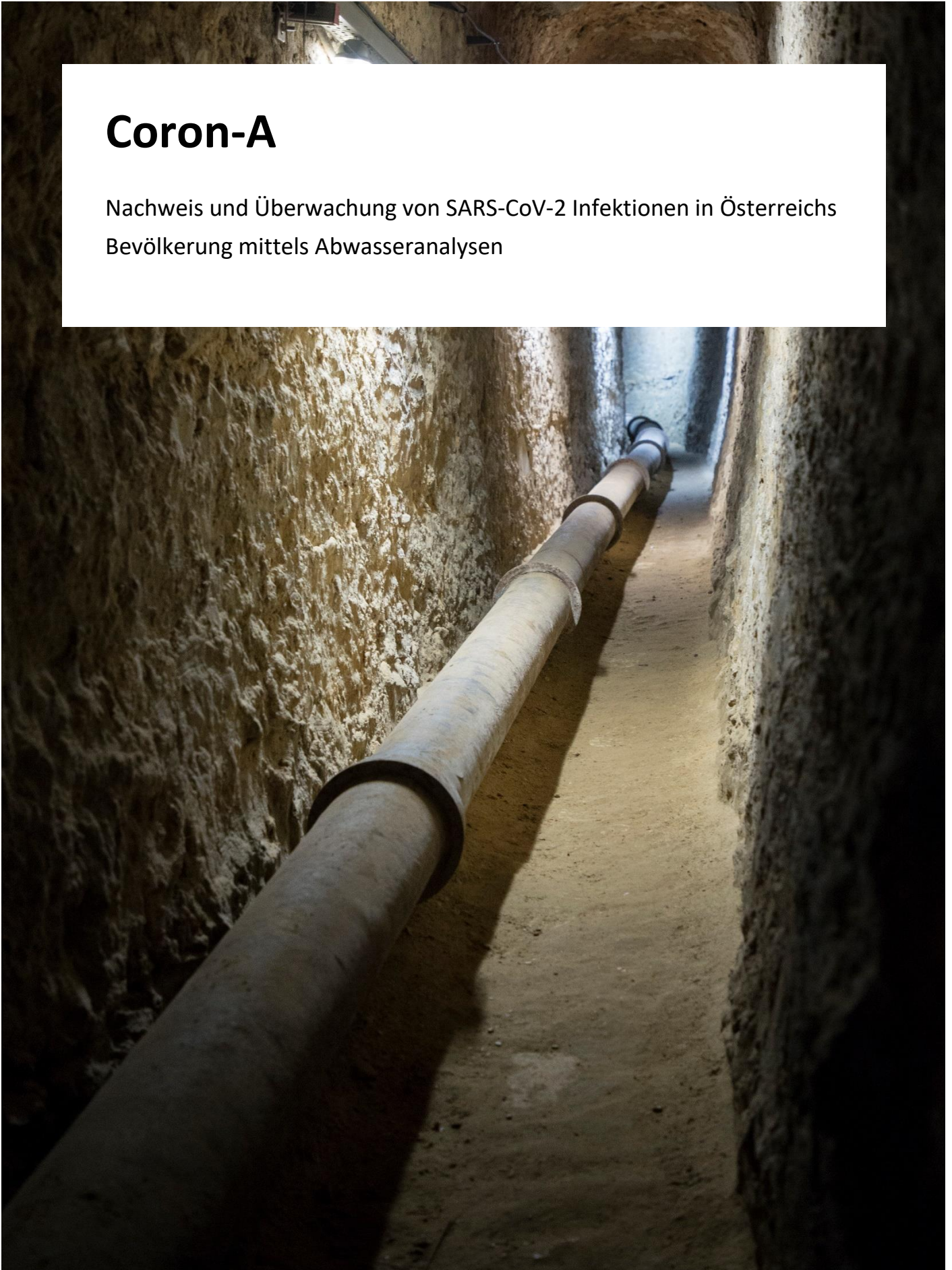


Coron-A

Nachweis und Überwachung von SARS-CoV-2 Infektionen in Österreichs
Bevölkerung mittels Abwasseranalysen



Impressum

Medieninhaber und Herausgeber:

Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Regionen und Wasserwirtschaft,
Stubenring 1, 1010 Wien

Autorinnen und Autoren:

Technische Universität Wien: Norbert Kreuzinger, Heidemarie Schaar

Universität Innsbruck: Heribert Insam, Wolfgang Rauch, Rudolf Markt, Markus Mayr,
Daniel Grünbacher

AGES: Hans Peter Stüger, Karin Weyermayer, Sabrina Kuchling, Oliver Alber, Tedej Zerak

Medizinische Universität Innsbruck: Herbert Oberacher, Beatrice Daleiden, Harald
Niederstätter, Richard Scheithauer, Martin Steinlechner

Hydro-IT: Heiko Kinzel

Gesamtumsetzung: Projektteam Umweltbundesamt – Robert Konecny, Dennis Worgull,
Florian Wolf-Ott, Sabine Enzinger, Elisabeth Stadler, Karin Weber, Doris Weismayr

Fotonachweis: Umweltbundesamt/Philipp Hohenblum (S. 1), BML/Paul Gruber (S. 3),
BMBWF/Marija Kanizaj (S. 5), TU Wien/Norbert Kreuzinger (Abb. 13/88), Medizinische
Universität Innsbruck (Abb. 79)

Wien, 2022.

Copyright und Haftung:

Auszugsweiser Abdruck ist nur mit Quellenangabe gestattet, alle sonstigen Rechte sind
ohne schriftliche Zustimmung des Medieninhabers unzulässig.

Es wird darauf verwiesen, dass alle Angaben in dieser Publikation trotz sorgfältiger
Bearbeitung ohne Gewähr erfolgen und eine Haftung des Bundesministeriums für Land-
und Forstwirtschaft, Regionen und Wasserwirtschaft und der Autorin / des Autors
ausgeschlossen ist. Rechtausführungen stellen die unverbindliche Meinung der Autorin /
des Autors dar und können der Rechtsprechung der unabhängigen Gerichte keinesfalls
vorgreifen.

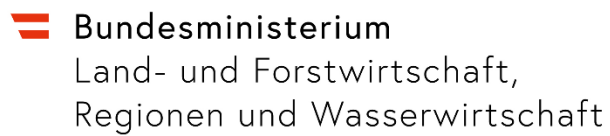
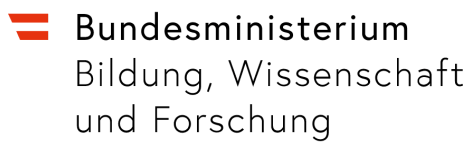
Projektbeteiligungen



Projektpartner:



Fördergeber:



Co-Auftraggeber:



Vorwort, BML



Mag. Norbert Totschnig, MSc

Seit März 2020 stellt uns die globale COVID-19-Pandemie vor enorme Herausforderungen, auf die wir als Gesellschaft reagieren müssen. Dabei spielt das Forschungsprojekt „Coron-A“ eine wichtige Rolle, da es in der Abwasser-epidemiologie Bahnbrechendes für ein Grundsatzverständnis des SARS-CoV-2 Virus im Abwasser und die methodische Entwicklung geleistet hat. Erstmals wurde die österreichische Expertise in diesem Bereich gebündelt und die Grundlagen für ein epidemiologisches Frühwarnsystem entwickelt. Ich freue mich, dass das Ergebnis auch ein international beachtetes

Vorreiter-Projekt geworden ist.

Im Rahmen des Forschungsprojektes „Coron-A“ wurde in kürzester Zeit eine Methodik entwickelt, mit der flächendeckende, räumlich zuordenbare und einzugsgebietsbezogene Daten gewonnen werden können. Für das Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Regionen und Wasserwirtschaft war es von Bedeutung, dass die Virusaktivität – unabhängig von der Anzahl durchgeführter Tests – beobachtet werden kann. Verglichen mit herkömmlichen Testmethoden, liefert es zusätzlich wesentliche Aufschlüsse über das regionale Infektionsgeschehen.

Das Potential des Projekts wurde vom BML von Beginn an erkannt und den beauftragten Institutionen ohne zu zögern die notwendigen Mittel zu Verfügung gestellt. Mein besonderer Dank gilt dem Umweltbundesamt, das die Koordination dieses interdisziplinären Projekts übernommen hat und den Projektpartnern TU Wien, Universität Innsbruck, Medizinische Universität Innsbruck, AGES und hydro-IT, die mit ihren wissenschaftlichen Entwicklungen eine wichtige Grundlage für das Pandemiemanagement geschaffen haben. Damit gelang es, den Gesundheitsbehörden mit der im Projekt „Coron-A“ entwickelten Methodik und den gewonnenen Erkenntnissen ein hilfreiches Instrument in die Hände zu legen.

Norbert Totschnig

Bundesminister für Land- und Forstwirtschaft, Regionen und Wasserwirtschaft

Vorwort, BMBWF



Martin Polaschek
Bundesminister

Das Coronavirus hat uns in den vergangenen zwei Jahren vor vielfältige Herausforderungen gestellt. Besonders in dieser von zahlreichen Veränderungen geprägten Zeit war und ist es wichtig, evidenzbasiert und faktenorientiert zu handeln.

Die Wissenschaft leistet dazu einen wesentlichen Beitrag, z. B. auch mithilfe der Abwasseranalyse. Forschende unterschiedlicher Fachgebiete haben gemeinsam ein innovatives Verfahren entwickelt, mit dem SARS-CoV-2 Viren im Abwasser festgestellt werden können, bevor die Infektionen durch Tests oder als Erkrankungen ersichtlich werden.

Ich freue mich sehr, dass das komplexe Verfahren der Abwasseranalyse so schnell und praxisnah entwickelt wurde. Das BMBWF hat, gemeinsam mit dem BML, die Entwicklung der Methodik bereits 2020–2021 im Rahmen eines Forschungsprojekts gefördert und unterstützt nun die flächige Ausrollung. Als zentraler Erfolgsfaktor, um vom Pilotprojekt zum österreichweiten Monitoring zu gelangen, erwies sich die fachübergreifende Kooperation verschiedener Institutionen: Die Universität Innsbruck, die Technische Universität Wien, die Medizinische Universität Innsbruck, die Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (AGES) und das Unternehmen hydro-IT arbeiteten unter der Koordination des Umweltbundesamts gemeinsam an der Entwicklung. Ich darf mich bei allen Beteiligten für die Zusammenarbeit bei dieser Initiative herzlich bedanken!

Mit dem Projekt konnte Österreich sein wissenschaftliches Potential beweisen und den internationalen Ruf als exzellenter Forschungsstandort festigen. Damit dies auch in Zukunft so bleibt, müssen wir besonderes Augenmerk auf die Bildung der jungen Generation legen. Mir ist es daher sehr wichtig, unseren Schülerinnen und Schülern einen geregelten Schulalltag und ein sicheres Lernumfeld zu ermöglichen. Die Erkenntnisse und Entwicklungen von „Coron-A“ fließen in das COVID-Maßnahmenpaket „Sichere Schule“ ein und ermöglichen, dass das Schuljahr mit regelmäßigen Abwasseruntersuchungen begleitet wird. Diese neue Methode ist eine wichtige Unterstützung im Umgang mit der Pandemie und hilft, unsere Schulen so sicher wie möglich zu gestalten.

ao. Univ.-Prof. Dr. Martin Polaschek
Bundesminister für Bildung, Wissenschaft und Forschung

Foreword, BML

Since March 2020, the global COVID-19 pandemic has confronted us with enormous challenges to which we must respond as a society. The "Coron-A" research project plays an important role in this. In wastewater epidemiology, it has made groundbreaking contributions to a basic understanding of the SARS-CoV-2 virus in wastewater and methodological developments. For the first time, Austrian expertise in this field was pooled and the foundations for an epidemiological early warning system were developed. I am pleased that the result has also become an internationally respected pioneer project.

In the context of the „Coron-A“ project a method was developed in a very short time with which area-wide, spatially assignable and catchment area-related data can be obtained. For the Federal Ministry of Agriculture, Forestry, Regions and Water Management, it was crucial that the virus activity could be observed independently of the number of tests carried out. Compared to conventional testing methods, it provides essential information about regional infection patterns.

The Federal Ministry of Agriculture, Forestry, Regions and Water Management recognised the potential of the project from the very beginning and provided the necessary funds to the commissioned institutions without hesitation. My special thanks go to the Environment Agency Austria, which took over the coordination of this interdisciplinary research project and to the project partners Technical University of Vienna, University of Innsbruck, Medical University of Innsbruck, Austrian Agency for Health and Food Safety and hydro-IT, whose scientific developments have made an important contribution to pandemic management. Thus, with the methodology developed and the knowledge gained in the project "Coron-A" it was possible to put an effective tool into the hands of the health authorities.

Mag. Norbert Totschnig MSc.

Federal Minister for Agriculture, Forestry, Regions and Water Management

Foreword, BMBWF

The coronavirus has confronted us with a variety of challenges over the past two years. In such times of change, it is more important than ever that we are able to work in an evidence-based manner and use scientific results.

Research makes a very important contribution to this: Scientists from various fields have developed an innovative procedure to detect the SARS-CoV-2 virus in waste water before infections result in positive tests or in people falling ill.

I am very pleased that this complex procedure was developed so quickly. The BMBWF together with the BML funded the development of this method already in 2020–2021 as part of a research project and now supports a wider roll-out. To get from a pilot project towards a monitoring across Austria was only possibly because of the cooperation beyond scientific fields and institutions. University of Innsbruck, Technical University Vienna, Medical University of Innsbruck, the Austrian Agency for Health and Food Safety and the company hydro-IT worked together under the coordination of the Environment Agency Austria. At this point, I would like to thank everyone who contributed to this project.

With this project, Austria was able to demonstrate its scientific potential and strengthen its international reputation as an excellent research location. In order to continue on this basis in the future, we must concentrate on training the young generation. It is very important to me to give children a regular school day and a safe learning environment. The results and developments from "Coron-A" will be used in the COVID-measures for a successful school year and will accompany this year's school year with regular waste water tests. This new method is an important support in dealing with the pandemic.

ao. Univ.-Prof. Dr. Martin Polaschek
Federal Minister for Education, Science and Research

Inhalt

Projektbeteiligungen.....	3
Vorwort, BML	4
Vorwort, BMBWF	5
Foreword, BML	6
Foreword, BMBWF	7
Zusammenfassung	12
Summary	15
1 Methodenentwicklung	17
1.1 Probenlagerung.....	17
1.1.1 Hintergrund.....	17
1.1.2 Methodik.....	18
1.1.3 Ergebnisse	18
1.1.4 Schlussfolgerung	20
1.2 Quantitative Bestimmung von SARS-CoV-2 RNA-Konzentrationen in Abwasserproben: Probenaufbereitung, Konzentrationsverfahren, Analytik.....	20
1.2.1 Zusammenfassung	20
1.3 Ringversuch zur Untersuchung der Vergleichbarkeit von Methoden, Abläufen und quantitativen Ergebnissen	22
1.3.1 Zusammenfassung	22
1.3.2 Hintergrund.....	22
1.3.3 Ziele des Ringversuchs	23
1.3.4 Durchführung des Ringversuchs	23
1.3.5 Vergleich der Quantifizierungsmethoden	24
1.3.6 Vergleich der Probenvorbereitungsmethoden.....	27
1.3.7 Vergleichbarkeit der Monitoringergebnisse.....	28
2 Probenlogistik	30
2.1 Vorarlberg – Institut für Mikrobiologie Universität Innsbruck	30
2.2 Tirol – Medizinische Universität Innsbruck.....	33
2.3 Salzburg – Institut für Mikrobiologie Universität Innsbruck.....	34
2.4 Kärnten – Institut für Mikrobiologie Universität Innsbruck.....	35
2.5 Oberösterreich – TU Wien	35
2.6 Steiermark – Medizinische Universität Innsbruck	37
2.7 Niederösterreich – TU Wien	37

2.8	Wien – TU Wien	38
2.9	Burgenland – TU Wien	38
3	Datenlogistik	39
3.1	Planung.....	39
3.2	Umsetzung Basissystem	40
3.3	Umsetzung als Projektwebsite.....	43
3.4	Ergebnisse: Datenmanagement und Dashboard	43
3.5	Übergabeoptionen der Coron-A Datenbank.....	48
4	Bestimmung der Einwohnerzahl mittels chemischer Analysen von Populationsgrößenmarkern	50
4.1	Zusammenfassung	50
4.2	Einführung.....	51
4.3	Zielsetzung	53
4.4	Auswahl von Biomarkerkandidaten	53
4.5	Quantitative Bestimmung der untersuchten Biomarkerkandidaten.....	54
4.6	Untersuchte Proben	54
4.7	Ergebnisse	54
4.7.1	Gegenüberstellung der aus dem Melderegister abgeleiteten Einwohnerzahlen mit dem aus dem CSB ₁₂₀ errechneten Einwohnerwerten	54
4.7.2	Evaluierung der Tauglichkeit der Biomarkerkandidaten	55
5	Österreichweites überblicksweises Monitoring	60
5.1	Im Rahmen von Coron-A untersuchte Kläranlagen	61
5.2	Daten zur Prävalenz des SARS-CoV-2 Genoms im Zulauf von Kläranlagen	69
5.2.1	Tauglichkeit zur Frühwarnung	78
5.2.2	Abwassermonitoring als Entwarnsystem	80
6	Untersuchungen von Klärschlamm- und Ablaufproben.....	83
7	Prävalenzmodellierung.....	86
7.1	Zusammenfassung	86
7.2	Terminologie und Grundlagen	87
7.3	Datensatz	88
7.4	Datenbehandlung und Analyse	91
7.4.1	Abflussspitzen	92
7.4.2	Bestimmung der Einwohnerwerte.....	93
7.4.3	Datenglättung	94
7.5	Inzidenzmodellierung.....	97
7.6	Prävalenzmodell.....	99

7.6.1	Abschätzung N_{RNA}	100
7.6.2	Prävalenzmodell Beispiel Wien.....	101
7.6.3	Weiterentwicklung.....	103
8	Prognosesysteme	104
8.1	Zusammenfassung	104
8.2	Datenaufbereitungsschritte	105
8.2.1	Kläranlagenliste.....	105
8.2.2	Infektionszahlen.....	106
8.2.3	Zusatzinformationen Gemeinden bzw. Bezirke.....	106
8.2.4	Wöchentliche Auswertung der Meldezahlen	106
8.2.5	Abwassermessungen	108
8.2.6	Datenverknüpfung	109
8.3	Modellierung.....	110
8.3.1	Deskriptive Analyse und Visualisierung Abwassermessungen.....	110
8.3.2	GAM-Ansatz: Rolling Window.....	114
8.3.3	Hyperparametertuning	121
8.3.4	Modellevaluierung	122
8.3.5	Trendzusammenfassungen	125
8.3.6	Zusammenhangsanalyse mit Inzidenzen.....	129
8.4	Interaktive Web-Applikation der AGES.....	133
8.5	Limitationen	136
8.6	Anforderungen an ein abwasserbasiertes, statistisches Analyse- und Prognosesystem	139
9	Epidemiologische Evaluierung	141
9.1	Zusammenfassung	141
9.2	Zielsetzung der Evaluierung	141
9.3	Evaluationskriterien	141
9.4	Humanbasierter Ansatz (HBA)	142
9.5	Abwasserepidemiologischer Ansatz (AEA)	144
9.6	Nutzungsmöglichkeiten des AEA durch Gesundheitsbehörden	146
10	Öffentlichkeitsarbeit und internationale Vernetzung.....	148
11	Anhang A – Weiterführende Methodenbeschreibungen.....	150
11.1	Ablauf der quantitativen Analyse von SARS-CoV-2 in Abwasserproben am Beispiel der Labore der Medizinischen Universität Innsbruck.....	150
11.1.1	Zusammenfassung	150
11.1.2	Hintergrund.....	150

11.1.3 Ablauf der Laboranalyse	151
11.1.4 Validierung der Quantifizierungsmethode	154
11.2 Vorgangsweise und Protokoll für die Extraktion von SARS-CoV-2 RNA aus Abwasserproben mittels PEG-Präzipitation.....	155
11.2.1 Zusammenfassung	155
11.2.2 Vorgangsweise	155
11.2.3 Protokoll.....	156
11.3 Abwasserproben als Basis für Ganzgenomsequenzierungen	157
11.3.1 Methodische Voraussetzungen	158
11.3.2 Analytierte Varianten	158
11.3.3 Ergebnisse	159
11.3.4 Verwendete Literatur	163
11.4 Das Konzept der „Fiktiven Ausscheider“ – Medizinische Universität Innsbruck.....	163
11.4.1 Hintergrund.....	163
11.4.2 Herleitung des Konzeptes der „Fiktiven Ausscheider“	164
11.4.3 Ableitung der Menge an ausgeschiedenen Viren und Evaluierung des Konzeptes der „Fiktiven Ausscheider“	165
11.4.4 Überregionale Ergebnisdarstellung	168
11.4.5 Anwendung in Monitoringprogrammen	168
11.4.6 Zusammenfassung	168
12 Anhang B – Factsheets	170
12.1 Factsheet 1 – Zweckmäßigkeit eines abwasserepidemiologischen Ansatzes	170
12.2 Factsheet 2 – Kompakte Arbeitsanweisung für analysierende Labore (SOPs).....	175
12.3 Factsheet 3 – Mindestanforderung für Labore.....	177
12.4 Factsheet 4 – Probenlogistik.....	183
12.5 Factsheet 5 – Abwassermarker.....	188
12.6 Factsheet 6 – Handout Kläranlagenbetreibende	192
12.7 Factsheet 7 – Datenmanagement.....	194
12.8 Factsheet 8 – Statistisches Analyse- und Prognosesystem (abwasserbasiert).....	196
Tabellenverzeichnis.....	198
Abbildungsverzeichnis.....	199
Literaturverzeichnis	205
Begriffe.....	210

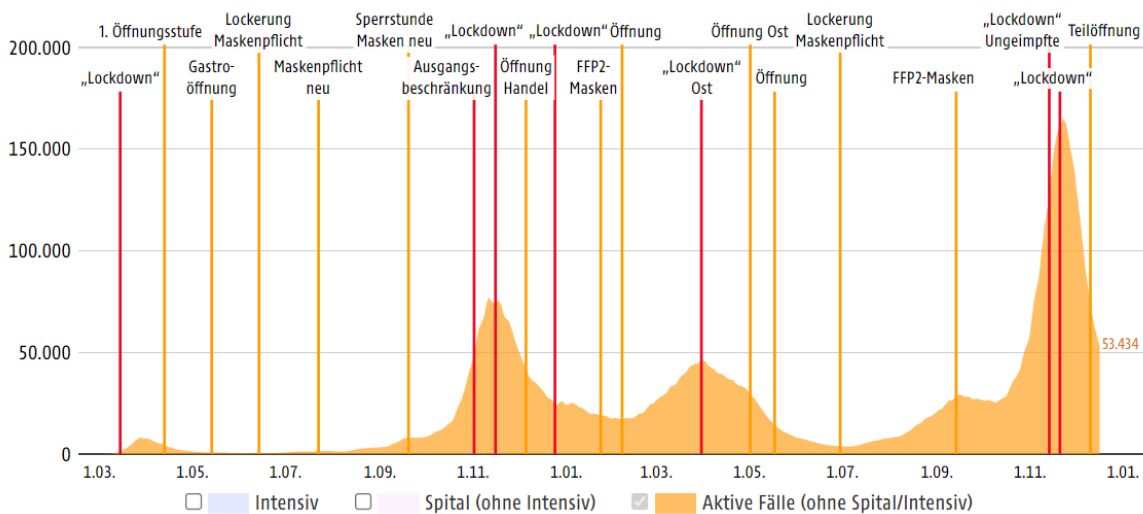
Zusammenfassung

Die „Coronavirus-Krankheit 2019“ (COVID-19) hat sich zu einer weltweiten Pandemie entwickelt, von der auch Österreich betroffen ist. In der Krise brauchen Politik und Behörden zuverlässige und umfassende Informationen zu Inzidenz und Prävalenz der Erkrankung. Die Informationen dienen sowohl als Entscheidungsgrundlagen als auch zum Nachweis der Wirksamkeit präventiver Maßnahmen (Zusammenstellung des Verlaufs der Pandemie, siehe Abbildung 1). Ziel dieses Projekts war es, das bestehende Repertoire an epidemiologischen Methoden und Ressourcen, z. B. das Epidemiologische Meldesystem und die Dunkelzifferstudie, mit der Abwasserepidemiologie zu ergänzen.

Abbildung 1: Übersicht über den bisherigen Pandemieverlauf (aktive Fälle) März 2020 bis Dezember 2021.

Österreich

Fälle (gesamte Epidemie)	Neue Fälle am 18.12.	Aktive Fälle	Verstorbene	7-Tage-Inzidenz
1.245.943		55.192	13.068	231
+2.131	+2.012	-2.541	+13	



Quelle: AGES/EMS. Datenstand: 19.12.2021; © ORF

Die Abwasserepidemiologie wird in Österreich bereits seit Jahren erfolgreich zum Monitoring des Konsums von Drogen, Genussmitteln und Pharmazeutika eingesetzt. Durch die frühzeitige Auseinandersetzung mit diesem Ansatz und der gebündelten Unterstützung der österreichischen Verwaltung gehört Österreich nunmehr international mit zu den Vorreitern dieser neuen Methode.

Das österreichische Forschungsprojekt Coron-A bündelte dazu die in Österreich in den Bereichen Abwasserepidemiologie, -mikrobiologie und -molekularbiologie vorhandenen Expertisen und Ressourcen, um in einer gemeinsamen Anstrengung der beteiligten Institutionen ein überblicksweises Monitoring zur Erfassung von umfassenden Informationen zur räumlichen Verteilung und des zeitlichen Verlaufs der COVID-19 Pandemie aufbauen zu können.

Im Rahmen des österreichischen Coron-A Projekts wurde ein **hochsensitives, selektives und zuverlässiges Analysenverfahren** zum Nachweis von **SARS-CoV-2 RNA** in Abwasserproben **etabliert** und die Aspekte zu Transport, Lagerung und **Probenstabilität untersucht**. Gleichzeitig wurden die für ein nationales Monitoringprogramm notwendigen **Ressourcen und Logistik aufgebaut**. Dies inkludiert sowohl die Ausarbeitung von Standardprozeduren für Probenahme, Lagerung und Transport als auch den Aufbau von Schnittstellen zu Behörden. Das im Projekt errichtete **Datennetz mit zentraler Geodatenbank kann in Echtzeit Ergebniswerte erfassen** und bereitet diese statistisch auf, so dass die ausgegebenen Tabellen, Karten und Diagramme des Systems immer auf dem neuesten Stand gebracht werden können.

Des Weiteren wurde ein **hochsensitives, selektives und zuverlässiges Analysenverfahren zur Ermittlung der Größe der jeweiligen Populationsstichprobe** anhand der Quantifizierung von geeigneten Biomarkern, z. B. Koffein, Cotinin, Ethylsulfat und Pharmazeutika, **etabliert**.

Die im Coron-A Netzwerk etablierten Strukturen und Abläufe wurden im Rahmen von **Pilotstudien erprobt**. Wichtige Kriterien für die Auswahl geeigneter Testregionen in Österreich waren unter anderem das Vorhandensein einer größeren Anzahl von infizierten Personen und zuverlässigen Prävalenzdaten sowie kurze Transportwege von der Kläranlage ins Labor. Sowohl **Längs- als auch Querschnittsanalysen** wurden durchgeführt. Ergänzend wurden im Abwasser **Marker zur Ermittlung der Größe der Populationsstichprobe** mit gerichteten und ungerichteten LC-MS/MS Techniken gemessen. Die Analyseergebnisse dienen der **Kalibrierung des Zusammenhangs zwischen den Prävalenzzahlen und den im**

Abwasser nachgewiesenen Mengen an Virus-RNA. Modelltechnisch wurden dieser Zusammenhang bzw. die Unsicherheit der diesbezüglichen **Prognose mittels stochastischer Modelle** untersucht.

In weiterer Folge wurden neben Zulaufproben auch **Klärschlamm- und Ablaufproben** auf das Vorhandensein von SARS-CoV-2 RNA untersucht, um so den **Abbau und Verbleib der Virus-RNA** untersuchen zu können.

Die Ergebnisse wurden für eine **Bewertung der Abwasserepidemiologie als Überwachungs- und Frühwarnsystem sowie Entwarnsystem für Österreich** herangezogen. Dafür wurde ein **statistisches Prognosesystem** entwickelt. Die Möglichkeiten und Grenzen dieses Früherkennungs-Ansatzes wurde auch mit anderen epidemiologischen Methoden verglichen.

Besondere Stärken der Abwasseranalyse im Vergleich zu anderen epidemiologischen Verfahren sind:

- eine hohe zeitliche und räumliche Auflösung,
- Erhebung von populationsspezifischen Daten, ohne in die Privatsphäre des Einzelnen eingreifen zu müssen (nicht-invasiv),
- keine Zustimmung und Kooperation der Probanden notwendig,
- einfache und sichere Probenahme im Rahmen der Eigenüberwachung der Kläranlagen,
- simple Logistik,
- schnelle und kostengünstige Umsetzung.

Projekthomepage mit Dashboards: coron-a.at

Summary

The "Coronavirus Disease 2019" (COVID-19) has developed into a worldwide pandemic that also affects Austria. In the crisis, policy makers and authorities need reliable and comprehensive information on the incidence and prevalence of the disease. The figures serve both as a basis for decision-making and to demonstrate the effectiveness of preventive measures. The aim of the project was to complement the existing repertoire of epidemiological methods and resources (e. g., the Epidemiological Reporting System, dark count study) with wastewater epidemiology.

Wastewater epidemiology has already been used very successfully in Austria for years to monitor the consumption of drugs, stimulants and pharmaceuticals.

Due to the early consideration of this approach and the bundled support of the Austrian administration, Austria is now one of the international pioneers of this new method.

The Austrian research project "Coron-A" bundled the expertise and resources available in Austria in the fields of wastewater epidemiology, microbiology and molecular biology in order to be able to carry out an overview monitoring in a joint effort of the participating institutions to collect comprehensive information on the spatial distribution and the temporal course of the COVID-19 pandemic.

Within the Austrian Coron-A project, a highly sensitive, selective and reliable analytical method for the detection of SARS-CoV-2 RNA in wastewater samples was established and the aspects concerning transport, storage and sample stability were investigated. At the same time, the resources and logistics necessary for a national monitoring program were established. This included the development of standard procedures for sampling, storage and transport, as well as the establishment of interfaces with authorities. The data network with central geodatabase established in the project can collect results in real time and process them statistically, so that the output tables, maps and diagrams of the system can always be updated.

Furthermore, a highly sensitive, selective and reliable analytical procedure has been established to determine the size of the respective population sample based on the

quantification of appropriate biomarkers (e. g. caffeine, cotinine, ethyl sulfate, pharmaceuticals).

