

Masterarbeit

SARS-CoV-2 Variantentypisierung und Trendanalyse mittels Droplet Digitaler RT-PCR aus Abwasserproben

eingereicht von

Mag. Penka Lechner

zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science

(MSc)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt im

Universitätslehrgang Medizinische Genetik

unter der Anleitung von

Regina Stitz, BSc, MSc

Vöcklabruck, 18.08.2023

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Vöcklabruck, am 18.08.2023

Mag. Penka Lechner

In Dankbarkeit für meinen Ehemann

Zusammenfassung

Das Abwassermonitoring des Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Type 2 (SARS-CoV-2) stellt nicht nur eine Momentaufnahme der aktuellen Infektionslage dar, sondern kann auch als kostengünstiges, schnelles und einfaches Frühwarnsystem für das Auftreten neuer Infektionswellen eingesetzt werden. Durch die Trendanalyse des Abwassermonitorings einzelner Kläranlagen, wird eine regionale Bewertung des Infektionsgeschehen insbesondere in Tourismusregionen ermöglicht und können Clusterbildungen frühzeitig entdeckt werden.

Die Verwendung effizienter und sensibler Methoden zur SARS-CoV-2 Detektion ist für die epidemiologische Überwachung des Abwassers von Bedeutung. Die RT-ddPCR ist eine Technologie, die eine absolute Quantifizierung der Virus-RNA ermöglicht. Die reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren und insbesondere der Nachweis niedriger Viruskonzentrationen in Abwasserproben stellen Vorteile dieses Verfahrens dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die RT-ddPCR als Methode für den spezifischen Nachweis der SARS-CoV-2 L452R Mutation angewandt. Im ersten Schritt wurde ein RT-ddPCR Mutation Assay mittels Verdünnungsreihen selbst hergestellter Referenzstandards validiert. Die Validierungsergebnisse wurden dann für eine Variantentypisierung der BA.5 und XBB Varianten in Abwasserproben herangezogen. Des Weiteren wurde eine Trendanalyse über einen Zeitraum von vier Monaten und mit einer Gesamtzahl von 102 RT-ddPCR Analysen mit Fokus auf der zeitlichen Verlaufsdarstellung der SARS-CoV-2 Viruslast durchgeführt. So konnte die Anwendbarkeit der RT-ddPCR als Routinemethode für das Abwassermonitoring analysiert werden.

Die Validierungsergebnisse mit dem RT-ddPCR SARS-CoV-2 L452R Mutation Assay von Bio-Rad Laboratories, Inc. haben gezeigt, dass eine gleichzeitige Detektion und Quantifizierung der L452R Mutation und WT in Abwasserproben möglich ist. Die errechnete und die gemessene Anzahl der Viruskopien zeigten dabei eine lineare Korrelation von $R^2=0,98$ für die L452R Mutation, bzw. $R^2=0,99$ für die WT-Variante, während die analytische Leistung des Assays eine Sensitivität von 95% und eine Spezifität von 100% erreichte. Die Nachweisgrenze für die L452R-Mutante wurde mit 5,5 Kopien/ml und für die WT-Variante mit 3,9 Kopien/ml Abwasser bei einer Wahrscheinlichkeit von 95% ermittelt.

Auf Basis der quantitativen Veränderung der L452R-Mutante im Abwasser konnten Rückschlüsse über den Anteil der BA.5 und XBB Varianten gezogen werden. Dadurch konnte beobachtet werden, wie sich die neue rekombinante XBB-Variante gegenüber der BA.5 Omikron Variante im zeitlichen Verlauf durchgesetzt hat.

Aus den Ergebnissen der RT-ddPCR N2 Trendanalyse kann nun abgeleitet werden, dass diese Methode für eine Überwachung besonders gut in Regionen mit niedriger Prävalenz geeignet ist. Dem gegenüber stehen die höheren Kosten und der höhere Arbeitsaufwand der ddPCR, was sie für die Routine im Abwassermonitoring weniger attraktiv macht. Dagegen ist eine Anwendung dieser Methode bei Validierungsprozessen der RT-qPCR, inklusive der Quantifizierung von Referenzstandards und der Durchführung fortlaufender Qualitätskontrollen in der Laborroutine für eine verbesserte Vergleichbarkeit des Abwassermonitorings über verschiedene Labore zu empfehlen.

Abstract

Wastewater monitoring of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Type 2 (SARS-CoV-2) not only provides a snapshot of current infection rates but also serves as an economical, rapid, and straightforward early warning system for emerging infection waves.

Through trend analysis of wastewater monitoring at individual treatment plants, a localized assessment of infection dynamics, particularly in tourism-centric regions, becomes feasible, enabling the early detection of infection clusters.

Effective and sensitive methods for SARS-CoV-2 detection are essential for epidemiological wastewater monitoring. RT-ddPCR is a technology enabling absolute quantification of viral RNA. Its resilience to inhibitors and its ability to detect low viral concentrations in wastewater samples present advantages.

In this study, RT-ddPCR was applied to specifically detect the SARS-CoV-2 L452R mutation. Initially, an RT-ddPCR mutation assay was validated using dilution series of self-prepared reference standards. The validation outcomes were then used for variant identification of the BA.5 and XBB variants in wastewater samples. Additionally, a four-month trend analysis encompassing 102 RT-ddPCR analyses was conducted, focusing on the temporal representation of SARS-CoV-2 viral load. This demonstrated the applicability of RT-ddPCR as a routine method for wastewater monitoring.

Validation of the RT-ddPCR SARS-CoV-2 L452R Mutation Assay from Bio-Rad Laboratories, Inc. showed simultaneous detection and quantification of the L452R mutation and WT in wastewater samples. Calculated versus measured viral copy numbers exhibited a linear correlation of $R^2=0.98$ for L452R and $R^2=0.99$ for WT, respectively. The assay demonstrated a sensitivity of 95% and specificity of 100%. The limit of detection for the L452R mutant was determined to be 5.5 copies/ml, and for the WT variant, it was 3.9 copies/ml of wastewater at a 95% confidence level.

Based on quantitative shifts in the L452R mutant in wastewater, insights were gained regarding the prevalence of BA.5 and XBB variants. This revealed the rising dominance of the novel recombinant XBB variant over the BA.5 Omicron variant over time.

The results of the RT-ddPCR N2 trend analysis suggest its suitability for monitoring regions with lower prevalence rates. However, the higher costs and labour-intensive nature of ddPCR diminish its attractiveness for routine wastewater monitoring. In laboratory

settings, this method is recommended for validation processes of RT-qPCR, including reference standard quantification and continuing quality control, enhancing comparability across different laboratories' wastewater monitoring.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	6
1.1	SARS-CoV2 virologische Basisdaten	6
1.2	SARS-CoV-2 Virusvarianten	7
1.3	Strategien zur Virusvariantenüberwachung in Österreich.....	10
1.3.1	SARS-CoV2 genomisches Surveillance Programm.....	10
1.3.2	SARS-CoV-2 Abwassermonitoring	10
1.3.3	Nationales Abwassermonitoring	12
1.3.4	Regionales Abwassermonitoring im Oberösterreich.....	12
1.4	Methoden zur SARS-CoV-2 Bestimmung im Abwasser	14
1.4.1	RT-qPCR	15
1.4.2	RT-ddPCR	17
1.4.3	Sequenzierungsverfahren.....	18
1.5	Ziel der Arbeit	19
2.	Material und Methoden	20
2.1	Referenzmaterialien.....	20
2.2	Abwasserprobengewinnung.....	21
2.3	SARS-CoV-2 Virus RNA Extraktion und Aufreinigung	21
2.4	RT-qPCR für die SARS-CoV-2 Quantifizierung	23
2.5	RT-ddPCR Mutation Assay SARS-CoV-2 L452R	25
2.6	RT-ddPCR SARS-CoV-2 Custom Assay N2.....	26
2.7	Qualitätskontrolle und Datenanalyse.....	28
2.8	Berechnung der Fiktiven Ausscheider.....	28
2.9	Validierungsplan des RT-ddPCR SARS-CoV-2 L452R Assays.....	29
2.10	Referenzmethode für die Variantentypisierung.....	33
2.11	Statistik.....	34
3.	Ergebnisse.....	34
3.1	Analytische Validierung mit Referenzstandards	35
3.1.1	Analytische Sensitivität	37
3.1.2	Analytische Spezifität.....	38
3.1.3	Wiederholbarkeit	40

3.1.4	Reproduzierbarkeit	40
3.2	Mutationsanalyse aus Abwasserproben.....	42
3.3	SARS-CoV-2 Trendanalyse aus Abwasserproben	44
4.	Diskussion	48
5.	Literatur	51
6.	Anhang	56

Abkürzungen und deren Erklärungen

ACE 2	Angiotensin Converting Enzyme 2
AGES	Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit
BMSGPK	Bundesministeriums für Soziales, Gesundheit, Pflege und Konsumentenschutz
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CeMM	Research Center for Molecular Medicine
Ct	Cycle Threshold
DNA	Desoxyribonukleinsäure
GISAID	Global Initiative on Sharing All Influenza Data
N2-Protein	Nucleocapsid-Protein 2
N-Gen	Nucleocapsid protein-Gen
NGS	Next Generation Sequencing
NTC	No Template Control
OÖ	Oberösterreich
PANGOLIN	Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak Lineages
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMMoV	Pepper Mild Mottle Virus
RBP	Receptor Binding Domain
RNA	Ribonukleinsäure
RT-ddPCR	Reverse Transkriptase-droplet digital PCR
RT-qPCR	Reverse Transkriptase-quantitative PCR
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Type 2
S-Gen	Spike-Gen
S-Protein	Spike-Protein
VK	Variationskoeffizient
VOC	Variant of concern
VOI	Variant of Interest
WGS	Whole Genome Sequencing
WHO	World Health Organization
WT	Wild Type

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht und Nomenklatur der SARS-CoV-2 VOC.....	8
Tabelle 2:	Information zur MIQE Kontext Sequenz für RT-ddPCR SARS-CoV-2 L452R Assay	25
Tabelle 3:	Sequenzen der Primer und Sonde des RT-ddPCR SARS-CoV-2 N2 Assays.....	27
Tabelle 4:	Validierungsplan mit Referenzmaterial.....	33
Tabelle 5:	VK der Ergebnisse in Intr-Run und Inter-Run Experimenten.....	41
Tabelle 6:	Relative Häufigkeit der Viruskopien mit L452R und WT, ermittelt mit RT-ddPCR und WGS in OÖ	42

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Relative Häufigkeit der Omikron-Subvarianten und rekombinante XBB Variante im Land OÖ	9
Abbildung 2:	Epidemiologische Überwachung im Abwasser	11
Abbildung 3:	Regionale Abdeckung des Abwassermonitorings in Oberösterreich	13
Abbildung 4:	Zeitlicher Verlauf des regionalen Abwassermonitorings in OÖ	14
Abbildung 5:	Workflow der RT-ddPCR.....	17
Abbildung 6:	Workflow der manuellen SARS-CoV-2 RNA-Extraktion aus Abwasserproben	22
Abbildung 7:	SARS-CoV-2 Virusvarianten und deren Mutationen in S-Gen.....	25
Abbildung 8:	Gradienten PCR.....	31
Abbildung 9:	Herstellung der Verdünnungsreihen mit Referenzstandards	32
Abbildung 10:	Graphische Darstellung der gemessenen Viruskopien mit L452R und WT in Referenzstandards der beiden Verdünnungsreihen	36
Abbildung 11:	Lineare Korrelation zwischen errechneten und gemessenen Viruskopien in ml Abwasser	37
Abbildung 12:	Nachweisgrenze des RT-ddPCR Mutation Assays	38
Abbildung 13:	Verteilung der gemessenen Viruskopien/ml über der Cut-Off Grenze in den Referenzstandards.....	39
Abbildung 14:	Zusammenhang zwischen Variationskoeffizient und errechneten WT- oder L452R-Viruskopien in ml Abwasser.....	41
Abbildung 15:	Graphische Darstellung der relativen Häufigkeit der L452R und L452, ermittelt mit WGS und RT-ddPCR	43
Abbildung 16:	Lineare Korrelation zwischen den Konzentrationen der SARS-CoV-2 N2-Fragmente in ml, ermittelt mit RT-qPCR und RT-ddPCR.....	45
Abbildung 17:	Zeitliche Verlaufsdarstellung der SARS-CoV-2 Trendanalyse in Kläranlagen 1, 2 und 3.....	46
Abbildung 18:	Zeitliche Verlaufsdarstellung der SARS-CoV-2 Trendanalyse in Kläranlagen 4, 5 und 6.....	47

1. Einleitung

Das Auftreten des SARS-CoV-2 Ende des Jahres 2019 steht in Verbindung mit einer viralen Lungenentzündung, bekannt als Coronavirus Diseases 19 (COVID 19). Das neuartige Coronavirus hat sich sehr schnell als Pandemie über die ganze Welt verbreitet (1). Die Übertragung erfolgt hauptsächlich als Tröpfcheninfektion durch die Luft oder durch Aerosole und verursacht bei den infizierten Personen unterschiedliche klinische Symptome (2).

1.1 SARS-CoV2 virologische Basisdaten

Coronaviren haben die Fähigkeit durch homologe Rekombination zwischen verschiedenen Arten zu springen (3). Insgesamt sind sieben humanpathogene Coronavirus-Spezies bekannt, von denen vier weltweit endemisch zirkulieren. Sars-CoV-2 gehört zu der Gattung der Betacoronaviren und kann, wie auch das schwere akute respiratorische Syndrom Coronavirus (Sars-CoV) oder das Middle East Respiratory Syndrome (Mers-CoV), zu schweren Erkrankungen mit tödlichem Verlauf führen (4).

Coronaviren sind von einer Membran umhüllte Ribonukleinsäure-Viren (RNA-Viren) und bilden Virionen mit einem Durchmesser von etwa 80-140 nm. Diese Virionen sind mit großen Oberflächenproteinen, auch Spikes genannt, ausgestattet (5). Das Genom der Coronaviren ist ein einzelsträngiges RNA-Genom mit positiver Polarität und einer Länge von ungefähr 30 Kilobasen. Es enthält sowohl strukturelle als auch nicht-strukturelle Proteine. Letztere sind für die RNA-Replikation verantwortlich. Die Strukturproteine sind Spike-Protein (S-Protein), Envelope-Protein (E-Protein), Membrane-Protein (M) und Nucleocapsid-Protein (N-Protein). Die Proteine S, E und M sind in die Virusmembran integriert, die das Nucleocapsid umgibt. Letzteres setzt sich aus N-Proteinen und dem Virusgenom zusammen (4). Das S-Protein besteht aus zwei Untereinheiten, S1 und S2. Die Untereinheit S1 enthält die Receptor Binding Domain (RBD), die sich an den Rezeptor der Wirtszelle bindet. Die Untereinheit S2 ist für die Fusion von Virus- und Zellmembran verantwortlich, nachdem sich das RBD an den Wirtszellenrezeptor gebunden hat. SARS-CoV-2 nutzt das Enzym ACE-2 (Angiotensin Converting Enzyme 2) als Rezeptor, um in

die Wirtszellen einzudringen, wobei der Zelleintritt auch durch andere Proteasen unterstützt wird (6).

Veränderungen des S-Proteins können sich auf die Wirksamkeit der Immunantwort auswirken, indem sie eine sogenannte „Immunevasion“ oder „immune escape“ auslösen. Darüber hinaus können diese Mutationen die Replikationsfähigkeit und Infektiosität des Virus beeinflussen, indem sie die Affinität des S-Proteins zum ACE-2-Rezeptor verändern, oder die Fähigkeit des Virus verbessern, in Zellen ohne ACE-2-Rezeptor einzudringen (7).

1.2 SARS-CoV-2 Virusvarianten

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) klassifiziert eine SARS-CoV-2-Variante als *Variante unter Beobachtung (Variant of Interest, VOI)*, wenn diese genetische Veränderungen, die voraussichtlich oder bekanntermaßen Eigenschaften des Virus beeinflussen, aufweist. VOI zeigen eine erhöhte Übertragbarkeit und Virulenz, eine verringerte Neutralisierung durch Antikörper, die gegen vorherige Infektionen oder Impfungen generiert wurden, eine verminderte Wirksamkeit von Behandlungen oder Tests und eine Zunahme der Übertragbarkeit oder der Schwere der Krankheit. Zusätzlich muss diese VOI Wachstumsvorteile gegenüber anderen zirkulierenden Varianten in mehr als einer WHO-Region haben (8).

Eine *Besorgniserregende Variante (Variants of Concern, VOC)* ist eine SARS-CoV-2-Variante, die der Definition einer VOI entspricht und durch veränderte Erregereigenschaften, insbesondere eine erhöhte Übertragbarkeit, zusätzlich mit schweren Krankheitsverläufen, einer noch deutlicher erhöhten Virulenz, sowie einer verringerten Wirksamkeit von Behandlungen und Impfstoffen gekennzeichnet ist (8).

Eine SARS-CoV-2 Variante mit genetischen Veränderungen, von denen vermutet wird, dass sie die Eigenschaften des Virus beeinflussen könnten, wird als *Variante unter Überwachung (Variant under Monitoring, VUM)* klassifiziert. Der Wachstumsvorteil solcher Varianten kann global oder nur in einer WHO-Region auftreten, jedoch ohne Hinweis, ob dies Auswirkungen auf den Phänotyp oder die Epidemiologie hat (8).

Am 31. Mai 2021 stellte die WHO eine zusätzliche Nomenklatur zur Bezeichnung von SARS-CoV-2-Varianten vor. Dabei wurden ausgeschriebene Namen von Buchstaben des griechischen Alphabets verwendet. Dies betraf alle Varianten, die als VOC oder als VOI

klassifiziert wurden. Mit 15. März 2023 wurden die griechischen Buchstaben nur mehr zur Klassifizierung der VOCs verwendet (8). Gleichzeitig existierten auch wissenschaftliche Nomenklaturen für SARS-CoV-2-Varianten nach PANGOLIN (Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak Lineages), GISAID (Global Initiative on Sharing All Influenza Data) und Nextstrain.

Seit Beginn der Pandemie wurden von der WHO fünf Varianten des SARS-CoV-2 als VOC eingestuft. In Tabelle 1 sind diese Varianten übersichtlich dargestellt.

Tabelle 1: *Übersicht und Nomenklatur der SARS-CoV-2 VOC und deren erstmaligem Auftreten (9)*

PANGOLIN	WHO	Mutationen	Erstmaliger Nachweis
B.1.1.7	Alpha	del69/70, del144, N501Y , A570D, D614G, P681H , T716I, S982A, D1118H	GB, Sept. 2020
B.1.351	Beta	L18F, D80A, D215G, R246I, K417N , E484K , N501Y , D614G, A701V	Südafrika, Mai 2020
P.1 alias B.1.1.28.1	Gamma	L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T , E484K , N501Y , D614G, H655Y, T1027I, V1176F	Brasilien, Nov. 2020
B.1.617.2	Delta	T19R, del157/158, L452R , T478K, D614G, P681R, D950N	Indien, Okt. 2020
B.1.1.529	Omikron	A67V, del69/70, T95I, G142D/del143/145, del211/L212I, R214REPE, G339D, S371L , S373P , S375F, K417N , N440K, G446S, S477N, T478K, E484A , Q493R, G496S, Q498R, N501Y , Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H , N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F	Botswana, Nov.2021

Ab November 2021 bis Anfang 2023 dominierte die besorgniserregende SARS-CoV-2 Omikron Variante. Es wurden weltweit mehrere Sublinien dieser Variante identifiziert (z.B. BA.1, BA.2, BA.2.12.1, BA.4, BA.5, BQ.1.1), die sich geographisch unterschiedlich verbreitet haben.

Mit Ende des Jahres 2022 wurde die neue rekombinante XBB Variante entdeckt. In den darauffolgenden Monaten hat sich diese Variante rasch durchgesetzt. Die Entwicklung der Subvarianten XBB.1.5, BQ.1, BA.2.75, CH.1.1, XBB, XBF und XBB.1.16 wurde von der WHO beobachtet. Die Variante XBB.1.5 war in vielen Ländern bereits seit März 2023 die dominierende Variante. XBB.1.5 stammte aus der XBB Variante, die wiederum eine Rekombination von BA.2.10.1 und BA.2.75 war und zusätzliche Mutationen im SARS-CoV-2 Spike-Protein mit erheblichen Immunfluchteigenschaften aufwies (10). Die

Subvariante XBB.1.5 besaß durch die Mutation F486P zusätzlich eine sehr starke Affinität zu den ACE 2-Rezeptoren, was mit einer verringerten Antikörperreaktion, einer höheren Übertragbarkeit, sowie einer höheren Krankheitslast in Verbindung gebracht wurde.

