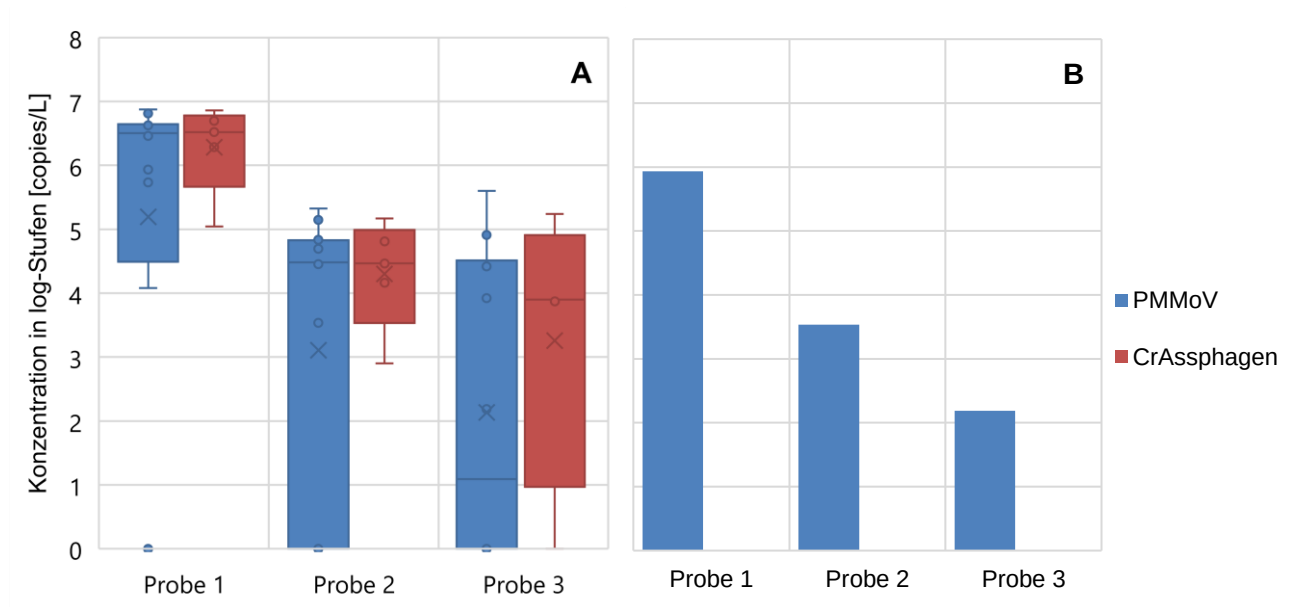


Abbildung 10: Konzentrationen der Surrogatparameter (PMMoV und CrAssphagen) in Kopien pro Liter in Log-Stufen in den Proben 1, 2 und 3. (A) Varianz der gemessenen Konzentrationen der Surrogatparameter aller Labore; (B) Ermittelte Konzentration der Surrogatparameter des Labor 13

4 Fazit und Ausblick

Die Laborvergleichsuntersuchung ermöglichte den Vergleich von 22 verschiedenen Laboren und 27 verschiedenen Datensätzen.

Beim Vergleich der Umfrage-Ergebnisse war besonders auffällig, dass eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden in jedem Schritt der Probenaufbereitung (Aufkonzentrierung und Extraktion) und der PCR-Analyse angewendet wurden, verschiedenen Geräten und Reagenzien und besonders auch eine große Spannweite eingesetzter Volumina in jedem Methodenschritt verwendet wurden. Dies kann zu Unterschieden zwischen den Laboren oder auch innerhalb eines Labors bei der Anwendung einer anderen Methode bezüglich der Ergebnisse führen. Daher sind die Ergebnisse zwischen unterschiedlichen Laboren nur bedingt miteinander vergleichbar.

Bei der Betrachtung der gemessenen SARS-CoV-2 Konzentrationen in den verdünnten Abwasserproben konnten die Bestimmungsgrenzen, welche bei den Laboren gemäß eigenen Angaben in Bereichen zwischen $2,50\text{E}+01$ und $6,42\text{E}+05$ Kopien/Liter liegen, aufgezeigt werden. Anhand der gemessenen Konzentrationen der Surrogatparameter wurden die Verdünnungsstufen der Proben deutlich. Bei niedrigen SARS-CoV-2 Konzentrationen im Abwasser kommen einige Labore mit der in diesem Versuch angewandten Methode an ihre Bestimmungsgrenze. Dies gilt es in der Zukunft, bei beispielsweise niedrigen Corona-Fallzahlen, zu beachten und bereits frühzeitig die eigenen Grenzen zu eruieren oder andere Aufbereitungsmethoden zu testen. Bei der Analyse mehrerer Zielgene oder der Verwendung unterschiedlicher Methoden ist zu betrachten, wie groß die Unterschiede hinsichtlich der gemessenen SARS-CoV-2 Konzentration sind und Überlegungen anzustellen, wie mit diesen Unterschieden künftig umzugehen ist.

5 Literaturverzeichnis

RKI. (4. 10 2022). *Robert Koch Institut: Abwassersurveillance*. Von <https://www.rki.de/DE/Content/Institut/OrgEinheiten/Abt3/FG32/Abwassersurveillance/Abwassersurveillance.html> abgerufen [Abgerufen am 19.12.2022]