The structures and procedures established in the Coron-A network were tested in pilot studies. Important criteria for the selection of suitable test regions in Austria included the presence of infected individuals and reliable prevalence data, as well as short transport distances from the treatment plant to the laboratory. Both longitudinal and cross-sectional analyses were performed. Complementary markers were measured in the wastewater to determine the size of the population sample using directional and non-directional LC-MS/MS techniques. The analytical results were used to calibrate the relationship between prevalence counts and the amounts of viral RNA detected in the wastewater. Modeling techniques were used to investigate this relationship or the uncertainty of the prediction in this regard using stochastic models.

Subsequently, in addition to influent samples, sewage sludge and effluent samples were analyzed for the presence of SARS-CoV-2 RNA in order to investigate the degradation and fate of the viral RNA.

These results were used to evaluate the wastewater epidemiology as a surveillance and early warning system for Austria as well as for a de-warning system. A statistical prediction system was developed for this purpose. The possibilities and limitations of this early detection approach were also compared with other epidemiological methods.

Particular strengths of wastewater analysis compared to other epidemiological methods are:

- high temporal and spatial resolution,
- collection of population-specific data without having to interfere with the privacy of the individual (non-invasive) ,
- no consent and cooperation of the subjects necessary ,
- simple and safe sampling as part of self-monitoring of wastewater treatment plants,
- simple logistics,
- fast and cost-effective implementation.

Project homepage with dashboards: coron-a.at

1 Methodenentwicklung

Abwasserepidemiologische Untersuchungen im Zusammenhang mit SARS-CoV-2 standen zu Projektbeginn weltweit am Anfang und es bedurfte zahlreicher Entwicklungs- und Validierungsschritte, um verwertbare und reproduzierbare Ergebnisse für dieses österreichische Forschungsprojekt zu erhalten.

Abbildung 2: Schematische Darstellung der wesentlichen Schritte in der COVID-Abwasser-epidemiologie.



Quelle: Universität Innsbruck/Heribert Insam

1.1 Probenlagerung

1.1.1 Hintergrund

Bisherige abwasserepidemiologische Untersuchungen wurden sehr oft mit frischen, aber auch mit tiefgekühlten Proben vorgenommen. Zweifel an der Eignung des Einfrierens und Wiederauftauens waren der Ausgangspunkt, die beiden Lagerungsmethoden experimentell zu vergleichen. Ziel dieser Untersuchung war es, den Einfluss der gängigsten Lagertemperaturen von Abwasserproben im Temperaturbereich zwischen, +4 °C und -20 °C (Ahmed et al., 2020; Michael-Kordatou et al., 2020) auf die Nachweisbarkeit von SARS-CoV-2 Genkopiennummern zu untersuchen.

1.1.2 Methodik

In einem Experiment wurden Proben verschiedenen Lagerungsbedingungen unterzogen. Es wurden 24 h-Mischproben von Rohabwasser aus den Kläranlagen Zirl, Tirol (91.000 Einwohnerwerte (EW)) und der Kläranlage Siggerwiesen, Salzburg (680.000 EW) analysiert. Die Proben der ersten Kläranlage wurden vor der Analyse aufgrund von Unsicherheiten über den Sicherheitsstatus des Abwassers zu diesem Zeitpunkt pasteurisiert, während jene der zweiten Kläranlage unpasteurisiert blieben. Bei der Pasteurisierung des Abwassers wurden die Proben vor der Probenverarbeitung 1,5 h einer Temperatur von 37 °C ausgesetzt (Markt et al., 2021). Die untersuchten Lagerungsbedingungen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Untersuchte Lagerungsbedingungen.

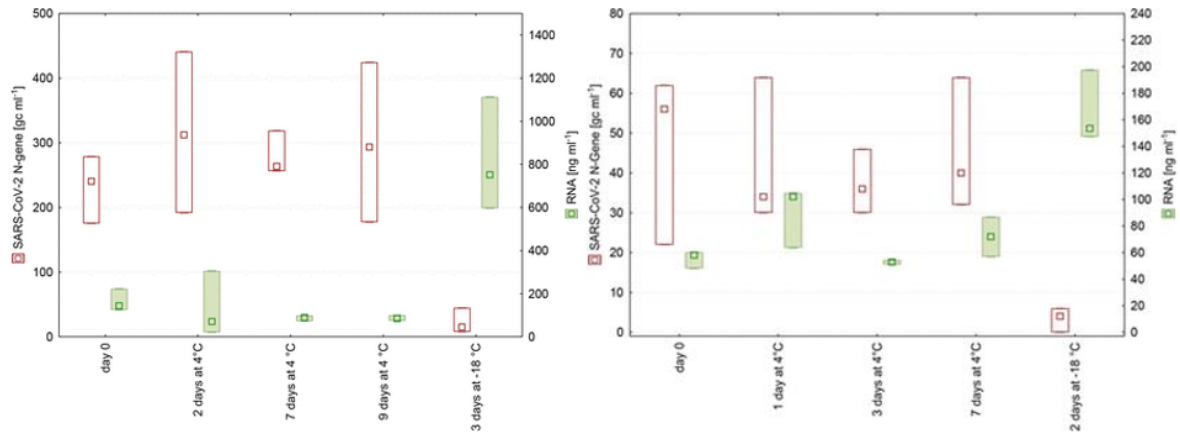
ARA	Probennahme	Pasteurisation	Lagerung -18 °C	Lagerung 4 °C
Zirl, Tirol	19.04.2020	Ja	2 Tage	0, 1, 3, 7 Tage
Siggerwiesen, Salzburg	04.10.2020	Nein	3 Tage	0, 2, 7, 9 Tage

Quelle: Universität Innsbruck

1.1.3 Ergebnisse

Die Lagerung bei -18 °C zeigte einen deutlichen Rückgang der nachweisbaren Virenlast, während auch eine 7-tägige Lagerung bei +4 °C stabile Messwerte ergab.

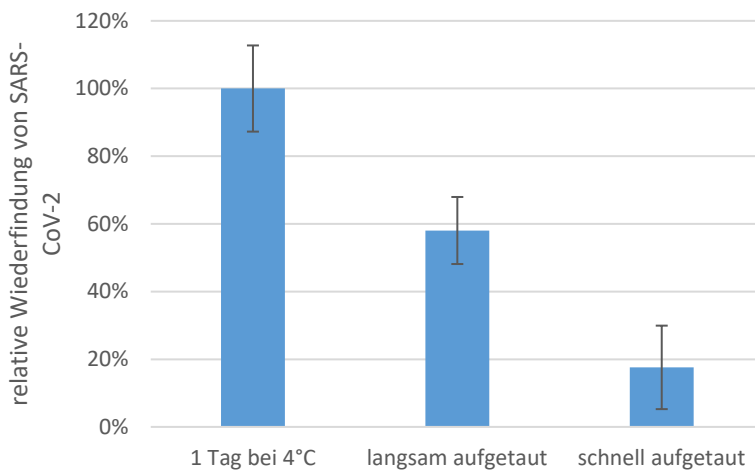
Abbildung 3: Anzahl der Genkopien und RNA-Konzentrationen in Abwasser aus zwei Kläranlagen in Salzburg (links) und Tirol (rechts) Lagerung bei +4 °C und tiefgefroren (-18 °C) (n = 4, Median, Box: min-max).



Quelle: Markt et al., 2021

Es wurde erwogen, dass die Geschwindigkeit des Auftauens einen Einfluss auf die Ausbeute haben könnte. Ein entsprechendes Experiment (Abbildung 4) zeigte zwar, dass langsames Auftauen der Probe gegenüber schnellem Auftauen die Ausbeute erhöhte, diese gegenüber der gekühlten Probe jedoch immer noch 50 % niedriger war.

Abbildung 4: Vergleich der Wiederfindungsrate bei Lagerung bei 4 °C sowie nach langsamem und schnellem Auftauen einer tiefgefrorenen Probe.



Quelle: Tribus, 2021

Weitere Experimente mit Zusatz von Hilfsmitteln wie Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Polyvinylsulfonsäure und Phenylmethylsulfonfluorid ergaben keine Erhöhung der Ausbeute. Eine Konsequenz aus diesem Ergebnis war, dass tiefgefrorene Rückstellproben keine mit frischen Proben vergleichbaren Ergebnisse liefern.

1.1.4 Schlussfolgerung

Aus den Ergebnissen wurde gefolgert, dass

- eine Lagerung bei -18 °C einen Verlust an nachweisbaren SARS-CoV-2 Genkopien bedeutet und
- die Lagerung bei 4 °C auch für mehrere Tage unproblematisch ist.
- Mit den getesteten Methoden für einen schonenden Auftauprozess konnte keine Verbesserung der Probenkonservierung erzielt werden.

1.2 Quantitative Bestimmung von SARS-CoV-2 RNA-Konzentrationen in Abwasserproben: Probenaufbereitung, Konzentrationsverfahren, Analytik

1.2.1 Zusammenfassung

Zur quantitativen Bestimmung von SARS-CoV-2 RNA-Konzentrationen in Abwasserproben kommt ein mehrstufiger analytischer Prozess zur Anwendung.

In der Empfehlung (EU) 2021/472 vom 17.3.2021 hat die Europäische Kommission Mindestanforderungen für effiziente Abwasserüberwachungsstrategien und die Anwendung gemeinsamer Probenahme-, Test- und Datenanalysemethoden definiert.

(Recommendation on monitoring COVID-19 and its variants in wastewaters in the EU, ec.europa.eu/environment/pdf/water/recommendation_covid19_monitoring_wastewaters.pdf). Diese können wie folgt zusammengefasst werden:

- Die Analysen sollen in Laboratorien durchgeführt werden, die im Rahmen der Standardverfahren des Qualitätsmanagements geeignete quantitative Echtzeit-PCR-Methoden (RT-qPCR-Methoden) anwenden.

- Der Zyklusschwellenwert der RT-qPCR sollte unter 40 liegen, um eine Probe für die Analyse mittels quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR-Analyse) oder für die Sequenzierung als positiv zu melden.
- Die Untersuchung aller Proben sollte mindestens in Duplikaten erfolgen, um falsch positive oder falsch negative Ergebnisse zu vermeiden.
- Das angewandte analytische Verfahren der Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion sollte angemessene Kontrollen umfassen, um zumindest die Wirksamkeit der Konzentrations-/Extraktionsschritte zu bewerten und zu prüfen, dass keine signifikante Reaktionshemmung vorliegt.
- Jeder Durchlauf sollte nach geeigneten Standards (mindestens 3-fach Verdünnungsreihen als Triplikate mit synthetischer SARS-CoV-2 RNA) durchgeführt werden sowie Positiv- und Negativkontrollen umfassen, um festzustellen, ob die durchgeführte PCR/qPCR zu zuverlässigen Ergebnissen geführt hat.
- Vor Beendigung des Amplifikationsverfahrens sollte für den Quantifizierungszyklus (Cq) für positive Proben ein Grenzwert von fünf Zyklen festgelegt werden, um eine Fehlzuordnung verspäteter Fluoreszenzsignale zu vermeiden.
- Eine negative Extraktionskontrolle sollte verwendet werden, um jede Kontamination während der RNA-Extraktion zu erfassen.

Alle beteiligten Labore entsprechen im Zuge ihrer Analysetätigkeiten diesen EU-Empfehlungen. In den Anhängen zur Mindestanforderung für Labore und dem exemplarischen Ablauf der quantitativen Analyse werden diese Vorgehensweisen detailliert dargestellt (siehe Factsheet „Mindestanforderung für Labore“ und Verfahrensbeschreibung „Ablauf der quantitativen Analyse von SARS-CoV-2 in Abwasserproben am Beispiel der Labore der Medizinischen Universität Innsbruck“).

1.2.1.1 Entscheidung für ein Konzentrationsverfahren

Weltweit sind mehrere Verfahren üblich, um Virenpartikel in Abwasserproben aufzukonzentrieren. Das Coron-A-Konsortium hat sich nach einigen Pilotversuchen dazu entschlossen, das PEG-Verfahren nach Medema et al. (2020) zu übernehmen. Die Methode wird allerdings in den drei am Projekt teilnehmenden Labore in leicht abgewandelter Form angewendet. Diese Zugänge werden in den Verfahrensbeschreibungen in Anhang A dargestellt (siehe Anhang „Protokoll für die Extraktion von SARS-CoV-2 RNA aus Abwasserproben mittels PEG-Präzipitation“ und „Ablauf der quantitativen Analyse von SARS-CoV-2 in Abwasserproben am Beispiel der Labore der Medizinischen Universität Innsbruck“).

1.2.1.2 Schlussfolgerung

Das PEG-Konzentrationsverfahren hat sich bezüglich der Effizienz bewährt und liefert eine gute Vergleichbarkeit mit vielen international durchgeführten Studien. Das beispielsweise von der TU Wien und der Universität Innsbruck verwendete Verfahren erwies sich nicht nur für die Detektion und Quantifizierung der SARS-CoV-2 Virenfragmente als geeignet, sondern auch für die Sequenzierungen¹, die sogar bei hohen CT-Werten geringe Ausfallraten zeigten.

1.3 Ringversuch zur Untersuchung der Vergleichbarkeit von Methoden, Abläufen und quantitativen Ergebnissen

1.3.1 Zusammenfassung

Zur quantitativen Bestimmung von SARS-CoV-2 RNA-Konzentrationen in Abwasserproben kommt ein mehrstufiger analytischer Prozess zur Anwendung. In den drei analysierenden Laboren wurden ähnliche, aber dennoch unterschiedliche Abläufe etabliert. Ziel des Ringversuchs war es, die Vergleichbarkeit der in den einzelnen Laboren erzielten quantitativen Ergebnisse zu beurteilen. Dazu wurden vier idente Abwasserproben in allen drei Laboren quantitativ ausgewertet. Die Ergebnisse bildeten zusammen mit einer Zweitauswertung der Extrakte mit einer RT-qPCR-Methode die Grundlage der Bewertung. Der Ringversuch zeigte auf, dass zum jetzigen Zeitpunkt die Monitoringergebnisse der einzelnen Labore nur bedingt vergleichbar sind. Als erste zielführende Maßnahme zur Verbesserung der Situation wurde die Verwendung von einheitlichen Referenzstandards und Referenzmaterialien vorgeschlagen. Langfristig könnte auch die Entwicklung von „internen Standards“ zu einer Verbesserung der Vergleichbarkeit führen.

1.3.2 Hintergrund

Das SARS-CoV-2 Abwassermonitoring beruht auf der quantitativen Bestimmung der Virus-RNA-Konzentrationen in prozessierten Abwasserproben. Der analytische Prozess umfasst

¹ Über die Leistungen des Coron-A Projekts hinaus wurden auch Vollsequenzierungen von ausgewählten Proben in Kooperation mit den Bergthaler Laboren durchgeführt. Siehe dazu Anhang A „Abwasserproben als Basis für Ganzgenomsequenzierungen“.

fünf Schritte: (1) Probenahme, (2) Virenisolation, (3) RNA-Extraktion, (4) RNA-Quantifizierung und (5) Datenauswertung (Abbildung 5). Für die Schritte 2–4 wurden in den drei analysierenden Laboren (Medizinische Universität Innsbruck, Universität Innsbruck, TU Wien) zum Teil unterschiedliche Methoden und Abläufe etabliert. Entsprechend war zu erwarten, dass die Quantifizierungsergebnisse der einzelnen Labore voneinander abweichen.

Abbildung 5: Gliederung des analytischen Prozesses zur quantitativen Bestimmung von SARS-CoV-2 in Abwasserproben.



Quelle: Medizinische Universität Innsbruck

1.3.3 Ziele des Ringversuchs

Im Rahmen eines Ringversuchs sollte die Vergleichbarkeit von Virusquantifizierungsergebnissen zwischen den drei analysierenden Laboren (Medizinische Universität Innsbruck, Universität Innsbruck, TU Wien) untersucht werden. Der Ringversuch sollte den Einfluss der in den drei analysierenden Laboren etablierten Methoden und Abläufe zur Virenisolation, RNA-Extraktion und RNA-Quantifizierung von SARS-CoV-2 RNA evaluieren.

1.3.4 Durchführung des Ringversuchs

Aliquote von vier Abwasserproben (250 mL jeweils) wurden in den drei teilnehmenden Laboren mittels den jeweils etablierten Arbeitsabläufen analysiert.

Die Abwasserproben stammten von den Kläranlagen Strass im Zillertal, Kufstein, Telfs und Kirchdorf. Die Proben wurden am 9., 10. und 13.12.2020 gesammelt und gepoolt. Eine Übersicht über die Proben gibt Tabelle 2. Die Proben wurden am 14.12.2020 versandt und am 15. bzw. 16.12.2020 analysiert.

Tabelle 2: Übersicht über die zur Herstellung der Ringversuchsproben gesammelten Abwasserproben.

Kläranlage	Datum	CSB [mg/l]	Zuflussmenge [m ³ /Tag]	Anzahl aktiv positiv getestete Personen
Kirchdorf	09.12.2020	622	4.710	42
Kirchdorf	10.12.2020	592	4.586	33
Kirchdorf	13.12.2020	488	6.694	24
Kufstein	09.12.2020	771	8.875	102
Kufstein	10.12.2020	992	6.264	94
Kufstein	13.12.2020	606	10.533	98
Strass	09.12.2020	353	28.858	294
Strass	10.12.2020	345	28.140	287
Strass	13.12.2020	442	27.109	243
Telfs	09.12.2020	557	6.075	95
Telfs	10.12.2020	507	6.202	94
Telfs	13.12.2020	587	5.851	69

Quelle: Medizinische Universität Innsbruck

Um die Variabilität in der Probenvorbereitung getrennt von der Variabilität der eigentlichen Messung/Quantifizierung untersuchen zu können, wurden alle Extrakte an der Medizinischen Universität Innsbruck einer Zweitanalyse mit einer definierten quantitativen Methode unterzogen. Diese erfolgte am 1.2.2021.

1.3.5 Vergleich der Quantifizierungsmethoden

Zur Quantifizierung der SARS-CoV-2 RNA in prozessierten Abwasserproben werden in allen drei Laboren RT-qPCR-Methoden verwendet. In den Innsbrucker Laboren wird N1 als Target verwendet. Die quantitative Analyse erfolgt mit selbst entwickelten Methoden. N2 ist das Target der quantitativen Methode der TU Wien. Von diesem Labor wird ein kommerzielles Produkt verwendet. Tabelle 3 gibt eine grobe Übersicht über die in den drei analysierenden Laboren verwendeten Methoden.

Tabelle 3: Vergleich der quantitativen Methoden.

Labor	Methode	Target	Kommerzielles Produkt
Medizinische Universität Innsbruck	RT-qPCR	N1	Nein
Universität Innsbruck	RT-qPCR	N1	Nein
TU Wien	RT-qPCR	N2	Ja

Quelle: Medizinische Universität Innsbruck

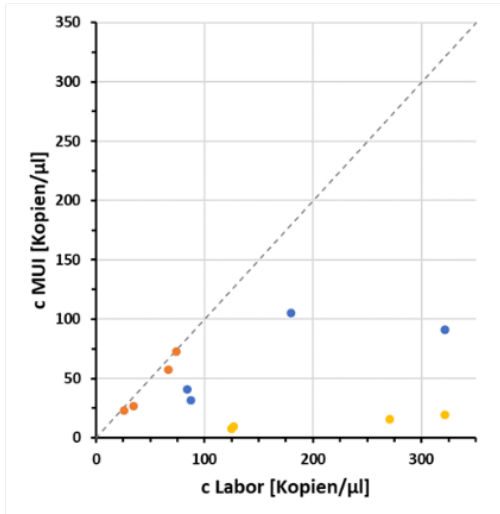
Zur Untersuchung der Übereinstimmung von erhobenen quantitativen Ergebnisse in den drei Laboren, durch die dort etablierten RT-qPCR-Methoden, wurden die prozessierten Abwasserproben einer Zweitanalyse mit einer einzigen quantitativen Methode unterzogen. Durch Vergleich der ermittelten Konzentrationen (in Kopien pro μl Extrakt) in der Erst- und Zweitauswertung konnte die Übereinstimmung der Ergebnisse evaluiert werden.

Abbildung 6 gibt eine Übersicht über die angestellten Vergleiche. Die Erst- und Zweitauswertungen der an der Medizinischen Universität Innsbruck hergestellten Extrakte stimmen sehr gut überein (Abbildung 6b). Die mittlere Abweichung ist kleiner als 10 %. Das Ergebnis kann als Indiz gewertet werden, dass die an der Medizinischen Universität Innsbruck verwendete Methode eine gute Reproduzierbarkeit und hohe zeitliche Stabilität aufweist. Bei den Extrakten der beiden anderen Labore wurden größere Abweichungen zwischen den beiden Auswertungen beobachtet. Die Werte der Universität Innsbruck waren im Schnitt 2,8-mal höher (Abbildung 6c). Die Werte der TU Wien waren im Schnitt um den Faktor 16,4 größer (Abbildung 6d). Vor allem die Messwerte der TU Wien korrelierten sehr gut mit den Messwerten der Zweitauswertung ($R^2=0,9662$). Das legt den Schluss nahe, dass die Quantifizierung in den einzelnen Laboren grundsätzlich funktioniert, aber aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Kalibrationen abweichende Ergebnisse erhalten werden.

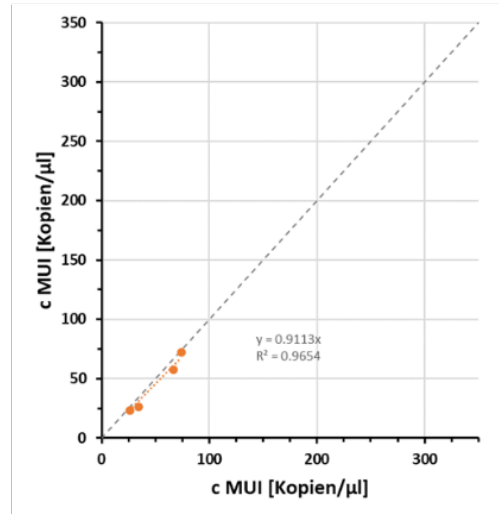
Die quantitative Analyse beruht in allen drei Laboren auf der Erstellung von Kalibrationsfunktionen mittels Referenzstandards. Es kann davon ausgegangen werden, dass sich die beobachteten Unterschiede der Messergebnisse zu einem großen Teil auf unterschiedliche Konzentrationen der verwendeten Standards zurückführen lassen. Ein zielführender Ansatz, um die Vergleichbarkeit der quantitativen Ergebnisse zu verbessern, wäre somit die Verwendung einheitlicher Standards bzw. Referenzmaterialien.

Abbildung 6: Vergleich der mittels etablierten RT-qPCR-Methoden erhobenen quantitativen Ergebnisse von prozessierten Abwasserproben in den beteiligten drei Laboren.

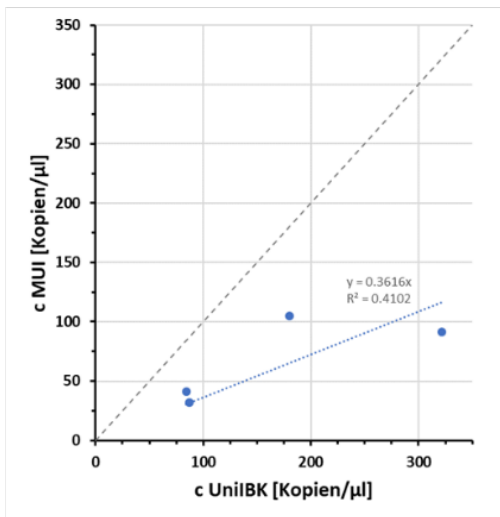
(a) Gesamtübersicht



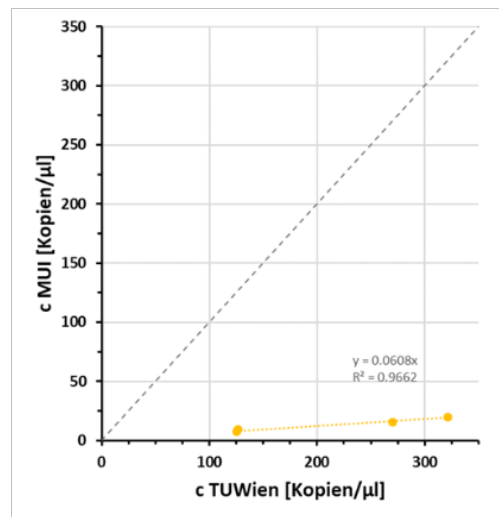
(b) MUI vs. MUI



(c) Uni IBK vs. MUI



(d) TU Wien vs. MUI



Anmerkungen:

orange – „MUI“ ... Medizinische Universität Innsbruck,

blau – „UniIBK“ ... Universität Innsbruck,

gelb – „TUWien“ ... Technische Universität Wien.

Bei vollständiger Übereinstimmung der Ergebnisse der Erst- und Zweitanalyse müssten die Messpunkte auf der strichlierten Linie (im Vergleich zur Eigenmessung der Medizinischen Universität Innsbruck (MUI)) zu liegen kommen.

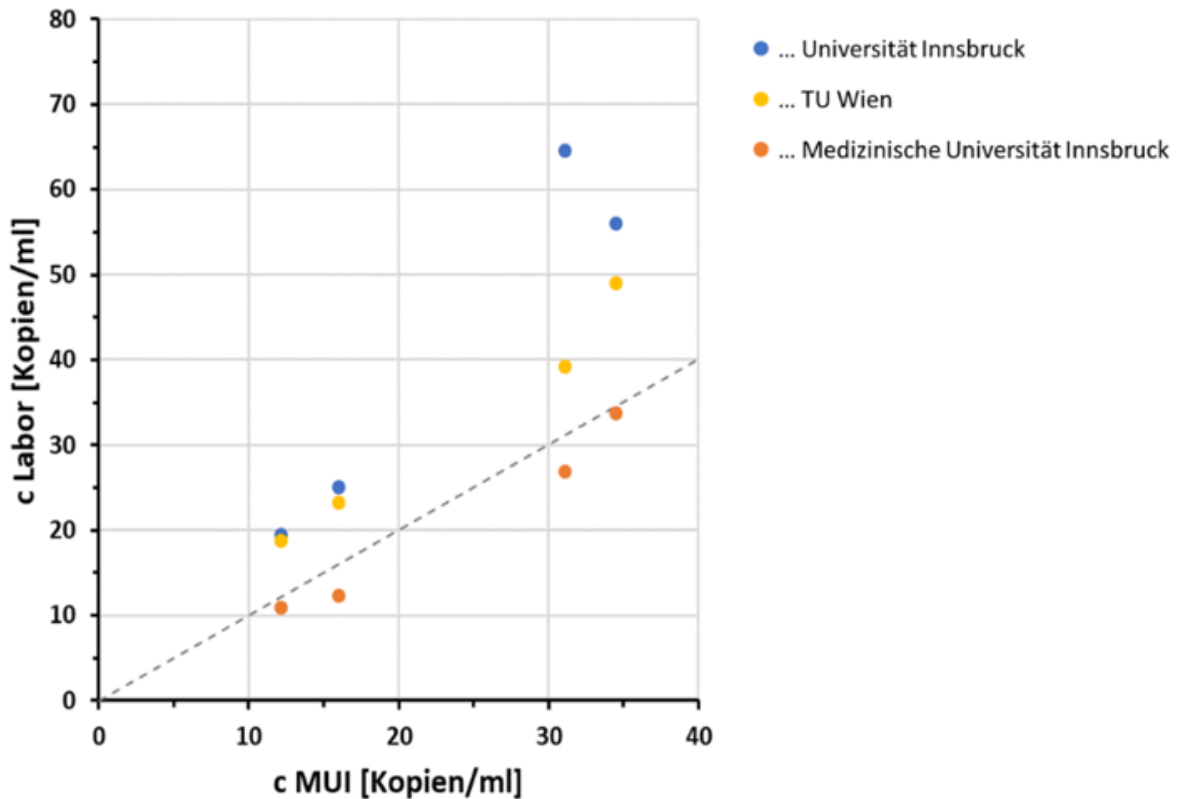
Quelle: Medizinische Universität Innsbruck

1.3.6 Vergleich der Probenvorbereitungsmethoden

Die Prozessierung der Abwasserproben ist ein mehrstufiger Prozess. Er umfasst folgende Schritte: (1) Vorreinigung der Proben, (2) Isolation der Viren, (3) Lyse und (4) Extraktion der Virus-RNA. Der grundsätzliche Ablauf ist in allen drei Laboren gleich. Die Vorreinigung erfolgt jeweils mittels Zentrifugation. Für die Fällung der Viren wird eine Mischung aus Polyethylenglykol und Kochsalz verwendet. Für die Lyse und Extraktion kommen unterschiedliche kommerzielle Produkte zur Anwendung. Etwaige Unterschiede in den Extraktionsausbeuten sind daher hauptsächlich auf die letzten beiden Schritte zurückzuführen. Zur Untersuchung der Vergleichbarkeit der Extraktionsausbeuten wurden die bei der Zweitauswertung ermittelten Konzentrationen der Extrakte verwendet, um die Virenkonzentrationen in den Abwasserproben (in Kopien pro mL Abwasser) zu berechnen. Da eine einheitliche quantitative Methode verwendet wurde, waren unterschiedliche Ergebnisse ausschließlich auf die verwendeten Probenvorbereitungsmethoden zurückzuführen. Als Referenzwerte dienten die bei der Erstauswertung durch die Medizinische Universität Innsbruck ermittelten Konzentrationen.

Abbildung 7 gibt eine Übersicht über die angestellten Vergleiche. Die Extraktionsausbeuten zeigten eine Variabilität. Die von der TU Wien und Universität Innsbruck verwendeten Abläufe lieferten ca. 40–80 % höhere Konzentrationen als die der Medizinischen Universität Innsbruck. Ein möglicher Ansatz zur Korrektur unterschiedlicher Extraktionsausbeuten wäre die Verwendung eines internen Standards, mit dem die unbehandelte Abwasserprobe dotiert wird.

Abbildung 7: Vergleich der quantitativen Ergebnisse der untersuchten Abwasserproben unter Verwendung von laborspezifischen Probenvorbereitungsprozessen und einer einheitlichen Quantifizierungsmethode (im Vergleich zur Eigenmessung der Medizinischen Universität Innsbruck (MUI)).