Die relativen Häufigkeiten der Omikron Subvarianten BA.5 und BA.2, sowie der neuen rekombinanten XBB Variante in Abwasserproben aus Oberösterreich (OÖ), zeigt

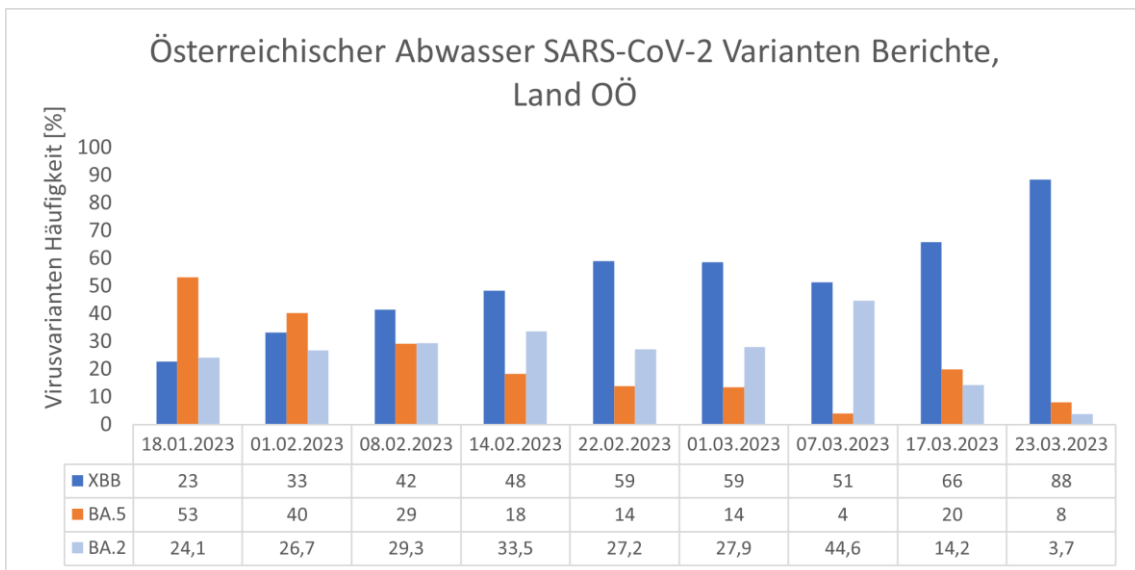


Abbildung 1: **Relative Häufigkeit der Omikron-Subvarianten und rekombinanten XBB Variante in Abwasserproben im Land OÖ.** Virus Varianten Häufigkeiten der XBB in dunkelblau, BA.5 in orange und BA.2 in hellblau dargestellt (Quelle: österreichische Abwasser SARS-CoV-2 Varianten Berichte)

Abbildung 1. Mit Anfang des Jahres 2023 galt die Omikron Variante BA.5 (in orange) mit einer relativen Häufigkeit von 53% nach wie vor als die dominante Variante in OÖ. BA.2 (hellblau) und XBB (dunkelblau) wurden mit jeweils ca. 23% relativer Häufigkeit nachgewiesen. Mit Ende März 2023 konnte die XBB Variante mit einem relativen Anteil von 88% in den Abwasserproben detektiert werden (11).

Am 3. März 2023 hat das ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) die besorgniserregenden Varianten BA.2, BA.4, BA.5 als VOI eingestuft (12). Zu diesem Zeitpunkt wurden auch folgende Varianten als VOI klassifiziert: BQ.1, BA.2.75, XBB, XBB.1.5. Andere Varianten, wie BF.7, BA.2.3.20, CH.1.1, oder XBC XAY, wurden unter Überwachung gestellt (12).

1.3 Strategien zur Virusvariantenüberwachung in Österreich

1.3.1 SARS-CoV2 genomisches Surveillance Programm

Zu Beginn der Pandemie waren humane PCR- und Antigentestungen die vorrangigen Maßnahmen zur Überwachung des Pandemiegeschehens (Surveillance) in Österreich. Ab 2022 wurden von sogenannten Sentinel-Laboratorien (Bundesland repräsentativ) wöchentlich positive Proben an die AGES (Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit) gesandt. Durch Teil- oder Ganzgenomsequenzierung der Proben konnten die bereits zirkulierenden Virusvarianten überwacht oder neue Varianten entdeckt werden. Die klinische und epidemiologische Relevanz der gewonnenen Information wurde in wöchentlichen Berichten durch die Agentur veröffentlicht.

1.3.2 SARS-CoV-2 Abwassermonitoring

Das Abwassermonitoring hilft dabei, Krankheitserreger über Urin und Fäkalien zu identifizieren. Im Gegensatz zur Erhebung von klinischen Daten kann diese Methode kostengünstig, schnell und einfach Trends und regionale Unterschiede aufzeigen. Bei der Abwassertestung spielen Verzerrungen in Bezug auf die Berichterstattung von positiv getesteten Personen oder die Datenerfassung von nichtsymptomatischen Trägern keine Rolle mehr. Daher hat sich dieses Überwachungsverfahren als wertvolle Ergänzung zu Massen-PCR- und Antigentests etabliert (13). Die Daten aus dem Abwassermonitoring können einen Vorsprung von bis zu sieben Tagen gegenüber diagnostischen Tests haben (14). Somit liefert es nicht nur Informationen über die aktuelle Infektionslage, sondern kann auch als Frühwarnsystem für das Auftreten neuer Infektionswellen eingesetzt werden (15, 16).

Viren benötigen Wirtszellen, um sich zu vermehren. Daher entspricht deren Konzentration im Abwasser den von der Bevölkerung ausgeschieden Virenmengen, solange Virenpartikel nachgewiesen werden können (2-4 Tage) (17, 18).

Abbildung 2 zeigt die schematische Darstellung des Konzepts einer epidemiologischen Überwachung im Abwasser. In den Kläranlagen werden 24-Stunden-Mischproben vom ungeklärten Zulauf gesammelt. Ein Teil bleibt in der Kläranlage und dient zur Bestimmung

verschiedener Routineparameter, wie z.B. chemischer Sauerstoffbedarf oder Stickstoff-Gehalt. Der Stickstoff liegt im Abwasser gebunden an Proteinen, Nukleinsäuren oder Harnstoff vor. Der zweite Teil wird für die weitere Aufbereitung und SARS-CoV-2 Bestimmung ins PCR-Labor verschickt. Dort kann die Virus-RNA isoliert, aufkonzentriert und gereinigt werden. Mithilfe unterschiedlicher Labormethoden, wie z.B. RT-qPCR oder RT-ddPCR wird die Viruslast in den Abwasserproben quantifiziert. Temperatur und Dauer der Lagerung der Abwasserproben können einen Einfluss auf den Virusnachweis haben (19). Die Auswertung der Abwasserproben sollte innerhalb von 12 bis 48 Stunden nach der Probennahme erfolgen. Anhand der gemessenen Viruskonzentrationen und unter Berücksichtigung der entsprechenden täglichen Abwassermenge wird die Virusfracht berechnet, aus welcher sich die Anzahl der viren-ausscheidenden Personen („fiktive Ausscheider“) in Einzugsgebiet der Kläranlage abschätzen lässt. Die ausgeschiedene Menge an Viren einer infizierten Person wird als Umrechnungsfaktor herangezogen.

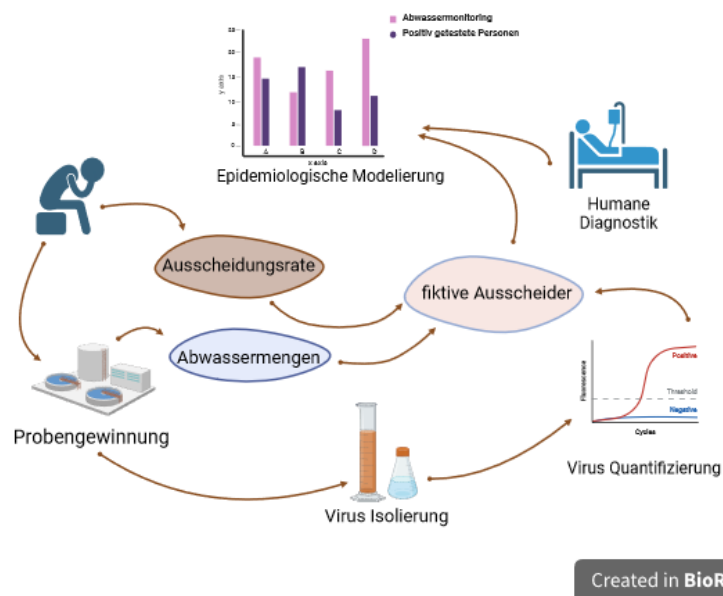


Abbildung 2: *Epidemiologische Überwachung im Abwasser*

Die ermittelten Ergebnisse werden dann mit öffentlichen Gesundheitsdaten zu einer epidemiologischen Modellierung zusammengeführt, um Vorhersagen mit ausreichender Genauigkeit treffen zu können (1, 20). Das Abwassermonitoring dient somit der Beurteilung, wie weit sich ein Virus in der Bevölkerung verbreitet hat. Die Abwasserproben bilden alle Personen im Einzugsgebiet der Kläranlage ab. Aus der Selektion bestimmter Abwasserreinigungsanlagen können damit auch regional begrenzte

Maßnahmen, wie lokale Testinitiativen, Einschränkungen oder Lockerungen abgeleitet werden. (20).

1.3.3 Nationales Abwassermonitoring

Auf Basis der Empfehlung der EU „*Commission Recommendation (EU) 2021/472 on a common approach to establish a systematic surveillance of SARS-CoV-2 and its variants in wastewaters in the EU*“ wurde in Österreich im Auftrag des Bundesministeriums für Soziales, Gesundheit, Pflege und Konsumentenschutz (BMSGPK) eine nationale Referenzzentrale für das SARS-CoV-2 Abwassermonitoring unter der Leitung von Prof. Dr. Martin Steinlechner, Direktor des Instituts für Gerichtliche Medizin, Medizinische Universität Innsbruck, eingerichtet (10). Anfang Jänner 2022 erfasste das Programm 23 Kläranlagen in Österreich. Nach einem Jahr wurde das Monitoringprogramm auf insgesamt 48 Kläranlagen erweitert und deckte somit ca. 60% der österreichischen Bevölkerung ab.

An der Medizinischen Universität Innsbruck wurden wöchentlich zwei Abwasserproben analysiert und die Viruslast mittels RT-qPCR quantifiziert. Die zeitlichen Verläufe der aus dem Abwassermonitoring ermittelten fiktiven Ausscheider wurden in den Berichten zum nationalen SARS-CoV-2 Abwassermonitoring des BMSGPK angegeben. Zum Überblick über die regionale Verteilung und die zeitliche Entwicklung von SARS-CoV-2 Varianten wurden die extrahierten Abwasserproben einem Variantenscreening unterzogen. Die dazu verwendeten PCR-Tests wurden laufend an die jeweils zirkulierenden Virusvarianten angepasst. Ergänzend wurden die extrahierten Abwasserproben am Forschungszentrum für Molekulare Medizin (CeMM) in Wien einer Ganzgenomsequenzierung unterzogen. Dadurch konnte die zeitliche und regionale Verbreitung von Virusvarianten untersucht und neue Varianten identifizieren werden (11).

1.3.4 Regionales Abwassermonitoring im Oberösterreich

Zur regionalen Abdeckung des SARS-CoV-2 Abwassermonitorings wurden zwei Proben wöchentlich aus 24 Kläranlagen in OÖ, die nicht Teil des nationalen Abwassermonitorings waren, am Institut für Pathologie des Salzkammergut Klinikums Vöcklabruck, OÖ,

analysiert. In Abbildung 3 sind die entsprechenden Einzugsgebiete der Kläranlagen in blauer Farbe dargestellt.

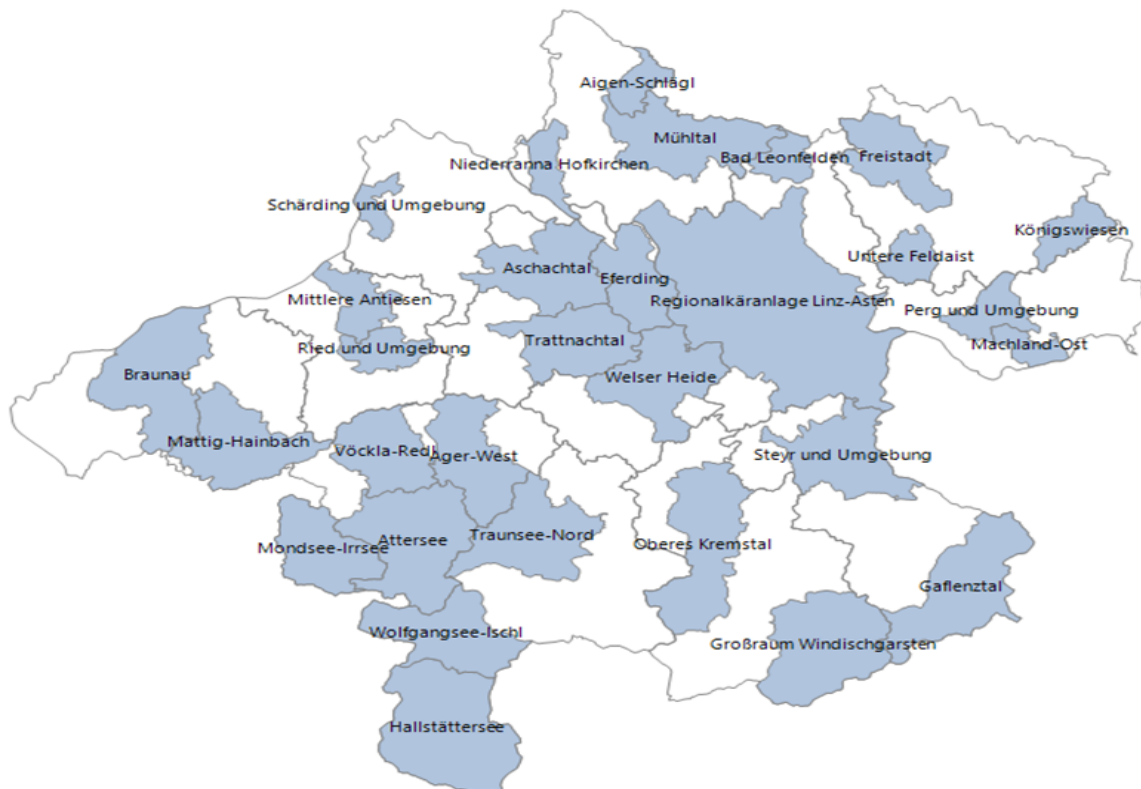


Abbildung 3: **Regionale Abdeckung des Abwassermonitorings in Oberösterreich.** Die Einzugsgebiete der Kläranlagen, die Abwasserproben zu Analyse schicken, sind in blau dargestellt (Quelle: Land Oberösterreich Abwassermonitoring Dashboard).

Die Auswahl der Kläranlagen erfolgte unter Berücksichtigung der Einwohnerzahl, um die größtmögliche Abdeckung zu erreichen. Die Einwohnerzahl im Einzugsgebiet dieser Kläranlagen beläuft sich auf ca. 388.000 mit Hauptwohnsitz registrierten Einwohner. Die im Labor ermittelten SARS-CoV-2 Konzentrationen der Viruskopien/ml Abwasser wurden anschließend zur Berechnung der Anzahl der fiktiven Ausscheider herangezogen. Die Ergebnisse wurden digital an die oberösterreichische Landesregierung übermittelt.

Durch die Trendanalyse der Abwassermonitorings der einzelnen Kläranlagen, wurde eine regionale Bewertung des Infektionsgeschehen insbesondere in Tourismusregionen ermöglicht. Bestimmte Kläranlagen sammeln Abwasser aus Regionen, deren Anzahl an Ausscheidern touristisch bedingt stark schwankt. Durch die Berücksichtigung des chemischen Sauerstoff- und Stickstoffgehalts im Abwasser konnten Rückschlüsse auf die Anzahl der Ausscheider (Einwohner und Besucher) in der Region gezogen und plötzliche

Sprünge in der Viruskonzentration erklärt werden. Auch konnten Clusterbildungen in starken Tourismusregionen frühzeitig entdeckt werden.

Abbildung 4 zeigt den zeitlichen Verlauf des Abwassermonitorings mit den positiv getesteten Personen und der ermittelten Anzahl fiktiver Abscheider. Das regionale Abwassermonitoringprogramm hat in OÖ mit Juli 2022 begonnen und wurde mit Ende April 2023 eingestellt, da ab Mai 2023 der Großteil Österreichs vom nationalen Abwassermonitoring abgedeckt wurde.

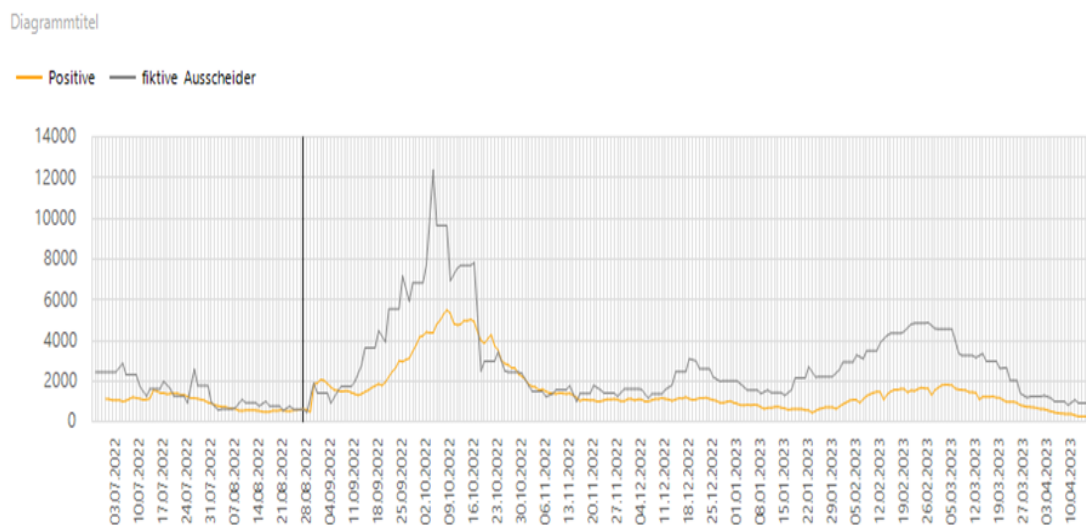


Abbildung 4: **Zeitlicher Verlauf des regionalen Abwassermonitorings in OÖ.** Positiv getestete Personen (orange Linie) und die aus dem regionalen Abwassermonitoring ermittelten fiktiven Ausscheider (graue Linie) (Quelle: Land Oberösterreich SARS-CoV-2 Abwassermonitoring Dashboard).

1.4 Methoden zur SARS-CoV-2 Bestimmung im Abwasser

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist eine unkomplizierte und leistungsstarke Methode zur Vermehrung der Desoxyribonukleinsäure (DNA). Dabei werden bestimmte genetische Regionen in drei Schritten wiederholt vervielfältigt. Im ersten Schritt erfolgt eine kurze Erhitzung (ca. 95°C) der doppelsträngigen DNA, damit beide Stränge voneinander getrennt werden. Im zweiten Schritt binden spezifische Primer an die komplementären Sequenzen der einzelsträngigen DNA-Moleküle (Annealing). Jeder der beiden Stränge erhält einen anderen Primer, der die rechte und linke Grenze der zu vervielfältigenden DNA markiert. Hierfür wird die Temperatur auf etwa 50°C bis 65°C gesenkt, damit die Primer sich mit den passenden Sequenzen in den DNA-Strängen verbinden können. Im dritten Schritt wird die

Temperatur erneut auf etwa 72°C erhöht und ein hitzestabiles DNA-Polymerase-Enzym fügt die fehlenden Nukleotide an die Primer an, wodurch DNA ausgehend von den beiden Primern synthetisiert wird. Dieser Vorgang wird als Extension oder Elongation bezeichnet. Der beschriebene PCR-Zyklus wird mehrfach wiederholt, wodurch exponentiell viele Kopien der ursprünglichen DNA-Sequenz erzeugt werden. (21). Durch das automatisierte Wiederholen dieser Schritte in einem PCR-Thermocycler können Millionen Kopien der Ziel-DNA-Sequenz erzeugt werden.

Bei der Amplifikation von RNA (Ribonukleinsäure) wird zuvor eine Reverse Transkription der RNA in komplementäre DNA (cDNA) durchgeführt. Die Reverse Transkriptase synthetisiert dabei einen DNA-Strang, indem sie die RNA-Vorlage als Matrize verwendet. Anschließend wird die cDNA durch PCR amplifiziert.

In Abwasserproben können unterschiedliche Inhibitoren vorhanden sein, welche die PCR beeinflussen und zu falsch negativen Ergebnissen führen können. Zu diesen zählen hochmolekulare, organische Verbindungen wie Huminstoffe, die natürlich in Boden und Abwasser vorkommen können, Schwermetalle, Proteine und Enzyme, Polysaccharide, Alkohole, Reinigungsmittel, Salze und Metallionen, sowie DNasen und RNasen. Diese Substanzen können direkt auf die DNA-Polymerase hemmend wirken, die Struktur der Nukleinsäure beeinflussen, sodass die Primer nicht binden können, oder mit der DNA interagieren und die Amplifikation beeinträchtigen (z.B. Phenol) (22–24).

1.4.1 RT-qPCR

Die gängigste Methode zur Bestimmung der SARS-CoV-2 RNA im Abwasser ist die Reverse Transkriptase real-time quantitative-PCR (RT-qPCR). Durch dieses Verfahren kann ein kleiner Teil des viralen Genoms nachgewiesen werden, was eine rasche, sensible und präzise Detektion ermöglicht. Während der Pandemie wurden zahlreiche RT-qPCR-Tests mit unterschiedlicher Leistungsfähigkeit entwickelt, um SARS-CoV-2 zu bestimmen.

Die RT-qPCR unter Verwendung von *DNA-Fluoreszenz-Farbstoffen* ist die einfachste Möglichkeit, PCR-Produkte zu quantifizieren. Die Fluoreszenzfarbstoffe (z.B. SYBR Green) werden am Anfang der PCR-Reaktion den Reaktionsgemischen hinzugefügt. Sie lagern sich an der kleinen Furche der doppelsträngigen DNA ab. Durch die Echtzeitüberwachung des Anstiegs der Fluoreszenzsignale während der PCR-Zyklen kann

die ursprüngliche Menge der Zielsequenz in der Probe semi-quantitativ durch die Bestimmung von Ct-Werten (Threshold Cycle) erfasst werden.

Der Ct-Wert gibt dabei an, in welchem PCR-Zyklus die Fluoreszenzintensität eines Probenansatzes erstmalig einen vorher festgelegten Schwellenwert überschreitet. Der Ct-Wert ist der Schnittpunkt zwischen einer Amplifikationskurve und der Schwellenwertlinie. Der Zeitpunkt des Beginns der exponentiellen Amplifikationsphase ist abhängig von der DNA-Ausgangsmenge. In einer Probe mit weniger Ausgangskopien wird der exponentielle Anstieg in einem späteren PCR-Zyklus beginnen, bzw. wird ein höherer Ct-Wert erfasst.

Die für diagnostische Zwecke bevorzugte Technologie ist die *sondenbasierte* RT-qPCR. Sondenbasierte PCR verwendet neben den üblichen PCR-Primern auch eine fluoreszierende Sonde (z.B. Taqman-Sonde), die mit einem Fluorophor (Fluoreszenzfarbstoff) und einem Quencher (Absorber des Fluoreszenzsignals) markiert ist. In der nicht hybridisierten Form befindet sich der Fluorophor in unmittelbarer Nähe des Quenchers, was zu einer Absorption des Fluoreszenzsignals führt und die Fluoreszenz deaktiviert. Während der PCR-Reaktion bindet die Sonde an die komplementäre Ziel-DNA-Sequenz. Wenn die Polymerase die DNA-Synthese initiiert und jenen Bereich erreicht, in welchem die Sonde gebunden ist, wird die Sonde durch die Polymerase enzymatisch abgebaut. Dadurch wird der Fluorophor vom Quencher getrennt, wodurch die Fluoreszenz aktiviert wird. Die Freisetzung des Fluorophors führt zu einem messbaren Anstieg des Fluoreszenzsignals.

Die Erstellung einer Standardkurve bei der RT-qPCR ist ein wichtiges Instrument zur Abschätzung der Konzentration der Zielsequenz in einer Probe. Durch den Vergleich der Ct-Werte der unbekanntenen Proben mit der Standardkurve kann die ursprüngliche Konzentration der Virus-DNA oder RNA in den Proben quantifiziert werden.

Die RT-qPCR ist empfindlich gegenüber Inhibitoren, was zu falsch negativen Ergebnissen führen kann, ebenso wie eine niedrige Viruslast in der Probe. Falsch positive Ergebnisse treten bei einer Kontamination der Probe auf, wie auch eine unspezifische Amplifikation, bei der die Primer und/oder die Sonden an andere DNA- oder RNA-Sequenzen binden, die ähnliche Sequenzabschnitte aufweisen.

1.4.2 RT-ddPCR

Die Reverse Transkriptase droplet digitaler PCR (RT-ddPCR) ist eine Technologie, die eine ultrasensitive und absolute Quantifizierung von Nukleinsäuren ermöglicht. Sie ist besonders passend für Zielmoleküle mit geringer Konzentration (z.B. bei „cell-free DNA“ aus dem Blutplasma - Liquid Biopsy), für Zielmoleküle mit komplexem Hintergrund, für allelische Varianten (SNPs) und für die Überwachung subtiler Veränderungen in den Zielkonzentrationen, die mit der RT-qPCR nicht erkannt werden können. Für die epidemiologische Überwachung des SARS-CoV-2 aus Abwasserproben wurde die RT-ddPCR während der Pandemie in vielen Projekten als Quantifizierungsmethode eingesetzt. Die Vorteile dieser Methode für eine einfache und präzise SARS-CoV-2 Variantenidentifizierung liegen im direkten Nachweis der Virus-RNA, ohne Verwendung einer Standardkurve, Multiplexing (Quantifizierung von mehr als zwei Targets in einer einzigen Reaktion), oder reduzierter Empfindlichkeit gegenüber PCR-Inhibierung. Die RT-ddPCR ist somit eine sehr effiziente Methode zum Nachweis von Virusmutationen und deren Beobachtung im Abwasser (25, 26). RT-ddPCR kann auch zum Nachweis von verschiedenen Pathogenen oder Antibiotikaresistenzen bei der Wasserforschung eingesetzt werden (27).

Zu Beginn der RT-ddPCR Reaktion werden entweder interkalierende Fluoreszenz-Farbstoffe (EvaGreen) oder spezifische, fluoreszenzmarkierte Sonden (FAM-, VIC- oder HEX-Sonden) für die jeweilige Zielsequenz, sowie die Virus-RNA und die spezifischen Primer-Paare zu Reaktionsgemischen vermischt. Mittels Emulsion wird der PCR-Reaktionsansatz in ca. 20.000 einzelne Partitionen („Droplets“) aufgeteilt. Die PCR-Reaktion findet in den einzelnen Partitionen statt.

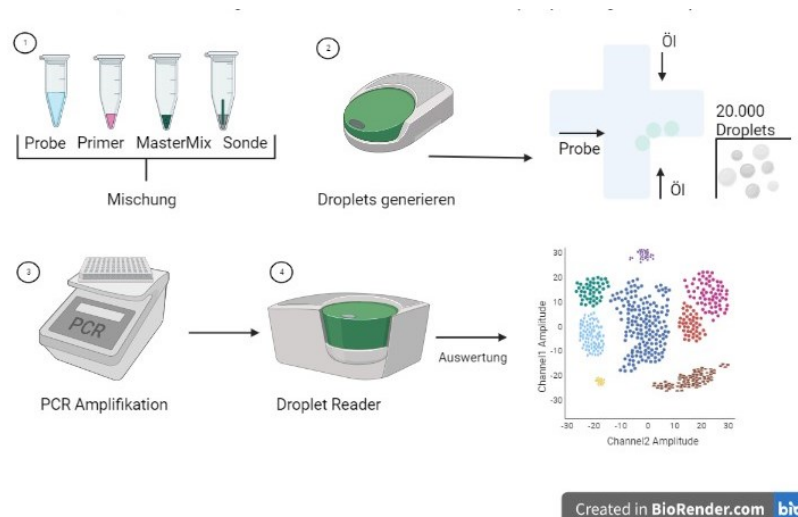


Abbildung 5: Workflow der RT-ddPCR

In jedem Droplet befindet sich nur ein („positiv“) oder kein Zielmolekül („negativ“), daher die Bezeichnung „digital“. Die Möglichkeit, die PCR-Reaktion in einzelnen, in sich geschlossenen Droplets durchzuführen, erlaubt es, Droplets mit wenig Viruskopien zuverlässig nachzuweisen (25). Während der PCR-Reaktion wird die RNA in cDNA umgewandelt und amplifiziert. Die Messung wird am Endpunkt der PCR durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wird anschließend in einem Lesegerät („Droplet Reader“) ausgelesen. Die Droplets werden voneinander getrennt und einzeln an einem Zweifarben-Detektor vorbeigeführt. Die Fluoreszenz jedes einzelnen Droplets wird analysiert, um zu bestimmen, welche Droplets eine Mutante cDNA enthalten und welche WT. Da die Zahl aller generierten Droplets bekannt ist, gibt der Anteil der Viruskopien mit Mutation erhaltenden Droplets die absolute Konzentration dieser Zielsequenz an (28). Dabei müssen das eingesetzte Probenvolumen sowie eventuell durchgeführte Verdünnungen berücksichtigt werden. Der RT-ddPCR Workflow ist in Abbildung 5 dargestellt.

Die Nachteile der RT-ddPCR gegenüber der RT-qPCR sind allerdings die derzeit noch deutlich höheren Kosten und der etwas größere Zeitaufwand.

1.4.3 Sequenzierungsverfahren

Die Ganzgenomsequenzierung (WGS) ermöglicht eine detaillierte Analyse des genetischen Materials von Pathogenen in Abwasserproben. Durch die Sequenzierung des gesamten Genoms eines Erregers, mittels Hochdurchsatztechnologie, wie New Generation Sequencing (NGS), kann man Informationen über dessen Eigenschaften, Mutationen, Verwandtschaft und potenzielle Resistenzmechanismen erhalten. Bei einer Targeted Amplikon Sequenzierung hingegen werden ein oder mehrere spezifische Abschnitte der Virus-RNA gezielt amplifiziert (z.B. für die S-Protein codierende Sequenz). WGS wird auch eingesetzt, um die virale Evolution, die Epidemiologie und die Auswirkungen von SARS-CoV-2 zu erforschen (29).

Das NGS-Verfahren beginnt mit der Herstellung einer repräsentativen Library der zu untersuchenden DNA oder RNA. Die DNA oder RNA Moleküle werden fragmentiert, an beiden Enden spezifische Oligonukleotide (Adapter) zugefügt und eine Bibliothek aus vielen identischen Templates erstellt. Mit den Adaptern können die Fragmente an spezielle Träger wie z.B. einer Glasflusszelle (Flow Cell), die mit komplementären

Adapteroligonukleotiden beschichtet sind (Illumina-System), binden. DNA- oder RNA-Moleküle einer bestimmten Probe werden mit einer spezifischen Indexsequenz markiert, um das Poolen von mehreren Proben zu ermöglichen. Es folgt die klonale Amplifikation. Jedes gebundene Fragment wird durch eine PCR vervielfältigt, um die Menge der DNA zu erhöhen und die Detektion zu erleichtern. Die Sequenzierung der Amplifikate und Detektion der DNA-Basenabfolge unterscheidet sich bei den unterschiedlichen NGS-Technologien. Bei der Sequencing-by-Synthesis (Illumina) erfolgt z.B. die Sequenzierung von Millionen Clustern auf einmal. Alle vier mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern markierten Nukleotide (A, T, C, G) werden nach und nach an die wachsenden DNA-Stränge hinzugefügt. Bei jedem Einbau eines Nukleotids in den wachsenden DNA-Strang wird ein Lichtsignal erzeugt und fotografiert. Dieser Sequenzierzyklus wird mehrmals wiederholt, um die gewünschte Länge der DNA-Sequenz zu erreichen. Die fotografischen Aufnahmen der Lichtimpulse beim Einbau der Nukleotide werden zu Sequenzen umgewandelt und bioinformatisch analysiert.

Die Anwendung der WGS auf Patienten- und Abwasserproben wurde bereits zu Beginn der Pandemie von den Behörden als epidemiologische Überwachungsmethode parallel zu RT-qPCR-Tests eingesetzt (30). Mit der WGS können sowohl bereits bestehende als auch neu auftretende Varianten des SARS-CoV-2 erkannt werden. Allerdings sind einige Probleme zu beachten. In Abwasserproben ist die Virus-RNA stark fragmentiert und verdünnt und sie setzt sich aus einer Mischung unterschiedlicher, zirkulierender Varianten zusammen (31, 32), was die Identifikation der Virusvarianten erschwert. Eine WGS ist eine aufwendige und ressourcenintensive Methode, die im Vergleich zu PCR-basierten Verfahren eine geringere Empfindlichkeit aufweist (33). Obwohl sie für ein simultanes Mutations-Screening geeignet ist, stößt sie bei niedriger Viruslast und unvollständiger Sequenzierungstiefe an ihre Grenzen (32). Zusätzlich erfordert die Anwendung spezielle Geräte und gut ausgebildetes Fachpersonal in der Bioinformatik, um seltene Mutationen von SARS-CoV2 im Abwasser zu erkennen (25).

1.5 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Anwendbarkeit der RT-ddPCR für einen SARS-CoV-2 Mutationsnachweis mit Variantentypisierung und der Erstellung einer SARS-CoV-2 Trendanalyse aus Abwasserproben.

Ziel dieses Projektes ist die Validierung eines RT-ddPCR Mutation Assays, um reproduzierbare Ergebnisse mit maximaler Sensitivität und Spezifität zu erreichen. Mithilfe des validierten Assays wird das Vorkommen sowie die zeitliche Entwicklung von SARS-CoV-2 Varianten in Abwasserproben analysiert.

Ein weiteres Ziel ist die Erstellung einer Trendkurve des SARS-CoV-2 Virustargets N2 in zeitlichem Verlauf, um zu überprüfen, ob die RT-ddPCR als Methode für das SARS-CoV-2 Abwassermonitoring in der Routine geeignet ist.

2. Material und Methoden

2.1 Referenzmaterialien

Zur Validierung des RT-ddPCR Mutation Assay SARS-CoV-2 L452R wurde die **SARS-CoV-2 S-Gen Epsilon Variant Kontrolle** der Firma Exact Diagnostics LLC verwendet. Das Referenzmaterial wird in einem matrixähnlichen Transportmedium geliefert und beinhaltet ein künstlich hergestelltes RNA-Transkript des Epsilon SARS-CoV-2 Variant S-Genes (Lineage B.1.429, B.1.429). Die enthaltenen Mutationen sind S13I, W152C, **L452R** und D614G. Dieses Produkt beinhaltet zur internen Kontrolle auch menschliche DNA (human RNase P), wodurch die Qualitätskontrolle des gesamten Prozesses (Extraktion, Amplifikation und Detektion) ermöglicht wird. Das Epsilon Variant S-Gen RNA Transkript und die menschliche DNA werden in einer Konzentration von 200.000 Kopien/ml und 75.000 Kopien/ml bereitgestellt (34).

Eine positive nasopharyngeale Patientenprobe mit Ct-Wert 19,31 wurde einer Sequenzierung unterzogen und als Omikron Variante BA.2 mit WT für die Position L452 bestätigt. Eine Verdünnung der Probe wurde als **Wild Type-Kontrolle** (WT, L452) bei der Bestimmung der Spezifität des RT-ddPCR Mutation Assay SARS-CoV-2 L452R verwendet.

EURM-019 Single Strang RNA, der Referenzstandard des Joint Research Centre der Europäischen Kommission, wurde zur Erstellung der Standardkurven der RT-qPCR und der Quantifizierung der SARS-CoV-2 RNA in Abwasserproben angewandt (35). Die zu erwartenden Ct-Werte für RT-qPCR-Assay für **N2-Gen** betragen bei Anwendung von 5 µl

einer 1.000-fachen Verdünnung des EURM-19 Standards $20,37 \pm 0,13$. Die RNA-Mengen in Kopien/ $\mu\text{l} \times 10^7$ wurden in fünf separaten Messungen mittels RT-ddPCR gemessen und ergaben $7,5 \pm 0,5$ bei einer Wahrscheinlichkeit von 95%. Der Referenzstandard wurde laut Gebrauchsanweisung 1:100 mit RNase-freiem Wasser verdünnt, aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Für das Monitoring der SARS-CoV-2-Viruslast im Abwasser diente der EURM-019 Single Strang RNA Referenzstandard als Positiv-Kontrolle für den RT-ddPCR Custom Assay SARS-CoV-2 N2.

2.2 Abwasserprobengewinnung

Im Zeitraum von Juli 2022 bis April 2023 wurden aus dem Zulauf von Kläranlagen in OÖ Abwasserproben gewonnen. Diese Kläranlagen decken ein Einzugsgebiet mit insgesamt ca. 388.000 Einwohnern mit Hauptwohnsitz ab. Zwei Tagesmischproben (24-Stunden) wöchentlich wurden in 500 ml Gefäßen zur Analyse in das molekularbiologische Labor des Instituts für Pathologie des Salzkammergut Klinikums Vöcklabruck angeliefert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit aufgereinigter SARS-CoV-2 RNA von Abwasserproben aus sechs der Kläranlagen getestet. Diese Kläranlagen decken ein Einzugsgebiet von insgesamt ca. 191.000 Einwohnern mit Hauptwohnsitz ab. Die durchschnittliche Einwohnerzahl beläuft sich auf 31.879 Einwohner (von 22.146 bis 46.949).

2.3 SARS-CoV-2 Virus RNA Extraktion und Aufreinigung

Im Folgenden wird auf die manuelle Extraktion und Aufreinigung der Virus-Nukleinsäure aus den Abwasserproben mit Hilfe von Maxwell® RSC Enviro Total Nucleic Acid Kit mittels PureYield™-Säulen und einer Vac-Man®-Pumpe der Promega GmbH eingegangen. Jede Vac-Man® Pumpe wird mit 20 einzelnen Luer-Lok® Absperrhähnen geliefert, so dass jeder Anschluss individuell gesteuert werden kann. Im Weiteren wird eine zweite Extraktion der Virus-RNA und Aufreinigung mit dem Maxwell® CSC 48 Instrument beschrieben (36).

Aus jeder Abwasserprobe wurden je 40 μl mit 500 μl Proteinase K in einem 50 ml Röhrchen vermenget. Diese enzymatische Vorbehandlung erfolgte für 30 Minuten bei

Raumtemperatur. Anschließend wurden die Abwasserproben für 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert, um die Festpartikel zu entfernen. Danach wurde der Überstand in einer neuen 50 ml Röhren überführt, in welche 6 ml Bindungspuffer 1 (BBD1), 0,5 ml Bindungspuffer 2 (BBE2) und anschließend 24 ml Isopropanol hinzugefügt wurden.

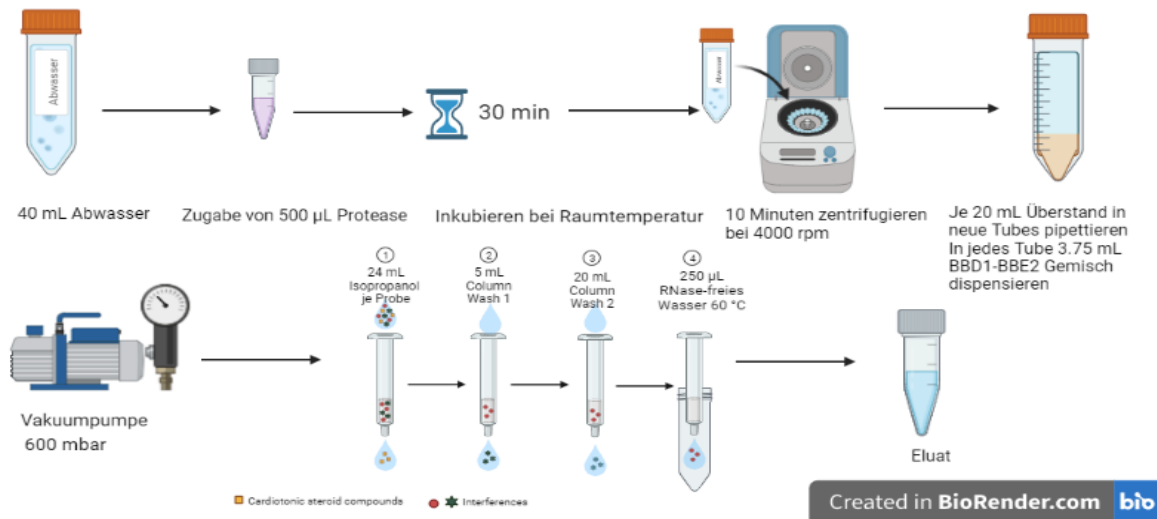


Abbildung 6: *Workflow der manuellen SARS-CoV-2 RNA-Extraktion aus Abwasserproben*

Binding PureYield™-Säulen mit Trichter, vorbereitet für jede Abwasserprobe, wurden auf die Vac-Man® Pumpe gesteckt. Bei geschlossenen Zugängen wurde die Pumpe eingeschaltet und, sobald der Barometer mindestens 600 mbar zeigte, die Proben auf die zugehörigen Säulen mit Trichter geladen. Im Anschluss wurden die Zugänge bis zum vollständigen Durchlauf der Abwasserproben unter Vakuum geöffnet. Bei diesem Vorgang bindet die Virus-RNA an die Silikamembran der Säulen. Um Verunreinigungen zu entfernen, folgten zusätzlichen Waschvorgänge unter Vakuum, zuerst mit 5 ml Colum Wash 1 (CWE) und anschließend mit 20 ml Colum Wash 2 (RWA), bei denen die Zugänge entsprechend wieder geöffnet und danach geschlossen wurden. Nach der anschließenden Extraktion von maximal 8 Abwasserproben musste die Abfallflüssigkeit in der Pumpe entleert werden, um weitere Proben prozessieren zu können. Nach dem Waschen wurden die Trichter verworfen, während die PureYield™-Säulen für die Eluation der gebundenen Nukleinsäure weiterverwendet wurden.

Nachdem für jede Abwasserprobe ein 1,5 ml Reaktionsgefäß in einem Eluator™ platziert und auf diesem die entsprechende PureYield™-Säule positioniert worden war, wurde diese Einrichtung auf die Pumpe gesteckt. 250 ml mit 60°C vorgewärmten RNase-freien Wassers wurde in die Säulen pipettiert. Nach einer kurzen Einwirkzeit konnten die Zugänge wieder

geöffnet werden, bis die Flüssigkeit vollständig durchgelaufen war. Dieser Vorgang wurde erneut wiederholt. Somit konnte die Virus-RNA in insgesamt 500 µl RNase-freiem Wasser eluiert werden. Workflow der manuellen SARS-CoV-2 RNA-Extraktion aus Abwasserproben ist in Abbildung 6 dargestellt.

Für die zweite Extraktion und Aufreinigung der Virus-RNA kam ein Maxwell® CSC 48 Instrument zum Einsatz. Das Gerät kann maximal 48 Proben voll automatisiert mit dem Total Nucleic Acid Kit in 35 Minuten prozessieren. Je 500 µl Eluat wurde mit 150 µl BBD1 und 50 µl BBE2 vermengt. Die notwendige Anzahl an Kartuschen und 0,5 ml Eluationsgefäße mit je 85 µl RNase-freiem Wasser wurden auf dem Deck Tray platziert. Darauf wurde das gesamte Volumenmix von Eluat und Bindungspuffern (ca. 700 µl) in die erste Kammer der Kartuschen pipettiert. An Position acht der Kartuschen wurde ein Stößel eingesetzt. Anschließend kam der vorbereitete Deck Tray ins Gerät, die Probennummern der Abwasserproben wurden eingegeben, der Barcode des verwendeten Kits eingescannt und die Extraktion gestartet. Die gereinigte Virus-RNA kann dann direkt für eine PCR Analyse verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

2.4 RT-qPCR für die SARS-CoV-2 Quantifizierung

Die gereinigte Nukleinsäure wurde mittels eines GoTaq® Enviro Wastewater SARS-CoV-2 System, N2 der Promega GmbH analysiert (37). Die RT-qPCR wurde für das N2-Target mittels spezifischer Primer und FAM-markierter Sonde durchgeführt. Zur Prozesskontrolle diente der gleichzeitige Nachweis des PMMoV (pepper mild mottle virus). Das PMMoV wird vom Menschen mit der Ernährung aufgenommen und wieder ausgeschieden. Daher kann es in Abwasserproben nachgewiesen werden. Zur Detektion der Amplifikation einer 68 bp Zielsequenz des PMMoV-Genoms wurden spezifische Primer und eine Cy-5 markierte Sonde verwendet. Die interne Kontrolle der Amplifikation, um den Einfluss von RT-qPCR Inhibitoren auszuschließen, wurde auch mitgeführt. Primer und CAL Fluor®-markierte Sonde dienten dabei zur Detektion und Amplifikation eines 285 bp-RNA Templates. Die interne Kontrolle kann im HEX-, JOE- oder VCK-Kanal erfasst werden.