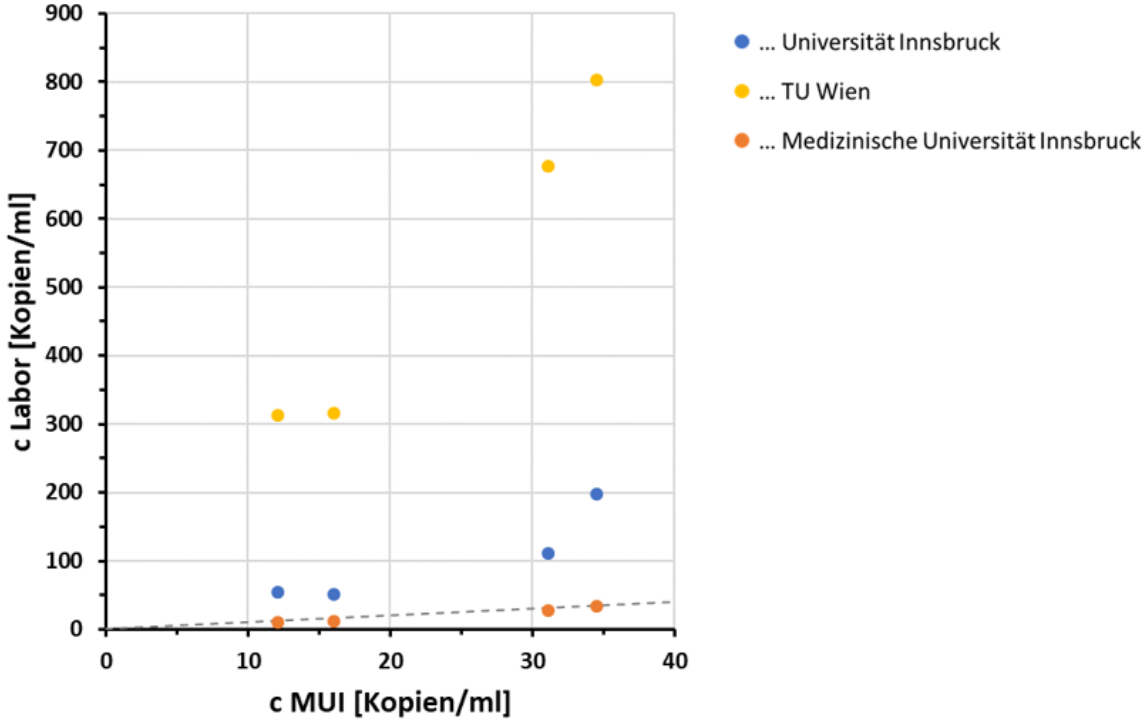


Quelle: Medizinische Universität Innsbruck

1.3.7 Vergleichbarkeit der Monitoringergebnisse

Die gesamte Abweichung der von den einzelnen Laboren erzielten Monitoringergebnisse setzt sich aus den Abweichungen in den einzelnen Teilen des analytischen Prozesses zusammen. Wie Abbildung 8 zeigt, können sich die für ein und dieselbe Probe ermittelten Konzentrationen um eine ganze Größenordnung unterscheiden. Daher sollten zum jetzigen Zeitpunkt Monitoringergebnisse, die von unterschiedlichen Laboren erstellt wurden, nur bedingt miteinander verglichen werden.

Abbildung 8: Vergleich der quantitativen Ergebnisse der untersuchten Abwasserproben unter Verwendung der in den teilnehmenden Laboren etablierten Prozesse (im Vergleich zur Eigenmessung der Medizinischen Universität Innsbruck (MUI)).



Quelle: Medizinische Universität Innsbruck

2 Probenlogistik

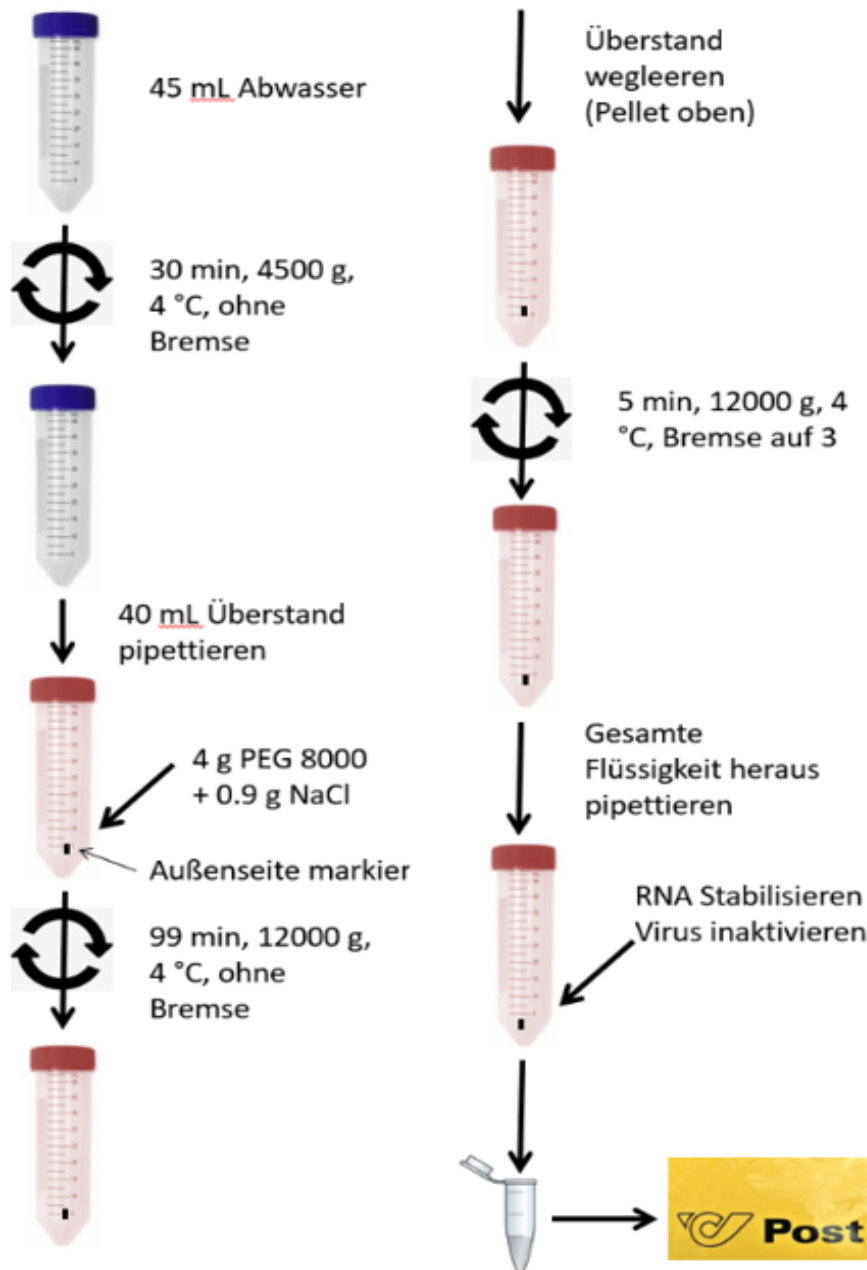
Um den Monitoringansatz als Frühwarnsystem zu verwenden sollten Abwasserproben möglichst zeitnah analysiert werden. Idealerweise sollte das Ergebnis innerhalb von 48 Stunden bzw. spätestens am Beginn des dritten Arbeitstages nach erfolgter Probenahme an den jeweiligen Auftraggeber übermittelt werden. Die Gesamtanalysendauer setzt sich aus vier Komponenten zusammen: (1) Transport, (2) Laboranalyse, (3) Probenverwaltung, (4) Datenauswertung und -übermittlung. Je besser der Transport organisiert ist und je schneller die Proben im Labor sind, umso leichter kann auch bei einer entsprechend großen Probenanzahl die 48-Stunden-Frist eingehalten werden.

Als Konsequenz aus der Methodenentwicklung ergab sich die Notwendigkeit, mit frischen Proben weiterzuarbeiten, was beträchtliche Auswirkungen auf die logistische Umsetzung hatte. Daher lag es für die geplante Umsetzung eines Monitorings nahe, die Proben einer möglichst raschen Verarbeitung zuzuführen. Die Projektpartner haben sich bezüglich der Zuständigkeit für die Bundesländer untereinander verständigt (Wien, Niederösterreich, Oberösterreich und Burgenland – TU Wien; Steiermark und Tirol – Medizinische Universität Innsbruck; Kärnten, Salzburg und Vorarlberg – Universität Innsbruck). Aufgrund der geografischen Distanz zu den Laboren ergaben sich für die verschiedenen Bundesländer unterschiedlich Ansätze, die in weiterer Folge von West nach Ost dargestellt sind.

2.1 Vorarlberg – Institut für Mikrobiologie Universität Innsbruck

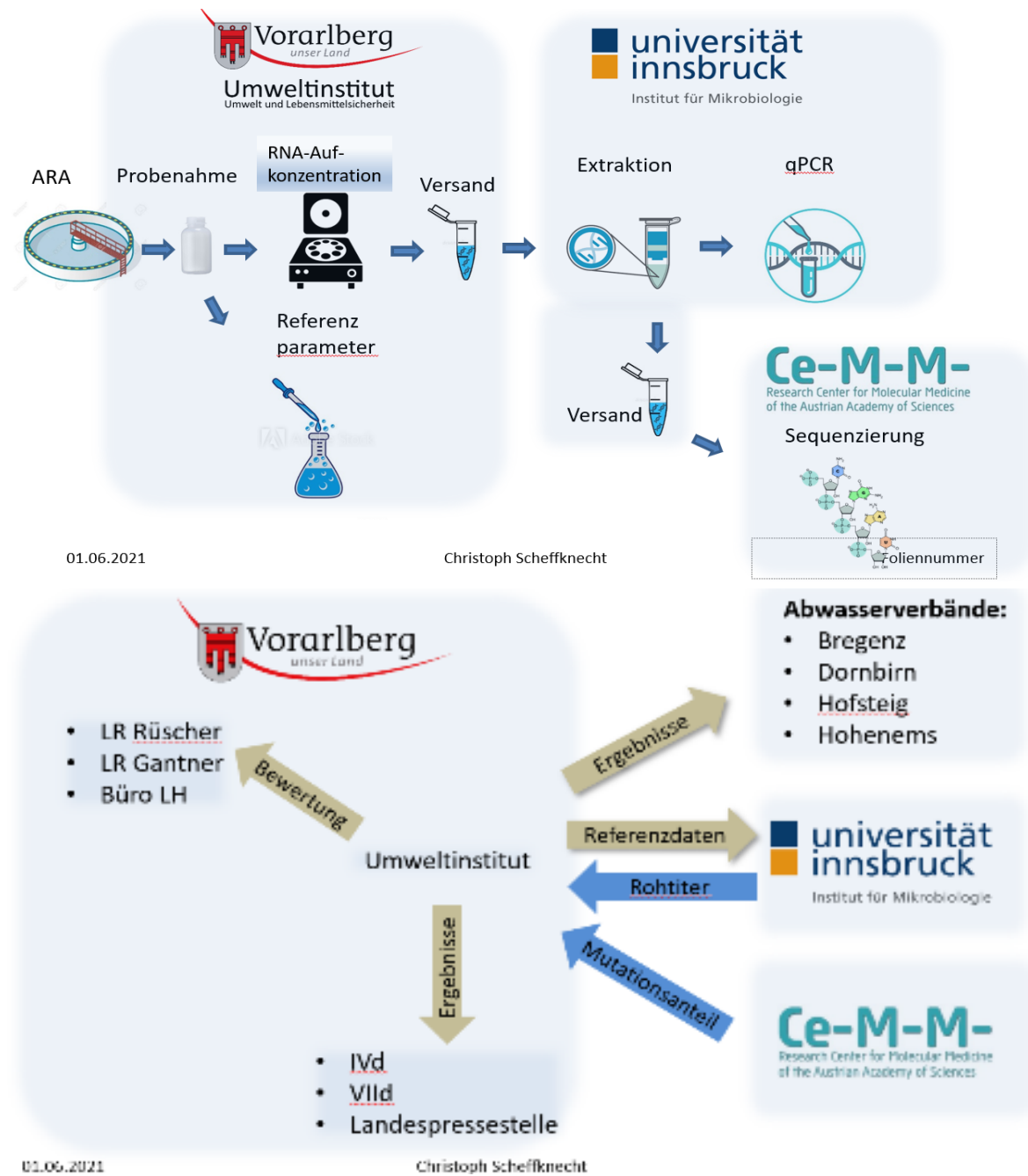
Nach anfänglicher Postexpresszustellung aus den Kläranlagen wurden gemeinsam mit dem Landeslabor Bregenz ein Konzept entwickelt, um die Ergebnisse rascher verfügbar zu machen. Die Sammlung der gekühlten Proben aus den Kläranlagen erfolgt morgens, und nach der Aufkonzentration der Proben und deren Stabilisierung werden die Eppendorf-Probenröhrchen mit Medlog (Firma für Medizinische Transportlogistik) über Nacht in gekühltem (4 °C) Zustand nach Innsbruck geschickt. Dort treffen sie am nächsten Tag spätestens um 11 Uhr ein, bis 16 Uhr sind RNA-Extraktion und qPCR fertig und die Daten über die Homepage zugänglich.

Abbildung 9: Prozessablauf von der Probennahme über die Probenaufbereitung, dem Versand, der Extraktion und Analytik.



Quelle: Universität Innsbruck

Abbildung 10: Erneuten Versand und der Vollsequenzierung² ausgewählter Vorarlberger Proben.



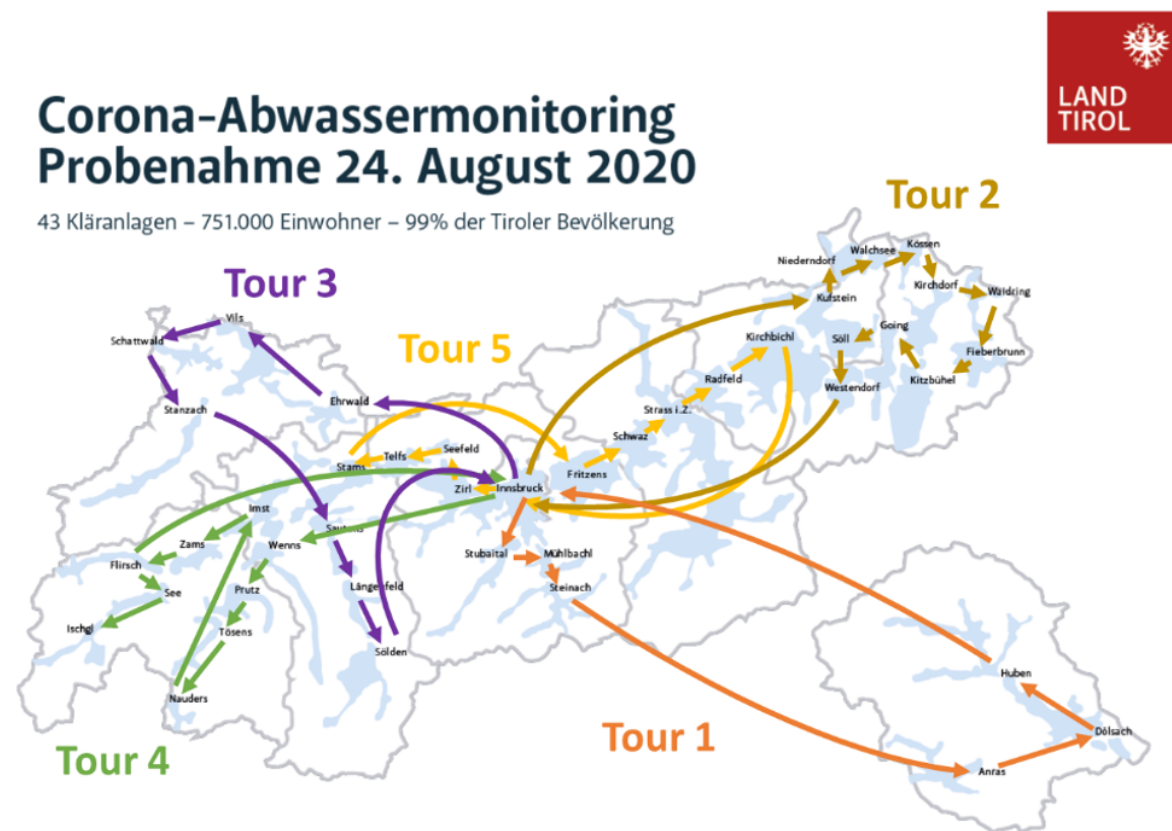
Quelle: Umweltinstitut Land Vorarlberg/Christoph Scheffknecht

² Über die Leistungen des Coron-A Projekts hinaus wurden auch Vollsequenzierungen von ausgewählten Proben in Kooperation mit den Bergthaler Laboren durchgeführt. Siehe dazu Anhang A „Abwasserproben als Basis für Ganzgenomsequenzierungen“.

2.2 Tirol – Medizinische Universität Innsbruck

Für den Transport von Proben wurden folgende zwei Varianten erprobt: (1) Transport durch Boten und (2) Transport durch die Post bzw. Paketdienstleistungsunternehmen. Der Transport durch Boten hat sich als zielführender erwiesen. Die Proben gelangen so noch am Tag des Abschlusses der Probennahme ins Labor. Die Machbarkeit wurde erstmals im Rahmen der am 24.08.2020 durchgeführten tirolweiten Abwassermonitoring-Pilotstudie erprobt. Die 43 beprobten Kläranlagen wurden am 25.08.2020 von fünf Fahrer:innen angefahren (Abbildung 11). Auf diese Weise konnten alle Proben innerhalb eines Arbeitstages nach Innsbruck gebracht werden.

Abbildung 11: Organisation des Transportes von Abwasserproben im Rahmen einer tirolweiten Pilotstudie zum Analyselabor nach Innsbruck.



Quelle: Medizinische Universität Innsbruck und Land Tirol

Auf Basis der Ergebnisse der Pilotstudie wurde ein Transportkonzept erstellt, das dann in der Folge für das Tiroler Abwassermonitoringprogramm umgesetzt wurde. Die Innsbrucker Proben (Kläranlage plus vier Probenehmer im Kanalsystem) werden durch Mitarbeiter:innen der Stadt Innsbruck eingesammelt und unmittelbar ins Labor gebracht. Die Proben vom Wochenende werden am Montag übergeben.

Proben von allen weiteren Kläranlagen werden durch Mitarbeiter:innen des Landes Tirol nach Innsbruck transportiert. Für den Transport der Probengefäße (vorbeschriftete 500 mL Flaschen aus Polypropylen) stehen isolierte Kühlboxen zur Verfügung. Die Kühlung erfolgt mittels Kühllakkus, die an den Startkläranlagen gelagert werden und täglich ausgetauscht und aufgeladen werden. So soll sichergestellt werden, dass die Kühlkette nicht unterbrochen wird. Die Tiroler Proben werden in Regel vor 13 Uhr im Labor abgegeben. Entsprechend ist es möglich einen Teil der Analysen bereits am selben Arbeitstag abzuschließen. Spätestens am darauffolgenden Arbeitstag liegen dann von allen Proben die Analysenergebnisse vor.

Abwasserproben können auch als Sammelpaket mittels Post oder Paketdienstleistungsunternehmen ins Labor verschickt werden. Bei Verwendung von entsprechend isolierten Boxen und einer Temperaturkontrolle mittels Kühllakkus kommt es in der Regel zu keiner Unterbrechung der Kühlkette. Nachteile dieser Vorgehensweise sind zum einen der Zeitverlust von mindestens einem Arbeitstag und der hohe organisatorische Aufwand sowohl für die betroffenen Kläranlagenbetreibenden als auch das Analysenlabor. Daher wurde dieser Ansatz nur im Rahmen von wissenschaftlichen Studien angewendet, bei denen wenige Proben analysiert werden, ein Zeitverzug keine Rolle spielt und Proben gesammelt verschickt werden können.

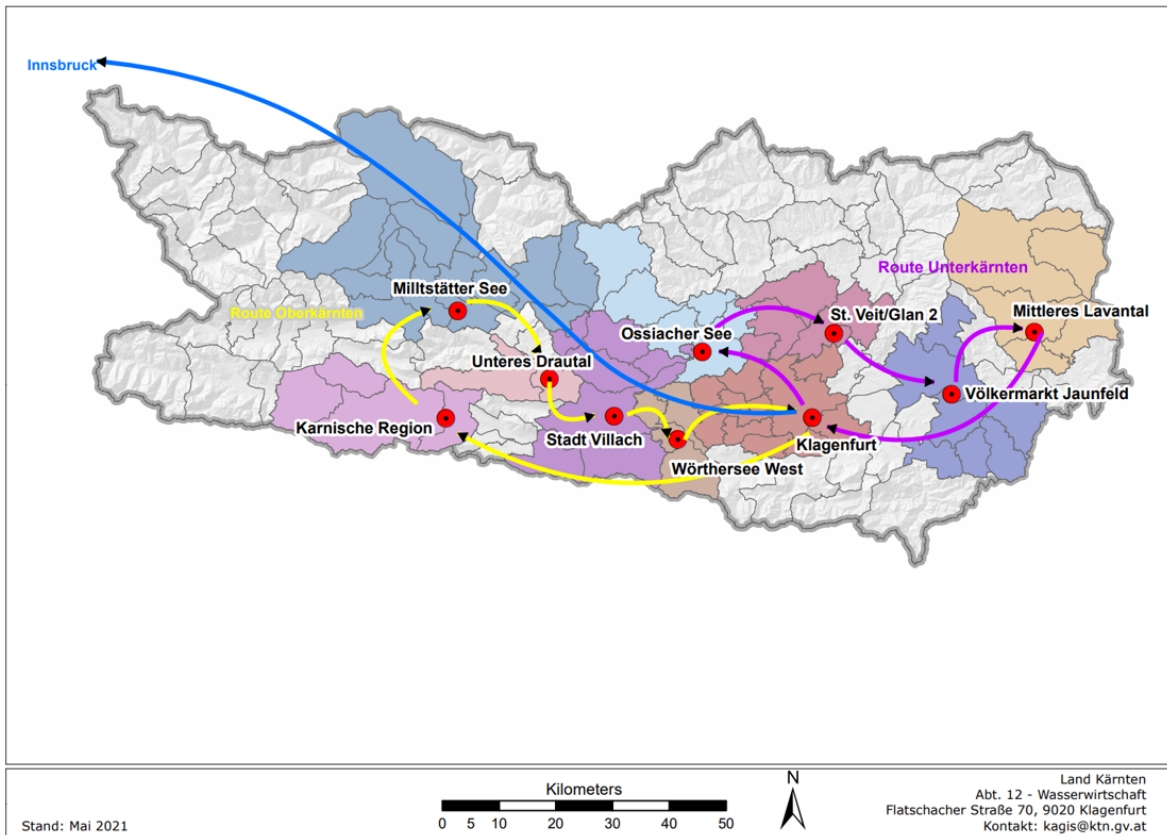
2.3 Salzburg – Institut für Mikrobiologie Universität Innsbruck

Der Versand erfolgte bis Ende April über Expresspost. Eine ähnliche Vorgehensweise wie für Vorarlberg wurde auch für Salzburg vorgeschlagen, konnte jedoch nicht umgesetzt werden. Daher wurde der Postversand gewählt, wie auch in Kapitel 2.5 beschrieben.

2.4 Kärnten – Institut für Mikrobiologie Universität Innsbruck

Der Versand erfolgte bis Ende April über Expresspost. Ab Mai 2021 lief im Auftrag der Kärntner Landesregierung ein Monitoring für zehn Kläranlagen, wobei die Proben morgens durch den Landes-Kraftfahrdienst abgeholt, und am nächsten Tag dem Labor in Innsbruck gekühlt zugestellt wurden.

Abbildung 12: Logistik der Kärntner Proben.



Quelle: Universität Innsbruck, © KAGIS

2.5 Oberösterreich – TU Wien

Die vier regelmäßig in Oberösterreich beprobten Kläranlagen (Freistadt, Wels, Steyr, Wolfgangsee-Ischl) wurden jeweils im Vorfeld der Beprobungen mit Versandmaterial für einen Zeitraum von zwei Monaten (vier Versandeinheiten) versorgt (siehe Abbildung 13). Eine Versandeinheit besteht aus:

- 500 mL HDPP vorbeschriftetes Probengebinde mit Möglichkeit der Ergänzung der Metadaten (Q, TN etc.)
- Kühlakkus, die vor Ort bis zum Versand bei -20 °C gelagert werden. Die Anzahl bzw. die Kapazität der Kühlakkus wurde im Vorfeld über die Größe und Kühlkapazität der umhüllenden Styroporbox sowie Transportdauer (vier Tage) und Umgebungstemperatur (30 °C) mittels vom Hersteller bereitgestelltem Online-Rechner erhoben. Die entsprechende Menge an Kühlakkus wurde der Verpackung beigelegt.
- Transportbox aus Styropor. Die Größe der Styroporbox wurde entsprechend der minimal notwendigen Größe zur Aufnahme des Probengefäßes und der Kühlakkus gewählt.
- Die umhüllende Kartonbox wurde über einen Onlineanbieter exakt für die Dimension der Styroporbox angefertigt und mit dem Absender sowie der Empfängeradresse vorbeschriftet, um den Aufwand der Kläranlagenbetreibenden zu minimieren.

Abbildung 13: Vorbereitete, den Kläranlagen in Oberösterreich und Burgenland sowie St. Pölten zur Verfügung gestellte Versandeinheit mit Gebinde, Kühlakkus, Styroporbox und Überkarton mit Empfänger und Absender (einige Kühlakkus wurden für das Foto entfernt).



© TU Wien/Norbert Kreuzinger.

Die Anzahl der im Rahmen des Projekts angeschafften Versandeinheiten orientierte sich an der Anzahl der zu Beginn geplanten zu untersuchenden Kläranlagen sowie einem Bereitstellungszeitraum von zwei Monaten bei 14-tägiger Beprobung. Alle Einheiten der Versandeinheit sind wiederverwendbar und wurden auch über mehr als ein Jahr wiederholt eingesetzt.

Der Versand an die TU Wien erfolgte per Post. Es wurde vereinbart, dass der Versand der jeweiligen „Donnerstagsprobe“ seitens der Kläranlagen üblicher Weise am Freitag erfolgt, wodurch die Proben am Montagvormittag an der TU eintreffen und entweder noch am Montag oder am Dienstag in der Früh aufgearbeitet werden.

2.6 Steiermark – Medizinische Universität Innsbruck

In der Steiermark wurden drei Kläranlagen regelmäßig beprobt. Die Proben wurden einmal pro Woche in Form von Kühlpaketen per Post oder Paketdienstleistungsunternehmen nach Innsbruck versendet (Details siehe Kapitel 2.2).

2.7 Niederösterreich – TU Wien

Für die Kläranlage St. Pölten erfolgte die Vorgangsweise analog zum Prozedere, das für Oberösterreich beschrieben wurde. Die Proben der weiteren regelmäßig untersuchten Kläranlagen Bad Vöslau, Baden und Guntramsdorf erfolgte durch Mitarbeiter:innen der TU Wien. Die frische Probe wurde früh morgens bei den Kläranlagen abgeholt und in einer mittels Kühllakkus temperierten Kühlbox direkt zur Aufarbeitung ins Labor transferiert.

Abseits von Coron-A erfolgt seit der Kalenderwoche 8/2021 ein wöchentliches Monitoring von 24 Kläranlagen in Niederösterreich. Die Probenlogistik erfolgt dafür ähnlich wie in Vorarlberg. Die Proben werden von Mitarbeiter:innen der Niederösterreichischen Landesregierung direkt von den Anlagen abgeholt und in einer mittels Kühllakkus temperierten Kühlbox ins wasserwirtschaftliche Landeslabor in St. Pölten gebracht, wo die weitere Probenaufbereitung erfolgt. Dazu wurde eine geeignete Zentrifuge angeschafft und nach Einschulung das Coron-A PEG-Protokoll angewandt. Die Pellets wurden in einem dem Workflow von TU entsprechenden Puffer gelöst und in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß bei -20 °C eingefroren. Alle 24 im Puffer eingefrorenen Proben wurden einmal wöchentlich zur weiteren Verarbeitung unter Einhaltung der Kühlkette direkt an die TU Wien transferiert.

2.8 Wien – TU Wien

Für die Proben der Kläranlage Wien wurden unterschiedliche Herangehensweisen eingesetzt, die sich im Wesentlichen an der Beprobungsfrequenz orientierten. Vereinzelt wurden die Proben durch die TU Wien direkt von der Kläranlage abgeholt bzw. die Proben von Mitarbeiter:innen der Kläranlage ins Labor der TU Wien gebracht, was aufgrund der räumlichen Nähe nur einen überschaubaren Mehraufwand für die Kläranlage bedeutet.

Über weite Perioden erfolgte jedoch die Probenvorbereitung direkt durch den Betreiber der Kläranlage. Dazu wurde eine geeignete Zentrifuge angeschafft und im Labor der Kläranlage Wien aufgebaut. Nach entsprechender Einschulung (und zweier Validierungsschulungen) wurden die Proben durch das Laborpersonal selbst vor Ort entsprechend dem Coron-A Protokoll zentrifugiert, das Pellet in Extraktionspuffer gelöst auf -20 °C gelagert und anschließend ins Labor der TU Wien transferiert. Da im Falle der Kläranlage Wien nicht nur Zulaufproben, sondern auch zahlreiche Kanalproben untersucht wurden, konnten dadurch die Laborressourcen an der TU Wien für RNA-Extraktionen und PCR „geschont“ werden. Aus Gründen der Qualitätssicherung erfolgte einmal wöchentlich eine parallele Probenaufarbeitung auch an der TU Wien, um die Ergebnisse vergleichen zu können.

2.9 Burgenland – TU Wien

Für die beiden regelmäßig untersuchten Kläranlagen Eisenstadt und (seit 29.1.2021) Rotenturm erfolgte die Vorgangsweise analog zum Prozedere, das für Oberösterreich beschrieben wurde.

Die Kläranlage Podersdorf nahm über den Sommer 2020 im Projekt eine Sonderrolle ein, da hier die Zusammenarbeit mit einem mobilen SARS-CoV-2 Labor zur Untersuchung von Humanproben („COVID Fighters“) getestet wurde. Dazu wurde über den Sommer 2020 eine Zentrifuge für PEG-Fällung vor Ort auf der Kläranlage bereitgestellt und von Mitarbeiter:innen des vor der Kläranlage positionierten Human-Test-Containers täglich eine Zulaufprobe vorbereitet, die dann in den Workflow der Humantestung eingeschleust wurde. Die Ergebnisse wurden durch die „COVID Fighters“ täglich auf eine eigene Datenbank hochgespielt und gemeinsam mit den Roh-Ergebnisdaten der PCR bereitgestellt. Außerhalb dieses Testzeitraums erfolgte auch für Podersdorf die Vorgangsweise analog zu Oberösterreich.

3 Datenlogistik

Von Anfang an stand eine gemeinsame und einheitliche Datenbasis mit der Möglichkeit, die neuesten Analysedaten der beteiligten Labore zu erfassen, im Zentrum der Überlegungen. Diese wurde genutzt um die Informationen gebündelt für die Weitergabe an Entscheidungsträger:innen und die Öffentlichkeit visuell über die Projekthomepage darstellen zu können.

3.1 Planung

Mit Projektstart wurde – gemeinsam mit den Projektpartnern – mit der Ausarbeitung des im Projektantrag skizzierten Systems zur Datenlogistik begonnen. Folgende Aufgaben des Projekts mussten durch den System- und Softwareentwurf möglichst gut unterstützt bzw. in diesen eingebettet werden können:

- ein österreichweites Monitoring,
- die Modellierung der Prävalenzzahlen sowie
- die Entwicklung des statistischen Prognosesystems.

Dabei wurde auch versucht, sämtliche Anforderungen, die im Laufe des Projekts an das System gestellt werden könnten, sowie die technischen und logistischen Randbedingungen der Datenlogistik abzuschätzen bzw. zu analysieren.