Für die Zubereitung des MasterMix wurden jeweils 5 µl GoTag® Enviro MasterMix, 0,2 µl GoScript™ Enzym Mix, 0,5 µl Primer/Sonden Mix für N2, PMMoV und interne Kontrolle, und 0,3 µl RNase-freies Wasser pro Probe miteinander vermengt. Anschließend

wurden auf einer 96-Well Platte jeweils 6 µl MasterMix und 4 µl gereinigte Virus-RNA pro Well pipettiert. In das erste Well wurden 4 µl Standard C als Positivkontrolle zu dem MasterMix und in das zweite Well 4 µl RNase-freies Wasser als NTC (No Template Control) pipettiert. Alle Reaktionen wurden im doppelten Ansatz angesetzt.

Die 96-Well Platte wurde mit einer Folie versiegelt, woraufhin der PCR-Lauf am z480 Light Cycler der Roche Austria GmbH gestartet wurde. Im Anschluss an eine Reverse Transkription für 15 Minuten bei einer Temperatur von 45°C, erfolgten eine Aktivierung der DNA-Polymerase sowie eine Deaktivierung der Reverse Transkriptase für 2 Minuten bei einer Temperatur von 95°C. Darauf folgten 40 Zyklen der Amplifikation, welche eine Denaturierung für 15 Sekunden bei 95°C und ein Annealing von 60 Sekunden bei 62°C umfassten. Anhand einer Standardkurve wurde die Konzentration der Viruskopien für jede Reaktion quantifiziert. Je Abwasserprobe oder Kontrolle wurde der Mittelwert jedes Doppelansatzes ermittelt und in einer Excel-Tabelle in Kopien/ml Abwasser berechnet.

Zur Erstellung einer neuen Standardkurve wurde der EURM 019 Referenzstandard als SARS-CoV-2-RNA Standard und einen PMMoV-RNA Standard verwendet. Der PMMoV-RNA Standard mit einer Konzentration von 106 Kopien/µl ist im Kit erhältlich. Die Standards wurden in fünf aufeinanderfolgenden Schritten im Verhältnis 1:10 mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Fünf low-binding 2 ml Reaktionsgefäße wurden für die Standards A, B, C, D und E vorbereitet. Für Standard A wurden 196µl RNase-freies Wasser mit 2 µl Sars-CoV-2 Referenzstandard und 2 µl PMMoV-Standard vermengt. In den übrigen vier Reaktionsgefäßen (Standard B bis E) wurden jeweils 45 µl RNase-freies Wasser vorgelegt. Anschließend wurden 5 µl von Standard A zu den 45 µl in Standard B pipettiert. Dieser Verdünnungsschritt wurde in der gleicherweise bis zum Erreichen des Standards E fortgeführt.

Der MasterMix wurde gemäß der vorherigen Beschreibung vorbereitet und anschließend wurden je 6 µl davon in die Wells einer 96-Well Platte vorgelegt. In den ersten fünf Wells wurden je 4 µl von Standard A, B, C, D oder E, während in die übrigen Wells 4 µl gereinigte Virus-RNA pipettiert wurden. Die Standards wurden, ebenso wie die Proben, in einem Doppelansatz aufgetragen. Der PCR-Lauf wurde mithilfe eines eigenen Makros für die Kalibration der neuen Standardkurve am z480 Light Cycler gestartet.

2.5 RT-ddPCR Mutation Assay SARS-CoV-2 L452R

Für eine Mutationsanalyse und die Variantentypisierung wurde in dieser Arbeit die **Mutation L452R** ausgewählt. Es handelt sich dabei um eine T>G Punktmutation in dem Spike-Gen (S-Gen) des SARS-CoV-2 Virus, die zum L452R Aminosäuren-Austausch im Spike-Protein führt. Wie in Abbildung 7 dargestellt, zeigt die Information aus der Datenbank GISAID, dass die Omikron Varianten BA.5 und BA.4 die L452R Mutation tragen, während die neue rekombinante XBB-Variante WT an derselben Position (L452) ist. Vom 18.01.2023 bis 23.03.2023 wurden insgesamt neun Mal Abwasserproben aus sechs Kläranlagen mit dem RT-ddPCR Mutation Assay SARS-CoV-2 L452R getestet.

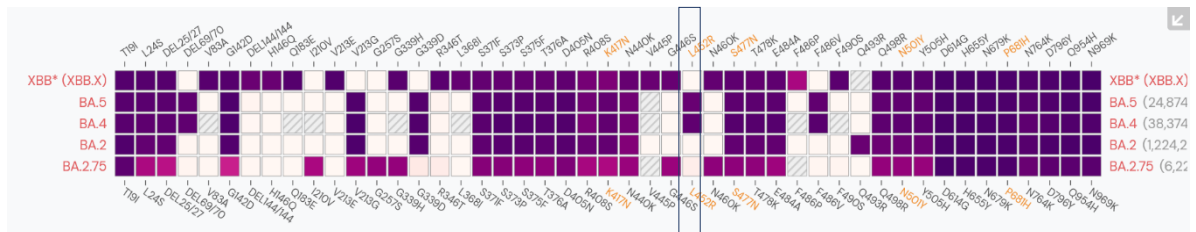


Abbildung 7: **SARS-CoV-2 Virusvarianten und deren Mutationen in S-Gen.** Prävalenz der Mutationen farblich dargestellt: nicht detektiert (gestrichelt); 0% (hellrosa), 100% (dunkellila); die Mutation L452R ist mit Rahmen markiert (38)

Die gereinigte SARS-CoV-2 RNA wurde mittels eines Duplex RT-ddPCR Mutation Assay SARS-CoV-2 L452R von Bio-Rad Laboratories, Inc. (Assay ID: dMDS983315944) analysiert. Die verwendeten Primer amplifizieren 75 bp Nukleotid Sequenz in dem S-Gen, welche die L452R Punktmutation trägt. Information über die MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) Sequenzen ist in Tabelle 2 angeführt (39). Die Detektion der PCR-Amplifikation erfolgte unter Verwendung von zwei fluoreszenzmarkierten Sonden, nämlich einer FAM-markierten Sonde für die L452R Mutation und einer HEX-markierten Sonde für den WT.

Tabelle 2: **Information zur MIQE Kontext Sequenz für RT-ddPCR SARS-CoV-2 L452R Assay (Bio-Rad Laboratories, INTC.)**

MIQE Context
912c71c047085f0382267300dccdd5b0 seq1:56-178:+ TGCGTTATAGCTTGAATTCTAACAATCTTGATTCTAAGGTTGGTGGTAATTAT AATTACC[T/G]GTATAGATTGTTAGGAAGTCTAATCTCAAACCTTTTGAGAGA GATATTCAACTGAAATC

Der MasterMix wurde unter Verwendung der Reagenzien des One-Step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes vorbereitet (40). Hierzu wurden für jede Probe 5,5 µl RT-ddPCR One-Step Advanced Supermix, 2,2 µl Reverse Transkriptase, 1,1 µl DTT (300 nM), 6,6 µl RNase freies Wasser und 1,1 µl Assay Primer/Sonden vermischt. 16,5 µl MasterMix je Probe wurden in einem 8er-Streifen mit 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen vorgelegt. Im ersten Reaktionsgefäß wurden 1,1 µl Epsilon-Kontrolle mit 4,4 µl RNase-freiem Wasser zum MasterMix pipettiert, welche als Positivkontrolle diente. Im zweiten Reaktionsgefäß wurden 5,5 µl RNase-freies Wasser als NTC pipettiert. An die restlichen sechs Positionen kamen je 5,5 µl gereinigte SARS-CoV-2 RNA. Anschließend wurden je Probe 20 µl des Reaktionsmixes in eine DG8-Kartusche überführt und im QX200 Droplet Generator unter Verwendung eines speziellen Öls emulgiert. Die resultierende Droplet-Emulsion wurde auf eine 96-Well PCR Platte übertragen und mittels des PX1 PCR Plate Sealers für 5 Sekunden bei 180°C versiegelt.

Die Amplifikation erfolgte daraufhin mittels C1000 Touch Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, Inc. Nach einer Reverse Transkription von 60 Minuten bei einer Temperatur von 50°C erfolgte eine Polymerase Aktivierung für 10 Minuten bei 95°C. Daraufhin folgten 50 Zyklen der Amplifikation mit einer Denaturierung für 30 Sekunden bei 95°C und einem Annealing von einer Minute bei 55°C. Anschließend wurde die Polymerase für 10 Minuten bei 98°C deaktiviert. Die PCR-Reaktion wurde für 30 Minuten bei 4°C beendet und dann bei 12°C gehalten. Die fertigen PCR-Produkte wurden mit QX200 Droplet Reader analysiert und mithilfe der QuantaSoft, Version 1.7, Regulatory Edition, ausgewertet.

Auf Empfehlung von Assoz. Prof. Dr. Herbert Oberacher, wissenschaftlicher Leiter des SARS-CoV-2 Abwassermonitorings, Medizinische Universität Innsbruck, wurden 50 Zyklen, statt der vom Hersteller empfohlenen 40 Zyklen, für die Amplifikation gewählt. Das Ziel war es, dadurch die Zahl der unspezifischen Droplets zu reduzieren.

2.6 RT-ddPCR SARS-CoV-2 Custom Assay N2

Für die RT-ddPCR Trendanalyse wurde das Custom Assay RT-ddPCR SARS-CoV-2 N2 mit der Bezeichnung **2019-nCoV_N2** von Bio-Rad Laboratories, Inc. hergestellt. Hierbei wurde die N2-Zielsequenz des entsprechenden RT-qPCR N2 Assay des EURM-019

Referenzstandards verwendet. Die Detektion der PCR-Amplifikation erfolgte durch Verwendung einer fluoreszenzmarkierten Sonde für den FAM-Kanal.

Als Positivkontrolle in den Experimenten wurde die Standard C des EURM-019 Referenzmaterials eingesetzt, während RNase-freies Wasser als NTC verwendet wurde. Die Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden des RT-ddPCR N2 Custom Assays sind in Tabelle 3 angeführt.

Tabelle 3: Sequenzen der Primer und Sonde des RT-ddPCR SARS-CoV-2 N2 Assays

Assay	Sequenz	Oligonukleotid
2019-nCoV_N2	Vorwärts	TTACAAACATTGGCCGCAAA
	Rückwärts	GCGCGACATTCCGAAGA
	Sonde	ACAATTTGCCCCAGCGCTTCAG
	Fluorophore	FAM

Der MasterMix wurde unter Verwendung der Reagenzien des One-Step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes vorbereitet (40). Hierzu wurden für jede Probe 5,5 µl RT-ddPCR One-Step Advanced Supermix, 2,2 µl Reverse Transkriptase, 1,1 µl DTT (300 nM), 6,6 µl RNase freies Wasser und 1,1 µl Assay Primer/Sonden vermengt. 16,5 µl MasterMix je Probe wurden in einem 8er-Streifen mit 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen vorgelegt.

Im ersten Reaktionsgefäß wurden 5,5 µl Standard C zum MasterMix pipettiert, welche als Positivkontrolle diente. Im zweiten Reaktionsgefäß wurden 5,5 µl RNase-freies Wasser als NTC pipettiert. An die restlichen sechs Positionen kamen je 5,5 µl gereinigte SARS-CoV-2 RNA. Anschließend wurden je Probe 20 µl des Reaktionsmixes in eine DG8-Kartusche überführt und im QX200 Droplet Generator unter Verwendung eines speziellen Öls emulgiert. Die resultierende Droplet-Emulsion wurde auf eine 96-Well PCR Platte übertragen und mittels des PX1 PCR Plate Sealers für 5 Sekunden bei 180°C versiegelt.

Die Amplifikation erfolgte daraufhin mittels C1000 Touch Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, Inc. Nach einer Reverse Transkription von 60 Minuten bei einer Temperatur von 50°C erfolgte eine Polymerase Aktivierung für 10 Minuten bei 95°C. Daraufhin folgten 45 Zyklen der Amplifikation mit Denaturierung für 30 Sekunden bei 95°C und einem Annealing von einer Minute bei 58°C. Anschließend wurde die Polymerase für 10 Minuten bei 98°C deaktiviert. Die PCR-Reaktion wurde für 30 Minuten bei 4°C beendet

und dann bei 12°C gehalten. Die fertigen PCR-Produkte wurden mit dem QX200 Droplet Reader analysiert und mithilfe der QuantaSoft, Version 1.7, Regulatory Edition, ausgewertet.

2.7 Qualitätskontrolle und Datenanalyse

Um die Performance der RT-ddPCR Assays zu evaluieren, wurden die SARS-CoV-2 S-Gen Epsilon Variant Kontrolle und der Standard C des EURM-019 Referenzmaterials als positive Kontrollen in den Experimenten mitgeführt. RNase freies Wasser als NTC und eine WT-Kontrolle kamen ebenso zur Anwendung, um eine Kontamination oder falsch-positive Droplets auszuschließen (41). Die Ergebnisse wurden mithilfe der QuantaSoft, Version 1.7, Regulatory Edition analysiert. Ergebnisse mit weniger als drei positiven Droplets im entsprechenden Bereich des FAM Kanals wurden als nicht nachweisbar bewertet. Ebenso wurden sie als nicht quantifizierbar eingestuft, wenn die durchschnittliche Anzahl der akzeptierten Droplets weniger als 10.000 betrug und die Konzentrationen der Viruskopien mit L452R oder WT unter dem berechneten Nachweisgrenze lagen (42, 43).

2.8 Berechnung der Fiktiven Ausscheider

Für die SARS-CoV-2 Trendanalyse wurde die Anzahl der fiktiven Ausscheider berechnet. Es handelt sich dabei um die hypothetische Anzahl von Personen, die Viruspartikel in das Abwasser ausscheiden. Die Berechnung der Anzahl der fiktiven Ausscheider erlaubt den Vergleich mit den Inzidenzen, eine Trendschätzung und den Abgleich der Ergebnisse verschiedener Labore. Das Konzept der fiktiven Ausscheider findet daher im nationalen und im regionalen Abwassermonitoring Anwendung. In den Berichten zum Nationalen SARS-CoV-2 Abwassermonitoring des BMSGPK wird die Anzahl der fiktiven Ausscheider aus der gemessenen Viruskonzentration folgendermaßen berechnet:

$$\text{Anzahl fiktive Ausscheider} = \frac{\text{Konzentration} \times \text{Abwassermenge}}{\text{Ausgeschiedene Menge}}$$

Die Quantifizierung der SARS-CoV-2 Viruskopien im Abwasser und die gemessene Abwassermenge erlauben die Berechnung der Virusfracht. Darauf aufbauend lässt sich, unter Kenntnis der durchschnittlichen Virusausscheidung einer infizierten Person, die Anzahl der fiktiven Ausscheider abschätzen. Der Umrechnungsfaktor für die mittlere Virusausscheidung einer infizierten Person konnte experimentell in einem aufwendigen Prozess vom Referenzzentrum in Innsbruck ermittelt werden (14). In der vorliegenden Arbeit wurde das Konzept der fiktiven Ausscheider angewandt und der Umrechnungsfaktor (16×10^3) übernommen.

2.9 Validierungsplan des RT-ddPCR SARS-CoV-2 L452R Assays

Für die Validierung des RT-ddPCR Mutations Assays SARS-CoV-2 L452R wurden folgende Experimente geplant:

- *Bestimmung der Ausgangskonzentrationen der Referenzstandards SARS-CoV-2 S-Gen Epsilon Variant Kontrolle als Positiv-Kontrolle sowie der nasopharyngealen BA.2 Patientenprobe als WT-Kontrolle*
- *Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur*
- *Vorbereitung und Durchführung von Validierungsläufen: Herstellung von Verdünnungsreihen mit Referenzstandard, Berechnung der erwarteten Viruskopien mit Mutation L452R und WT, Erstellung eines Validierungsplanes zur Bestimmung der analytischen Leistung des Assays, Durchführung der Validierungsläufe und statistischen Analyse der gewonnenen Daten.*

Als erstes Experiment zur Validierung des Mutation Assays wurden primär die Ausgangskonzentrationen der SARS-CoV-2 RNA in der Epsilon-Kontrolle als Positivkontrolle und der nasopharyngealen BA.2 Probe, als WT-Kontrolle bestimmt. Die BA.2 Probe wurde in einer Verdünnungsreihe in drei Schritten jeweils im Verhältnis von 1:10 mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Anschließend wurden die Epsilon-Kontrolle (unverdünnt), die WT-Kontrolle (BA.2 Probe) und die drei Verdünnungen der WT-Kontrolle (V1, V2 und V2) in einem RT-ddPCR Lauf analysiert.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde die Epsilon Kontrolle auf eine Konzentration von 143 Kopien/ μ l mit RNase-freiem Wasser verdünnt und als „L452R-only“-Probe für

weitere Experimente bezeichnet. Diese Probe enthielt ausschließlich Viruskopien mit der L452R Mutation. Die WT-Kontrolle (Verdünnung eins, V1) wurde ebenfalls mit RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 126 Kopien/ μ l verdünnt. Diese WT-Kontrolle (V1), bezeichnet als Probe „**L452-only**“, enthielt ausschließlich Viruskopien mit WT an der Position L452. Ziel war es, daraus einen Referenzstandard „**Standard 0**“ herzustellen, in welchem die Epsilon Kontrolle und die WT-Kontrolle in möglichst gleicher Konzentration vorliegen.

Im zweiten Validierungsexperiment wurde die optimale Annealing-Temperatur eruiert. Dazu wurde eine Gradienten-PCR mit dem „Standard 0“ durchgeführt. Es entstand ein Temperaturgradient mit einer Anfangstemperatur von 50°C und einem Gradientenbereich von 8°C. In einem RT-ddPCR-Lauf wurden acht Reaktionsgefäße mit unterschiedlichen Temperaturen angewandt (58.0°C, 57.5°C, 56.5°C, 55°C, 53.2°C, 51.7°C, 50.6°C, 50.0°C). Für jedes Reaktionsgemisch wurde eine einzige Annealing-Temperatur verwendet. Auf diese Weise wurde die optimale Temperatur für die Annealing der Primer mit der Zielsequenz ermittelt und für alle weiteren Experimenten mit dem RT-ddPCR Sars-CoV-2 L452R Mutation Assay gewählt.

Bei einer **Annealing-Temperatur von 55°C** wurden die positiven Droplets mit der Mutation L452R und die negativen Droplets mit dem WT im Duplex-Assay optimal von den leeren Basislinien separiert, wodurch eine gute PCR-Amplifikation erzielt wurde. Die Temperaturgradienten-PCR in der 1D-Ansicht des FAM- und HEX-Kanals und die entsprechende 2D-Ansicht bei 55°C sind in Abbildung 8 dargestellt.

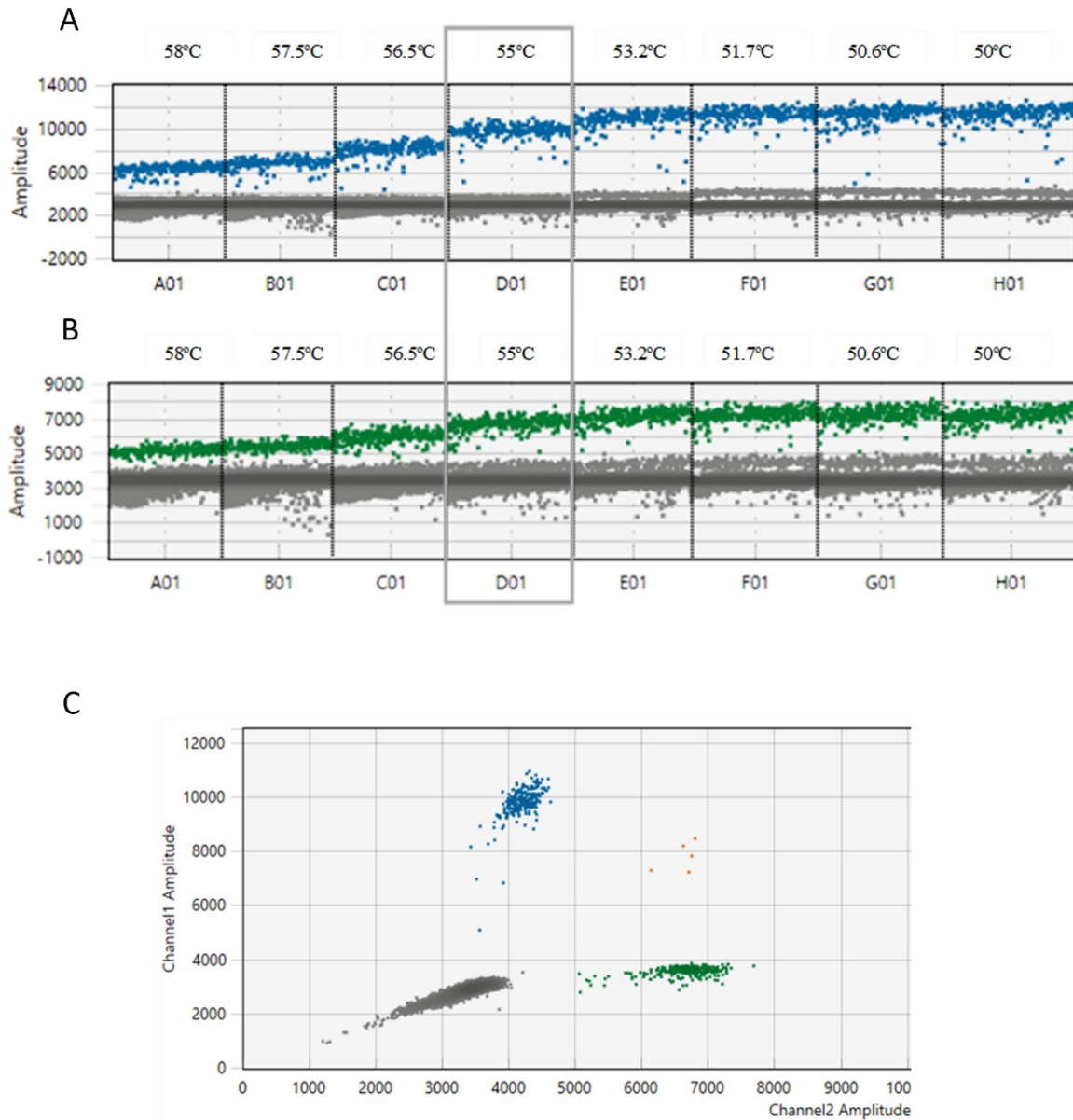
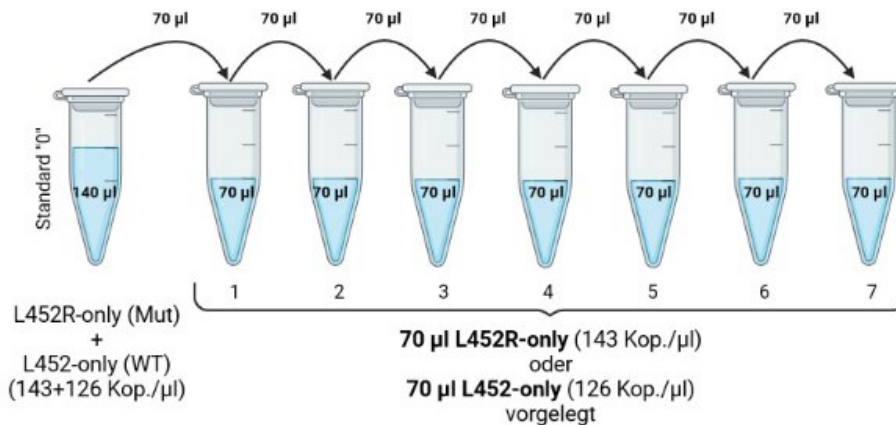


Abbildung 8: **Gradienten PCR.** (A) 1D Ansicht der positiven Droplets mit L452R Mutation (blau) in FAM-Kanal. (B) 1D Ansicht der negativen Droplets mit WT (grün) in HEX-Kanal. (C) 2D Ansicht der Cluster bei 55°C mit positiven Droplets (blau), negativen Droplets (grün), Droplets mit beiden Templates (orange) und Droplets ohne Template (grau)

Validierungsläufe mit Referenzstandards: Der sogenannte „Standard 0“ wurde zur Herstellung zweier Verdünnungsreihen mit Referenzstandards verwendet. Die **erste Verdünnungsreihe** umfasste sieben Verdünnungsstufen, bei denen die Konzentration der Viruskopien mit L452R Mutation als Hintergrund konstant gehalten, während die Konzentration der WT-Kopien (L452) schrittweise verdünnt wurde. In der **zweiten Verdünnungsreihe** wurde das gleiche Prinzip angewandt, jedoch mit schrittweiser Verdünnung der L452R Mutation, während die Konzentration der WT-Kopien als Hintergrund konstant gehalten wurde (Abbildung 9).



Created in BioRender.com 

Abbildung 9: Herstellung der Verdünnungsreihen mit Referenzstandards.

Mittels des Verdünnungsfaktors wurden die zu erwartenden Konzentrationen von Viruskopien für jeden Referenzstandard der beiden Verdünnungsreihen berechnet.

Für die Validierungsläufe mit Referenzstandards wurde ein Validierungsplan erstellt, um die analytische Spezifität, analytische Sensitivität und Präzision (Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit) zu ermitteln. Anhand dieses Planes wurden die Validierungsläufe mit Referenzstandards durchgeführt (Tabelle 4).

Die Wiederholbarkeit (Intra-Run Präzision) wurde mittels Intra-Run-Triplikaten ermittelt. Alle Referenzstandards wurden in Triplikaten auf einer 96-Well PCR Platte analysiert und die Übereinstimmung der Ergebnisse überprüft.

Die Reproduzierbarkeit (Inter-Run-Präzision) wurde mittels Inter-Run Triplikaten in drei verschiedenen Reaktionsansätzen (96-Well PCR Platten) und zu verschiedenen Zeiten untersucht. Auf diese Weise konnte die Übereinstimmung der Ergebnisse in unabhängigen Läufen überprüft werden.

Zur Bestimmung der Spezifität wurde die Probe L452-only achtmal in einem PCR-Lauf bestimmt.

Tabelle 4: Validierungsplan mit Referenzmaterial

Validierungsläufe mit Referenzmaterial									Bemerkung	
Wiederholbarkeit	1	2	3	4	5	6	7	8	x 3	intra-run (auf einer 96-Well Platte)
	L452R-only	Referenzstandards mit gleicher Konzentration der L452R vermischt mit verdünnten Kopien des WT								
	und									
	1	2	3	4	5	6	7	8	x 3	
L452R-only	Referenzstandards mit gleicher Konzentration des WT vermischt mit verdünnten Kopien der L452R									
Reproduzierbarkeit	1	2	3	4	5	6	7	8		inter-run (separate 96-Well Platten)
	L452R-only	Referenzstandards mit gleicher Konzentration der L452R vermischt mit verdünnten Kopien des WT								
	und									
	1	2	3	4	5	6	7	8		
L452R-only	Referenzstandards mit gleicher Konzentration des WT vermischt mit verdünnten Kopien der L452R									
Spezifität	1	2	3	4	5	6	7	8		auf einer 96-Well Platte
	L452-only (x 8)									

2.10 Referenzmethode für die Variantentypisierung

Im Rahmen des nationalen SARS-CoV-2 Abwassermonitorings wurden die Abwasserproben einer Ganzgenomsequenzierung unterzogen. Die umfassende Auswertung dieser Daten erfolgte am CeMM, Wien, unter der Leitung von Prof. Bergthaler. Dabei wurden einzelne SARS-CoV-2 Varianten mithilfe der Software LoFreg* identifiziert und quantifiziert, wobei deren relative Häufigkeit in den Berichten des CeMM, Wien, für die einzelnen Bundesländer detailliert dargestellt wurde (44, 45).

In der Datenbank GISAID werden Informationen über die Prävalenz einer S-Gen Mutation einer SARS-CoV-2 Virusvariante bereitgestellt. Diese Prävalenz wird mittels SARS-CoV-2-Sequenzen ermittelt, die im Rahmen dieser globalen Initiative übertragen wurden. Die Zuordnung erfolgt durch den Abgleich mit den Referenzsequenzen in PANGOLIN.

Daraus wurden Erkenntnisse über das Vorhandensein der L452R-Mutation in den mittels WGS identifizierten SARS-CoV-2 Varianten gewonnen. Im Zeitraum von Jänner bis März konnten BQ.1.1, BQ.1, BF.7, BA.5, BA.5.2, BA.5.1, CH.1.1, BF.7 Varianten mit einer mehr als 95% Prävalenz der L452R Mutation und XBB.1.5, XBB, XBB.1.9, XBB.1.16, BN.1.3, BA.2.9, EG.1 mit WT an der Position L452 detektiert werden (siehe Anhang). Die relative Häufigkeit der WGS L452R-Mutante wurde als Summe der prozentualen Anteile

jener Varianten berechnet, die eine L452R-Mutation aufwiesen. Die relative Häufigkeit der WT-Variante wurde hingegen als Summe jener Varianten ermittelt, die an derselben Position (L452) keine Mutation aufwiesen.

Diese Datenbankrecherche wurde durchgeführt, um Vergleichswerte zu erhalten. In diesem Forschungsprojekt wurden insgesamt 54 aufgereinigte Abwasserproben in neun Experimenten mittels des RT-ddPCR Mutation Assays SARS-CoV-2 L452R analysiert. Aus den ermittelten Konzentrationen wurden die relativen Häufigkeiten der L452R-Mutante und WT-Variante berechnet. Abschließend wurden die Ergebnisse mit den relativen Häufigkeiten der WGS unter Einbeziehung der GISAID Datenbank verglichen.

2.11 Statistik

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten und ihre anschauliche Darstellung erfolgte mittels deskriptiver Statistik in Excel. GraphPad Prism Version 9.4.1 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) wurde bei der Berechnung der Nachweisgrenze mittels logistischer Regression verwendet.

3. Ergebnisse

Zur analytischen Validierung des RT-ddPCR Mutation Assay SARS-CoV-2 L452R wurden Validierungsläufe mit Referenzstandards durchgeführt. Dabei lag der Fokus darauf, die ausgewählten Leistungsmerkmale, wie analytische Sensitivität, analytische Spezifität, Richtigkeit und Wiederholbarkeit der Ergebnisse, zu überprüfen. Die Nachweisgrenze des Verfahrens hinsichtlich der Konzentration der L452R-Mutation und WT wurde mit Hilfe zweier Verdünnungsreihen der Referenzstandards ermittelt.

Auf Grundlage dieser Validierungsergebnisse wurde die RT-ddPCR anschließend auf Abwasserproben angewandt, um den Anteil der SARS-CoV-2 Varianten mit einer L452R Mutation oder WT an der L452-Position zu ermitteln sowie ihre zeitliche Entwicklung zu beobachten.

Weiters wurde eine RT-ddPCR Trendanalyse des SARS-CoV-2 Virustargets N2 erstellt und mit RT-qPCR Trendanalyse gleicher Abwasserproben, sowie mit der Trendkurve der SARS-CoV-2 positiv getesteten Personen verglichen.

3.1 Analytische Validierung mit Referenzstandards

Insgesamt wurden fünf Validierungsläufe mit den Referenzstandards beider Verdünnungsreihen zu verschiedenen Zeitpunkten und von unterschiedlichen Anwendern durchgeführt, wobei jeweils 51 Ergebnisse erzielt wurden. Die Referenzstandards in der ersten Verdünnungsreihe enthielten eine konstante Hintergrund-Konzentration von 304 Kopien/ml der L452R-Mutation, während die Standards der zweiten Verdünnungsreihe eine stabile Konzentration von 268 Kopien/ml der WT-Variante zeigten.

Die gemessenen Konzentrationen der verdünnten Targets beider Verdünnungsreihen sind in Abbildung 10 als Mittelwert im Säulendiagramm dargestellt. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass eine niedrige Kopienzahl des WT (grün) bei gleichzeitig hohem L452R-Hintergrund zuverlässig detektiert werden kann. (Abbildung 10A). Auch konnten sehr niedrige Konzentrationen von Viruskopien mit L452R Mutation (blau) in einem Standard mit gleichbleibendem WT-Hintergrund zuverlässig detektiert werden (Abbildung 10B).

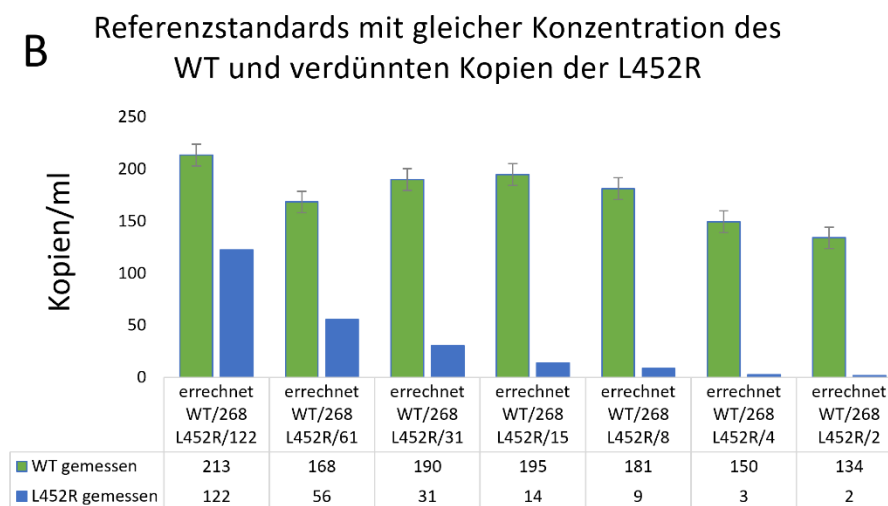
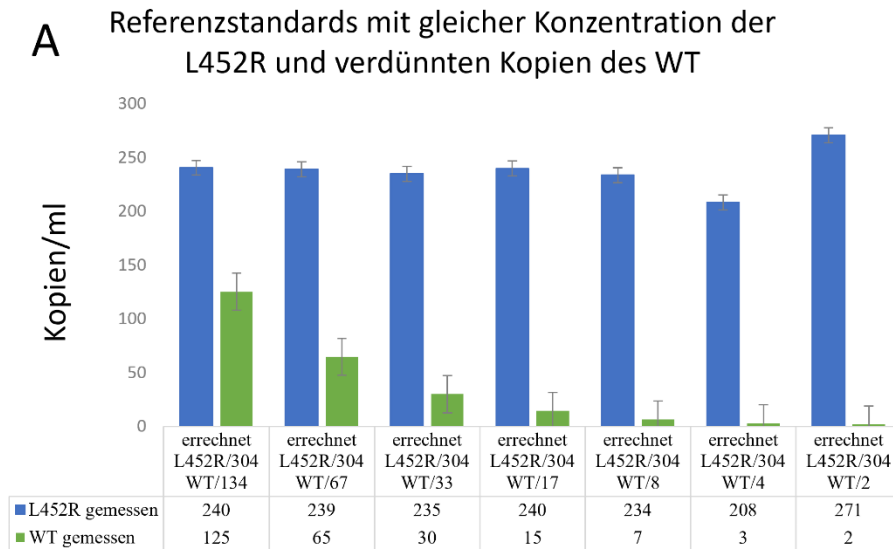


Abbildung 10: **Gemessene Viruskopien mit L452R und WT in Referenzstandards der beiden Verdünnungsreihen.** (A) Dargestellt ist die erste Verdünnungsreihe mit errechneten 304 Kopien/ml L452R-RNA und den erwarteten Targetkonzentrationen (WT/134, WT/67, WT/33, WT/17, WT/8, WT/4, WT/2). Die gemessenen Viruskopien der L452R-Mutation (blau) und verdünnten WT-Kopien (grün) sind jeweils unterhalb aufgelistet. (B) Dargestellt ist die zweite Verdünnungsreihe mit errechneten 268 Kopien/ml WT-RNA und den erwarteten Targetkonzentrationen (L452R/122, L452R/61, L452R/31, L452R/15, L452R/8, L452R/4, L452R/2), sowie die gemessenen WT-Kopien (grün) und verdünnte L452R-Kopien (blau).

Ein Vergleich zwischen den errechneten und gemessenen RNA Kopien/ml der L452R-Mutation zeigte eine lineare Korrelation von $R^2=0,98$, beziehungsweise $R^2=0,99$ für die WT-Variante (Abbildung 11).

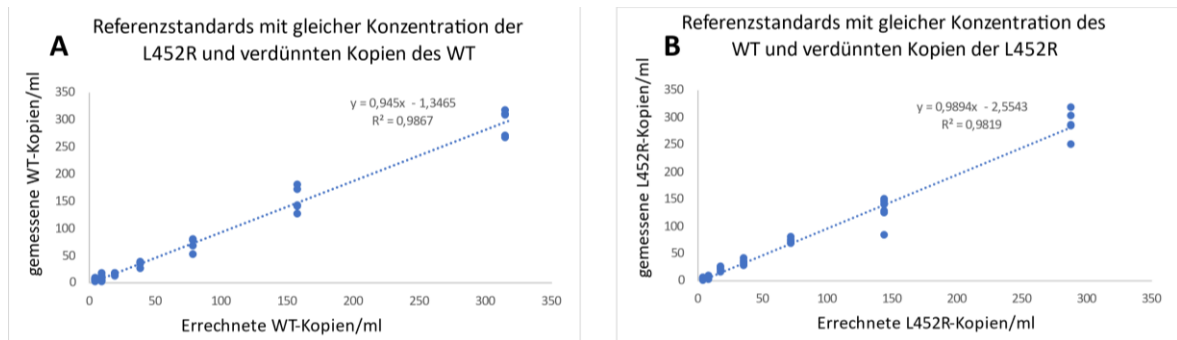


Abbildung 11: **Lineare Korrelation zwischen errechneten und gemessenen Viruskopien in ml Abwasser.** (A) WT-Kopien in den Referenzstandards der ersten Verdünnungsreihe. (B) L452R-Kopien in den Referenzstandards der zweiten Verdünnungsreihe.

3.1.1 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität ist von der eingesetzten Menge der Virus-RNA abhängig. Die Nachweisgrenze ist definiert, als die geringste Konzentration eines Analyten, die mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% nachgewiesen werden kann. Sie wurde basierend auf den Validierungsläufen mit Referenzstandards mittels logistischer Regression ermittelt.

Die vertikale, rot gestrichene Linie (x-Achse) in Abbildung 12 zeigt, dass ab einer Konzentration von 5,5 Kopien/ml Abwasser die gefundenen Viruskopien mit L452R Mutation mit 95% Wahrscheinlichkeit nachgewiesen werden kann (Konfidenzintervall CI: 4,4 - 9,8). Bei Viruskopien mit L452 lag die Nachweisgrenze bei 3,9 Kopien/ml Abwasser (CI: 2,9-6,9) (Abbildung 12). Unter Berücksichtigung der Nachweisgrenze hat die analytische Leistung des Mutationsassays eine **Sensitivität von 95%** für beide Targets.

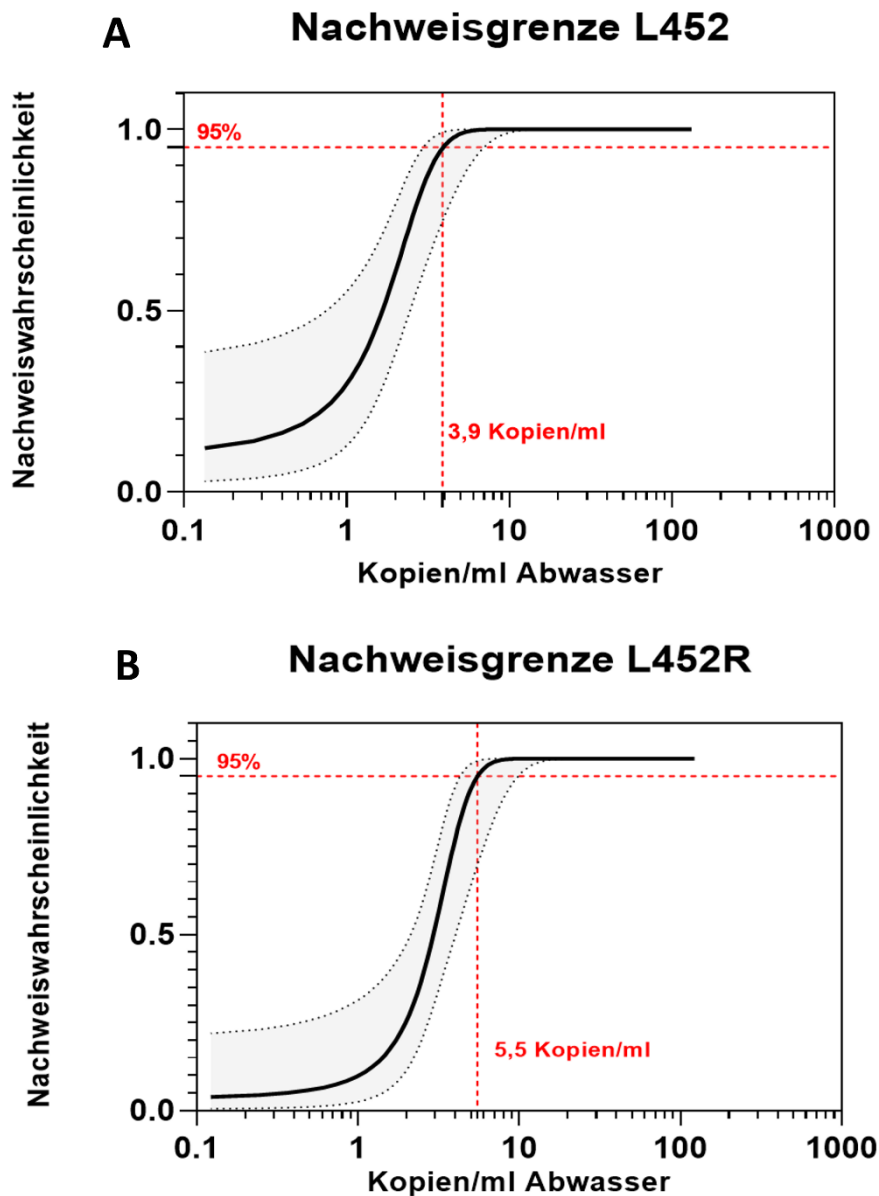


Abbildung 12: *Nachweisgrenze des RT-ddPCR Mutation Assays für ein positives Ergebnis mit einer Wahrscheinlichkeit von 95%. (A) Viruskopien mit WT werden ab einer Konzentration von 3,9 Kopien/ml Abwasser nachgewiesen; (B) Viruskopien mit L452R Mutation werden ab einer Konzentration von 5,5 Kopien/ml Abwasser nachgewiesen.*

3.1.2 Analytische Spezifität

Die Evaluierung der Leistungsmerkmale des RT-ddPCR Mutation Assays, insbesondere hinsichtlich Spezifität, erforderte die Ermittlung der **Toleranzgrenze (Cut-Off)**, ab der ein Ergebnis zuverlässig als positiv eingestuft werden kann. Eine Probe, die weniger als drei Droplets im FAM-Kanal aufweist, wurde als negativ klassifiziert. Der Cut-Off Wert wurde

in Kopien/ml Abwasser umgerechnet und beträgt $\geq 1,28$ Kopien/ml, wenn 2,35 ml Abwasserprobe in die Untersuchung eingesetzt werden.