Basierend auf diesen Grundlagen und Abschätzungen und den im Projektantrag beschriebenen Aufgaben wurde ein Softwareentwurf erstellt. Das Grundkonzept einer webbasierten Anwendung wurde dabei umgesetzt. Es wurde Wert auf eine sehr gute Skalierbarkeit gelegt, um Erweiterungen des Systems problemlos abfangen zu können. Dies wurde durch eine leistungsfähige Datenbank und leistungsfähige, moderne Interfaces, aufbauend auf ein Geodateninformationssystem der Softwarefirma hydro-IT, sichergestellt.

Es wurden ausschließlich freie Softwarekomponenten, wie z. B. PostgreSQL, als Datenbank verwendet. Das System läuft auf einer Cloud-Lösung. Die Daten werden dabei ausschließlich innerhalb der EU gelagert und verarbeitet.

Die wichtigste Aufgabe der Datenlogistik in diesem Projekt war die reibungslose Verknüpfung verschiedener Umgebungen, Systeme und Infrastrukturen der Projektpartner sowie die Optimierung des Datenflusses. Die Daten mussten (unter möglichst großem Schutz vor Fehleingaben) einfach aufgenommen und dann sofort allen Beteiligten am Projekt zur Verfügung gestellt werden können. Dazu war ein möglichst einfaches Interface zur Datenerfassung mit integrierter Prüfung zu entwickeln.

3.2 Umsetzung Basissystem

In Zusammenarbeit mit den Laboren im Coron-A Projekt wurde ein System entwickelt, das die gewohnte Arbeit mit Excel-Tabellen unterstützt. Sind neue Messergebnisse in das System zu laden, so kann eine ausgefüllte Excel-Datei (die als Vorlage von der Homepage heruntergeladen werden kann) mit den entsprechenden Ergebnissen per Drag&Drop auf die Homepage hochgeladen werden. Die Datei wird dann automatisch auf Plausibilität der Eingaben geprüft und etwaige Fehlermeldungen ausgegeben. Bei Erfolg werden die entsprechenden Eingaben direkt in die Datenbank integriert und stehen fortan für alle Projektpartner über diverse Schnittstellen (Download, aber auch Diagramme und Auswertungen in Dashboardform) zur Verfügung.

Abbildung 14: Ausschnitt aus dem Kontextmenü.

Anzeigefilter: UINN GMI TU fix im Projekt zusätzlich inaktiv

Anzahl Anlagen: 42
Proben pro Woche: 78.5

Messstellen im Projekt:

- Eisenstadt (Eisbachtal)
- Podersdorf
- Siget / Wart (Mittleres Pinka- und Zickenbachtal)
- Abwasserverband Karnische Region
- Wasserverband Wörthersee Ost
 - Bearbeiter: UINN
 - Häufigkeit: 2 x pro Woche
 - Status: fix im Projekt
 - Label: K-Klagenfurt
 - uwwcode: ATTP_2-K1931629
 - Hinweis:

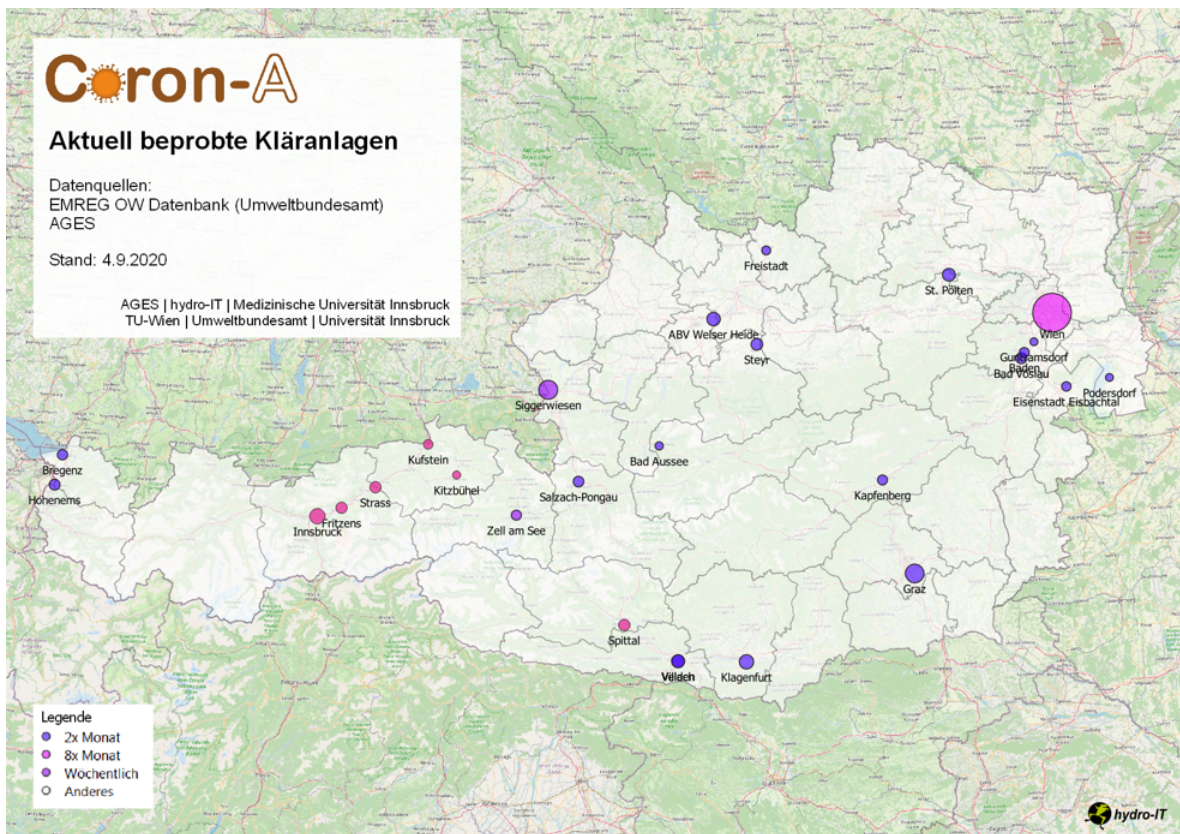
--> Bearbeiten --> Entfernen

- WV Millstätter See

Quelle: hydro-IT

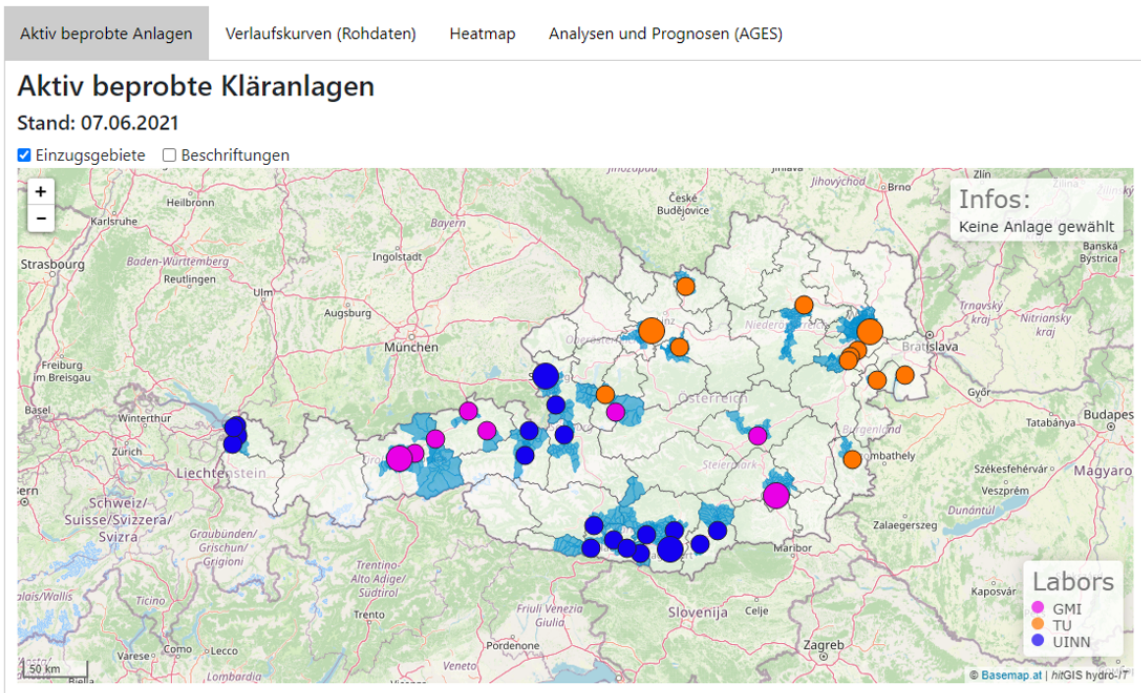
Zusätzlich können die beprobten Messstellen (Kläranlagen) im System dynamisch verwaltet werden. Sie können aus einer Liste bzw. Karte aller Abwasserreinigungsanlagen in Österreich gewählt sowie einem Labor zugewiesen werden, und es können weitere Stammdaten eingegeben werden. Diese Stammdaten werden unter anderem zur Berechnung und/oder Darstellung diverser Auswertungen/Diagramme verwendet.

Abbildung 15: Überblick der beprobten Anlagen als Bildschirmdarstellung der Coron-A Projektwebsite (Stand per 4.9.2020).



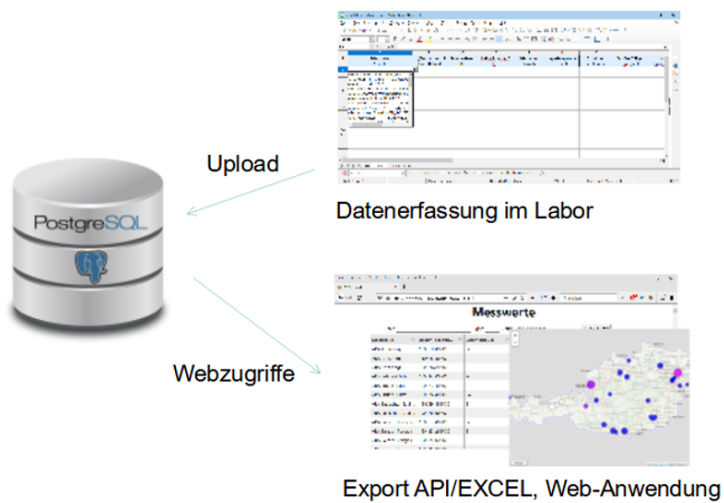
Quelle: hydro-IT

Abbildung 16: Übersicht aktiv beprobter Kläranlagen mit Einzugsgebiet (Stand per 7.7.2021).



Quelle: hydro-IT

Abbildung 17: Schematische Darstellung: Upload und Webzugriffrealisierung mit/über PostgreSQL.



Quelle: hydro-IT

3.3 Umsetzung als Projektwebsite

Die Web-Anwendung für den Aufbau des projektinternen Datenmanagements benötigte eine Webseite, über die die Erreichbarkeit für das Projektteam sichergestellt werden konnte. Diese Projektwebsite wurde unter coron-a.at angelegt und war ab 15.01.2021 erreichbar. Diese Webseite entwickelte sich direkt nach dem Projektstart zu einer eigenen Projekthomepage mit öffentlich verfügbaren Informationen über das Projekt und dadurch entstanden höhere Ansprüche an das Design.

Des Weiteren wurde für den internen Datenzugriff ein Login-System mit komplexen Zugriffsrechten notwendig und dementsprechend implementiert. So können unterschiedliche Accounts beispielsweise nur Daten der ihnen freigeschalteten Kläranlagen einsehen, oder die aktuellsten Daten werden nur mit einem entsprechenden Zeitversatz angezeigt.

Für eine öffentliche Ansicht auf die Daten wurde ein Dashboard mit einer Übersichtskarte von Österreich und einer Heatmap eingerichtet und über die Projektwebsite seit 25.2.2021 veröffentlicht.

3.4 Ergebnisse: Datenmanagement und Dashboard

Die folgenden Arbeiten wurden im Rahmen des Coron-A Projektes durchgeführt:

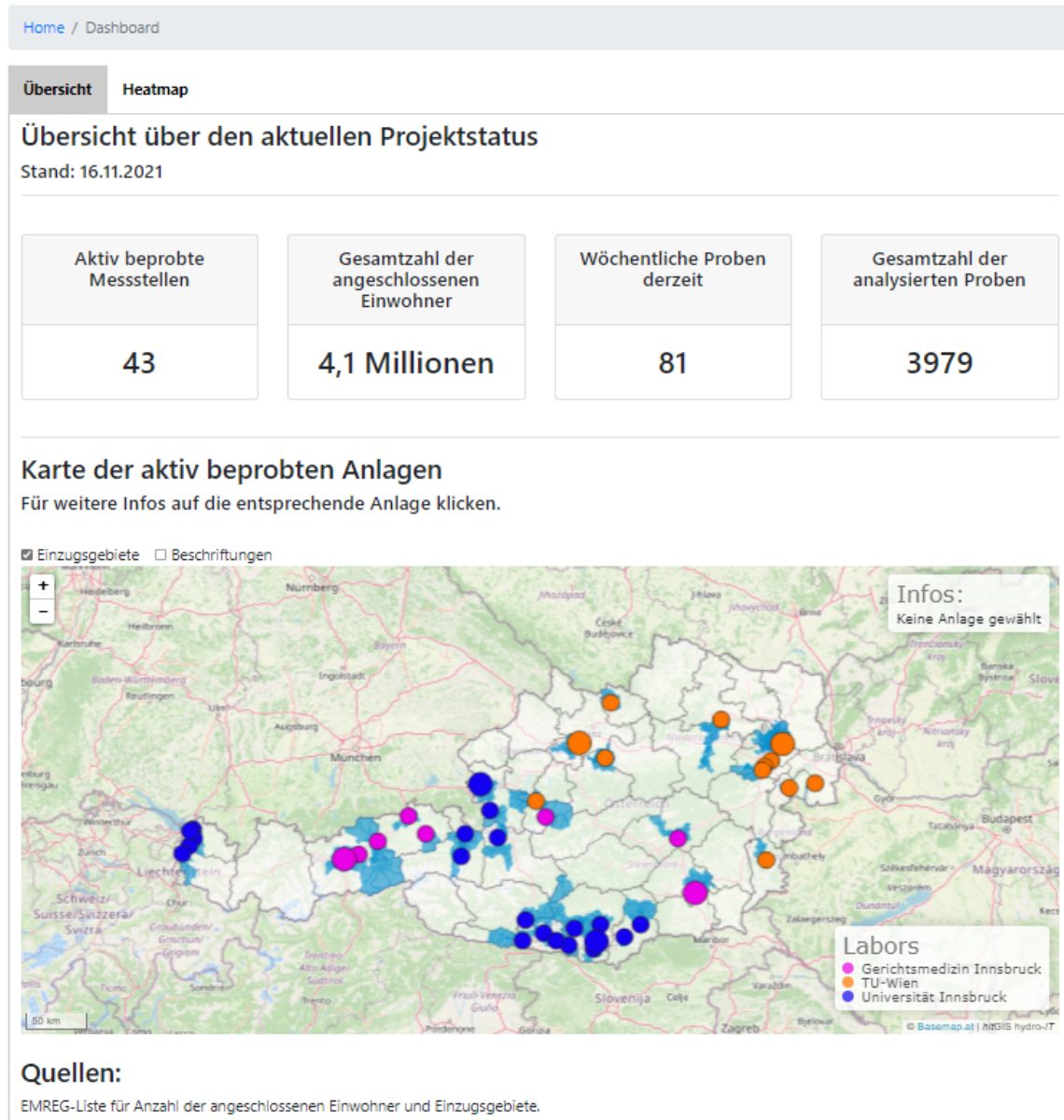
- Eine Projektwebsite wurde aufgebaut und veröffentlicht (coron-a.at):
 - Team-Seite realisiert,
 - FAQ-Seite eingerichtet,
 - Seiten der Projektergebnisse (Ablaufschema, Datenbehandlung, Vergleich mit Inzidenzen) komplettiert.
- Ein projektinternes Datenmanagement wurde mit den Projektpartnern entwickelt:
 - Upload der Messdaten über Excel-File für die Labore wurde ermöglicht,
 - Download der Messdaten mit diversen Filterfunktionen (als Excel-File) ist operativ,
 - Messstellenverwaltung mit Persistenz diverser Stammdaten existiert.
- Ein GIS-basiertes Datenbank- und Auswertesystem inklusive Schnittstellen zu Behörden wurde entwickelt und implementiert. Die Web-Anwendung funktioniert und ist für die Projektpartner und Behörden erreichbar:

- Verarbeitung der Rohdaten (Normierung, Glättungsfilter, Ausreißerbehandlung) ist funktional.
- Dynamisch generierte Diagramme (Heatmap, Liniendiagramme, Punktwolken) werden dargestellt.
- Dynamisch generierte interaktive Karte mit aktiven Messstellen inklusive Einzugsgebieten der Kläranlagen ist online.
- Eine Visualisierung von erhaltenen Ergebnissen wurde auf verschiedenen Ebenen (interne/externe Zugänglichkeit) umgesetzt:
 - Ein öffentliches Dashboard mit Projektstatus, Übersichtskarte und Heatmap existiert.
 - Ein internes Dashboard mit Aufbereitung der Rohdaten sowie Auswertungen der AGES wurde realisiert.

Nur durch eine einfache und direkte Übermittlung der Messergebnisse aus den Laboren an eine zentrale Dateninfrastruktur kann die Aktualität der Daten sichergestellt werden. Genauso wichtig ist für alle Stakeholder:innen die übersichtliche Ausgabe der aufbereiteten Daten über die Dashboards und Applikationen der Homepage.

Abbildung 18: Dashboard und Ergebnisse – Übersicht über den aktuellen Projektstatus.

Dashboard und Ergebnisse



Quelle: hydro-IT

Abbildung 19: Dashboard und Ergebnisse – Heatmap.

Dashboard und Ergebnisse

[Home](#) / [Dashboard](#)

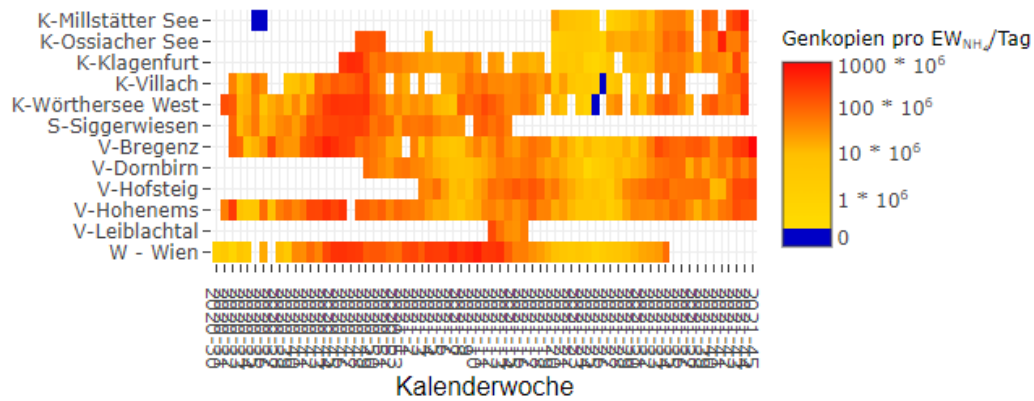
Übersicht

Heatmap

Heatmap

Populationsmarker:

Coron-A - Nachweis von SARS-CoV-2 im Abwasser



Hinweise:

Die Heatmap zeigt einen landesweiten Überblick über die Covid-19-Lage seit Juli 2020, wie sie im Zulauf von Kläranlagen gesehen wird.

Blau bedeutet hier einen negativen Befund, es wurden also keine Virenpartikel nachgewiesen.

Die Farbskalierung von gelb über orange auf rot zeigt eine steigende Virenbelastung an.

Dabei ist die logarithmische Skalierung zu beachten.

Quelle: hydro-IT

Abbildung 20: Menü für die Verlaufskurvendarstellung.

Verlaufskurven (Pipeline)

K-Klagenfurt × S-Siggerwiesen ×

Schnellauswahl ▾

Optionen Datenverarbeitung:

- Q90 Filter
- EW Filter
- Normierung NH₄ CSB

Glättung: Punkte Linien

- Glättung (spline) Faktor
- Glättung (gam) Number of Splines
- Glättung (rbf) Faktor

Optionen Darstellung:

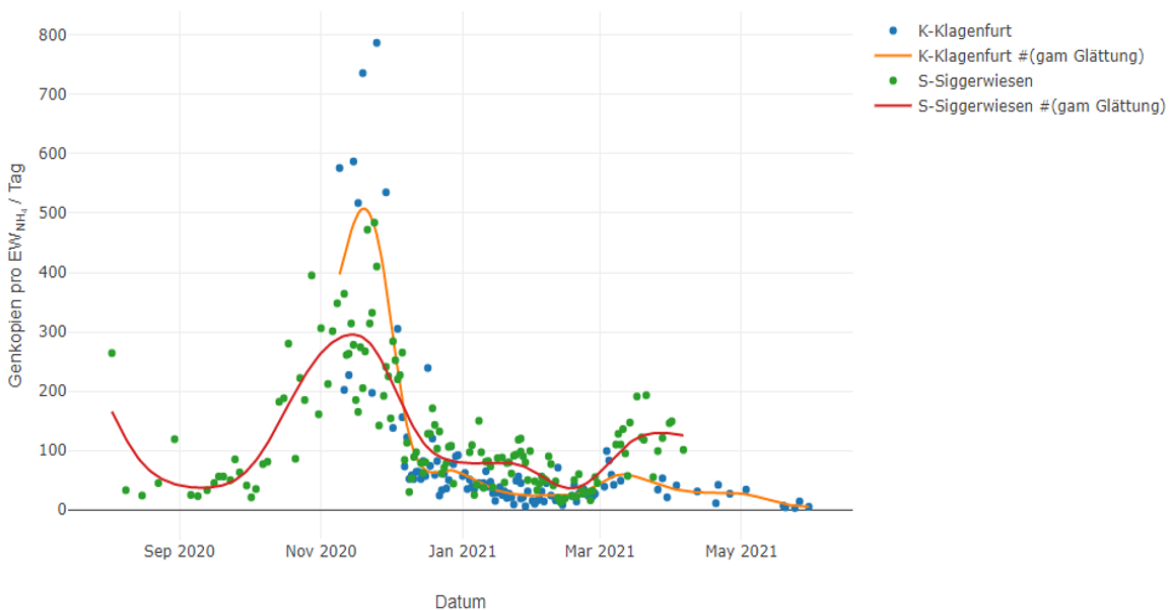
- ungeglättete Werte
 - Punkte Linien
- Inzidenzen (14d)
- Logarithmus

Log:

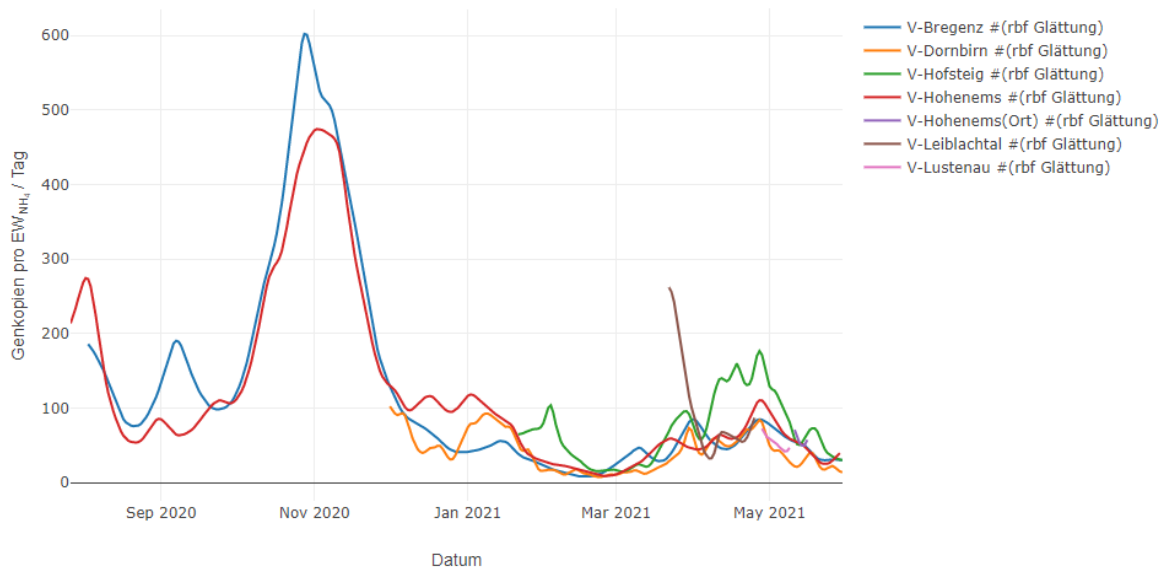
K-Klagenfurt:
 - 114 Datenpunkte
 - 5 Messwerte ohne Populationsmarker (entfernt)
 S-Siggerwiesen:
 - 154 Datenpunkte
 - 9 Messwerte ohne Populationsmarker (entfernt)

Quelle: hydro-IT

Abbildung 21: Zwei Beispiele von Verlaufskurvendarstellungen.



Quelle: hydro-IT



Quelle: hydro-IT

3.5 Übergabeoptionen der Coron-A Datenbank

Es ergaben sich während des Projekts Arbeiten, die über den Umfang des Projektantrages hinausgingen. Dies waren im Wesentlichen die umfangreiche Projektwebsite inklusive Mehrebenen-Benutzer:innenverwaltung als zentrale Anlaufstelle.

Datenmanagementlösungen, die Datenquellen mehrerer Institutionen und Unternehmen integrieren, können nur in wenigen Fällen monolithisch aufgebaut werden. Die Vernetzung verschiedener Systeme zur Erreichung der gestellten Ziele ist essentiell.

Übergabeoptionen der Coron-A Datenbank

Eine Bewertung einer Übergabe der IT-Projektergebnisse kann nach den verschiedenen erstellten bzw. bearbeiteten Komponenten erfolgen. Der Server des Coron-A Projekts beinhaltet im Wesentlichen:

- das Betriebssystem,
- die (statische) Homepage mit Texten, Bildern, Dokumenten und Veröffentlichungen,
- die Server-Funktionen und Server-Schnittstellen zur Webanwendung,
- das Geodatenmanagementsystem mit den hochgeladenen Messdaten,
- die Server-Funktionen und Server-Schnittstellen zur Webanwendung,

- die Webanwendungen der Homepage (Datenverwaltung, Karten etc.).

Das Betriebssystem ist eine Standard Ubuntu Server Version, die auf einem Cloudserver ausschließlich innerhalb der EU läuft.

Der Export der Projektwebsite als statische Webseite kann problemlos im Rahmen des Coron-A Projekts durchgeführt werden, allerdings sind sämtliche Funktionen wie Benutzer:innenanmeldung, Datenausgabe im Dashboard (Diagramme oder Karten usw.) in dieser Version nicht möglich.

Ein Rohdatenexport aus der Datenbank in Tabellenform ist ebenfalls so einfach zu realisieren, dass er innerhalb des Projektrahmens abgehandelt werden kann. Die meisten Auswertefunktionen werden online bei der Aufbereitung für die Darstellung im Dashboard auf der Datenbank direkt ausgeführt.

Diese Daten liegen also nicht in der Datenbank, sondern werden immer aktuell berechnet. Die erstellten Funktionen sind Teil des Coron-A Projekts und können gemäß den Projektvorgaben an Dritte weitergegeben werden. Ein zentrales Modul für die Auswertefunktionen existiert nicht, so dass beim Extrahieren dieser Quelltexte ein deutlicher Arbeitsaufwand entstehen würde.

Das Geodatenmanagementsystem basiert vollständig auf Komponenten aus freier Software, das System selbst basiert auf dem Wissen der hydro-IT GmbH, für eine Weitergabe des Gesamtsystems müssten hier erst die Rahmenbedingungen geprüft werden.

Die Webapplikationen der Homepage sind nur in Verbindung mit einem Zugriff auf das Serversystem nutzbar. Eine Weitergabe ohne Weiterbetrieb eines entsprechenden Servers ist daher nicht möglich.

Für einen funktionsfähigen Weiterbetrieb der IT-Komponenten von Coron-A (Stand Projektende) wäre die einfachste Methode der Weiterbetrieb des bestehenden Servers oder gegebenenfalls die Verlegung dieses Systems ohne Änderungen in eine andere Cloud bzw. auf einen anderen freien Server. Der Weiterbetrieb des Servers im gegenwärtigen Zustand kann von der hydro-IT bis zu einem zu vereinbarenden Zeitpunkt problemlos durchgeführt werden. Die beste Option für einen Weiterbetrieb wäre die Weiterentwicklung dieses etablierten und gut funktionierenden Systems innerhalb eines oder mehrerer neuer Projekte zum Abwassermonitoring.

4 Bestimmung der Einwohnerzahl mittels chemischer Analysen von Populationsgrößenmarkern

Zur besseren Bestimmung der mit den Abwasserproben erfassten Populationsgröße wurden neben klassischen Abwasserparametern noch weitere Substanzen untersucht. Davon stellten sich zwei als geeignete Populationsgrößenmarker heraus.

4.1 Zusammenfassung

Ein Ziel des Projekts war es, neben den leicht verfügbaren klassischen Abwasserparametern CSB, Gesamtstickstoff und Ammonium weitere Populationsgrößenmarker zu identifizieren, die sich für die Zuordnung einer untersuchten Populationsgröße im Abwasser eignen. Mit Cotinin und Koffein liegen zwei vielversprechende Biomarker vor, deren Frachten potentiell zur Ermittlung von Einwohnerwerten herangezogen werden können.

Cotinin und Koffein sind in so hohen Konzentrationen im zulaufenden Abwasser enthalten, dass die quantitative Analyse mit nur minimaler Probenvorbereitung erfolgen kann.

Sowohl die aus den Koffein- als auch die aus den Cotinifrachten berechneten Einwohnerwerte korrelieren sehr gut mit den aus den CSB₁₂₀-Werten abgeleiteten Einwohnerwerten und damit auch mit den Einwohnerzahlen. Die Abweichungen der verschiedenen Einwohnerwerte sind in der Regel kleiner als 25 %.

Trotz vielversprechender Ergebnisse hat die Studie auch Limitationen. Die untersuchten Proben und Kläranlagen repräsentieren lediglich eine Stichprobe aller österreichischen Kläranlagen. Damit kann momentan die Frage nicht zweifelsfrei beantwortet werden, ob die beiden Chemikalien als universelle Marker zur Bestimmung der Einwohnerwerte verwendet werden können.