Die Verteilung der gemessenen RNA-Konzentrationen, welche die Cut-Off Grenze von 1,28 Kopien/ml überschritten, ist in Abbildung 13 für beide Verdünnungsreihen dargestellt. Insgesamt gab es 47 solcher Ergebnisse für die Referenzstandards der ersten Verdünnungsreihe (in grün in Abbildung 13A) und 38 für die Analyse der Referenzstandards der zweiten Verdünnungsreihe (in blau in Abbildung 13B). Die Verteilung der ermittelten Konzentrationen der Proben L452R-only und L452-only in den Validierungsläufen, ist ebenso in Abbildung 13 abgebildet.

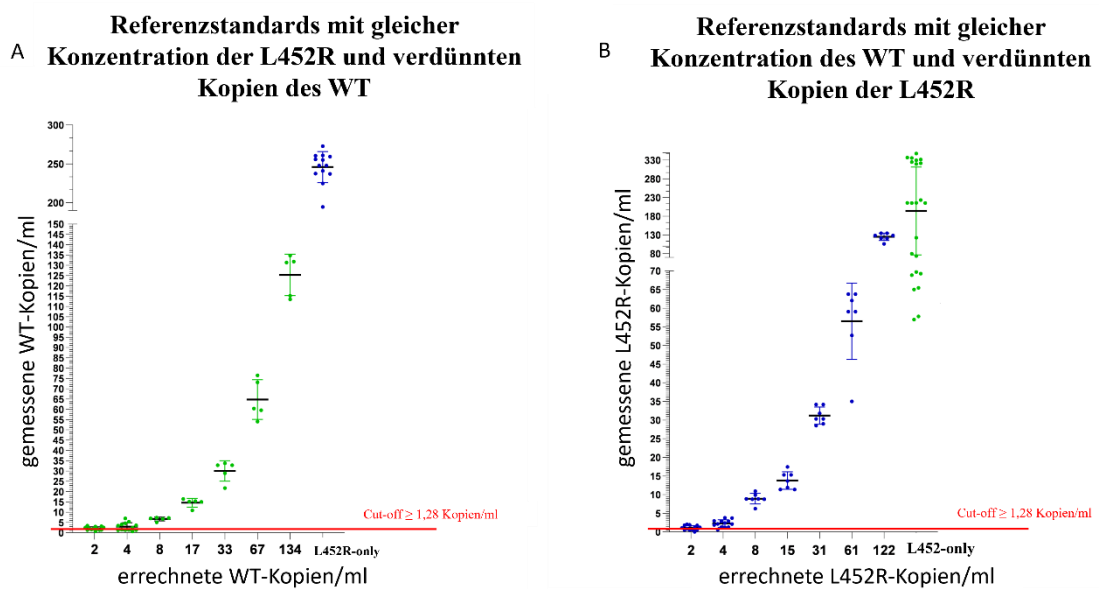


Abbildung 13: Verteilung der gemessenen Viruskopien über der Cut-Off Grenze in den Referenzstandards. (A) Konzentrationen der Viruskopien mit WT in den Referenzstandards der ersten Verdünnungsreihe (grün); Konzentrationen der Viruskopien mit Mutation in der Probe L452R-only (blau). (B) Konzentrationen der Viruskopien mit L452R Mutation in den Referenzstandards der zweiten Verdünnungsreihe (blau); Konzentrationen der Viruskopien mit WT in der Probe L452-only (grün).

Die analytische Spezifität wird definiert als der Prozentsatz der Viruskopien mit WT, die als richtig negativ eingestuft wurden. Sie wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{TN}{(TN + FP)} * 100$$

TN bedeutet „true negative“ und FP bedeutet „false positive“. Unter Berücksichtigung der Cut-off Grenze führten die Bestimmungen mit der L452-only Probe zu einer **Spezifität von 100%** (keine falsch positiven Ergebnisse).

3.1.3 Wiederholbarkeit

Die Wiederholbarkeit der Ergebnisse wurde mittels Intra-Run-Triplikaten in drei parallelen Bestimmungen der Referenzstandards, wie in Kapitel 2.9 beschrieben, durchgeführt. Der mittlere Variationskoeffizient (VK) der Intra-Run-Triplikate der Referenzstandards der ersten Verdünnungsreihe betrug 17% und variierte dabei zwischen 1% und 36%. Für die Referenzstandards der zweiten Verdünnungsreihe ergab die Berechnung einen Variationskoeffizienten von 11%, wobei dieser zwischen 1% und 36% schwankte. Die Wiederholbarkeit der Ergebnisse mit der Probe L562R-only zeigten einen VK von 3% (von 1% bis 5%), während dieser bei der L452-only Probe 7% betrug (zwischen 3% und 12%) (Tabelle 5).

3.1.4 Reproduzierbarkeit

Um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen, wurden Referenzstandards in drei verschiedenen Reaktionsansätzen analysiert und der VK berechnet. Der mittlere VK der Standards der ersten Verdünnungsreihe ergab 31% und variierte zwischen 8% und 67%. Für die Referenzstandards der zweiten Verdünnungsreihe ergab die Berechnung einen Variationskoeffizienten von 19% mit einer Spanne von 6% bis 36%. Die Variationskoeffizienten der Ergebnisse für die L452-only Probe und die L452R-only Probe sind entsprechend 3% (von 1% bis 5%) und 7% (von 3% bis 12%). Die errechneten Kopien/ml Abwasser und die berechneten Variationskoeffizienten sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: VK der Ergebnisse in Intra-Run und Inter-Run Experimenten

Referenzstandards mit gleicher Konzentration der L452R und verdünnten Kopien des WT				Probe L452R-only		
L452 errechnete Kopien/ml	Intra-Run VK %	Inter-Run VK %	L452R-only errechnete Kopien/ml	Intra-Run VK %	Inter-Run VK %	
134	1	8	304	1	8	
67	12	16	304	4	6	
33	2	20	304	5	9	
17	5	21	304	3	15	
8	3	19	304	4	6	
4	61	67	304	3	4	
2	36	67	304	1	13	
total:	17	31	total:	3	9	

Referenzstandards mit gleicher Konzentration des WT und verdünnten Kopien der L452R				Probe L452-only		
L452R errechnete Kopien/ml	Intra-Run VK %	Inter-Run VK %	L452-only errechnete Kopien/ml	Intra-Run VK %	Inter-Run VK %	
122	6	7	268	3	20	
61	6	10	268	12	20	
31	5	6	268	2	14	
15	13	20	268	5	11	
8	9	27	268	7	13	
4	36	24	268	7	23	
2	6	36	268	11	45	
total:	11	19	total:	7	21	

Die ermittelten Werte des Variationskoeffizienten in den Inter-Run und Intra-Run Experimenten wiesen große Unterschiede bei den verschiedenen Target-Konzentrationen auf. Im Bereich der Nachweisgrenze wurde eine größere Variabilität der gemessenen Konzentrationen festgestellt, während sich der Variationskoeffizient verringerte, je größer die Target-Konzentration war. Die Übereinstimmung der Ergebnisse in den Inter-Run Experimenten ergab einen deutlich höheren VK im Vergleich zu den Intra-Run Resultaten. Der Zusammenhang zwischen dem VK und errechneten Viruskopien in Intra- und Inter-Run für jede Verdünnungsreihe ist in Abbildung 14 dargestellt.

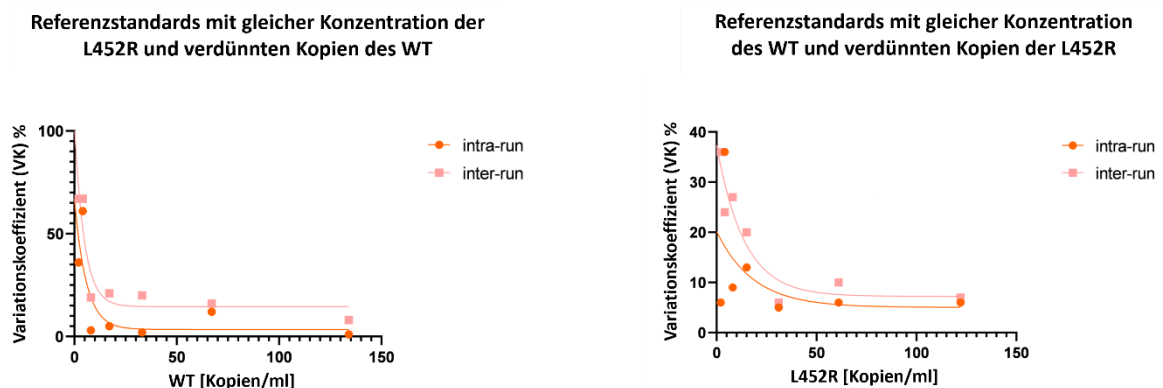


Abbildung 14: Zusammenhang zwischen Variationskoeffizient und errechneten WT- oder L452R-Viruskopien in ml Abwasser beider Verdünnungsreihen.

3.2 Mutationsanalyse aus Abwasserproben

Von 18.01.2023 bis 23.03.2023 wurden mit dem RT-ddPCR Mutation Assay SARS-CoV-2 L452R insgesamt 54 Analysen mit Proben aus sechs Kläranlagen durchgeführt. Durch die Mutation L452R in den Varianten BA.4 und BA.5 im Vergleich zu der nicht mutierten XBB-Variante an derselben Position (L452) war es möglich, mithilfe des validierten Assays Rückschlüsse auf den Anteil der jeweiligen Varianten zu ziehen.

In neun Experimenten wurden die Konzentrationen der Viruskopien mit L452R und WT in jeweils sechs Abwasserproben ermittelt und deren Mittelwert berechnet. Anschließend wurden diese Mittelwerte in relative Häufigkeiten der Viruskopien umgerechnet (Normalisierung).

Diese Normalisierung ermöglichte, einen Abgleich der relativen Häufigkeiten der L452R-Mutation und WT in den SARS-CoV-2 Varianten vorzunehmen. Die relative Häufigkeit der beiden Targets war im Zuge des nationalen SARS-CoV-2 Abwassermonitorings mittels WGS der Abwasserproben aus OÖ im selben Zeitraum detektiert worden. Die relativen Häufigkeiten der WGS wurden dann den RT-ddPCR Ergebnissen gegenübergestellt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Relative Häufigkeit der Viruskopien mit L452R und WT, ermittelt mit RT-ddPCR und WGS in OÖ. Mit der RT-ddPCR-Analyse sind die Viruskopien in ml Abwasser als Mittelwert der sechs Proben berechnet.

Datum	RT-ddPCR				Proben aus dem Zeitraum	WGS	
	L452 Kopien/ml (Mittelwert)	L452R Kopien/ml (Mittelwert)	L452 %	L452R %		L452 %	L452R %
18.01.2023	7,9	8,3	49	51	27.12.-08.01.23	40	60
01.02.2023	29,3	31,6	48	52	22.01.-29.01.23	48	52
08.02.2023	31,0	8,7	78	22	05.02.-05.02.23	61	39
14.02.2023	63,3	28,2	69	31	12.02.-12.02.23	54	46
22.02.2023	31,1	16,6	65	35	19.02.-21.02.23	64	36
01.03.2023	13,9	14,0	50	50	19.02.-26.02.23	63	37
07.03.2023	29,7	4,5	87	13	05.03.-05.03.23	70	30
17.03.2023	13,6	5,0	73	27	12.03.-12.03.23	72	29
23.03.2023	16,4	1,1	94	6	26.03.-26.03.23	91	9

In Abbildung 15A wird klar ersichtlich, wie in der WGS die relative Häufigkeit der L452R-Mutante (in blau) abnimmt, während die der WT-Variante (in grün) zunimmt. Die

mittels RT-ddPCR ermittelten relativen Häufigkeiten der SARS-CoV-2 Varianten zeigten eine ähnliche Entwicklung (Abbildung 15B). Eine lineare Regressionsanalyse der beiden Methoden, ergab sowohl für die Mutante als auch für den WT ein Bestimmtheitsmaß von $R^2=0,65$.

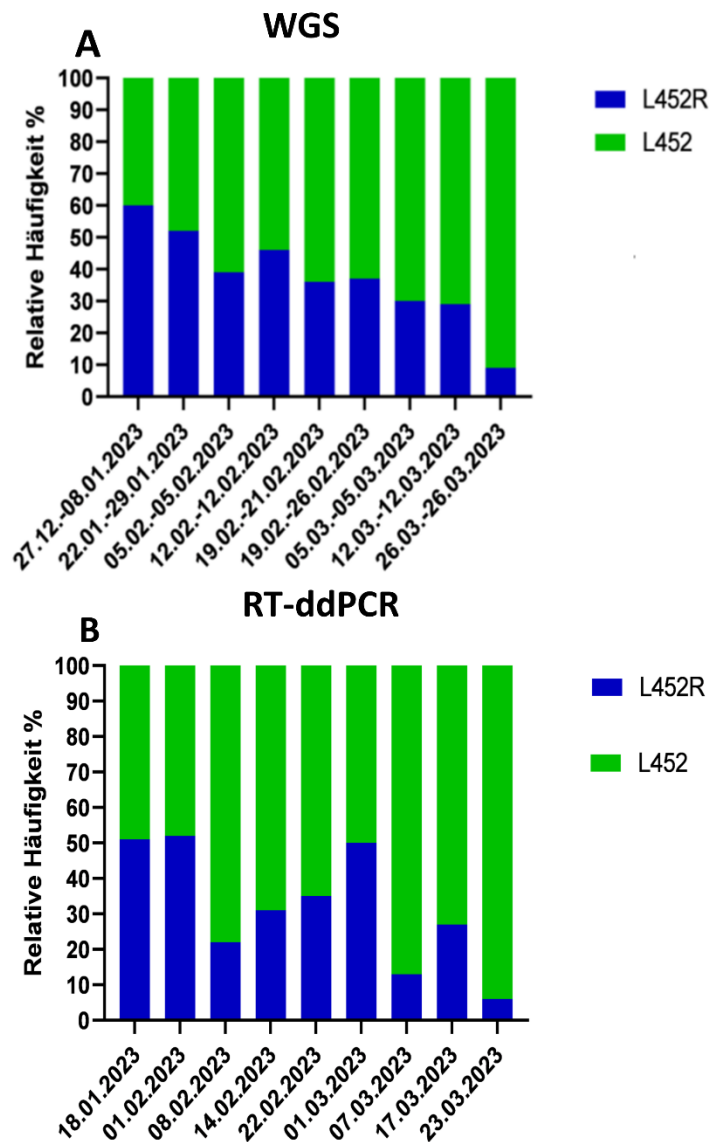


Abbildung 15: Graphische Darstellung der relativen Häufigkeit der L452R und L452, ermittelt mit WGS und RT-ddPCR. (A) Relative Häufigkeit der L452R Mutation (blau) und WT (grün) in SARS-CoV-2 Varianten, detektiert in Abwasserproben mittels WGS; (B) Relative Häufigkeit der L452R-Mutanten (blau) und WT-Varianten (grün) detektiert in Abwasserproben mittels RT-ddPCR

Mitte Jänner 2023 waren die Omikron BA.5 Variante und deren Subvarianten noch immer die dominanten Varianten in OÖ. Ende März 2023 wurden sie fast zur Gänze von der neuen rekombinanten XBB.X Variante verdrängt. Mit der Quantifizierung der L452R-

Mutante und der WT-Variante in Abwasserproben mittels RT-ddPCR konnte das Auftreten der neuen rekombinanten XBB-Variante verglichen mit der BA.5 Omikron-Variante im zeitlichen Verlauf beobachtet werden.

3.3 SARS-CoV-2 Trendanalyse aus Abwasserproben

In der Zeit zwischen November 2022 und März 2023 wurden insgesamt 102 RT-ddPCR-Analysen mit aufgereinigten Abwasserproben aus sechs Kläranlagen durchgeführt. Mit Hilfe des Custom Assay RT-ddPCR SARS-CoV-2 N2 wurde die Gesamt-Viruslast in den Abwasserproben bestimmt. Durch die Analyse der ermittelten Viruskopien in ml Abwasser und unter Berücksichtigung der entsprechenden täglichen Abwassermengen in den Kläranlagen konnte die Anzahl der fiktiven Ausscheider berechnet werden. Ziel dieses Experiments war es, eine Trendanalyse zu erstellen und diese mit dem Trend des regionalen Abwassermonitorings bzw. mit den Ergebnissen der RT-qPCR zu vergleichen.

Die Konzentrationen der Viruskopien in ml Abwasser, ermittelt durch die beiden Methoden in denselben Abwasserproben, wurden verglichen. Die RT-ddPCR zeigte dabei im Durchschnitt um 28% höhere Werte. Eine lineare Regressionsanalyse der beiden Methoden ergab für die Konzentration der SARS-CoV-2 Kopien eine lineare Korrelation von $R^2=0,74$ (Abbildung 16).

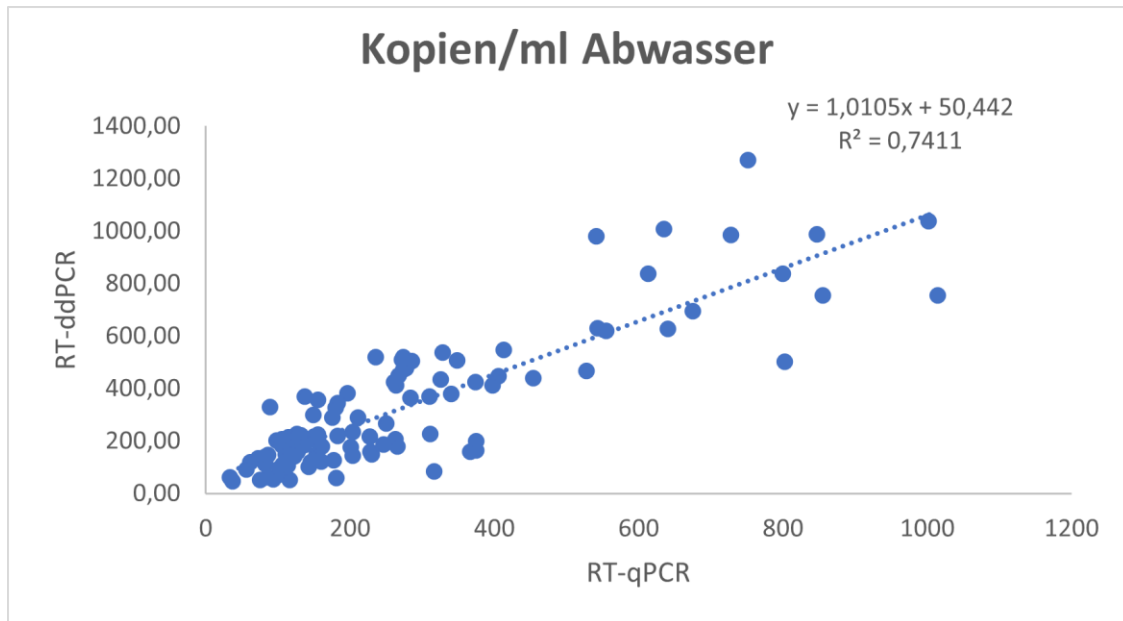


Abbildung 16: Lineare Korrelation zwischen den Konzentrationen der SARS-CoV-2 N2-Fragmente in ml, ermittelt mit RT-qPCR und RT-ddPCR.

In Abbildung 17 sind die Kurvenverläufe der Trendanalysen für Kläranlagen 1, 2 und 3 abgebildet, während Abbildung 18 jene für Kläranlagen 4, 5, und 6 zeigt. Die Anzahl der fiktiven Ausscheider nach beiden Methoden wurde für die Kläranlagen im zeitlichen Verlauf parallel dargestellt.

Bei allen sechs Kläranlagen zeigt sich ein vergleichbarer Kurvenverlauf beider Methoden, wobei die Trendkurve der RT-ddPCR-Methode nahezu durchgehend über derjenigen der RT-qPCR-Methode liegt. In den Kurvenverläufe beider Methoden ist ein Anstieg während der ersten drei Monate des Jahres 2023 zu beobachten. Die Kurve der positiv getesteten Personen ist hingegen flacher und entspricht der niedrigeren Inzidenzrate und reduzierten PCR-Testungen während der Zeit von November 2022 bis März 2023.

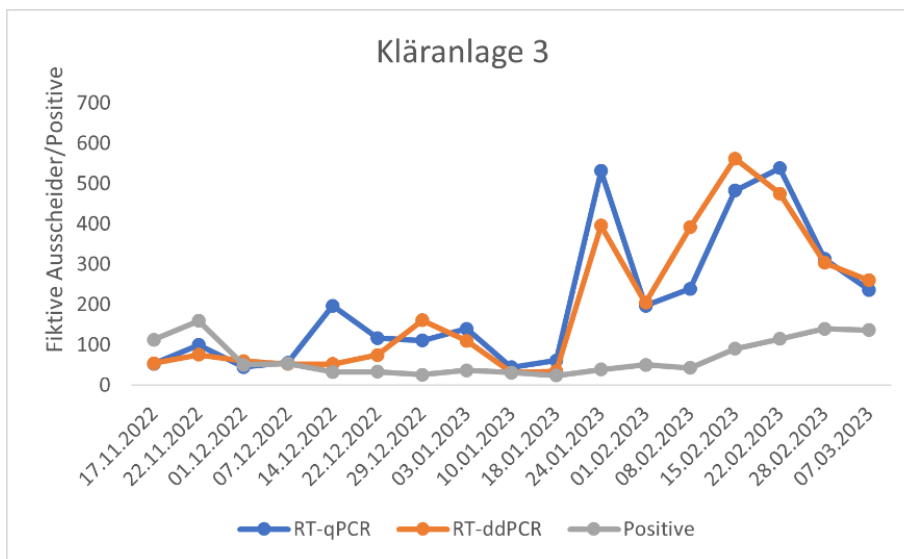
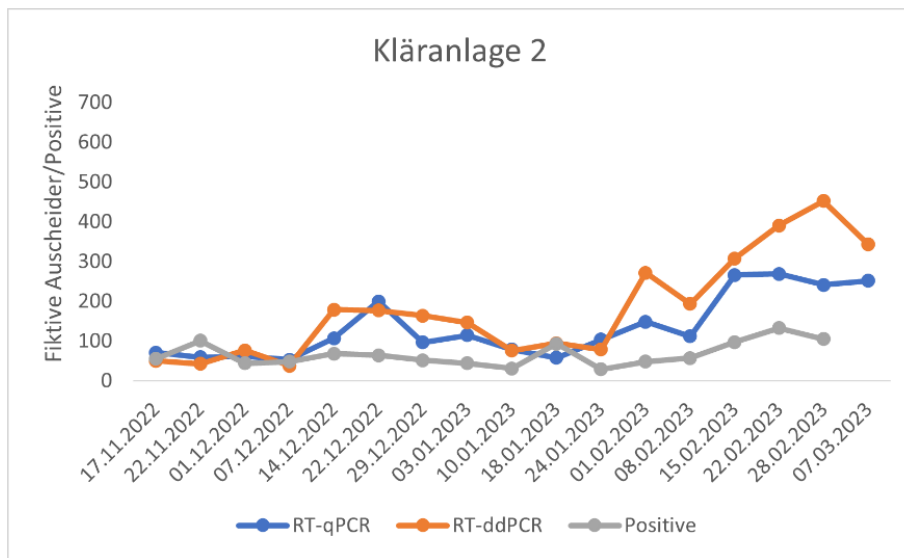
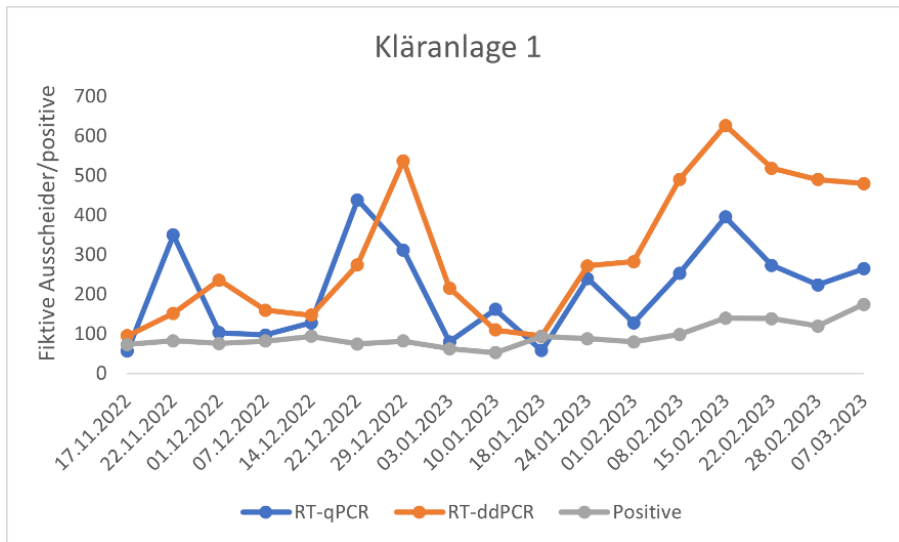


Abbildung 17: Zeitliche Verlaufsdarstellung der SARS-CoV-2 Trendanalyse in Kläranlagen 1, 2 und 3. Zeitliche Verläufe der positiv getesteten Personen (graue Linie) und der aus dem Abwassermonitoring ermittelten fiktiven Ausscheider mit RT-qPCR (blaue Linie), bzw. RT-ddPCR (orange Linie).

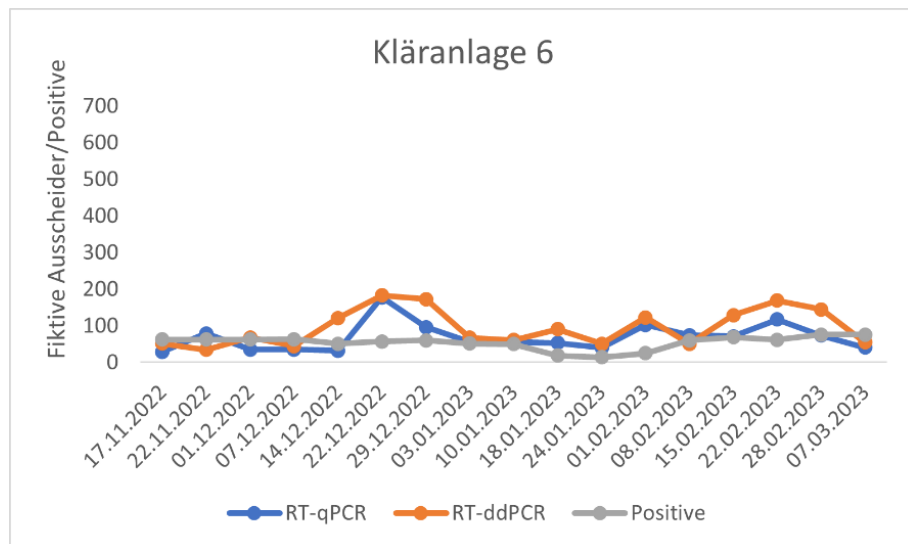
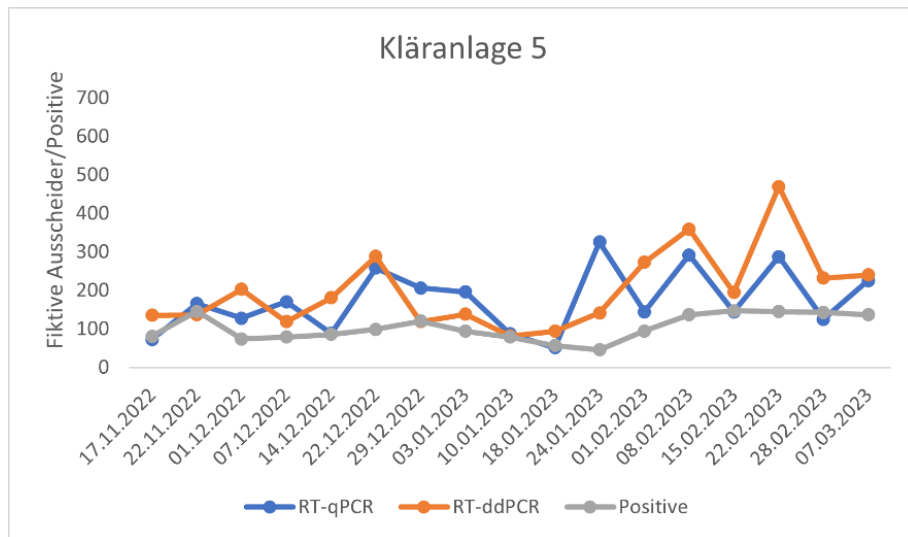
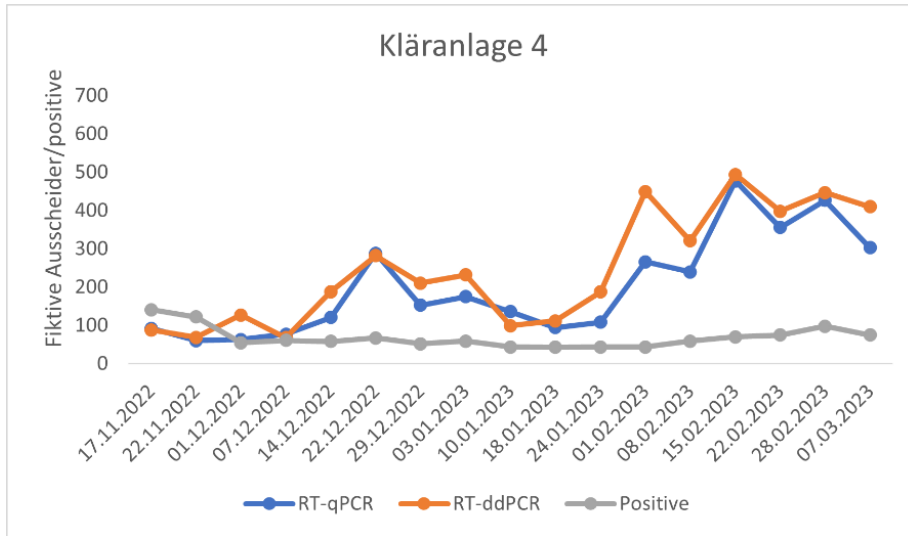


Abbildung 18: **Zeitliche Verlaufsdarstellung der SARS-CoV-2 Trendanalyse in Kläranlagen 4, 5 und 6.** Zeitliche Verläufe der positiv getesteten Personen (graue Linie) und der aus dem Abwassermonitoring ermittelten fiktiven Ausscheider mit RT-qPCR (blaue Linie), bzw. RT-ddPCR (orange Linie).

4. Diskussion

Beim Abwassermonitoring wird eine genaue Quantifizierung der viralen Erreger durchgeführt, um im Bereich der öffentlichen Gesundheit Entscheidungen zur Eindämmung von Krankheiten ableiten zu können. Unter Verwendung effizienter und sensibler Methoden zur SARS-CoV-2 Detektion wird die aktuelle Infektionslage analysiert und das Auftreten neuer Virusvarianten detektiert. Die RT-qPCR Methode ist dabei das Standardverfahren für die Bestimmung von SARS-CoV-2 im Abwasser. In einer Abwasserprobe kann eine nur geringe Anzahl von Viruskopien von SARS-CoV-2 vorhanden sein, welche dann mit dieser Methode nicht mehr erfasst werden kann. Mit der RT-ddPCR, bei der die Reaktionen in einzelne Reaktionskammern aufgeteilt sind, können hingegen falsch negative Ergebnisse vermieden werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die RT-ddPCR als Methode für den spezifischen Nachweis der SARS-CoV-2 L452R Mutation, sowie für eine Variantentypisierung der BA.5 und XBB Varianten in Abwasserproben angewandt. Auch eine Trendanalyse der SARS-CoV-2 Viruslast wurde mit diesem Verfahren erstellt und die Vor- und Nachteile der RT-ddPCR in der Routineanwendung für das Abwassermonitoring analysiert.

Mittels Validierungsexperimenten wurde die Fähigkeit des RT-ddPCR SARS-CoV-2 L452R Mutation Assays, zwischen dem SARS-CoV-2 Genom mit einer L452R Mutation und einer WT-Sequenz zu unterscheiden, experimentell überprüft. Dabei wurde die Leistung des Assays sowohl für die L452R Mutation als auch für den WT in zwei unterschiedlichen Verdünnungsreihen bei jeweils gleichbleibendem Hintergrund (L452R oder WT) bestimmt. Die Konzentrationen der errechneten und der gemessenen Viruskopien dieser mittels Verdünnungsreihe selbst hergestellten Referenzstandards zeigten eine lineare Korrelation von $R^2=0,98$ für die L452R Mutation, bzw. $R^2=0,99$ für die WT-Variante. Diese Ergebnisse veranschaulichen, dass mit dem RT-ddPCR L452R Mutation Assay eine gleichzeitige Detektion und Quantifizierung der L452R Mutation und WT in Abwasserproben möglich ist (25). Mit dem angewandten RT-ddPCR Mutation Assay konnte eine Nachweisgrenze für die L452R Mutation mit 5,5 Kopien/ml und für WT mit 3,9 Kopien/ml Abwasser bei einer Wahrscheinlichkeit von 95% ermittelt werden.

Die analytische Leistung der RT-ddPCR Methode für den Nachweis von SARS-CoV-2 Virustarget N2 im Abwasser wurde von Ciesielski et al. (2021) mit den Ergebnissen der RT-qPCR Methode verglichen. Die Konzentrationen der SARS-CoV-2 Fragmente,

gemessen mit RT-PCR Assays für zwei unterschiedliche Targets im N2- oder S-Gen, können sich sehr voneinander unterscheiden, wie von Hejnen et al (2021) beobachtet wurde (25). Daher können die ermittelten Ergebnisse der Nachweisgrenze der S-Gen L452R Mutation in der vorliegenden Arbeit nicht direkt mit den Werten der Studie von Ciesielksi et al. verglichen werden. Dieser stellt jedoch fest, dass die mehr als zehnfach niedrigere Nachweisgrenze der RT-ddPCR aufgrund ihrer hohen analytischen Sensitivität den Vorteil dieser Methode bei der Frühdetektion von SARS-CoV-2 Viruspartikeln im Abwasser verdeutlicht (42). Ahmed et al. (2022) amplifizierte SARS-CoV-2 RNA mit N1- und N2-Gen in Regionen mit einer niedrigen SARS-CoV-2 Prävalenz auch mit beiden Methoden und erzielte ähnliche Ergebnisse. RT-ddPCR Assay zeigte eine um das zwei- bis fünffach höhere analytische Sensitivität als bei der RT-qPCR (46).

Die Wiederholbarkeit der Ergebnisse in den Intra-Run Triplikaten zeigte im Durchschnitt einen VK von 17% für die Viruskopien mit WT-RNA und 11% für jene mit einer L452R Mutation in den Referenzstandards. In unabhängigen Läufen konnte hingegen eine Übereinstimmung der Ergebnisse mit einem VK von 31% für die WT-Variante und 19% für die L452R-Mutante erzielt werden. Unter Berücksichtigung der errechneten Konzentrationen in den Referenzstandards, sind diese relativen Abweichungen akzeptabel.

Mit Hilfe des validierten Assays wurde die relativen Häufigkeiten der L452R-Mutante und WT-Variante in Abwasserproben ermittelt. Auf Basis der quantitativen Veränderung der L452R-Mutante im Abwasser konnten Rückschlüsse über den Anteil der BA.5 und XBB Varianten gezogen werden. Die oberösterreichischen Kläranlagen des nationalen Abwassermonitorings haben ein Einzugsgebiet von ca. 656.000 Einwohnern, während jene sechs Kläranlagen, die für dieses Projekt herangezogen wurden, ein Einzugsgebiet von ca. 190.000 Einwohnern abdecken. Obwohl die Viruslast in deren Abwasserproben entsprechend geringer ist, zeigte eine Gegenüberstellung der relativen Häufigkeiten der L452R-Mutante und WT-Variante aus der WGS und RT-ddPCR trotzdem eine vergleichbare Entwicklung. So ergab die Detektion der WT-Variante bzw. XBB Variante in den Abwasserproben am Ende der Experimente mit beiden Methoden eine relative Häufigkeit von jeweils mehr als 90%. Dadurch konnte mit der Quantifizierung der L452R-Mutante und WT-Variante die Durchsetzung der neue rekombinante XBB-Variante gegenüber der BA.5 Omikron Variante im zeitlichen Verlauf beobachtet werden.

Im Rahmen der Experimente mit dem RT-ddPCR N2 Assay wurde eine Trendanalyse des SARS-CoV-2 Viruslast mittels RT-ddPCR erstellt. Die analytische Leistung dieses Assays

selbst wurde nicht analysiert, da der Fokus dieses Experimentes lediglich auf der zeitlichen Verlaufsdarstellung der Viruslast liegt und nicht auf der Ermittlung der Absolutwerte. Dazu wurde die Trendanalyse des SARS-CoV-2 Viruslast über einen Zeitraum von vier Monaten und mit einer Gesamtzahl von 102 RT-ddPCR Analysen umfassend durchgeführt. Ein Vergleich zwischen Kopien/ml der SARS-CoV-2 N2-Fragmente gemessen mit RT-ddPCR und RT-qPCR für die gleichen Abwasserproben zeigte eine lineare Korrelation zwischen beiden Methoden ($R^2=0,74$). Mit der RT-ddPCR konnte ein nahezu identischer Verlauf der Trendkurve der SARS-CoV-2 Viruslast erzielt werden, wobei allerdings die Trendlinie der RT-ddPCR praktisch durchgehend über derjenigen der RT-qPCR-Methode lag. Inhibitoren im Abwasser, welche bei der Extraktion nicht vollständig entfernt werden können, stören die RT-qPCR und führen zu niedrigeren Ergebnissen bei der Messung der Viruskonzentrationen.

Barua et al. (2022) untersuchte sechs Monate lang Abwasserproben auf SARS-CoV-2 RNA mit RT-qPCR und RT-ddPCR jeweils für Virustarget N2-Gen und erstellte dazu eine Trendanalyse. Die Ergebnisse beider Methoden dieser Studie zeigten eine vergleichbare Korrelation ($r=0,57$) und bestätigten die Anwendbarkeit der RT-ddPCR für das Abwassermonitoring (47).

Eine Trendanalyse des SARS-CoV-2 Virustarget N2 in 250 Abwasserproben wurde von Ai, Davis et al. (2021) für sechs Monate mittels RT-ddPCR erstellt. Die sehr gute Korrelation ($r=0,70$) zwischen ermittelter Viruslast im Abwasser mit den offiziell gemeldeten COVID-19 Fällen im selben Zeitraum zeigte ebenso den Vorteil dieser Methode bei der Frühdetektion von SARS-CoV-2 Viruspartikeln im Abwasserproben (48).

Der **Fokus** dieser Arbeit liegt in der umfassenden Validierung des angewandten Mutation Assays und der dadurch erzielten, sehr guten analytischen Leistung mit einer Sensitivität von 95% und einer Spezifität von 100%. Ein Teil dieser ermittelten Assay Konditionen könnte auch auf andere, ähnliche Mutation Assays übertragen werden. Um die Variantentypisierung laufend und relativ rasch auf das aktuelle Virusgeschehen anpassen zu können, müsste dann jedoch ein etwas kürzeres Validierungsprozedere für neue Assays entwickelt werden. Weiters kann die RT-ddPCR als zusätzliches Tool zur Qualitätskontrolle des Validierungsprozesses der RT-qPCR dienen.

Als **Einschränkung** ist allerdings zu beachten, dass die RT-ddPCR auch Nachteile gegenüber der RT-qPCR aufweist, wie ihre höheren Kosten und längere Laufzeiten. Die

WT-Kontrolle zeigte in den Referenzstandards im Vergleich zur synthetisch hergestellten Positivkontrolle etwas größere Abweichungen bei der Anzahl gemessener Viruskopien.

Zusammenfassend kann aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, dass RT-ddPCR für eine SARS-CoV-2 Variantentypisierung und die Überwachung der Virusentwicklung verwendet werden kann. Der RT-ddPCR SARS-CoV-2 L452R Mutation Assay zeigte eine sehr gute analytische Leistung, insbesondere beim Nachweis niedriger Viruskonzentrationen in Abwasserproben. Mit RT-ddPCR können bekannte Virusvarianten gescreent und Veränderungen frühzeitig nachgewiesen werden. Eine Sequenzierung der Abwasserproben gibt ein umfassendes Bild der zirkulierenden, sowie neuer SARS-CoV-2 Mutationen. In der Praxis kann eine quantitative Analyse wie die RT-ddPCR auch mit einer Sequenzierung kombiniert werden, um quantitative Informationen über variantenassoziierte Mutationen zu erhalten (32).

Die RT-ddPCR N2 Trendanalyse zeigte einen vergleichbaren Trend zur RT-qPCR Analyse, jedoch mit einer höheren Empfindlichkeit. Sie ist daher für eine Überwachung in Regionen mit niedriger Prävalenz besonders gut geeignet. Zusätzlich könnte die Anwendung von RT-ddPCR im gesamten Validierungsprozess der qPCR, inklusive der Quantifizierung von Referenzstandards und der Durchführung von fortlaufenden Qualitätskontrollen, zu einer verbesserten Vergleichbarkeit des Abwassermonitorings über verschiedene Labore, Regionen und Länder hinweg beitragen.

Dem gegenüber stehen die höheren Kosten und der höhere Arbeitsaufwand der ddPCR, was sie für die Routine im Abwassermonitoring weniger attraktiv macht. Eine Kombination aus beiden Methoden im Abwasserscreeninglabor wäre deshalb ratsam.

5. Literatur

1. Polo D, Quintela-Baluja M, Corbishley A, Jones DL, Singer AC, Graham DW et al. Making waves: Wastewater-based epidemiology for COVID-19 - approaches and challenges for surveillance and prediction. *Water Res* 2020; 186:116404. doi: 10.1016/j.watres.2020.116404.
2. Chan JF-W, Yuan S, Kok K-H, To KK-W, Chu H, Yang J et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet* 2020; 395(10223):514–23. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30154-9.