4.2 Einführung

In der Abwasserepidemiologie werden Informationen über den Lebensstil und den Gesundheitszustand der Bevölkerung im Einzugsgebiet einer Kläranlage aus der Analyse von Abwasserproben gezogen. Substanzen (z. B. Drogen, Genussmittel und Medikamente) aber auch Krankheitserreger gelangen nach der Ausscheidung als Teil des Abwassers in die Kläranlage. Mittels hochspezifischer und nachweisempfindlicher Analysenverfahren werden die Ausscheidungsprodukte nachgewiesen und deren Konzentration in den Abwasserproben bestimmt. Die ermittelten Frachten geben Auskunft über das Ausmaß der Exposition der Bevölkerung. Sie ergeben sich durch Multiplikation der Konzentration mit der Zuflussmenge. Durch Normieren auf die Einwohnerzahl lassen sich Kenngrößen ableiten, auf Basis derer sich Regionen untereinander vergleichen lassen und zeitliche Trends abgeleitet werden können.

Die Konzentrationen der Ausscheidungsprodukte und die Zuflussmengen lassen sich direkt mittels geeigneter Messmethoden bestimmen. Kläranlagen verfügen über geeignete Messinstrumente zur Bestimmung von Zuflussmengen. Die eingesetzten Bestimmungsmethoden sind zuverlässig und reproduzierbar. So ist laut Angaben der Kläranlagenbetreibenden der Fehler der Zuflussmengenmessung typischerweise kleiner als 5 %. Die relative Standardabweichung bei Mehrfachbestimmungen der SARS-CoV-2 Konzentrationen ist in der Regel kleiner als 20–30 %.

Unter Einwohnerzahl wird hier die Anzahl der Personen verstanden, die sich innerhalb des Probenahmezeitraums (24 Stunden) im Einzugsgebiet einer Kläranlage aufhalten und damit zur beobachteten Abwassermenge einen Beitrag leisten. Eine zuverlässige Bestimmung der Einwohnerzahl gestaltet sich in der Regel schwierig (Gao J. et al., 2016; Tschärke B. J. et al., 2019; van Nuijs A.L.N. et al., 2011; Rico M. et al., 2017)

Den einfachsten Zugang zu Einwohnerzahlen stellt das Zentrale Melderegister (ZMR) dar. Die ZMR-Daten sind statische Daten. D. h. jede Form der Mobilität von Personen bleibt unberücksichtigt. Zur zusätzlichen Erfassung von ein- und auspendelnden Personen, Tagesgästen oder Tourist:innen bedarf es daher einer dynamischen Erfassung der Einwohnerzahl.

Es gibt zwei Ansätze, die zur Bestimmung der dynamischen Einwohnerzahl Verwendung finden: die Ableitung aus routinemäßig erfassten hydrochemischen Parametern und die Verwendung von im Abwasser bestimmbar Biomarkern.

Hydrochemische Parameter werden regelmäßig im Rahmen der Eigenüberwachung der Kläranlagen gemessen. Dazu gehören der biochemische Sauerstoffbedarf (BSB), der chemische Sauerstoffbedarf (CSB), der gesamte organische Kohlenstoff (TOC), der als Ammonium vorliegende Stickstoff ($\text{NH}_4\text{-N}$), der gesamte gebundene Stickstoff (N_{ges}) und der Gesamtphosphor (P_{ges}). Die Anzahl der Untersuchungen der einzelnen Parameter ist in der Verordnung des Bundesministeriums für Landwirtschaft, Regionen und Tourismus über die Begrenzung von Abwasseremissionen aus Abwasserreinigungsanlagen für Siedlungsgebiete (1. AEV für kommunales Abwasser) festgelegt und hängt von der Größenklasse der untersuchten Kläranlage ab.

Aus den hydrochemischen Parametern können Einwohnerwerte (EW) berechnet werden. Der EW gibt das Einwohneräquivalent der Tagesschmutzfracht wieder. Per Definition trägt eine Person 60 g/Tag zum BSB, 120 g/Tag zum CSB, 8,0 g/Tag zum $\text{NH}_4\text{-N}$, 11 g/Tag N_{ges} und 1,8 g/Tag zum P_{ges} bei. Die aus hydrochemischen Parametern abgeleiteten EW liegen in der Regel deutlich höher als die Anzahl der gemeldeten Personen (Reinstadler V. et al., 2021). In den meisten Kläranlagen sind die aus den CSB-Werten abgeleiteten EW rund ein Drittel höher als die aus den Melderegistern abgeleiteten Einwohnerzahlen. In Kläranlagen mit einem entsprechend hohen Anteil an Schmutzfracht aus Gewerbe, Industrie und Landwirtschaft können die Einwohnerzahlen allerdings in einem weit höheren und damit unzulässigen Ausmaß überschätzt werden. In solchen Fällen können Biomarker zur Bestimmung der Populationsgröße zum Einsatz kommen.

Die Möglichkeit der Verwendung von Biomarkern zur Bestimmung der Populationsgröße im Einzugsgebiet einer Kläranlage wird seit einigen Jahren untersucht (Gao J. et al., 2016; Rico M. et al., 2017; Hou CZ. et al., 2021; O'Brien J. W. et al., 2014; Lai FY. et al. 2011; Senta I. et al., 2015). Als Biomarker werden hier kleine bioorganische Moleküle bezeichnet, die mittels Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS) effizient und zuverlässig in Abwasserproben quantifiziert werden können. Stoffe, deren Tauglichkeit als Biomarker zur Bestimmung der Größe der Populationsstichprobe evaluiert wurde, sind pharmazeutische Wirkstoffe (z. B. Carbamazepin), Bestandteile von Nahrungsmitteln und Getränken (z. B. Nikotin, Koffein) sowie endogene Biomoleküle (z. B. Kreatinin, Cortisol, Cholesterol). Ein universell einsetzbarer Biomarker wurde bis dato allerdings nicht gefunden.

4.3 Zielsetzung

Im Rahmen des Projektes war es auch mit ein Ziel, die Tauglichkeit von organischen Biomarkern bzw. Populationsgrößenmarkern für die zuverlässige Bestimmung der Einwohnerzahl im Einzugsgebiet einer Kläranlage zu evaluieren. Als organische Biomarker kommen pharmazeutische Wirkstoffe, Bestandteile von Nahrungsmitteln und Getränken sowie deren Stoffwechselprodukte in Frage. Diese Untersuchung erfolgte über die klassischen Parameter CSB, Gesamtstickstoff und Ammonium hinaus.

4.4 Auswahl von Biomarkerkandidaten

Folgende Kriterien wurden zur Auswahl von Biomarkerkandidaten verwendet:

- Biomarker sind kleine bioorganische Moleküle. Insbesondere pharmazeutische Wirkstoffe, Bestandteile von Nahrungsmitteln und Getränken sowie deren Stoffwechselprodukte sollten in Betracht kommen.
- Die Chemikalien sollten mittels LC-MS/MS quantifizierbar sein.
- Die Chemikalien sollten in größeren Mengen von einem nicht zu geringen Anteil der Bevölkerung konsumiert werden.
- Die Pharmakokinetik der Substanzen sollte umfassend untersucht sein.
- Die Biomarker sollten im Abwasser über mehrere Tage stabil sein.

Auf Basis dieser Kriterien wurden die folgenden 23 Biomarkerkandidaten ausgewählt:

6-Acetylmorphin (MAM), Acetaminophen, Amphetamin, Benzoyllecgonin, Koffein, Carbamazepin, Kokain, Codein, Cotinin, 2-Ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidin (EDDP), Ethylsulfat (EtS), Lidocain, 3,4-Methylenedioxyamphetamin (MDA), 3,4-Methylenedioxymethamphetamin (MDMA), Methadon, Methamphetamin, Metoprolol, Morphin, 11-Nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC-COOH), Oxazepam, Tramadol, Trimethoprim und Venlafaxin.

4.5 Quantitative Bestimmung der untersuchten Biomarkerkandidaten

Die quantitative Bestimmung der Biomarkerkandidaten erfolgte unter Verwendung von LC-MS/MS-Methoden (Reinstadler V. et al., 2021). Im Rahmen der internen Qualitätskontrolle wurden Leerproben und dotierte Proben mitanalysiert. Im Rahmen der externen Qualitätskontrolle wurde ein Ringversuch erfolgreich absolviert (van Nuijs A.L.N., 2011).

4.6 Untersuchte Proben

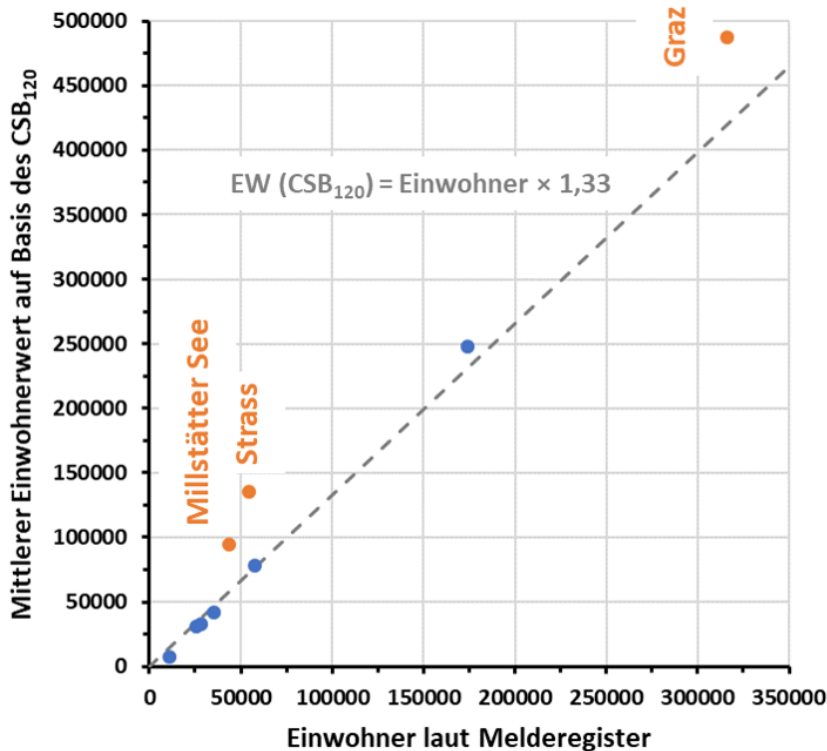
Mengenproportionale 24-Stunden-Mischproben wurden am Zulauf zu neun österreichischen Kläranlagen gesammelt: Innsbruck, Strass, Kapfenberg, Millstätter See und Erlauftal vom 7.9.–13.9.2020, in den Kläranlagen Hall-Wattens und Kufstein vom 8.9.–14.9.2020, in der Kläranlage Graz vom 29.9.–5.10.2020 und in der Kläranlage Korneuburg vom 10.6.–16.6.2020. Jeweils 80 mL der gesammelten mengenproportionalen 24-Stunden-Mischproben wurden in Plastikflaschen abgefüllt und unmittelbar tiefgefroren. Die Proben wurden als Kühlpaket verschickt und im Labor bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

4.7 Ergebnisse

4.7.1 Gegenüberstellung der aus dem Melderegister abgeleiteten Einwohnerzahlen mit dem aus dem CSB₁₂₀ errechneten Einwohnerwerten

Von den neun im Rahmen dieser Studie untersuchten Regionen wiesen drei Regionen deutliche Abweichungen zwischen EW und den gemäß Melderegister abgeleiteten Einwohnerzahlen auf (Abbildung 22). Dies waren die Regionen Millstätter See, Strass und Graz. Die Analyse von Biomarkern kann in diesen Fällen helfen, sowohl die Richtigkeit der EW zu überprüfen und gegebenenfalls zu korrigieren, als auch mögliche Ursachen für die Abweichungen zu ermitteln.

Abbildung 22: Gegenüberstellung der auf Basis der CSB₁₂₀-Werte errechneten mittleren Einwohnerwerte mit den aus dem Melderegister abgeleiteten Einwohnerzahlen.



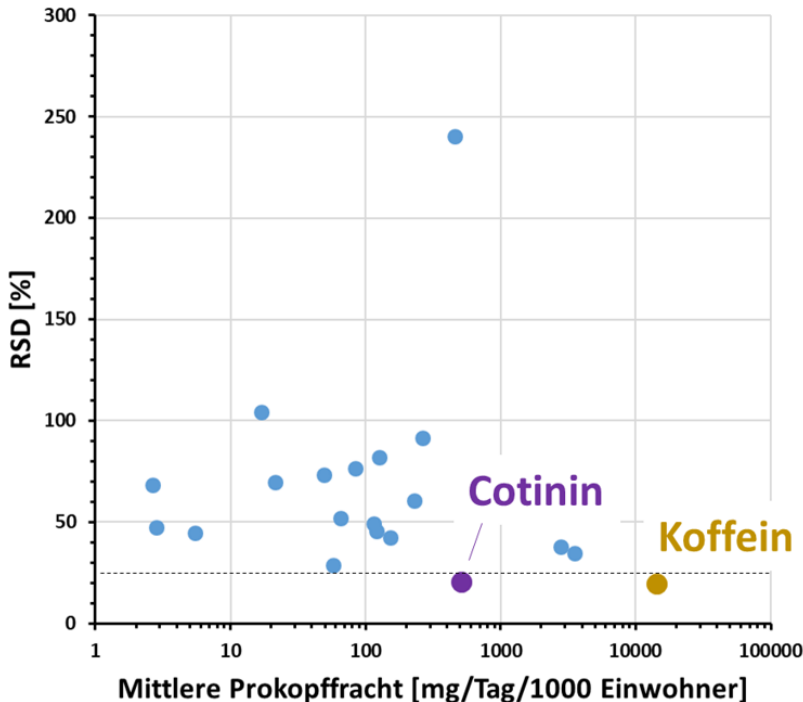
Quelle: Medizinische Universität Innsbruck

4.7.2 Evaluierung der Tauglichkeit der Biomarkerkandidaten

Auf Basis der Gegenüberstellung der aus den CSB₁₂₀-Werten errechneten mittleren Einwohnerwerte mit den aus dem Melderegister abgeleiteten Einwohnerzahlen wurde ein Trainingsset und ein Testset definiert. Das Trainingsset bestand aus 42 Proben von den sechs Kläranlagen, die eine gute Übereinstimmung zwischen EW und den gemäß Melderegister abgeleiteten Einwohnerzahlen aufwiesen. Das Testset umfasste 21 Proben von den Regionen Millstätter See, Strass und Graz. Die 23 Biomarkerkandidaten wurden in allen gesammelten Abwasserproben quantitativ bestimmt.

Als erster Parameter zur Evaluierung der Tauglichkeit eines Biomarkerkandidaten wurde die relative Standardabweichung (RSD) der Pro-Kopf-Frachten im Trainingsset herangezogen. Zur Berechnung der Pro-Kopf-Frachten wurden die aus den CSB₁₂₀-Werten errechneten EW verwendet. Von den untersuchten Biomarkerkandidaten bestanden lediglich Cotinin und Koffein mit RSD-Werten unter 25 % den Test.

Abbildung 23: Relative Standardabweichungen (RSD, in %) der Pro-Kopf-Frachten der Biomarkerkandidaten (in mg/Tag/1000 Einwohner:innen) für das Trainingsset bestehend aus 42 Proben von sechs Kläranlagen.



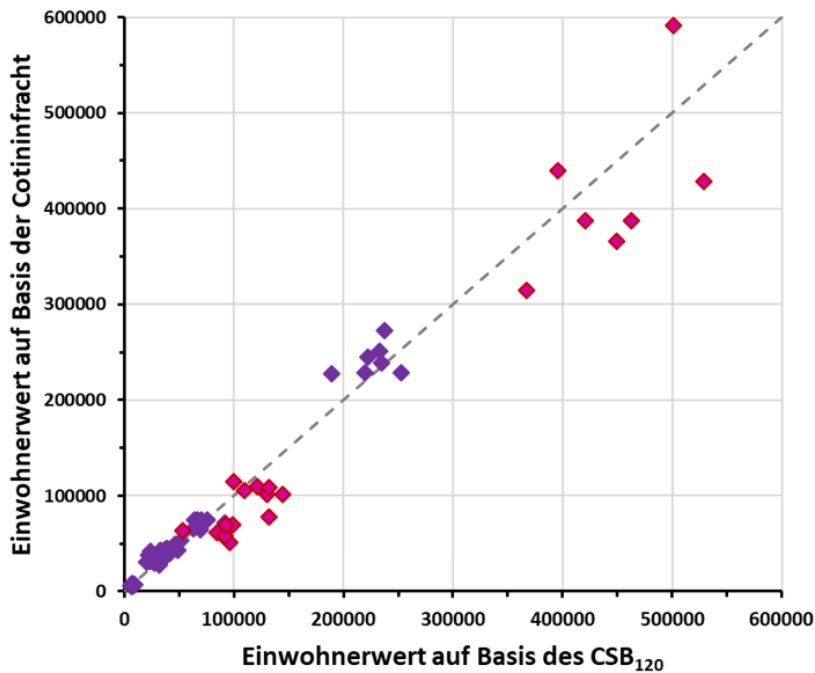
Quelle: Medizinische Universität Innsbruck

Cotinin zählt zu den Alkaloiden des Tabaks. Im menschlichen Organismus wird Nikotin zu Cotinin verstoffwechselt und dient als Marker für den Nachweis des Tabakkonsums. Laut Literatur scheidet eine rauchende Person rund 2,4 mg Cotinin pro Tag über den Urin aus (Buerge I.J. et al., 2008; Mackulak T. et al., 2015). Bei einem Raucher:innenanteil von rund 20 % an der Gesamtbevölkerung scheidet ein:e Einwohner:in rund 0,5 mg Cotinin pro Tag aus. Mithilfe der mittleren ausgeschiedenen Menge lässt sich aus der Cotininfracht ein Einwohnerwert ableiten.

Die aus den Cotininfrachten abgeleiteten Einwohnerwerte lagen bei fünf von sechs Kläranlagen des Trainingssets innerhalb von ± 25 % um die aus den CSB₁₂₀-Werten abgeleiteten Einwohnerwerte (Abbildung 24). Lediglich Korneuburg zeigte größere Abweichungen (4–74 %).

Bei den drei Kläranlagen des Testsets wurden mithilfe der Cotininfracht in der Regel deutlich niedrigere Einwohnerwerte als mit den CSB₁₂₀-Werten errechnet. Die Abweichungen lagen im Bereich von -46,6 % bis 20 % (Abbildung 24).

Abbildung 24: Korrelation der auf Basis der Cotinfrachten berechneten Einwohnerwerte mit jenen aus den CSB₁₂₀-Werten abgeleiteten Einwohnerwerten.



(Trainingsset ... rote Punkte, Testset ... violette Punkte)

Quelle: Medizinische Universität Innsbruck

Koffein ist ein Alkaloid mit stimulierender Wirkung aus der Stoffgruppe der Xanthine. Es ist ein Bestandteil von Genussmitteln wie Kaffee, Tee, Cola und diversen Energy-Drinks und gilt als die am häufigsten konsumierte pharmakologisch aktive Substanz. Laut DeLonghi Kaffeereport Österreich 2020³ nimmt jeder Erwachsene in Österreich täglich 259–357 mg Koffein zu sich. Koffein wird im menschlichen Körper fast vollständig in diverse Stoffwechselprodukte umgewandelt. Lediglich 3 % des aufgenommenen Koffeins wird unverändert über den Urin ausgeschieden. Damit scheidet ein:e Einwohner:in rund 9 mg Koffein pro Tag aus. Mithilfe der mittleren ausgeschiedenen Menge lässt sich aus der Koffeinfracht ein Einwohnerwert ableiten.

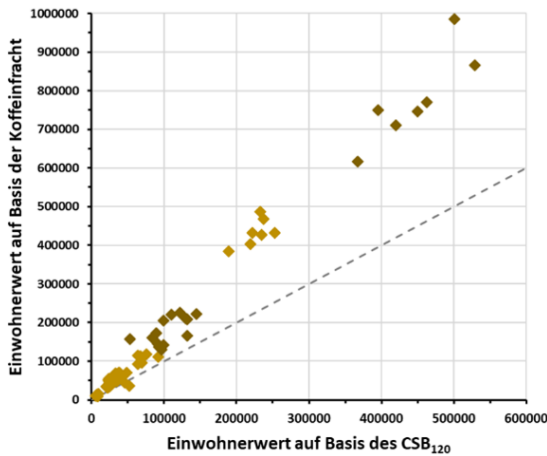
Die aus den Koffeinfrachten abgeleiteten Einwohnerwerte führten bei allen untersuchten Kläranlagen zu einer deutlichen Überschätzung der Einwohnerwerte (Abbildung 25a). Diese Beobachtung legte den Schluss nahe, dass pro Kopf und Tag mehr Koffein ins Abwasser gelangt als auf Basis der Ausscheidungsrate und der Konsummengen zu erwarten

³ weichselbaum-pr.at/wp-content/uploads/2020/08/DeLonghi_Kaffee_Report2020_Infografiken.pdf

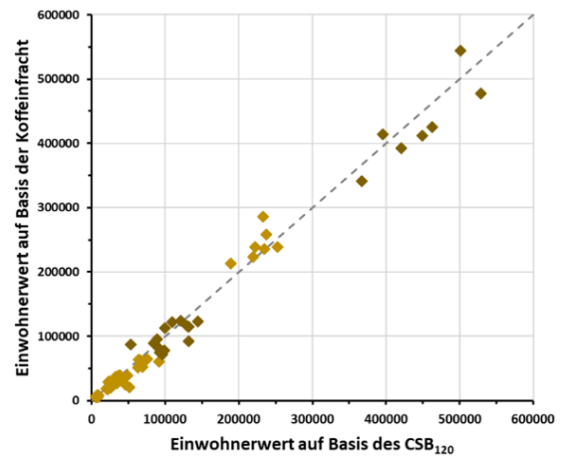
war. Eine mögliche Erklärung dafür wäre ein direkter Eintrag von Koffein ins Abwasser z. B. aufgrund des Reinigens von Geschirr, Tassen oder Kaffeemaschinen.

Abbildung 25: Korrelation der auf Basis der Koffeintrachten berechneten Einwohnerwerte mit jenen aus den CSB₁₂₀-Werten abgeleiteten Einwohnerwerten.

(a) Mittlere ausgeschiedene Menge: 9 mg pro Tag



(b) Mittlere ausgeschiedene Menge: 17 mg pro Tag



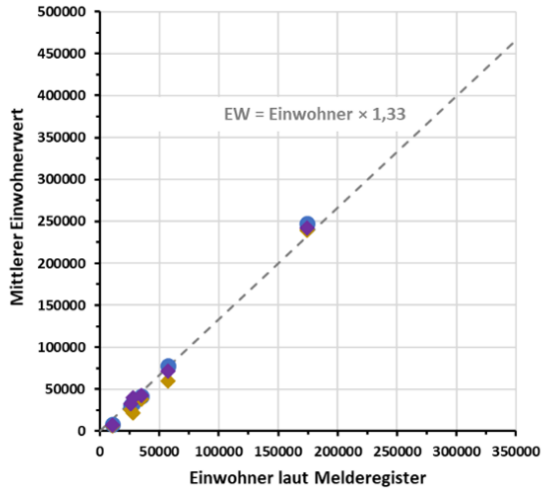
(Trainingsset ... beige Punkte, Testset ... braune Punkte)

Quelle: Medizinische Universität Innsbruck

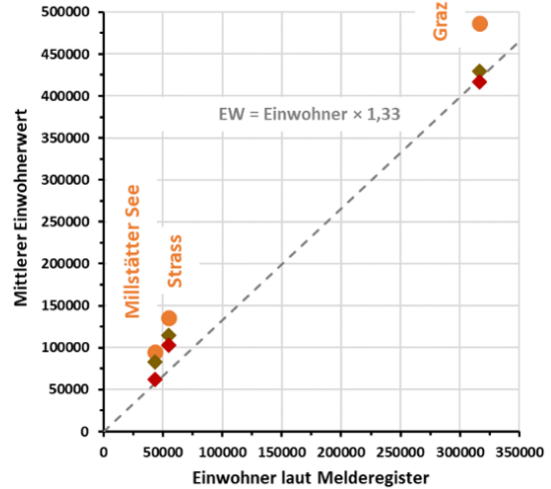
Eine verbesserte Übereinstimmung der Einwohnerwerte konnte durch Anpassung des täglichen Pro-Kopf-Eintrags an Koffein erreicht werden (Abbildung 25b). Ein passender Wert scheint 17 mg pro Tag pro Einwohner:in zu sein. Für 90 % der Proben des Trainings- und des Testsets lagen die so aus den Koffeintrachten abgeleiteten Einwohnerwerte innerhalb von $\pm 25\%$ um die aus den CSB₁₂₀-Werten abgeleiteten Einwohnerwerte.

Abbildung 26: Vergleich der aus CSB₁₂₀-Werten (Kreise), Koffeinfracht (Karas) und Cotinifracht (Dreiecke) abgeleiteten mittleren Einwohnerwerte für neun Kläranlagen.

(a) Trainingsset



(b) Testset



Erläuterung zur Abb. 25: Die Einwohnerzahlen wurden aus dem Melderegister abgeleitet. Das Trainingsset umfasste Proben der Regionen Innsbruck, Hall-Wattens, Kufstein, Korneuburg und Erlaufthal. Als Testset fungierten Proben der Regionen Graz, Strass und Millstätter See.

Quelle: Medizinische Universität Innsbruck

Die Ergebnisse der Evaluierungsexperimente legen den Schluss nahe, dass mit Cotinin und Koffein zwei Biomarker vorliegen, die für die dynamische Ermittlung von Einwohnerwerten verwendet werden können. Die beiden Marker können für sich oder in Kombination mit dem CSB₁₂₀-Wert Verwendung finden.

Bei der Mehrzahl der Kläranlagen ist anzunehmen, dass die durch die drei Ansätze ermittelten Einwohnerwerte sehr gut übereinstimmen (Abbildung 26a). Es wird aber voraussichtlich auch Kläranlagen geben, wo einer oder mehrere der drei Ansätze zu Werten führen, die von den anderen Werten bzw. von den auf Basis der Meldedaten erwarteten Einwohnerzahlen abweichen. Beispiele dafür sind die drei Kläranlagen Graz, Strass und Millstätter See (Abbildung 26b). Die Biomarkeranalyse kann in solchen Fällen zur Bestätigung oder Korrektur der aus den CSB₁₂₀-Werten abgeleiteten Einwohnerwerte dienen.

5 Österreichweites überblicksweises Monitoring

Um eine gute Datengrundlage für die Modellierungen im Projekt zu erreichen, wurden verschiedene Anlagen unterschiedlich häufig und manche Anlagen kurzzeitig zusätzlich beprobt. Damit konnte sowohl eine überblicksmäßige als auch zeitlich hochaufgelöste Datenbasis für weitere Auswertungen geschaffen werden.

Das primäre Ziel der Erhebung der SARS-Cov-2 Abundanzen (gemessen als Genkopien pro mL) lag in der Bereitstellung von Daten für die im Rahmen des Projekts durchgeführten Modellierungen (siehe Kapitel 7, 8 und 9). Da es rasche nationale und internationale Entwicklungen im Bereich des abwasserepidemiologischen Monitorings gab und das Potential des Ansatzes für das Pandemiemanagement erkannt wurde, entwickelten sich auch die ursprünglichen Fragestellungen des Projekts bezüglich der Ansprüche an Dokumentation und Auswertung laufend weiter. Dadurch veränderte sich sowohl die Anzahl der untersuchten Kläranlagen, als auch die Frequenz der Beprobung ständig weiter. Um eine geeignete Datenbasis für die Modellierungen zur Verfügung zu stellen, wurden einzelne Kläranlagen in einer hohen zeitlichen Auflösung beprobt (z. B. 3-mal wöchentlich), für die überblicksmäßige Darstellung der Situation in Österreich andere jedoch in geringer Auflösung (z. B. 2-mal im Monat). Einzelne Kläranlagen wurden zudem für kurze Zeit zusätzlich ins Beprobungsprogramm aufgenommen, um spezielle Fragestellungen zu behandeln.

Dieser Ansatz unterscheidet sich von einem systematischen Monitoring, bei dem sowohl die Anzahl der Untersuchungsstellen als auch die Anzahl der Probenahmen aus möglichst konstant bleiben und meist keine Anpassungen, die aufgrund des experimentellen Charakters erforderlich sind, mehr vorgenommen werden.

Das nachfolgende Kapitel fasst auf Basis der in die Coron-A Datenbank eingepflegten Datensätze die Anzahl der über den Zeitraum April 2020 bis Juni 2021 erhobenen Messungen zusammen. Die Auswertung über die Coron-A Datenbank weist folgende Rahmenbedingungen auf:

- Erfassung von Daten des Landesmonitorings Vorarlbergs, Kärntens und (vereinzelt) Niederösterreichs,

- Spezialdatensätze zur Erhebung von Kanalteilinzugsgebieten, die in der Datenbank eingetragen sind, werden nicht berücksichtigt,
- Daten aus Liechtenstein, die sich ebenfalls in der Datenbank befinden, werden nicht berücksichtigt.

5.1 Im Rahmen von Coron-A untersuchte Kläranlagen

Am Beginn der Untersuchungen im Rahmen des Coron-A Projekts standen die methodischen Fragestellungen im Mittelpunkt. Dazu wurden unterschiedliche Varianten für Beprobung, Logistik, Probenaufarbeitung und Analytik evaluiert, welche die Basis für die weiteren Untersuchungen darstellten. Zudem waren die Prävalenzzahlen der Pandemie zu diesem Zeitpunkt sehr niedrig, was auch zu sehr niedrigen Genom-Abundanzen im Zulauf der Kläranlagen führte. Aus diesen Gründen war die Anzahl der untersuchten Anlagen bis Ende Sommer 2020 gering und steigerte sich erst mit dem Beginn der zweiten Pandemiewelle ab August 2020.

Tabelle 4 (Jahr 2020) und Tabelle 5 (Jahr 2021) stellen dar, welche Kläranlagendaten in die Coron-A-Datenbank übernommen werden konnten. Dies erfolgt aufgegliedert nach Bundesland und Monat.

Tabelle 4: Anzahl der Abwasseranalysen in der Coron-A Datenbank nach Kläranlage und Monat (Teil 1).