3. Graham RL, Baric RS. Recombination, reservoirs, and the modular spike: mechanisms of coronavirus cross-species transmission. *J Virol* 2010; 84(7):3134–46. doi: 10.1128/JVI.01394-09.
4. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol* 2015; 1282:1–23. doi: 10.1007/978-1-4939-2438-7_1.
5. Laue M, Kauter A, Hoffmann T, Möller L, Michel J, Nitsche A. Morphometry of SARS-CoV and SARS-CoV-2 particles in ultrathin plastic sections of infected Vero cell cultures. *Sci Rep* 2021; 11(1):3515. doi: 10.1038/s41598-021-82852-7.
6. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 2020; 181(2):271-280.e8. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
7. Peacock TP, Brown JC, Zhou J, Thakur N, Sukhova K, Newman J et al. The altered entry pathway and antigenic distance of the SARS-CoV-2 Omicron variant map to separate domains of spike protein; 2022.
8. WHO. Updated working definitions and primary actions for SARS-CoV-2 variants, 15 March 2023 [Stand: 16.08.2023]. Verfügbar unter: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/annex1_updated_working_definitions.pdf?sfvrsn=2cde3a06_1.
9. Robert Koch Institut. RKI - Coronavirus SARS-CoV-2 - Anwendung der SARS-CoV-2 Varianten Nomenklatur der WHO durch das RKI; 2023 [Stand: 20.04.2023]. Verfügbar unter: https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Virologische_Basisdaten_Varianten_Nomenklatur.html.
10. Bundesministerium Soziales, Gesundheit, Pflege und Konsumentenschutz. Nationales Abwassermonitoring Österreich; 2023 [Stand: 16.04.2023]. Verfügbar unter: <https://abwassermonitoring.at/natmon/>.
11. Amman F, Endler L, Schedl A, Thornton M, Bergthaler A. Österreichischer Abwasser SARS-CoV-2 Varianten Bericht. Berichte von 08.01.2023 bis 11.04.2023.
12. European Centre for Disease Prevention and Control. Operational considerations for respiratory virus surveillance in Europe - July 2022 [Stand: 20.04.2023]. Verfügbar unter: <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/ecdc-de-escalates-ba2-ba4-and-ba5-its-list-variants-concern>.
13. Thompson JR, Nancharaiyah YV, Gu X, Lee WL, Rajal VB, Haines MB et al. Making waves: Wastewater surveillance of SARS-CoV-2 for population-based health management. *Water Res* 2020; 184:116181. doi: 10.1016/j.watres.2020.116181.
14. Daleiden B, Niederstätter H, Steinlechner M, Wildt S, Kaiser M, Lass-Flörl C et al. Wastewater surveillance of SARS-CoV-2 in Austria: development, implementation, and operation of the Tyrolean wastewater monitoring program. *J Water Health* 2022; 20(2):314–28. doi: 10.2166/wh.2022.218.
15. Prado T, Fumian TM, Mannarino CF, Resende PC, Motta FC, Eppinghaus ALF et al. Wastewater-based epidemiology as a useful tool to track SARS-CoV-2 and support public health policies at municipal level in Brazil. *Water Res* 2021; 191:116810. doi: 10.1016/j.watres.2021.116810.
16. Ho J, Stange C, Suhrborg R, Wurzbacher C, Drewes JE, Tiehm A. SARS-CoV-2 wastewater surveillance in Germany: Long-term RT-digital droplet PCR monitoring,

- suitability of primer/probe combinations and biomarker stability. *Water Res* 2022; 210:117977. doi: 10.1016/j.watres.2021.117977.
17. Curnin S, Brooks B. Making waves: How do we prepare for the next drinking water disaster? *Water Res* 2020; 185:116277. doi: 10.1016/j.watres.2020.116277.
 18. Randazzo W, Truchado P, Cuevas-Ferrando E, Simón P, Allende A, Sánchez G. SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *Water Res* 2020; 181:115942. doi: 10.1016/j.watres.2020.115942.
 19. Maksimovic Carvalho Ferreira O, Lengar Ž, Kogej Z, Bačnik K, Bajde I, Milavec M et al. Evaluation of Methods and Processes for Robust Monitoring of SARS-CoV-2 in Wastewater. *Food Environ Virol* 2022; 14(4):384–400. doi: 10.1007/s12560-022-09533-0.
 20. Factsheet zum Abwassermonitoring SARS-CoV - Google Suche; 2023 [Stand: 22.04.2023]. Verfügbar unter: <https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&q=Factsheet+zum+Abwassermonitoring+SARS-CoV>.
 21. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K et al. *Molekularbiologie der Zelle*. 6. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2017. ISBN: 978-3-527-34072-9
 22. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol* 2012; 113(5):1014–26. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x.
 23. Ahmed W, Simpson SL, Bertsch PM, Bibby K, Bivins A, Blackall LL et al. Minimizing errors in RT-PCR detection and quantification of SARS-CoV-2 RNA for wastewater surveillance. *Sci Total Environ* 2022; 805:149877. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.149877.
 24. Farkas K, Hillary LS, Malham SK, McDonald JE, Jones DL. Wastewater and public health: the potential of wastewater surveillance for monitoring COVID-19. *Curr Opin Environ Sci Health* 2020; 17:14–20. doi: 10.1016/j.coesh.2020.06.001.
 25. Heijnen L, Elsinga G, Graaf M de, Molenkamp R, Koopmans MPG, Medema G. Droplet digital RT-PCR to detect SARS-CoV-2 signature mutations of variants of concern in wastewater. *Sci Total Environ* 2021; 799:149456. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.149456.
 26. Mills MG, Hajian P, Bakhash SM, Xie H, Mantzke D, Zhu H et al. Rapid and accurate identification of SARS-CoV-2 Omicron variants using droplet digital PCR (RT-ddPCR). *Journal of Clinical Virology* 2022; 154:105218. doi: 10.1016/j.jcv.2022.105218.
 27. Cao Y, Raith MR, Griffith JF. Droplet digital PCR for simultaneous quantification of general and human-associated fecal indicators for water quality assessment. *Water Res* 2015; 70:337–49. doi: 10.1016/j.watres.2014.12.008.
 28. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem* 2011; 83(22):8604–10. doi: 10.1021/ac202028g.
 29. van Poelvoorde LAE, Delcourt T, Coucke W, Herman P, Keersmaecker SCJ de, Saelens X et al. Strategy and Performance Evaluation of Low-Frequency Variant Calling for SARS-CoV-2 Using Targeted Deep Illumina Sequencing. *Front Microbiol* 2021; 12:747458. doi: 10.3389/fmicb.2021.747458.

30. van Vo, Tillett RL, Papp K, Shen S, Gu R, Gorzalski A et al. Use of wastewater surveillance for early detection of Alpha and Epsilon SARS-CoV-2 variants of concern and estimation of overall COVID-19 infection burden. *Sci Total Environ* 2022; 835:155410. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.155410.
31. Wilhelm A, Schoth J, Meinert-Berning C, Agrawal S, Bastian D, Orschler L et al. Wastewater surveillance allows early detection of SARS-CoV-2 omicron in North Rhine-Westphalia, Germany. *Sci Total Environ* 2022; 846:157375. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.157375.
32. Lou EG, Sapoval N, McCall C, Bauhs L, Carlson-Stadler R, Kalvapalle P et al. Direct comparison of RT-ddPCR and targeted amplicon sequencing for SARS-CoV-2 mutation monitoring in wastewater. *Sci Total Environ* 2022; 833:155059. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.155059.
33. Maljkovic Berry I, Melendrez MC, Bishop-Lilly KA, Rutvisuttinunt W, Pollett S, Talundzic E et al. Next Generation Sequencing and Bioinformatics Methodologies for Infectious Disease Research and Public Health: Approaches, Applications, and Considerations for Development of Laboratory Capacity. *J Infect Dis* 2020; 221(Suppl 3):S292-S307. doi: 10.1093/infdis/jiz286.
34. Exact Diagnostics. SARS-CoV-2 S Gene Epsilon Variant Control; 2023 [Stand: 18.04.2023]. Verfügbar unter: <http://www.exactdiagnostics.com/sars-cov-2-s-gene-epsilon-variant-control.html>.
35. EURM-019 single stranded RNA (ssRNA) fragments of SARS-CoV-2 - Certified Reference Materials catalogue of the JRC; 2023 [Stand: 18.04.2023]. Verfügbar unter: <https://crm.jrc.ec.europa.eu/p/EURM-019>.
36. Corporation P. Maxwell® RSC Enviro Total Nucleic Acid Kit Technical Manual #TM663 [Stand: 04.07.2023]. Verfügbar unter: https://at.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/500/maxwell-rsc-enviro-total-nucleic-acid-protocol-tm663.pdf?rev=63bb20044fc1492fa5ed025c33ff30e1&sc_lang=en.
37. Corporation P. GoTaq® Enviro Wastewater SARS-CoV-2 Systems Technical Manual TM661 [Stand: 04.07.2023]. Verfügbar unter: <https://at.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/500/gotaq-enviro-wastewater-sars-cov-2-systems-protocol-tm661.pdf?rev=6d83a0a08f3543cf9593718149113063&la=en>.
38. GISAIID - Lineage Comparison; 2023 [Stand: 04.04.2023]. Verfügbar unter: <https://gisaid.org/lineage-comparison/>.
39. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; 55(4):611–22. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797.
40. One-Step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes [Stand: 04.07.2023]. Verfügbar unter: <https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/10049226.pdf>.
41. BioRad. Rare mutation detection best practices guidelines - Google Suche; 2023 [Stand: 21.04.2023]. Verfügbar unter: <https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&q=rare+mutation+detection+best+practices+guidelines>.
42. Ciesielski M, Blackwood D, Clerkin T, Gonzalez R, Thompson H, Larson A et al. Assessing sensitivity and reproducibility of RT-ddPCR and RT-qPCR for the

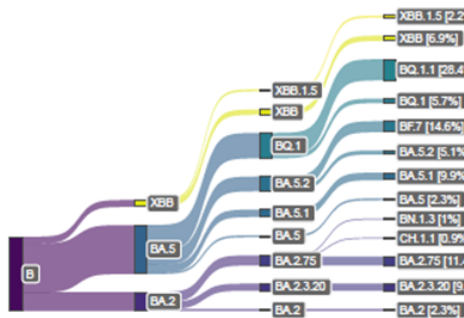
- quantification of SARS-CoV-2 in wastewater. *J Virol Methods* 2021; 297:114230. doi: 10.1016/j.jviromet.2021.114230.
43. Deprez L, Corbisier P, Kortekaas A-M, Mazoua S, Beaz Hidalgo R, Trapmann S et al. Validation of a digital PCR method for quantification of DNA copy number concentrations by using a certified reference material. *Biomolecular Detection and Quantification* 2016; 9:29–39. doi: 10.1016/j.bdq.2016.08.002.
 44. Amman F, Markt R, Endler L, Hupfauf S, Agerer B, Schedl A et al. Viral variant-resolved wastewater surveillance of SARS-CoV-2 at national scale. *Nat Biotechnol* 2022; 40(12):1814–22. doi: 10.1038/s41587-022-01387-y.
 45. Popa A, Genger J-W, Nicholson MD, Penz T, Schmid D, Aberle SW et al. Genomic epidemiology of superspreading events in Austria reveals mutational dynamics and transmission properties of SARS-CoV-2. *Sci Transl Med* 2020; 12(573). doi: 10.1126/scitranslmed.abe2555.
 46. Ahmed W, Smith WJM, Metcalfe S, Jackson G, Choi PM, Morrison M et al. Comparison of RT-qPCR and RT-dPCR Platforms for the Trace Detection of SARS-CoV-2 RNA in Wastewater. *ACS ES T Water* 2022; 2(11):1871–80. doi: 10.1021/acsestwater.1c00387.
 47. Barua VB, Juel MAI, Blackwood AD, Clerkin T, Ciesielski M, Sorinolu AJ et al. Tracking the temporal variation of COVID-19 surges through wastewater-based epidemiology during the peak of the pandemic: A six-month long study in Charlotte, North Carolina. *Sci Total Environ* 2022; 814:152503. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.152503.
 48. Ai Y, Davis A, Jones D, Lemeshow S, Tu H, He F et al. Wastewater SARS-CoV-2 monitoring as a community-level COVID-19 trend tracker and variants in Ohio, United States. *Sci Total Environ* 2021; 801:149757. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.149757.

6. Anhang

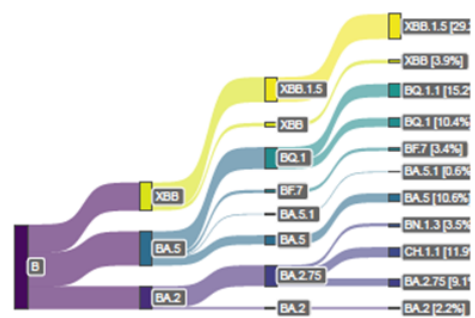
Abwasser Varianten Monitoring – Berichte des CeMM, Wien (11).

SARS-CoV-2 Varianten und deren Relative Häufigkeit in den sequenzierten Abwasserproben aus OÖ. Die Proben stammen aus dem jeweils angegebenen Zeitraum.

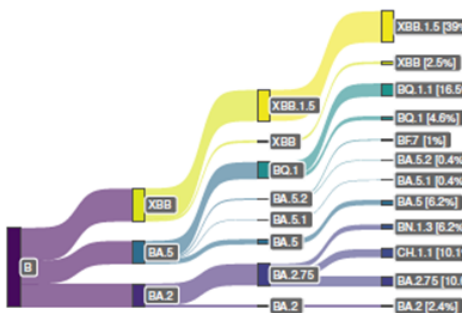
2022-12-27 bis 2023-01-08



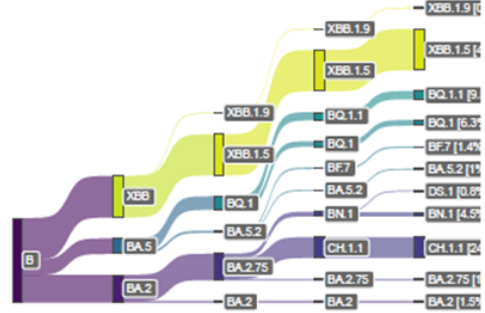
2023-01-22 bis 2023-01-29



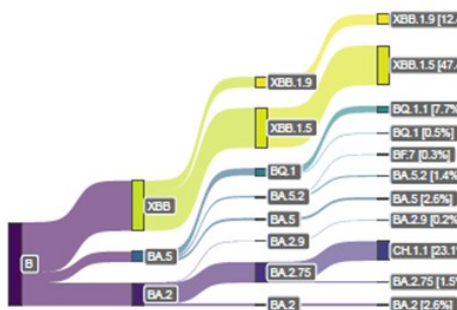
2023-02-05 bis 2023-02-05



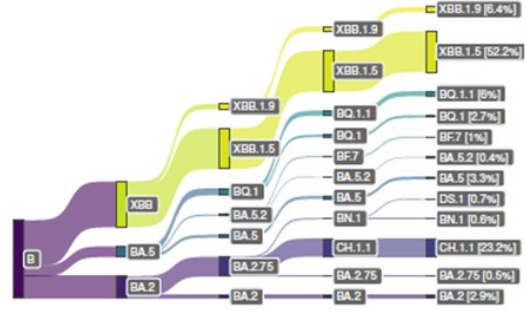
2023-02-12 bis 2023-02-12



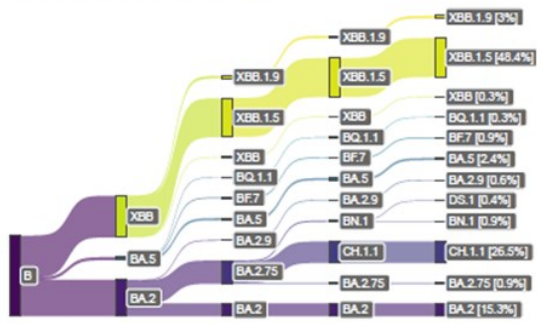
2023-02-19 bis 2023-02-21



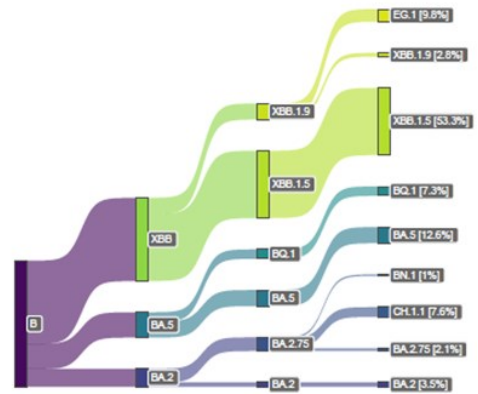
2023-02-19 bis 2023-02-26



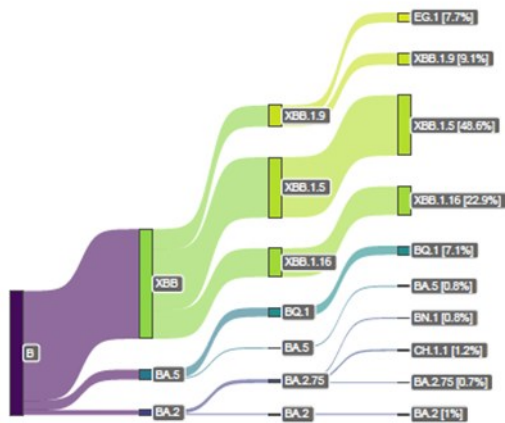
2023-03-05 bis 2023-03-05



2023-03-12 bis 2023-03-12



2023-03-26 bis 2023-03-26



Land OÖ Abwassermonitoring: Anzahl der positiv getesteten Personen, Anzahl fiktive Ausscheider (RT-qPCR) und Abwassermenge in m³ verwendet für die Erstellung der SARS-CoV-2 Trendanalyse. Die durch RT-ddPCR ermittelte Anzahl der fiktiven Ausscheider ist auch dargestellt.

Datum	Kläranlage	Positive	Fiktive Ausscheider RT-qPCR	Abwassermenge m ³	Fiktive Ausscheider RT-ddPCR	Kläranlage	Positive	Fiktive Ausscheider RT-qPCR	Abwassermenge m ³	Fiktive Ausscheider RT-ddPCR
17.11.2022	Kläranlage 1	73	56	8400	95	Kläranlage 2	55	71	6386	50
22.11.2022	Kläranlage 1	83	350	14934	152	Kläranlage 2	101	59	9411	42
01.12.2022	Kläranlage 1	76	103	10608	236	Kläranlage 2	44	62	8725	77
07.12.2022	Kläranlage 1	82	97	8856	160	Kläranlage 2	48	53	5958	38
14.12.2022	Kläranlage 1	94	128	10084	147	Kläranlage 2	68	107	6384	179
22.12.2022	Kläranlage 1	75	439	8750	274	Kläranlage 2	64	200	6056	177
29.12.2022	Kläranlage 1	82	312	17982	537	Kläranlage 2	52	97	11765	164
03.01.2023	Kläranlage 1	63	80	9322	216	Kläranlage 2	44	115	6456	147
10.01.2023	Kläranlage 1	53	162	9740	110	Kläranlage 2	31	79	8183	76
18.01.2023	Kläranlage 1	93	58	16522	94	Kläranlage 2	93	58	16522	94
24.01.2023	Kläranlage 1	88	240	10292	272	Kläranlage 2	29	104	6721	79
01.02.2023	Kläranlage 1	80	128	8714	282	Kläranlage 2	48	148	6327	272
08.02.2023	Kläranlage 1	99	253	20606	491	Kläranlage 2	57	112	22084	194
15.02.2023	Kläranlage 1	140	395	9956	627	Kläranlage 2	97	266	7823	308
22.02.2023	Kläranlage 1	139	274	15988	519	Kläranlage 2	133	269	12338	390
28.02.2023	Kläranlage 1	120	224	15530	490	Kläranlage 2	105	241	14173	452
07.03.2023	Kläranlage 1	175	265	7824	480	Kläranlage 2	106	251	6556	343
17.11.2022	Kläranlage 3	113	53	8009	54	Kläranlage 4	141	93	6519	88
22.11.2022	Kläranlage 3	160	100	10040	76	Kläranlage 4	122	60	7850	69
01.12.2022	Kläranlage 3	51	45	8714	60	Kläranlage 4	55	63	6785	127
07.12.2022	Kläranlage 3	54	56	7929	52	Kläranlage 4	61	77	6141	68
14.12.2022	Kläranlage 3	33	197	9958	53	Kläranlage 4	58	121	7326	188
22.12.2022	Kläranlage 3	34	117	8115	75	Kläranlage 4	67	288	7203	282
29.12.2022	Kläranlage 3	26	111	11875	162	Kläranlage 4	52	153	11605	211
03.01.2023	Kläranlage 3	37	141	8573	111	Kläranlage 4	59	175	6777	232
10.01.2023	Kläranlage 3	32	44	8222	32	Kläranlage 4	44	136	6992	99
18.01.2023	Kläranlage 3	24	61	9645	35	Kläranlage 4	43	94	9544	112
24.01.2023	Kläranlage 3	39	532	8391	396	Kläranlage 4	44	108	6340	187
01.02.2023	Kläranlage 3	51	197	7931	205	Kläranlage 4	44	266	5667	450
08.02.2023	Kläranlage 3	43	239	11650	392	Kläranlage 4	59	240	11797	321
15.02.2023	Kläranlage 3	91	483	9116	562	Kläranlage 4	70	477	7624	494
22.02.2023	Kläranlage 3	115	539	10078	475	Kläranlage 4	75	356	10249	398
28.02.2023	Kläranlage 3	140	313	11046	304	Kläranlage 4	98	426	8533	447
07.03.2023	Kläranlage 3	137	237	9331	260	Kläranlage 4	75	302	6650	410
17.11.2022	Kläranlage 5	81	73	10152	136	Kläranlage 6	63	30	4493	52
22.11.2022	Kläranlage 5	146	165	18191	137	Kläranlage 6	63	79	10939	35
01.12.2022	Kläranlage 5	74	128	16560	203	Kläranlage 6	63	35	9150	68
07.12.2022	Kläranlage 5	79	171	11945	119	Kläranlage 6	64	35	4450	45
14.12.2022	Kläranlage 5	86	89	14415	181	Kläranlage 6	51	33	5881	121
22.12.2022	Kläranlage 5	99	258	12159	288	Kläranlage 6	57	178	4219	183
29.12.2022	Kläranlage 5	120	207	35448	119	Kläranlage 6	60	97	12280	173
03.01.2023	Kläranlage 5	94	196	15410	138	Kläranlage 6	52	56	4934	67
10.01.2023	Kläranlage 5	79	87	13638	82	Kläranlage 6	50	55	5512	61
18.01.2023	Kläranlage 5	57	51	24760	94	Kläranlage 6	19	54	9982	91
24.01.2023	Kläranlage 5	46	326	14221	142	Kläranlage 6	14	40	5647	51
01.02.2023	Kläranlage 5	95	145	12674	273	Kläranlage 6	25	103	5319	123
08.02.2023	Kläranlage 5	137	292	39581	360	Kläranlage 6	60	74	15825	51
15.02.2023	Kläranlage 5	147	144	16947	195	Kläranlage 6	69	71	6342	130
22.02.2023	Kläranlage 5	145	288	17672	470	Kläranlage 6	62	118	12099	169
28.02.2023	Kläranlage 5	143	125	27460	232	Kläranlage 6	76	74	11190	145
07.03.2023	Kläranlage 5	137	226	14472	240	Kläranlage 6	76	41	5886	55