Anzahl von SarsCoV2 Titer (Teil 1)		2020								
BL	Kläranlage	Apr	Mai	Jun	Jul	Aug	Sep	Okt	Nov	Dez
B	Eisenstadt (Eisbachtal)	1	1	-	-	1	1	3	2	2
B	Podersdorf	-	-	-	-	3	-	2	2	2
B	Siget / Wart (Mittleres Pinka- und Zickenbachtal)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K	Abwasserverband Karnische Region	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K	Abwasserverband Wörthersee West	-	-	-	2	14	13	13	13	13
K	Reinhalteverband "Mittleres Lavanttal"	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K	Reinhalteverband für das Gebiet St. Veit/Glan	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K	Wasserverband Unteres Drautal	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K	Wasserverband Wörthersee Ost	-	-	-	-	-	-	-	9	28
V	Stadtgemeinde Villach	-	-	-	-	5	2	4	6	16
K	WV Abwasserverband Völkermarkt-Jaunfeld	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K	WV Millstätter See	-	-	-	4	31	-	3	3	3
K	WV Ossiacher See	-	-	-	-	-	-	-	3	10
N	ARA AV An der Traisen	-	-	-	-	2	2	2	2	2
N	ARA Baden	1	1	1	-	1	-	-	3	2
N	ARA Guntramsdorf	1	2	1	-	1	1	2	3	2
N	ARA GV Abwasserbeseitigung Raum Bad Vöslau	1	2	1	-	1	1	2	3	2
O	Freistadt	-	-	-	1	1	2	2	2	2
O	Steyr und Umgebung	-	-	-	-	2	1	3	2	2
O	Welser Heide	-	-	-	-	2	2	2	2	2

Anzahl von SarsCoV2 Titer (Teil 1)		2020									
BL	Kläranlage	Apr	Mai	Jun	Jul	Aug	Sep	Okt	Nov	Dez	
O	Wolfgangsee-Ischl	-	-	-	-	2	5	4	4	5	
S	ARA Fritztal-Hütttau	-	-	-	-	-	-	-	3	6	
S	ARA Saalachtal-Saalfelden	-	-	-	-	-	-	-	1	14	
S	ARA Salzach-Pongau	-	-	-	-	-	2	4	9	17	
S	ARA Salzburger Ennstal	-	-	-	-	-	-	-	12	8	
S	ARA Siggerwiesen	-	-	-	-	5	10	12	24	28	
S	ARA Tennengau-Süd-Kuchl	-	-	-	-	-	-	5	13	16	
S	ARA Zeller Becken	-	-	-	-	5	4	9	9	11	
St	Bad Aussee	-	-	-	-	22	8	-	6	3	
St	Graz-Gössendorf	-	-	-	-	-	7	3	-	6	
St	Kapfenberg/Mürz-IV	-	-	-	-	24	20	-	3	3	
T	Fritzens	-	-	-	-	-	21	15	-	-	
T	Innsbruck	-	-	29	31	31	29	15	-	-	
T	Kitzbühel	-	-	-	-	-	13	-	-	-	
T	Kufstein	-	-	-	-	-	23	15	-	-	
T	Strass	-	-	-	-	-	22	15	-	-	
V	Bregenz	-	-	-	-	5	4	7	9	13	
V	Dornbirn	-	-	-	-	-	-	-	-	25	
V	Hofsteig	-	-	-	-	-	-	-	8	2	
V	Hohenems	-	-	-	1	5	5	6	15	23	
V	Lech	-	-	-	-	-	-	-	-	5	
V	Leiblachtal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
V	Ludesch	-	-	-	-	-	-	-	-	11	
W	Hauptkläranlage Wien	-	8	8	12	6	11	8	10	9	
Gesamtergebnis		4	14	40	51	169	209	158	181	293	
Anzahl der Kläranlagen		4	5	5	6	21	24	25	28	32	

Tabelle 5: Anzahl der Abwasseranalysen in der Coron-A Datenbank nach Kläranlage und Monat (Teil 2).

Anzahl von SarsCoV2 Titer (Teil 2)		2021						Summen 2020+2021
BL	Kläranlage	Jän	Feb	Mär	Apr	Mai	Jun	
B	Eisenstadt (Eisbachtal)	2	2	2	3	2	2	24
B	Podersdorf	1	2	2	-	-	-	14
B	Siget / Wart (Mittleres Pinka- und Zickenbachtal)	1	2	2	2	2	2	11
K	Abwasserverband Karnische Region	-	2	2	4	4	8	20
K	Abwasserverband Wörthersee West	13	12	14	8	9	8	132
K	Reinhalteverband "Mittleres Lavanttal"	-	-	-	-	4	8	12
K	Reinhalteverband für das Gebiet St. Veit/Glan	-	-	-	-	3	8	11
K	Wasserverband Unteres Drautal	-	-	-	-	4	7	11
K	Wasserverband Wörthersee Ost	31	22	13	5	7	7	122
V	Stadtgemeinde Villach	12	12	13	11	9	8	98
K	WV Abwasserverband Völkermarkt-Jaunfeld	-	-	-	-	3	8	11
K	WV Millstätter See	3	3	3	-	3	8	64
K	WV Ossiacher See	1	-	-	-	4	8	26
N	ARA AV An der Traisen	2	4	4	4	5	4	33
N	ARA Baden	2	2	2	2	2	3	24
N	ARA Guntramsdorf	2	2	2	2	2	3	26
N	ARA GV Abwasserbeseitigung Raum Bad Vöslau	4	3	5	4	4	5	38
O	Freistadt	2	2	2	3	2	2	23
O	Steyr und Umgebung	2	2	3	2	2	2	23
O	Welser Heide	2	2	2	3	2	2	23

Anzahl von SarsCoV2 Titer (Teil 2)		2021						Summen 2020+2021
BL	Kläranlage	Jän	Feb	Mär	Apr	Mai	Jun	
O	Wolfgangsee-Ischl	4	4	4	4	5	4	45
S	ARA Fritztal-Hüttau	-	-	-	-	-	-	9
S	ARA Saalachtal-Saalfelden	9	11	13	3	-	-	51
S	ARA Salzach-Pongau	13	12	13	3	-	-	73
S	ARA Salzburger Ennstal	-	-	-	-	-	-	20
S	ARA Siggerwiesen	28	25	19	3	-	-	154
S	ARA Tennengau-Süd-Kuchl	12	8	12	6	-	-	72
S	ARA Zeller Becken	11	18	8	2	-	-	77
St	Bad Aussee	4	8	8	9	9	7	84
St	Graz-Gössendorf	7	8	8	9	9	6	63
St	Kapfenberg/Mürz-IV	7	8	8	8	9	8	98
T	Fritzens	-	-	-	-	-	-	36*
T	Innsbruck	-	-	-	-	-	-	135*
T	Kitzbüchel	-	-	-	-	-	-	13*
T	Kufstein	-	-	-	-	-	-	38*
T	Strass	-	-	-	-	-	-	37*
V	Bregenz	10	13	20	14	15	15	127
V	Dornbirn	18	28	29	29	25	20	178
V	Hofsteig	7	9	24	30	28	26	138
V	Hohenems	13	14	15	16	15	15	145

* Im Gesamtrahmen des Coron-A-Projekts war nur ein beschränkter Anteil für Daten aus dem Bundesland Tirol vorgesehen, dafür in besonders hoher Dichte (bis zu 7 Werten pro Woche), die bis zum Jahr 2020 in die Coron-A-Datenbank eingespielt wurden. Darüber hinaus wurden zur wissenschaftlichen Nutzung vom Projektpartner Medizinische Universität Innsbruck in Abstimmung mit den zuständigen Stellen des Landes Tirol vollständige Datensätze auch für längere Zeiträume aus dem SARS-CoV-2-Abwasser-Monitoring des Landes Tirol zur Verfügung gestellt.

Anzahl von SarsCoV2 Titer (Teil 2)		2021						Summen 2020+2021
BL	Kläranlage	Jän	Feb	Mär	Apr	Mai	Jun	
V	Lech	8	-	-	-	-	-	13
V	Leiblachtal	-	-	10	19	-	-	29
V	Ludesch	-	-	-	-	-	-	11
W	Hauptkläranlage Wien	10	9	8	7	8	7	118
Gesamtergebnis		241	249	270	215	196	211	2510
Anzahl der Kläranlagen		30	29	30	28	28	28	

Quelle: TU Wien (Datenbasis: EMREG-OW und Coron-A Datenbank).

Tabelle 6 zeigt die Anzahl der erhobenen Daten aufgeschlüsselt nach Bundesland und Monat. Wie bereits einleitend erwähnt, umfassen Tabelle 4, Tabelle 5 und Tabelle 6 auch Daten des seit 2021 laufenden Landesmonitorings aus Vorarlberg und Kärnten sowie einen verdichteten Datensatz für zwei niederösterreichische Anlagen sowie Daten aus Wien, die dem Konsortium für die Projektbearbeitung zur Verfügung gestellt wurden. Diese Daten aus Wien wurden nicht im Rahmen von Coron-A erhoben, jedoch ebenfalls in die Datenbank eingepflegt und zur wissenschaftlichen Bearbeitung zur Verfügung gestellt.

Tabelle 6: Anzahl der Abwasseranalysen in der Coron-A Datenbank nach Bundesland und Monat.

Anzahl von SarsCoV2 Titer		B	K	NÖ	OÖ	S	St	T	V*	W	Gesamt
2020	Apr	1	-	3	-	-	-	-	-	-	4
2020	Mai	1		5	-	-	-	-	-	8	14
2020	Jun	-	-	3	-	-	-	29	-	8	40
2020	Jul	-	6	-	1	-	-	31	1	12	51
2020	Aug	4	50	5	7	10	46	31	10	6	169
2020	Sep	1	15	4	10	16	35	108	9	11	209
2020	Okt	5	20	8	11	30	3	60	13	8	158
2020	Nov	4	34	11	10	71	9	-	32	10	181

Anzahl von SarsCoV2 Titer		B	K	NÖ	OÖ	S	St	T	V*	W	Gesamt
2020	Dez	4	70	8	11	100	12	-	79	9	293
2021	Jän	4	60	10	10	73	18	-	56	10	241
2021	Feb	6	51	11	10	74	24	-	64	9	249
2021	Mär	6	45	13	11	65	24	-	98	8	270
2021	Apr	5	28	12	12	17	26	-	108	7	215
2021	Mai	4	50	13	11	-	27	-	83	8	196
2021	Jun	4	78	15	10	-	21	-	76	7	211
Gesamt		49	507	121	114	456	245	259	641	118	2510

* inkl. Daten Landesmonitoring

Quelle: TU Wien (Datenbasis: EMREG-OW und Coron-A Datenbank).

Im Gesamtrahmen des Coron-A-Projekts war nur ein beschränkter Anteil für Daten aus dem Bundesland Tirol vorgesehen dafür in besonders hoher Dichte (bis zu 7 Werten pro Woche) vorgesehen, die bis zum Jahr 2020 in die Coron-A-Datenbank eingespielt wurden. Darüber hinaus wurden zur wissenschaftlichen Nutzung vom Projektpartner Medizinische Universität Innsbruck in Abstimmung mit den zuständigen Stellen des Landes Tirol vollständige Datensätze auch für längere Zeiträume aus dem SARS-CoV-2-Abwasser-Monitoring des Landes Tirol zur Verfügung gestellt.

Wie oben erwähnt, hat sich die Anzahl der untersuchten Kläranlagen im Laufe des Projekts verändert. In Tabelle 7 und Tabelle 8 sind für den Überblick daher jene Einwohnerzahlen zusammengefasst, die durch die in Coron-A durchgeführten Untersuchungen erfasst wurden. Die Zahlen ergeben sich aus den für die einzelnen Kläranlagen angegebenen angeschlossenen Einwohner:innen (Zensus 2018) und wurden der Emissionsregister-Datenbank (EMREG-OW Datenbank) des Bundes entnommen (gemäß Emissionsregisterverordnung für Oberflächenwasserkörper, EmRegV-OW, BGBl. II 207/2017 in der Fassung von BGBl. II 63/2018).

Tabelle 7: Anzahl der durch die Kläranlagen angeschlossenen Einwohner:innen in der Coron-A Datenbank nach Bundesland und Monat – 2020.

2020									
Kläranlage	Apr	Mai	Jun	Jul	Aug	Sep	Okt	Nov	Dez
Burgenland	21.000	21.000	-	-	23.100	21.000	23.100	23.100	23.100
Kärnten*	-	-	-	78.600	167.663	112.663	167.663	326.163	326.163
Nieder- österreich	82.552	82.552	82.552	-	162.154	135.081	162.154	162.154	162.154
Ober- österreich	-	-	-	15.000	188.049	188.049	188.049	188.049	188.049
Salzburg	-	-	-	-	354.385	392.807	413.177	481.372	481.372
Steiermark	-	-	-	-	38.910	394.232	355.323	38.910	394.232
Tirol	-	-	172.413	172.413	172.413	309.824	299.024	-	-
Vorarlberg*	-	-	-	41.696	74.167	74.167	74.167	141.128	224.346
Wien	-	1.900.000	1.900.000	1.900.000	1.900.000	1.900.000	1.900.000	1.900.000	1.900.000
Gesamt- ergebnis	103.552	2.003.552	2.154.965	2.207.709	3.080.841	3.527.823	3.582.657	3.260.876	3.699.416

* inkl. Daten Landesmonitoring

Quelle: TU Wien (Datenbasis: Coron-A Datenbank und Daten Landesmonitoring).

Tabelle 8: Anzahl der durch die Kläranlagen angeschlossenen Einwohner:innen in der Coron-A Datenbank nach Bundesland und Monat – 2021.

2021						
Kläranlage	Jän	Feb	Mär	Apr	Mai	Jun
Burgenland	36.661	36.661	36.661	34.561	34.561	34.561
Kärnten*	326.163	313.763	313.763	258.763	439.083	439.083
Niederösterreich	162.154	162.154	162.154	162.154	162.154	162.154
Oberösterreich	188.049	188.049	188.049	188.049	188.049	188.049
Salzburg	444.815	444.815	444.815	444.815	-	-
Steiermark	394.232	394.232	394.232	394.232	394.232	394.232
Tirol*	-	-	-	-	-	-

2021						
Kläranlage	Jän	Feb	Mär	Apr	Mai	Jun
Vorarlberg**	194.012	192.494	204.568	204.568	192.494	192.494
Wien	1.900.000	1.900.000	1.900.000	1.900.000	1.900.000	1.900.000
Gesamtergebnis	3.646.086	3.632.168	3.644.242	3.587.142	3.310.573	3.310.573

* Im Gesamtrahmen des Coron-A-Projekts war nur ein beschränkter Anteil für Daten aus dem Bundesland Tirol vorgesehen dafür in besonders hoher Dichte (bis zu 7 Werten pro Woche), die bis zum Jahr 2020 in die Coron-A-Datenbank eingespielt wurden. Darüber hinaus wurden zur wissenschaftlichen Nutzung vom Projektpartner Medizinische Universität Innsbruck in Abstimmung mit den zuständigen Stellen des Landes Tirol vollständige Datensätze auch für längere Zeiträume aus dem SARS-CoV-2-Abwasser-Monitoring des Landes Tirol zur Verfügung gestellt.

**inkl. Daten Landesmonitoring

Quelle: TU Wien (Datenbasis: Coron-A Datenbank und Daten Landesmonitoring).

5.2 Daten zur Prävalenz des SARS-CoV-2 Genoms im Zulauf von Kläranlagen

Die im Rahmen des Coron-A Projekts erhobenen und in die Datenbank eingepflegten Daten dienen in erster Linie als Grundlage für die Bearbeitung der wissenschaftlichen Fragestellungen (siehe Kapitel 1, 4, 6, 7 und 8).

In den nachfolgenden Abbildungen (Abbildung 27 bis Abbildung 35) sind alle erhobenen Messdaten grafisch über die Zeit dargestellt, wobei die Daten in den Abbildungen bundesländerweise zusammengefasst sind. Bei den dargestellten Daten handelt es sich um die Rohdaten (Genkopien pro mL) und nicht um mittels Abwasserparametern bzw. Humanmarkern normierte Rechenwerte, da nicht für alle Kläranlagen alle Informationen zu den Normierungsparametern zur Verfügung stehen (siehe weiter unten) und die Rohdaten somit den Datenstand am besten widerspiegeln. Die Grafiken wurden direkt im internen Bereich der Projekthomepage generiert, stellen die unterste Basis der Datenverarbeitung bzw. Visualisierung dar und verdeutlichen die Anzahl der beprobten Anlagen sowie die zeitliche Auflösung.

Quellenangaben zu den nachfolgenden Abbildung 27 bis Abbildung 36:

Quelle: TU Wien (Datenbasis: Coron-A Datenbank).

Abbildung 27: Prävalenzen (Genkopien pro mL Abwasser) über die Zeit für die Kläranlagen Burgenland.

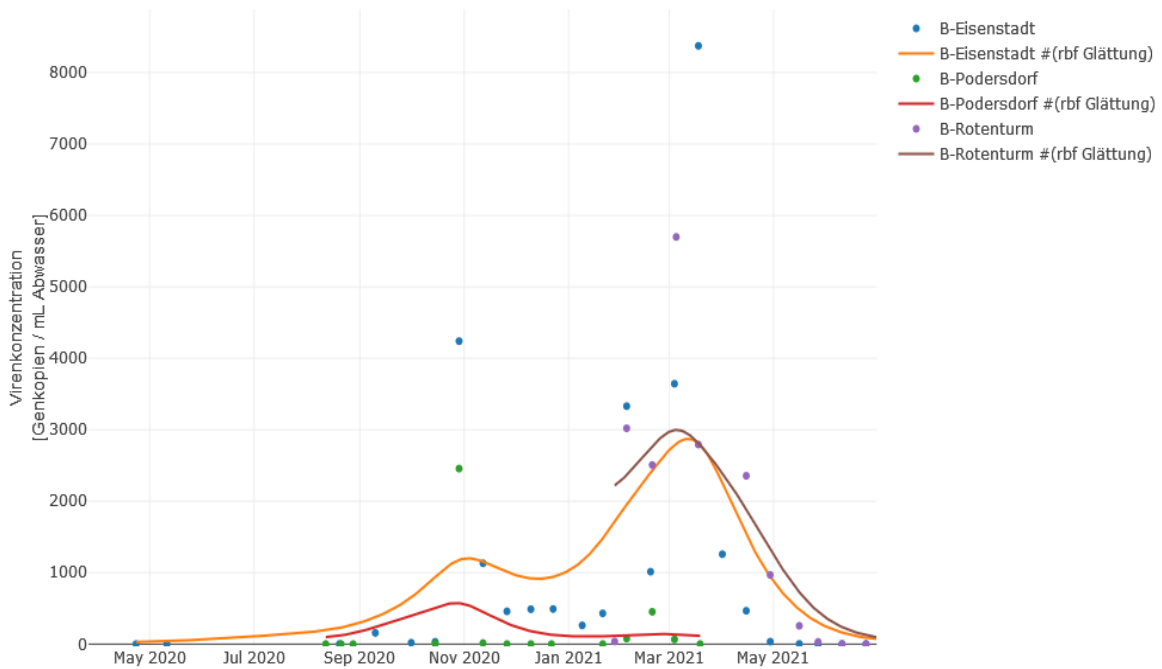


Abbildung 28: Prävalenzen (Genkopien pro mL Abwasser) über die Zeit für die Kläranlagen Kärnten.

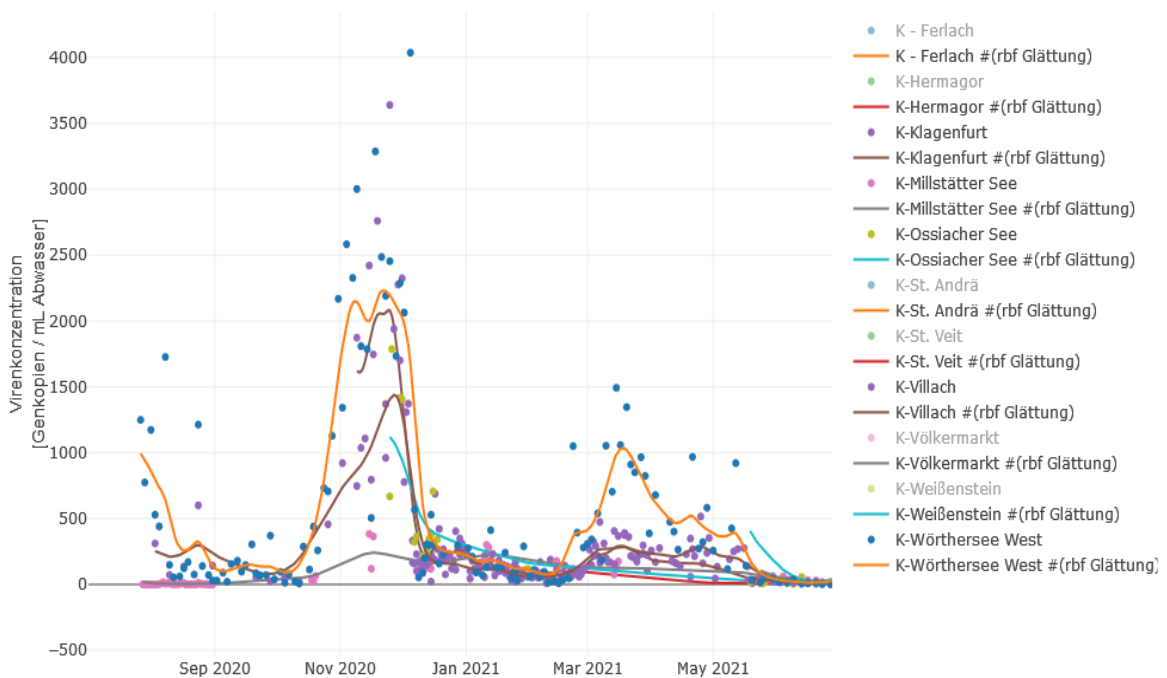


Abbildung 29: Prävalenzen (Genkopien pro mL Abwasser) über die Zeit für die Kläranlagen Niederösterreich.

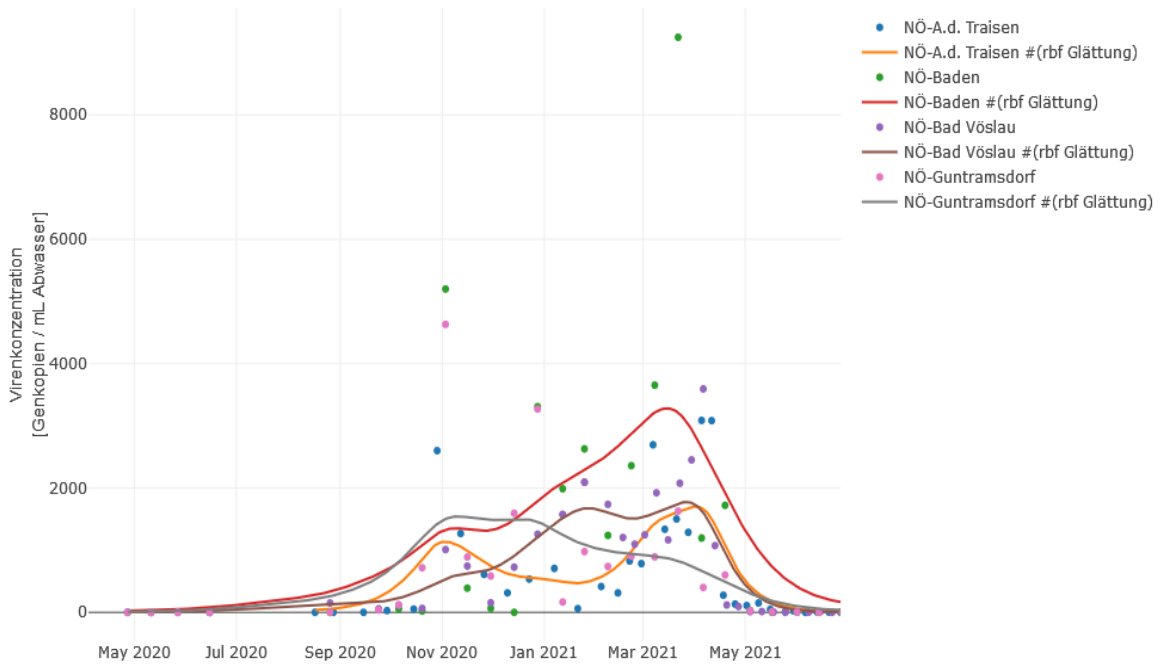


Abbildung 30: Prävalenzen (logarithmische Darstellung der Genkopien pro mL Abwasser) über die Zeit für die Kläranlagen Oberösterreich. Wegen eines einzelnen, besonders hohen Wertes wurde eine logarithmische Darstellung gewählt.

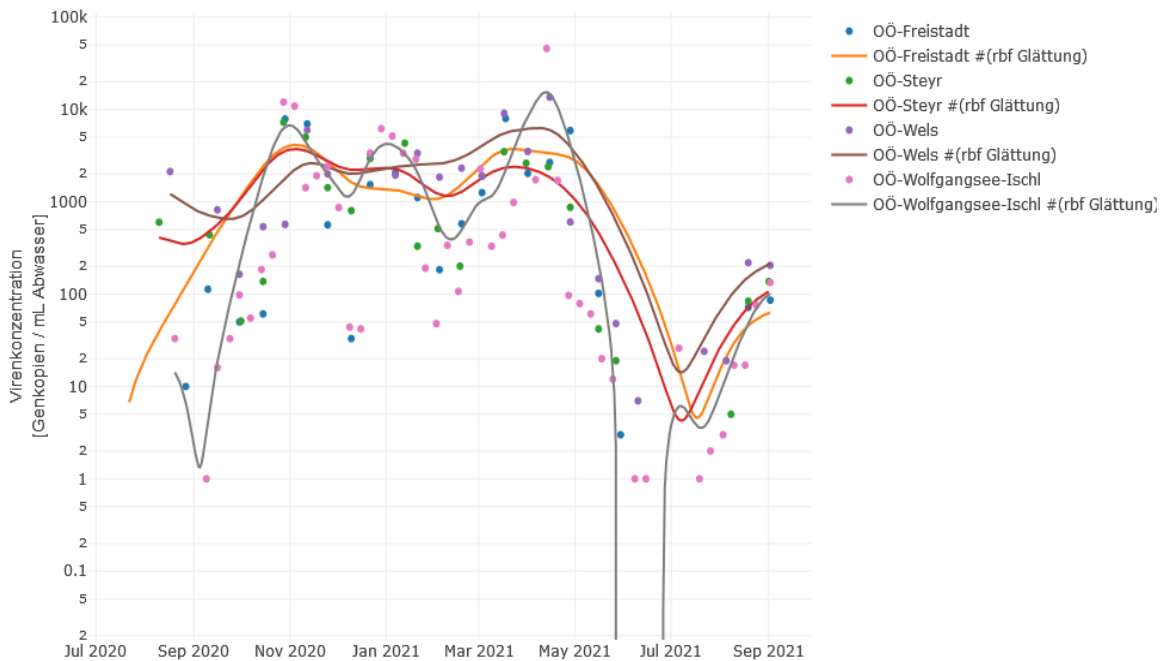


Abbildung 31: Prävalenzen (Genkopien pro mL Abwasser) über die Zeit für die Kläranlagen Salzburg.

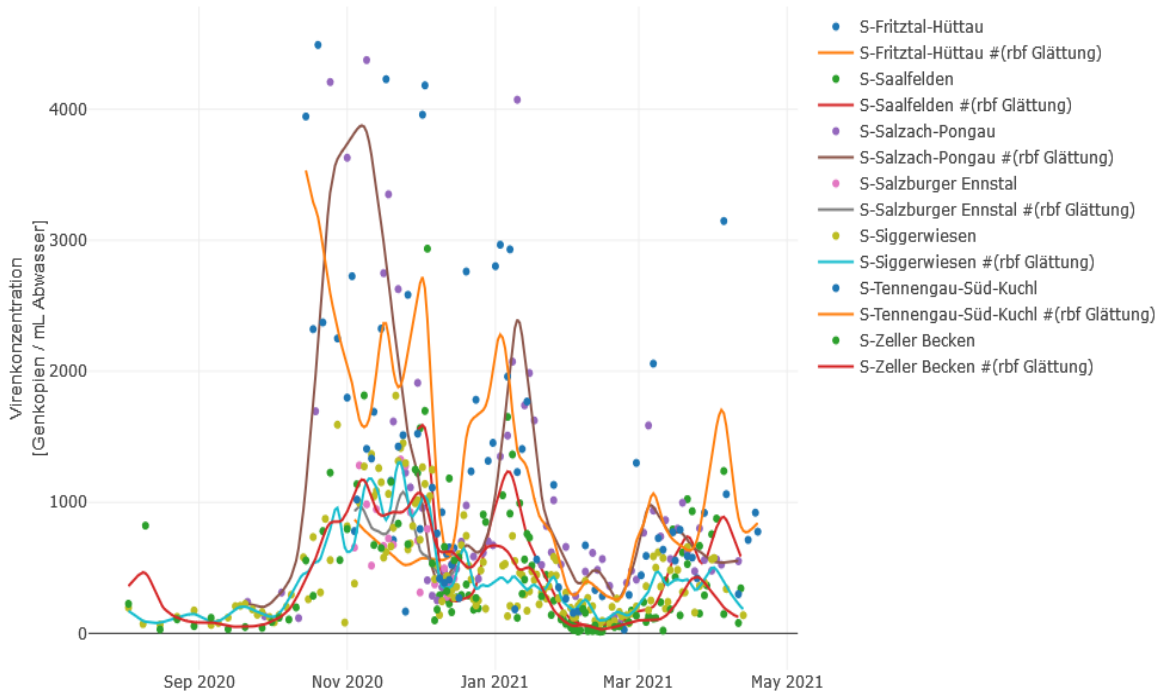


Abbildung 32: Prävalenzen (Genkopien pro mL Abwasser) über die Zeit für die Kläranlagen Steiermark.

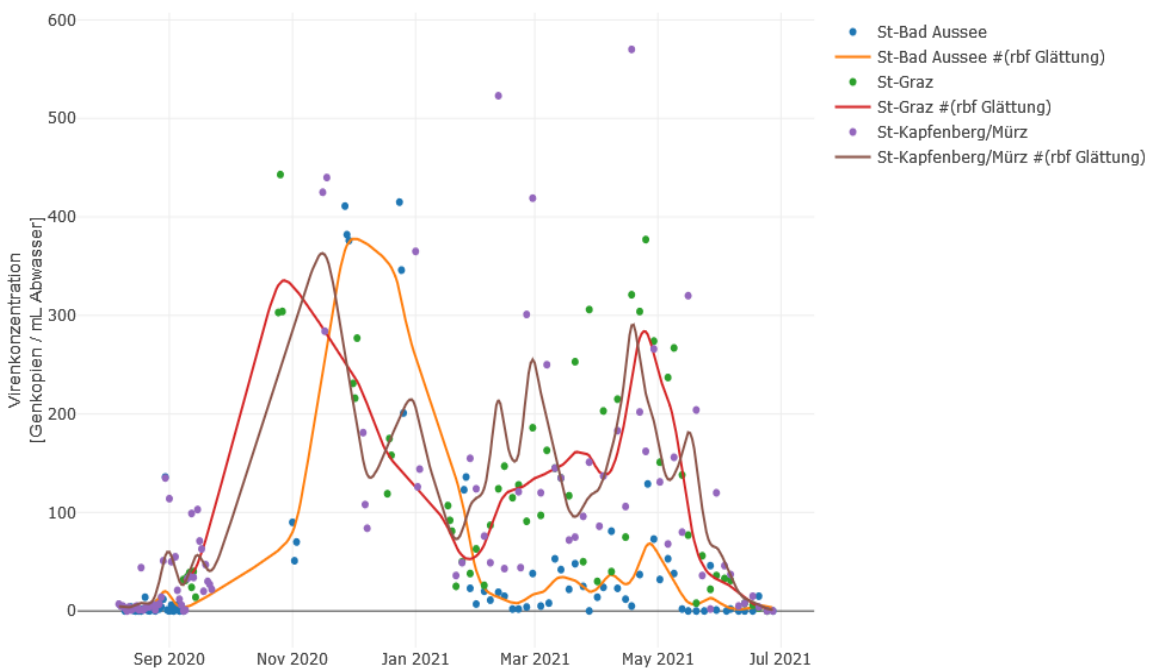


Abbildung 33: Prävalenzen (Genkopien pro mL Abwasser) über die Zeit für die Kläranlagen Tirol (es stehen nur Daten bis Oktober 2020 zur Verfügung).

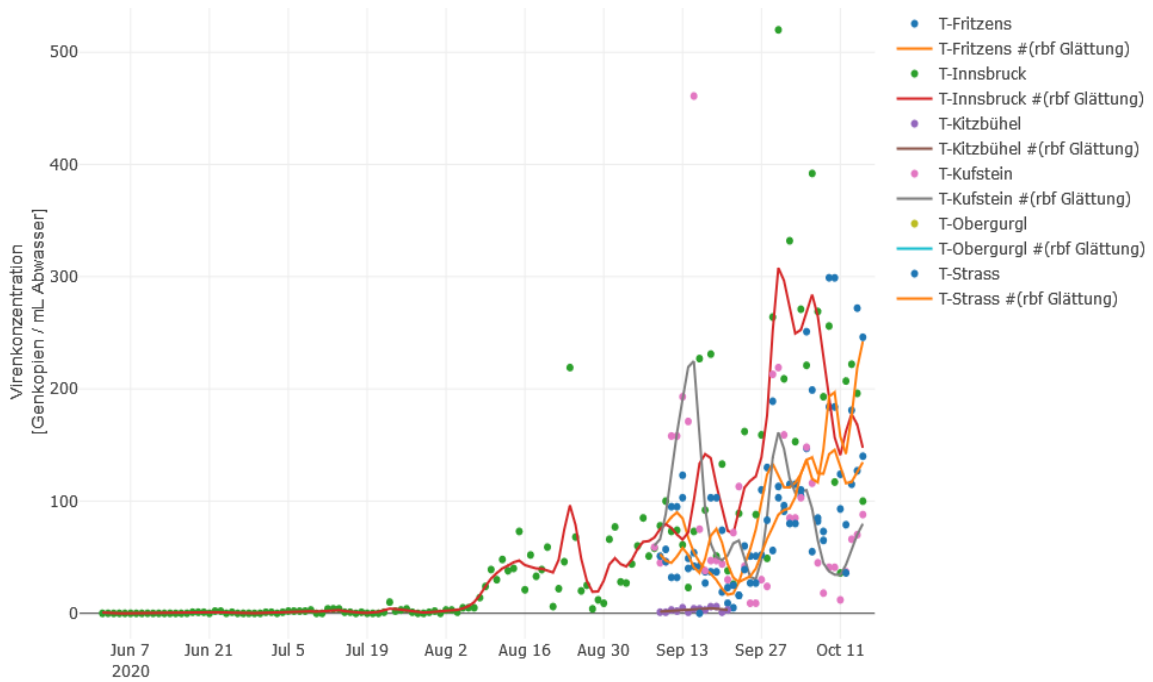


Abbildung 34: Prävalenzen (Genkopien pro mL Abwasser) über die Zeit für die Kläranlagen Vorarlberg.

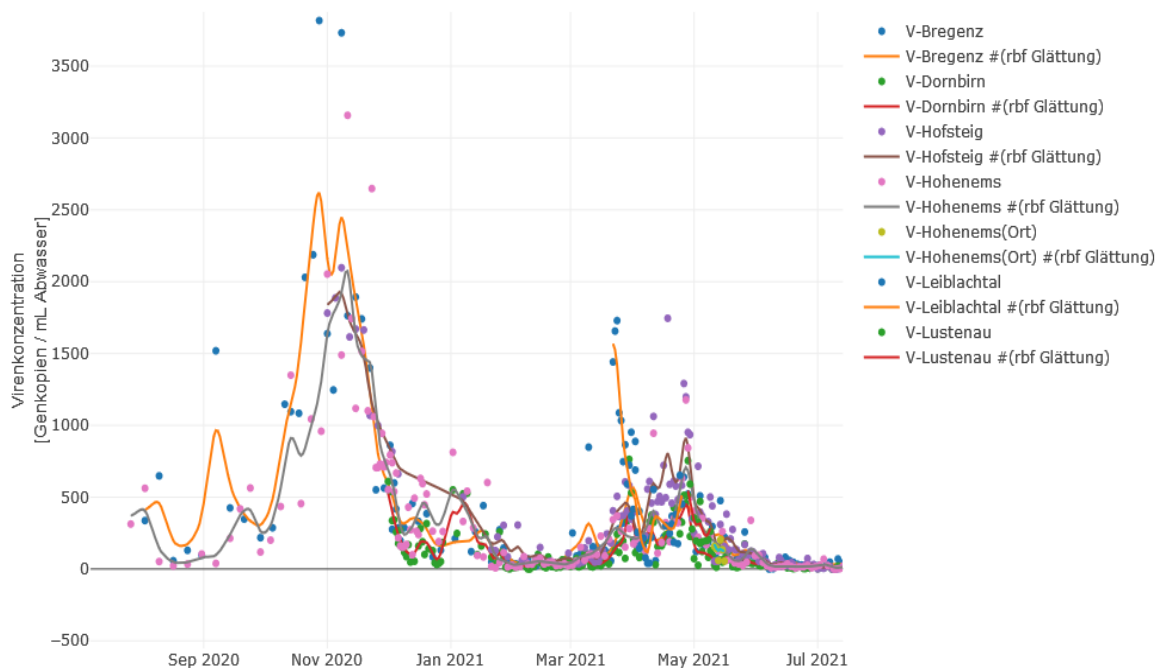


Abbildung 35: Prävalenzen (logarithmische Darstellung der Genkopien pro mL Abwasser) über die Zeit für die Kläranlage Wien .

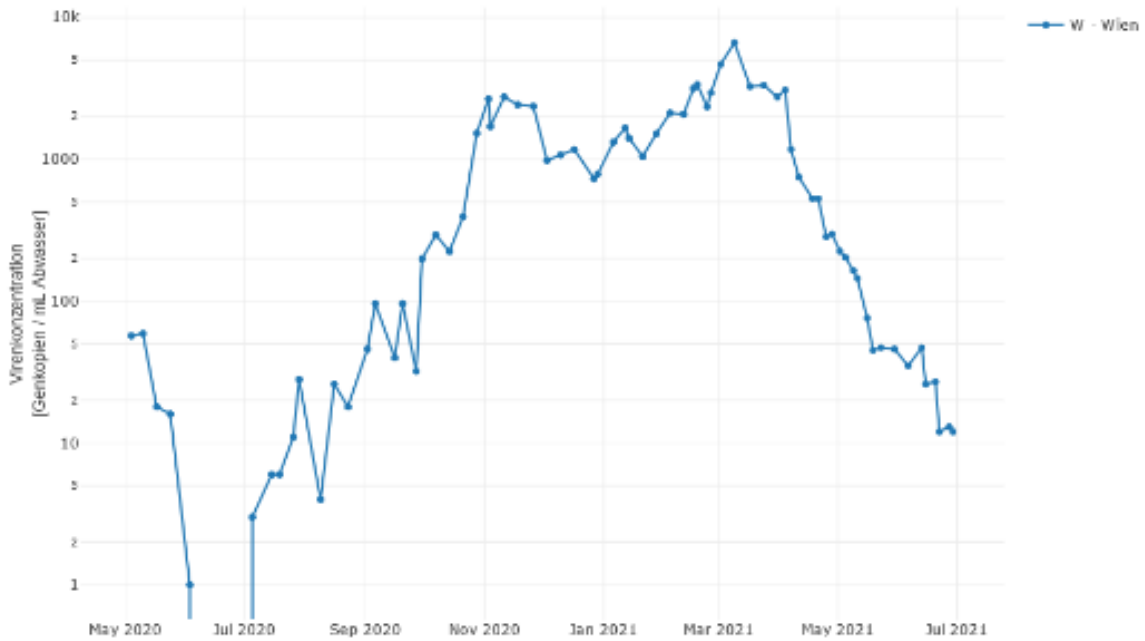


Abbildung 36: Prävalenzen (logarithmische Darstellung der Genkopien pro mL Abwasser) über die Zeit für alle Kläranlagen in der Coron-A Datenbank.

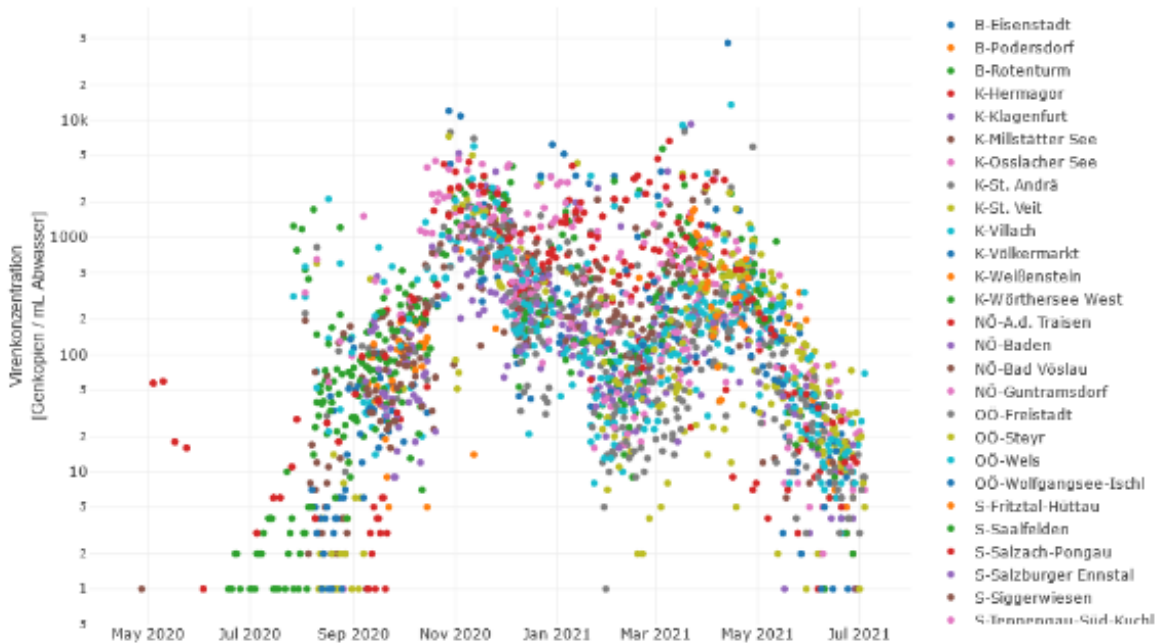


Abbildung 36 fasst alle Daten der Datenbank über die gesamte Projektdauer zusammen. Trotz der Heterogenität der lokalen Bedingungen sind die niedrige Prävalenzphase im Sommer 2020, die „zweite Welle“ mit Peak im November 2020 sowie die „dritte Welle“ mit Peak im April 2021 und das flächendeckende Abklingen mit Juli 2021 auch in den Rohdaten zu erkennen.

Die Rohdaten (Genkopien pro mL) sind neben dem Ausscheideverhalten (u. a. Schweregrad der Erkrankung, Dauer der Erkrankung, Virenvariante), dem Verhalten im Kanal und der Probenahme auch aufgrund der Abhängigkeit des Rohabwassersignals generell von Verdünnungseffekten beeinflusst und sind damit stark von den hydraulischen Gegebenheiten zum Zeitpunkt der Probenahme abhängig. Die Verdünnungseffekte ergeben sich durch Mischwasserereignisse unterschiedlichster Intensität und der Saisonalitäten im Wasserverbrauch. Die Verwendung abwassertypischer chemischer (z. B. Cotinin oder Koffein) oder mikrobieller Parameter (z. B. PMMoV-Pepper mild mottle virus oder CrAssphage – cross-assembly phage) mit einer einwohner:innenspezifischen Tagesfracht (z. B. 120 g CSB oder 11 g Gesamtstickstoff pro Einwohner:innen und Tag) kann die hydraulischen Fluktuationen kompensieren. Während für die chemischen und mikrobiellen Parameter eine getrennte Erhebung notwendig ist, liegen die klassischen abwasserassoziierten Parameter üblicherweise vor, da sie etwa im Zuge der Eigenüberwachung der Kläranlagen vor Ort erhoben werden. Details zu diesen Überlegungen können dem „Factsheet 5 – Abwassermarker“ im Anhang entnommen werden.)

Auf Grund der Bestimmungen der 1. AEV erfolgt die Analytik jedoch in Abhängigkeit von der Kläranlagengröße für unterschiedliche Parameter und in unterschiedlicher Auflösung, sodass auch die Verwendung der abwassertypischen Parameter nicht vollständig möglich ist. Dies zeigt sich auch bei der im internen Bereich der Homepage automatisierten Normierung der Rohdaten. Während der CSB bei beinahe allen Proben vorliegt (einzelne Ausnahmen, wenn Beprobungstermin nicht synchron mit dem Analysenworkflow der Kläranlage), ist die Datendichte für Ammonium und noch mehr für Gesamtstickstoff weniger ausgeprägt. Dieser Unterschied ist auch in den folgenden Abbildungen sichtbar, wo exemplarisch die Messdaten Vorarlbergs als Rohsignal (Abbildung 37), normiert auf CSB (Abbildung 38) und normiert auf Ammonium-N (Abbildung 39) dargestellt sind.

Abbildung 37: Prävalenzen (logarithmische Darstellung der Genkopien) über die Zeit für die Kläranlagen in Vorarlberg. Vergleich unterschiedlicher Normierungen: Rohdaten.

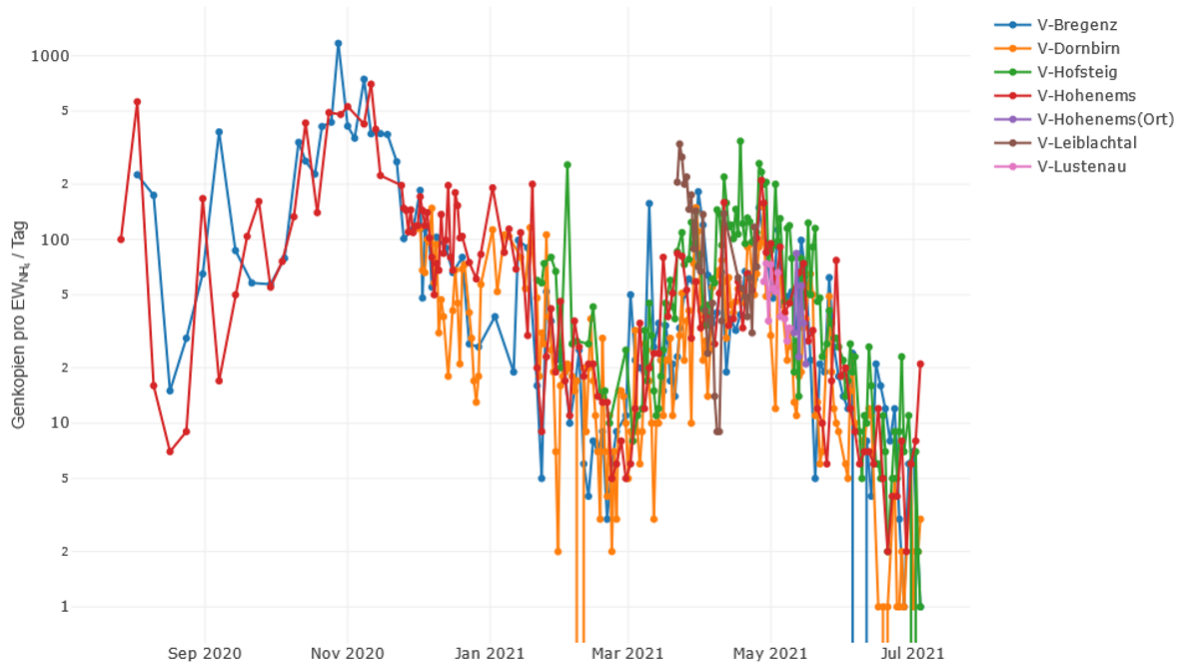


Abbildung 38: Prävalenzen (logarithmische Darstellung der Genkopien) über die Zeit für die Kläranlagen in Vorarlberg. Vergleich unterschiedlicher Normierungen: normiert auf CSB (EW₁₂₀).

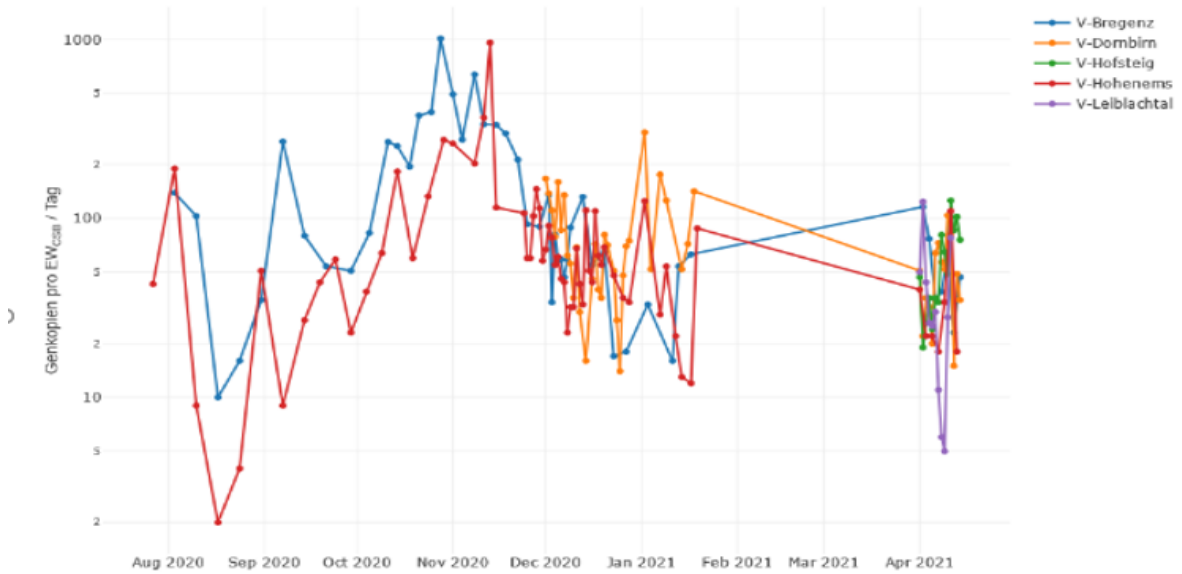
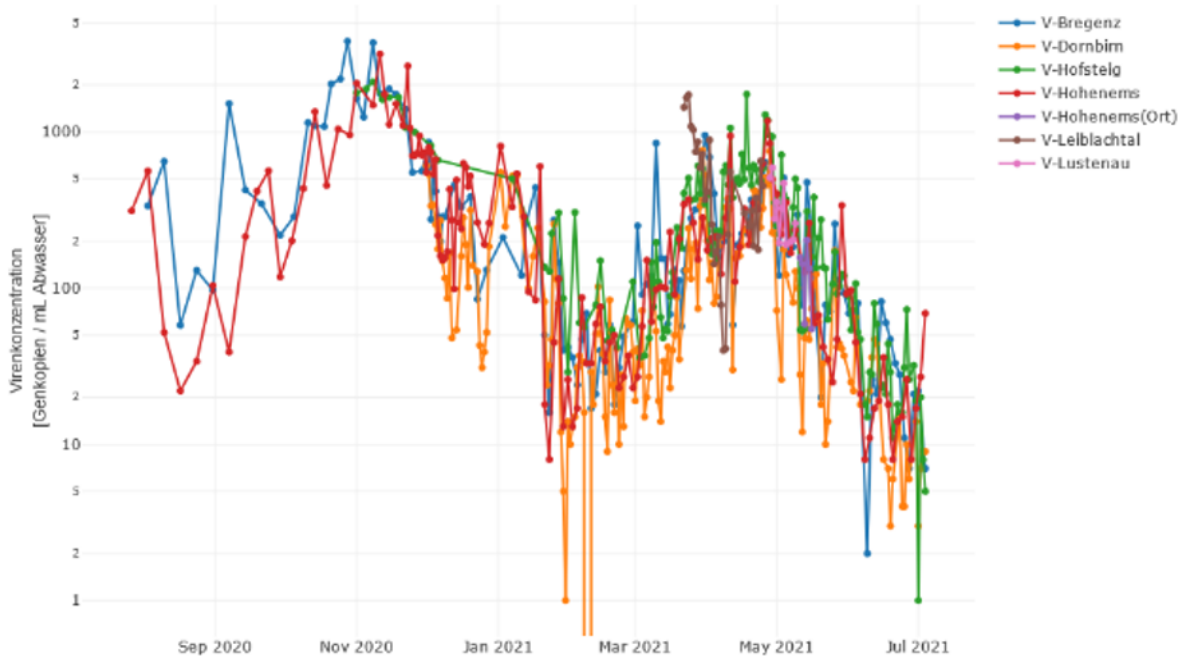


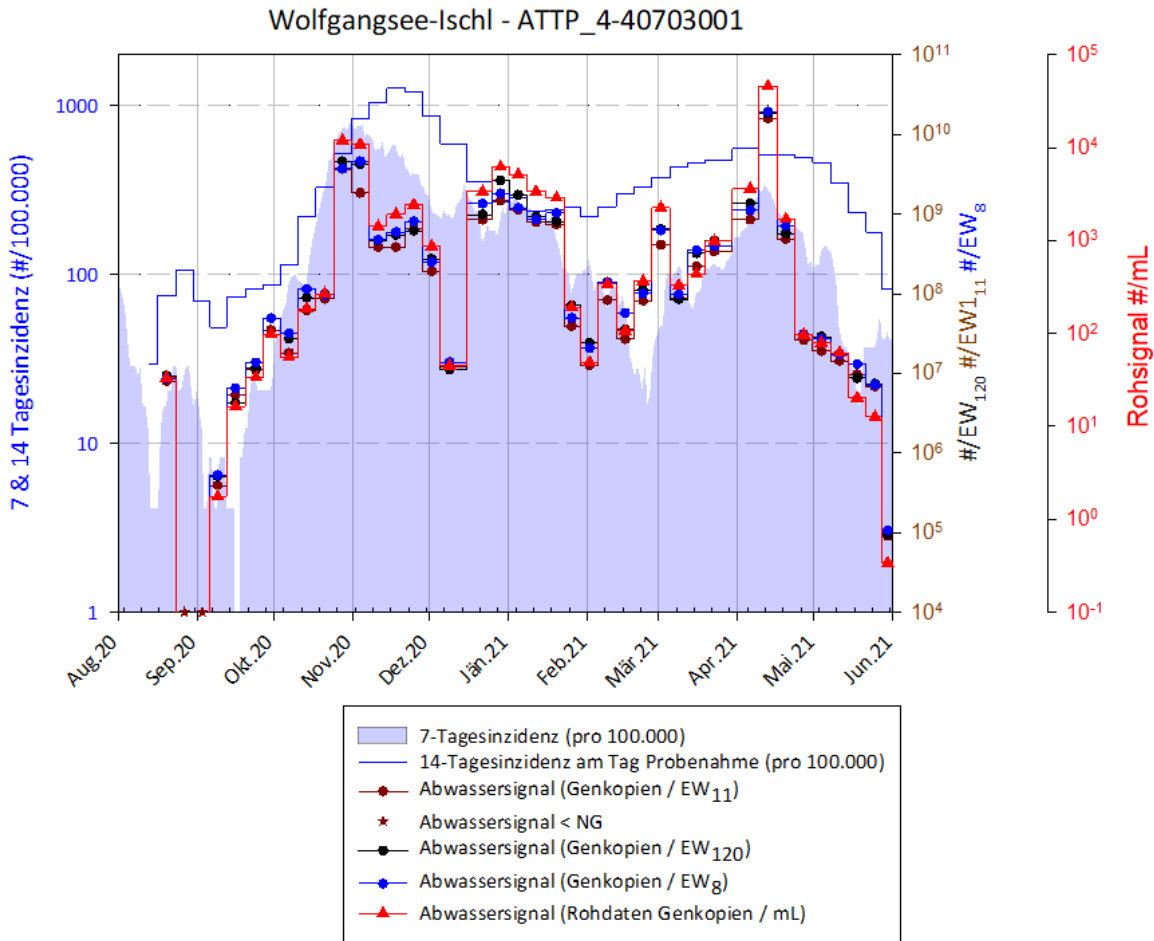
Abbildung 39: Prävalenzen (logarithmische Darstellung der Genkopien) über die Zeit für die Kläranlagen in Vorarlberg. Vergleich unterschiedlicher Normierungen: normiert auf $\text{NH}_4\text{-N}$ (EW_8).



Quelle (Abb. 38-40): TU Wien (Datenbasis: Coron-A Datenbank).

In Abbildung 40 sind die unterschiedlichen Normierungen des Rohsignals auf CSB (EW_{120}), TN (EW_{11}) und Ammonium (EW_8) (Basis: Eigenüberwachung Kläranlage) im Vergleich zum Rohsignal für den Zeitraum August 2020 bis Mai 2021 dargestellt. Trotz gewisser Unterschiede, liegen die Zahlenwerte der EW Normierung für die einzelnen Parameter in einem vergleichbaren Bereich – was für kommunale Anlagen nicht überraschend ist und – spiegeln dieselbe Dynamik im SARS-CoV-2 Signal wider, sodass alle drei Normierungsparameter grundsätzlich für eine Normierung geeignet sind. Die abgebildete Anlage wurde ausgewählt, um den Effekt der unterschiedlichen Normierungen zu demonstrieren und weil es durch die Ausprägung des Kanalsystems als Trennkanalisation zu keinen Einflüssen durch Einträge von außen oder Verdünnungen durch Mischwasserereignisse kommt.

Abbildung 40: Prävalenzen über die Zeit für die Kläranlage Wolfgangsee-Ischl
 Vergleich unterschiedlicher Normierungen (Rohdaten; CSB (EW₁₂₀) TN (EW₁₁); NH₄-N (EW₈)).



Quelle: TU-Wien

5.2.1 Tauglichkeit zur Frühwarnung

Für diese Untersuchung wurden alle 43 Tiroler Kläranlagen mit einem Bemessungswert EW₆₀ über 5.000 im Rahmen einer Querschnittstudie am 24.8.2020 gleichzeitig beprobt. Fünf Kläranlagen wurden in eine Längsschnittstudie eingeschlossen (Innsbruck, Fritzens, Strass im Zillertal und Kitzbühel). In der Steiermark wurden drei Kläranlagen untersucht (Graz (310.000 Einwohner:innen), Kapfenberg (28.000 Einwohner:innen), und Bad Aussee (11.000 Einwohner:innen)). In der Kläranlage Graz wurden vom 8.9.–20.12.2020 monatlich und ab 17.1.2021 zweimal wöchentlich Proben gezogen. In der Kläranlage Kapfenberg wurden vom 7.8.–22.9.2020 täglich, vom 16.11.2020–03.01.2021 monatlich und ab

25.1.2021 zweimal wöchentlich Proben gezogen. In der Kläranlage Bad Aussee wurden vom 10.8.–8.9.2020 täglich, vom 1.11.2020–26.12.2020 monatlich und ab 25.1.2021 zweimal wöchentlich Proben gezogen.

Am 24.08.2020 wurden Abwasserproben aller 43 Tiroler Kläranlagen ausgewertet. Anhand der Anzahl positiv getesteter Personen in den Einzugsgebieten der Kläranlagen wurden die Kläranlagen in zwei Gruppen unterteilt: eine Gruppe Positivkontrollen und eine Gruppe Negativkontrollen. Mit diesen zwei Datensätzen ließ sich die Zuverlässigkeit des Abwassermonitorings evaluieren.

In den Einzugsgebieten von 30 Kläranlagen wurden im Zeitraum 17.–31.8.2020 Personen positiv auf SARS-CoV-2 getestet. Diese 30 Kläranlagen wurden als Positivkontrollen verwendet, um die Sensitivität (= Richtig-Positiv-Rate) des Frühwarnsystems zu evaluieren. In 27 von 30 Kläranlagen wurde das Virus im Abwasser nachgewiesen, in drei Kläranlagen konnte kein Nachweis erbracht werden. In sechs der 27 Kläranlagen mit einem Virennachweis lag die ermittelte Viruskonzentration unter der Nachweisgrenze der Methode. Je nach Zählweise lag die Sensitivität somit bei 90 % bzw. 70 %. Im Untersuchungszeitraum waren allerdings in keinem der Einzugsgebiete, die den neun Kläranlagen mit nicht eindeutigen bzw. negativen Testergebnis entsprechen, mehr als fünf aktiv positiv getestete Personen registriert worden.

Es gab 13 Kläranlagen, die im Zeitraum 17.–31.8.2020 in deren Einzugsgebiet durch Humantestungen keine positiv getesteten Personen gefunden wurden. Diese Kläranlagen wurden als Negativkontrollen verwendet, um die Spezifität (= Richtig-Negativ-Rate) des Frühwarnsystems zu evaluieren. In drei dieser Kläranlagen wurden Spuren von Viren-RNA detektiert. Die ermittelten Viruskonzentrationen lagen unter der Nachweisgrenze der Methode. Je nach Zählweise lag die Sensitivität somit bei 77 % bzw. 100 %.

Die Tauglichkeit des Abwassermonitorings als Frühwarnsystems konnte anhand der Ergebnisse der in Innsbruck durchgeführten Längsschnittstudie gezeigt werden (Abbildung 41). Die Fallzahlen blieben im Laufe des Julis 2020 bei unter zwanzig durch Humantestungen als aktiv positiv getestet klassifizierten Personen. Das Abwassermonitoring lieferte in der Zeit durchgehend positive Ergebnisse. Daraus kann abgeleitet werden, dass das Abwassermonitoring in der Lage ist, grob 5–20 virusausscheidende Personen unter 100.000 Gesunden zu erkennen. Ein zweiter Anstieg der Konzentration von SARS-CoV-2 RNA im Inns-

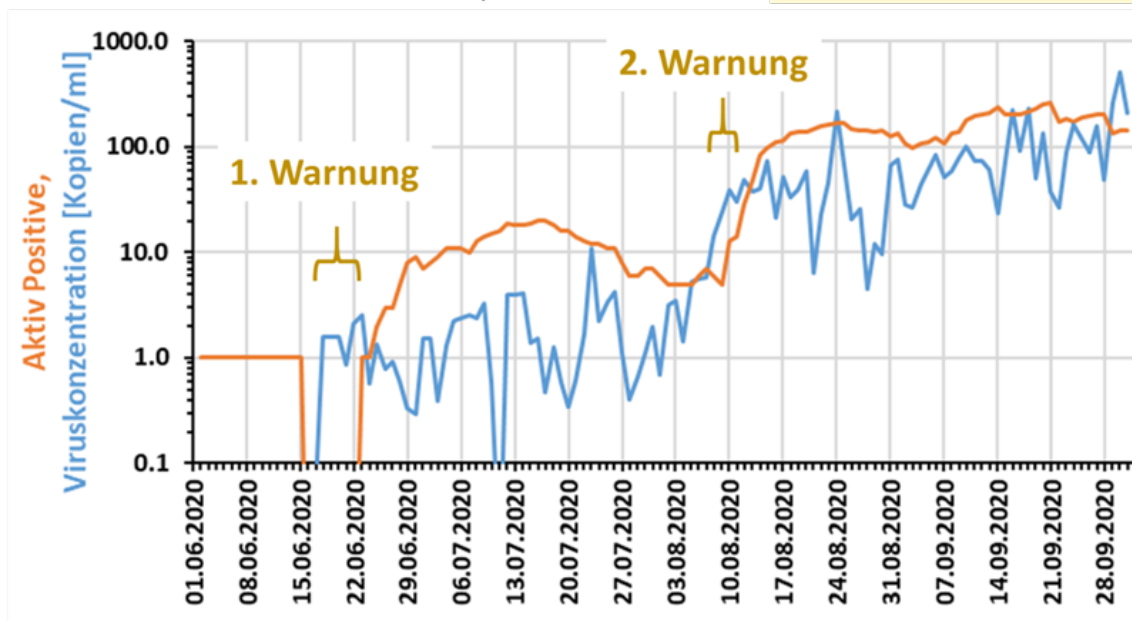
brucker Abwasser konnte Anfang August 2020 beobachtet werden. Die offiziellen Fallzahlen zogen dann 3–5 Tage später nach. Damit konnte erneut gezeigt werden, dass das Abwassermonitoring als Frühwarnsystem dienen kann.

Abbildung 41: Veränderung der Konzentration von SARS-CoV-2 RNA im Innsbrucker Abwasser im Zeitraum Juni bis September 2020 im Vergleich mit der Anzahl an aktiv positiven getesteten Personen im Einzugsgebiet der Kläranlage.

Kläranlage Innsbruck:

Innsbruck und 14 Umlandgemeinden
 174.000 Einwohner
 260.000 Einwohneräquivalente

- 3-7 Tage Vorlaufzeit
- 10 in 174.000 Einwohner



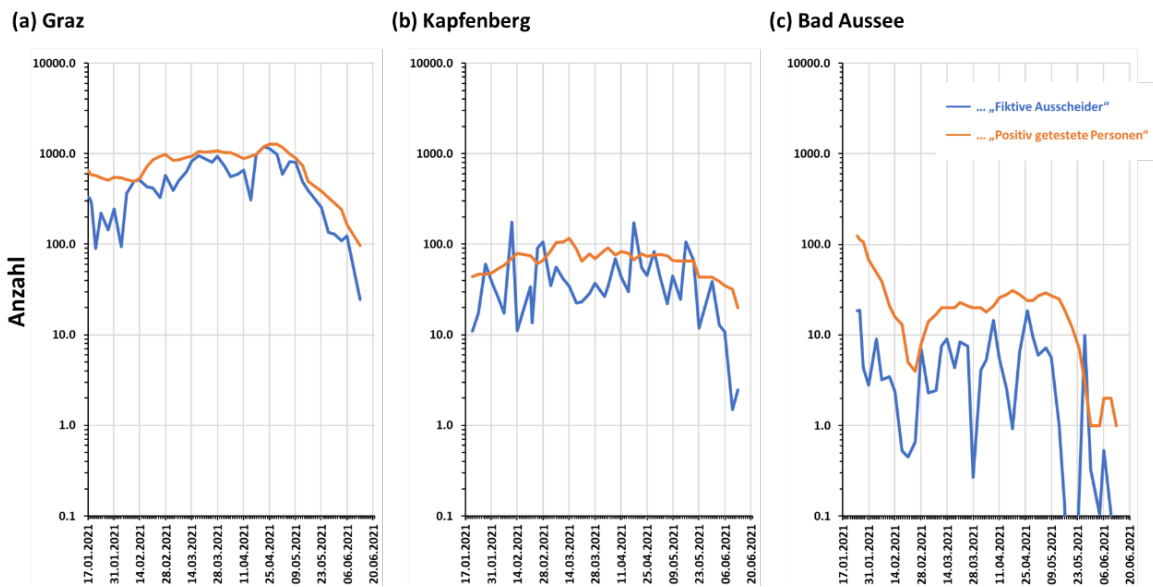
Quelle: Medizinische Universität Innsbruck

5.2.2 Abwassermonitoring als Entwarnsystem

Die Tauglichkeit des Abwassermonitorings zum Trendmonitoring als auch zur Verwendung als Entwarnsystem konnte mithilfe der Ergebnisse von steirischen Kläranlagen demons-

triert werden. Abbildung 42 zeigt die zeitliche Entwicklung der Anzahl an „fiktiven Ausscheidern“⁴ in den drei untersuchten steirischen Regionen im Vergleich zur jeweiligen Anzahl an positiv getesteten Personen für den Zeitraum Jänner bis Juni 2021.

Abbildung 42: Zeitliche Entwicklung der Anzahl an „positiv getesteten Personen“ sowie der Anzahl an „fiktiven Ausscheidern“ in drei steirischen Regionen von Jänner bis Juni 2021.



Quelle: Medizinische Universität Innsbruck

In allen drei Fällen zeigten die beiden Kurven einen parallelen Verlauf (Abbildung 42), was auf eine gute Übereinstimmung der aus dem Abwassermonitoring und den Humantestungen abgeleiteten Informationen zur zeitlichen Entwicklung der Pandemie hindeutet. Eine Auffälligkeit war, dass der zeitliche Verlauf der Abwasserdaten generell weniger stabil als der Verlauf der aufgrund von Humantestungen ermittelten Anzahl an positiv getesteten Personen war. Verschiedenste Faktoren, wie etwa Regen, Schmutzanteil, Probenahme, Lagerbedingungen oder Fallzahlen, können das Messergebnis beeinflussen und auch zu Ausreißern führen. Daher sollte bei der Lagebeurteilung eine „konservative“

⁴ siehe „Konzept der Fiktiven Ausscheider“ im Anhang

Vorgehensweise gewählt werden und erst nach Bestätigung eines Trends Maßnahmen eingeleitet werden.

In allen drei steirischen Regionen wurde ab Anfang Mai 2021 ein Rückgang der im Abwasser gemessenen SARS-CoV-2 RNA-Mengen beobachtet werden. Der Abwasserwert schien sowohl in der Region Kapfenberg als auch der Region Bad Aussee einige Tage früher als die durch Humantestungen ermittelten aktiv positiv getesteten Personen zu sinken. Das legt den Schluss nahe, dass die Abwasserergebnisse einen frühzeitigen Hinweis auf einen bevorstehenden Rückgang bei den Fallzahlen bis hin zur Entwarnung geben können (Abbildung 42).

6 Untersuchungen von Klärschlamm- und Ablaufproben

Auch der Ablauf von Kläranlagen wurde exemplarisch beprobt, um einen Vergleich aus dem Zulauf von Kläranlagen zu jenen nach dem Passieren der Virusfracht von konventionellen Kläranlagen anstellen zu können.

Der Schwerpunkt der Untersuchungen des Coron-A Projekts lag aufgrund der Fragestellung in der Untersuchung unterschiedlichster Aspekte im Zusammenhang mit Zulaufproben. Dennoch stellt sich auch die Frage, inwieweit konventionelle Kläranlagen nach dem Stand der Technik das SARS-CoV-2 Virus aus der Wasserphase und somit aus dem Ablauf der Kläranlagen entfernen. Im Rahmen dieser Fragestellung wurden deshalb vereinzelte Untersuchungen zur Entfernung aus der wässrigen Phase durchgeführt.

Eine erste Untersuchung erfolgte bereits sehr zeitig in der Pandemie. Am 20.4.2020 wurde basierend auf demselben methodischen Ansatz, wie er für die Zulaufproben angewandt wurde (80 mL Probe; PEG-Zentrifugation), die Untersuchung einer Tagesmischprobe aus dem Ablauf der Kläranlage Wien durchgeführt. Die Zulaufkonzentration lag zu diesem Zeitpunkt bei niedrigen 17 Genkopien pro Milliliter, weshalb das negative Ergebnis der Ablaufprobe nicht weiter überraschte. Um repräsentativere Aussagen treffen zu können, wurden weitere Untersuchungen erst im späteren Verlauf der Pandemie im Frühjahr 2021 durchgeführt, nachdem Ende 2020 Methoden getestet wurden, um höhere Probenmengen mit geringem Feststoffanteil zu verarbeiten.

Das in weiterer Folge herangezogene Verfahren bestand in einer Vacuumfiltration (Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold; Promega) in Kombination mit einem TNA (RNA und DNA) Extraktionssystem für Umweltproben (SV Total RNA Isolation System; Promega). Mit diesem Verfahren konnten schließlich 400 mL Ablauf reproduzierbar mit einer mittleren Extraktionseffizienz von etwa 40 % (Basis: Zugabe RNA-basierte interne Positivkontrolle – IPC) verarbeitet werden. Das Volumen von 400 mL wurde gewählt, da dies dem 10-Fachen der üblicherweise für die Untersuchung des Zulaufs eingesetzten Probenmenge entspricht. Es wurde nicht mehr Probe eingesetzt, da es sich um ein TNA (RNA und DNA) Extraktions- und Aufreinigungsverfahren handelt und bei höheren Mengen aufgrund eines

vorangegangenen Methodentests eine Übersättigung der Bindungsstellen im Adsorptionsmaterial trotz implementierter DNase Behandlung nicht auszuschließen war, was eine Quantifizierung des Ergebnisses verhindert.

Die in Tabelle 9 aufgelisteten Ablaufproben wurden untersucht. In keiner der untersuchten Ablaufproben konnte – trotz sehr hoher Zulaufwerte in den Proben Wolfgangsee/Ischl und Kläranlage Wien ein positiver Nachweis an SARS-CoV-2 Genom erbracht werden.

Tabelle 9: Auf SARS-CoV-2 untersuchte Ablaufproben und errechnete Entfernungsraten.

Kläranlage	Datum	SARS-CoV-2 Kopien im Zulauf (#/mL)	SARS-CoV-2 Kopien im Ablauf (#/mL)	% Entfernung	Log Entfernung
Kläranlage Wien*	16.04.2020	17	< 1	> 94,284	> 1,243
Wolfgangsee- Ischl	19.01.2021	3.359	< 0.3	> 99,991	> 4,049
Kläranlage Wien	21.03.2021	3.259	< 0.3	> 99,991	> 4,036
Bad Vöslau	04.05.2021	26	< 0.3	> 98,862	> 1,944
Baden	04.05.2021	31	< 0.3	> 99,041	> 2,018
Guntramsdorf	04.05.2021	26	< 0.3	> 98,858	> 1,942
Steyr	28.04.2021	87	< 0.3	> 99,656	> 2,463
Freistadt	28.04.2021	591	< 0.3	> 99,949	> 3,295

* erster Ansatz vor Methodenoptimierung

Quelle: TU Wien

Für die Berechnung der erreichten Entfernungsraten musste somit die methodische Nachweisgrenze (LOD) herangezogen werden, die sich unter der Annahme einer Extraktionseffizienz von 40 % und einer Kopie des Zielgenoms pro PCR-Ansatz errechnet. Die derart ermittelte (und auch mittels Standardverdünnungsreihen abgesicherte) LOD liegt rechnerisch bei 0,06 Kopien pro mL. Für die Berechnung der Entfernungsrates wurde jedoch konservativ mit einer realen LOD von 0,3 Kopien pro mL (LOD x 5) gerechnet.

Basierend auf dem Zeitpunkt mit der höchsten Abundanz für die Proben Wolfgangsee-Ischl und Kläranlage Wien (21.3.2021) ergeben sich somit Entfernungsraten von jeweils zumindest 99,99 % bzw. vier Logstufen zwischen Zulauf und Ablauf.

Von den in Tabelle 9 zusammengefassten Proben wurden zudem die Belebtschlämme der Kläranlagen Bad Vöslau, Baden, Guntramsdorf, Steyr und Freistadt untersucht. Dazu wurden 2 x 2 mL Belebtschlamm für 5 Min. bei 4.500 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets in 500 µL CTAB Puffer und 500 µL RNase-freiem Wasser resuspendiert. In einem weiteren Schritt erfolgte ein mechanischer Aufschluss mittels FastPrep (MP Bio-medicals™ FastPrep 4™ 5G) für 2 x 40 sec mit 6 m/s in einem 2 mL bead beating tube. Nach der FastPrep erfolgte die weitere Extraktion und Aufreinigung mittels Maxwell Extraktionsroboter (Maxwell® RSC Instrument, Promega) und Maxwell® RSC Wastewater Viral RNA/DNA Extraction Kit.

In den Proben der Kläranlagen Steyr und Freistadt wurde ein positives Signal mit CT < 39 erhalten, in den drei anderen Anlagen nicht. Die Ursache für dieses heterogene Ergebnis kann einerseits in den unterschiedlichen Zulaufabundanz liegen, andererseits wahrscheinlicher jedoch in einer Inhibierung der PCR durch mitextrahierte Stoffe, wie dies auch bei Zulaufproben der Fall ist, wenn – wie in einigen Protokollen zur SARS-CoV-2-Bestimmung im Zulauf – keine Abtrennung der partikulären Stoffe erfolgt. Die Angabe genauerer quantitativer Ergebnisse erfolgt an dieser Stelle nicht, da die Methode nicht evaluiert ist und die Angabe von Zahlen eine Genauigkeit suggerieren würde, die nicht nachgewiesen ist. Es wird in diesem Zusammenhang jedoch auf eine Studie von Balboa (Balboa et al. 2021) verwiesen, die den Versuch einer Bilanzierung des SARS-CoV-2 Virus auf einer kommunalen Kläranlage unternommen haben. Diese Studie kommt insofern zu vergleichbaren Ergebnissen, als einerseits im Belebtschlamm derselben Anlage in Proben über einen Zeitraum von etwa 14 Tagen positive und negative Nachweise auftraten und andererseits auch immer wieder eine Inhibition der PCR beobachtet wurde. Die höchsten Abundanz wurden in dieser Studie im eingedickten Überschussschlamm gefunden, wohingegen nach Schlammfäulung keine positiven Befunde mehr auftraten.

7 Prävalenzmodellierung

Zur Abschätzung der Prävalenzzahlen und ihren Unsicherheiten wurden diese mit Hilfe der Informationen der ersten pandemischen Wellen modelliert.

7.1 Zusammenfassung

Ziel war die Entwicklung eines stochastischen Modells zur Abschätzung der Prävalenzzahlen und der Unsicherheit dieser Aussage als Baustein für weitere Untersuchungen. Im Laufe der Bearbeitung zeigte sich die Notwendigkeit, sich diesem Ziel schrittweise anzunähern. Zudem konnten relevante Zusammenhänge erst nach der zweiten pandemischen Welle im Herbst 2020 analysiert werden. Ein erster Punkt der Untersuchung war die Ausweisung einer stringenten Vorgangsweise zur Datenbehandlung. Dabei mussten – aus der zeitlich überlappenden Bearbeitung – teilweise Fragestellungen, die zeitgleich in anderen Arbeitspaketen behandelt wurden, auch hier aufgegriffen (Populationsgrößenmarker und Datenglättung) und simplifiziert gelöst werden. Das betrifft insbesondere die Themen Biomarker und Datenglättung. In einem weiteren Arbeitsschritt wurde gezeigt, dass sich das Abwassersignal sehr gut mit den Daten aus dem Humanmonitoring (Inzidenz) korrelieren lässt. Wichtig ist hierbei aber die Verwendung einer multivariaten Methode unter Einbezug des Zeitversatzes der beiden Datensätze (das Abwassersignal hat einen Vorlauf gegenüber den Inzidenzdaten) und – falls vorhanden – der Anzahl der täglichen Testungen. Aus diesen Erkenntnissen wurde dann – wie vorgesehen – ein stochastisches Prävalenzmodell entwickelt. Es stellte sich allerdings heraus, dass die Entwicklung eines detaillierten Ansatzes (unter Einbezug von zeitlich und räumlichen Dynamiken) derzeit noch nicht zielführend ist. Der Grund ist die unzureichende Datenlage um ein derartiges Modell verifizieren zu können. Das hier dargestellte Prävalenzmodell beruht auf der Ableitung einer zeitlich konstanten und vom Krankheitsverlauf unabhängigen Virenausscheidung (hier $10^{10.4}$ Genkopien/infizierter Person/d). Damit lassen sich – basierend auf den Daten der vierten Prävalenzstudie in Österreich (12. bis 15. November 2020) – die Zeitserien der effektiven Krankheitsfälle in den jeweiligen Einzugsgebieten ermitteln. Die Auswirkungen von Mutanten im epidemiologischen Geschehen wurden noch nicht berücksichtigt und stellen einen wichtigen nächsten Schritt der Modellentwicklung dar.

7.2 Terminologie und Grundlagen

Grundlagen der Pandemiebekämpfung und des Managements des Infektionsgeschehens sind individuelle Humantestungen. Die Anzahl der täglich durchgeführten Testungen ist abhängig von den technischen und organisatorischen Möglichkeiten und war daher über den Verlauf des Pandemiegeschehens stark variabel. Grundsätzlich sind in diesem Zusammenhang die beiden Begriffe Prävalenz und Inzidenz zu unterscheiden:

- Prävalenz ist das Verhältnis von infizierten Personen zur Gesamtbevölkerung. Diese Information ist aber de facto unmöglich zu erheben und kann nur durch Massentests punktuell abgeschätzt werden. In Österreich wurden insgesamt vier Prävalenzstudien durchgeführt, wobei die vierte Studie vom 12. bis 15. November 2020 am aussagekräftigsten ist. Das Ergebnis war eine Prävalenz von 3,1 % mit einem 95 %-Vertrauensintervall von 2,6 %–3,5 %.

- Inzidenz ist das Verhältnis von positiv getesteten bzw. von derzeit als aktiv erkrankt eingestuft Personen zur Gesamtbevölkerung. Dieser Wert unterscheidet sich von obiger Prävalenz durch die Anzahl von nicht erkannten bzw. nicht erfassten infizierten Personen – der sogenannten Dunkelziffer. Inzidenz bezieht sich daher nur auf getestete Personen. Die Anzahl der aktiven Erkrankten wird folgendermaßen ermittelt:

$$AK = \sum PT - \sum T - \sum G$$

mit *AK* = aktiv krank, *PT* = positiv getestet – d. h. Neuinfektionen, *T* = tot und *G* = genesen.

- Alternativ können die aktiv Erkrankten auch aus der Zahl der Neuinfektionen mit der Annahme einer durchschnittlichen Krankheitsdauer von z. B. 14 Tagen abgeschätzt werden. Man beachte, dass Inzidenz üblicherweise als Summenwert von sieben Tagen (bzw. auch 14 Tagen) pro 100.000 Einwohner:innen angegeben wird. Damit wird der Inzidenzwert geglättet. Im Gegensatz zur Prävalenz liegt der Inzidenzwert aber als laufendes Signal vor.

Das Abwassersignal stellt grundsätzlich eine Information zur Prävalenz im Einzugsgebiet der Messstelle dar. Gemessen wird – innerhalb eines bestimmten Messintervalls von üblicherweise 24 Stunden – die Anzahl der RNA-Genkopien pro Messvolumen Abwasser – entsprechend einer Konzentrationsangabe. Aus den Überlegungen zur abwasserbasierten Epidemiologie (Daughton, 2001; Zuccato et al., 2008) kann damit eine Prävalenzgleichung erstellt werden:

$$PZ = \frac{C_v * Q}{EZ * F_v}$$

mit PZ = Prävalenz (dimensionslos); F_v = (persönliche) Virenfracht in Genkopien pro Tag pro infizierte Person; C_v = Konzentration der Viren in der Messung in Genkopien pro L; Q = mittlere Abwasserzufluss im Messintervall in L/d, EZ = Einwohnerzahl d. h. Gesamtzahl der (realen) Personen im Einzugsgebiet.

Im Sinne der obigen Gleichung ist F_v definiert als diejenige Virenfracht pro infizierter Person, welche am Messpunkt ankommt. Dieser Wert kann nicht gemessen werden. Will man diesen Wert aber als geschätzten Kennwert angeben, ist zu beachten, dass

- die Virenausscheidung pro infizierter Person vom Krankheitsverlauf, vom Auftreten von Mutationen bzw. der individuellen Konstitution abhängt und damit sehr schwankend ist und
- nicht präzise quantifizierbare Verluste und Abbauvorgänge während des Transports im Kanalsystem auftreten.

7.3 Datensatz

Im Coron-A Projekt wurden bis zu 44 Kläranlagen zumindest zeitweise untersucht (Tabelle 10). Die folgenden Untersuchungen wurden hauptsächlich anhand der Daten von vier Anlagen durchgeführt, für welche sowohl Daten über die gesamte Projektdauer vorliegen als auch entsprechende Metadaten (aktive Erkrankungen, Anzahl Tests etc.). Wien (A) und Siggerwiesen (B) repräsentieren jeweils größere urbane Umgebungen während Hohenems (C) und Rosegg (D) kleinere, bzw. Letztere auch touristisch geprägte Einheiten beschreiben. Die gemessenen Titerwerte der vier Messstandorte sind zusammen mit der Anzahl der aktiv Erkrankten als Zeitreihe in Abbildung 43 gezeigt. Die Virenkonzentration folgt dabei in etwa dem Verlauf der Fallzahlen.

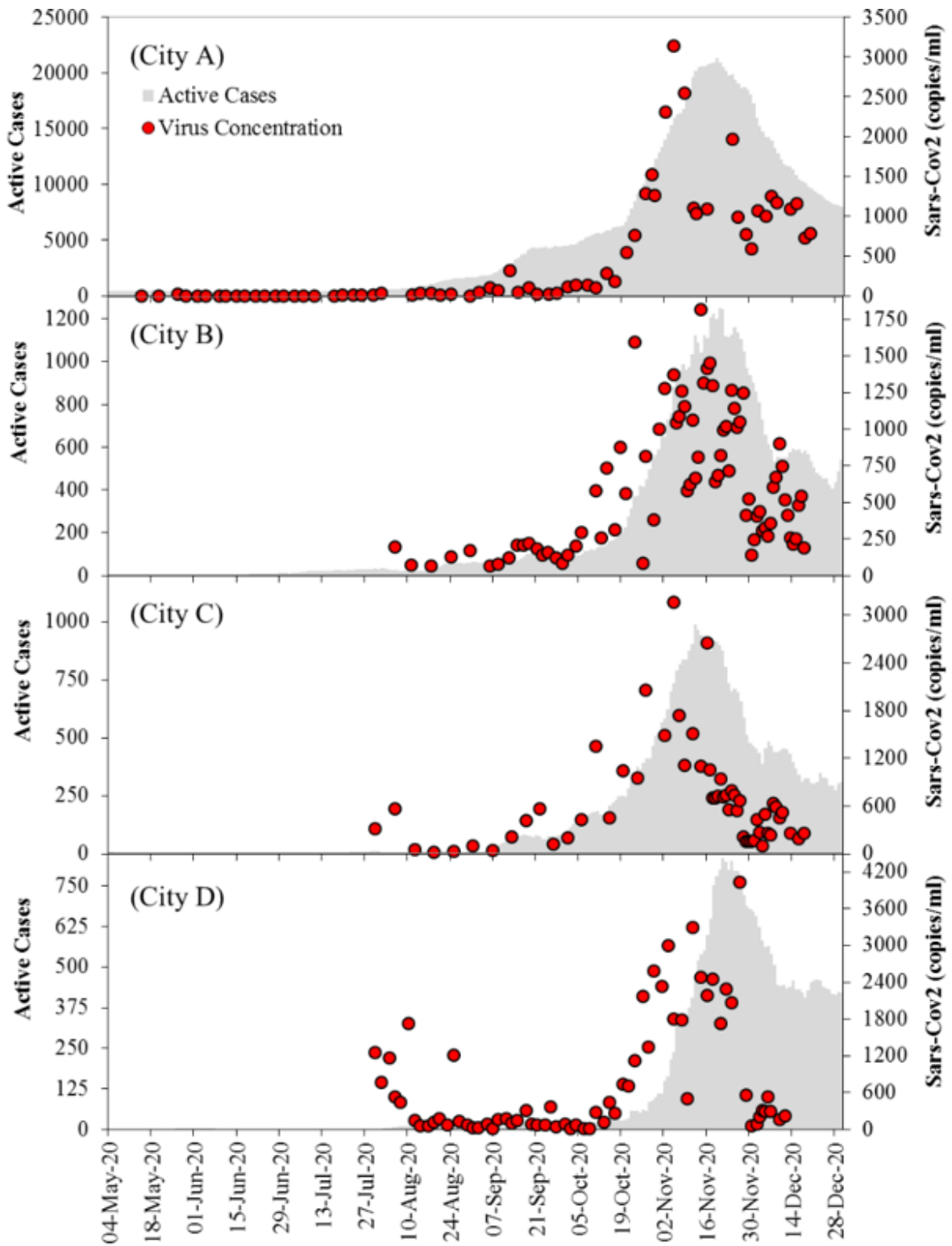
Tabelle 10: Vier Beispiele der beprobten Messstandorte mit dazugehöriger Population und Klimainformation.

Messstandort	Angeschlossene Einwohner:innen	mittlerer Zulauf (m ³ /d)	mittlere jährl. Regenmenge 1971–2000 (mm/a)	mittlere Anz. Tage mit Niederschlag > 10 mm (d/a)
A (Wien)	1.900.000	539.500	548	14,9
B (Siggerwiesen)	320.700	83.190	1.184	40,0
C (Hohenems)	41.700	16.340	1.231	40,3
D (Rosegg)	23.600	4.900	889	29,1

Quelle: Arabzadeh et al. 2021

Der Lockdown nach der ersten Pandemiewelle (16.3.2020 bis 4.5.2020) führte zu einer Verringerung des Virensignals im Abwasser. Dies ist beispielhaft durch die niedrige Virenkonzentration des Messstandortes A in den frühen Sommerperioden verdeutlicht. Bei allen Messstandorten ist bis zum frühen Herbst ein niedriger Verlauf der Konzentration zu beobachten. Eine Ausnahme ist jedoch Standort D, bei dem im August 2020 ein starker Anstieg des Virensignals erkennbar ist. Dieser kurzzeitige Anstieg ist auf lokale Infektionsdynamiken zurückzuführen, welche (vermutlich) durch Tourismus ausgelöst wurden. Anfang Oktober 2020 ist die zweite Pandemiewelle bei allen Standorten zu sehen. Die Höchstwerte zu Fallzahlen und Virenkonzentrationen wurden Mitte November festgestellt. Danach wurde in Österreich ein zweiter Lockdown (17.11.2020 bis 6.12.2020) verhängt, was wiederum zu einer Senkung der Infektionszahlen und der Konzentration führte.

Abbildung 43: Zeitlicher Verlauf der Virenkonzentration und der aktiven Krankheitsfälle für die vier untersuchten Kläranlagen.



Quelle: Arabzadeh et al. 2021

7.4 Datenbehandlung und Analyse

Wie schon eingangs erwähnt ist die direkte Anwendung der Prävalenzgleichung wenig aussagekräftig. Üblicherweise wird daher eine vereinfachte Kenngröße, wie z. B. die relative Virenfracht pro Einwohnerwert und Tag, als Vergleichswert verwendet:

$$F_{V_rel} = \frac{c_V * Q}{EW}$$

Einzelbestimmungen des Indikatorwertes F_{V_rel} eignen sich nur wenig zur Einschätzung der pandemischen Situation, jedoch kann der Parameter zur Einordnung von Trends innerhalb einer Zeitserie verwendet werden.

Man beachte, dass in diesem Zusammenhang natürlich die Einwohnerzahl die relevante Größe darstellt. Da dieser Wert aber nur aus den Zensusdaten recherchiert werden kann, liegt diese Information teilweise gar nicht oder nur in zeitlich niedrig aufgelöster Form vor. Der Einwohnerwert kann jedoch mit einem Populationsgrößenmarker (PG) abgeschätzt werden (Chen et al., 2008; Choi et al., 2018). In diesem Fall wurden dafür die Standardparameter NH_4 und CSB als Populationsgrößenmarker verwendet. Der Einwohnerwert ergibt sich dann aus:

$$EW = \frac{c_{PG} * Q}{PF_{PG}}$$

Hierbei ist c_{PG} die Konzentration des Populationsgrößenmarkers im Abwasser und PF_{PG} die populationspezifische Fracht – abgeschätzt mit 8 g NH_4 -N/EW/Tag bzw. 120 g CSB/EW/Tag. Dabei muss beachtet werden, dass Mischwasserüberläufe (MÜ) und (industrielle) Indirekteinleiter den c_{PG} Messwert stark beeinflussen und sich daraus falsche Werte für EW ergeben können. Durch Eliminierung von EW in der obigen Gleichung ergibt sich die relative Virenfracht zu:

$$F_{V_rel} = \frac{c_V * PF_{PG}}{c_{PG}}$$

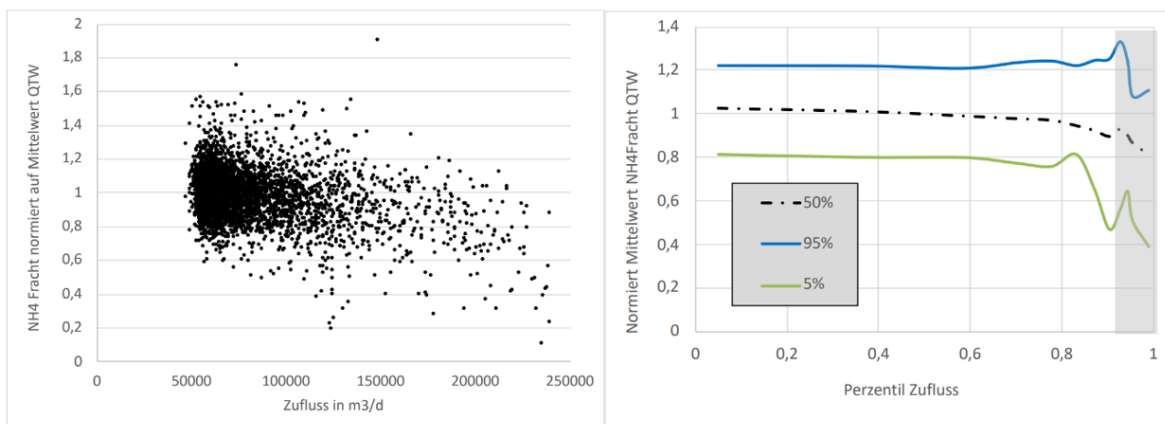
Das Ziel der hier beschriebenen Methodik ist die Ausweisung einer überprüften Zeitserie der relativen Virenfracht. Die einzelnen Schritte dafür sind:

- Elimination der Ausreißer aus Abflussspitzen,
- Anwendung des standardisierten Populationsgrößenmarkers auf die Messdaten,
- Datenglättung der Messwerte mit standardisierten Verfahren.

7.4.1 Abflussspitzen

Unter der Annahme, dass mit dem Niederschlag keine zusätzliche Menge des Populationsgrößenmarkers in das Entwässerungssystem eingetragen wird, kommt es bei Regenwetterbedingungen zu einer Verdünnung und – beim Anspringen der Mischwasserüberläufe – zu einem Frachtverlust. Abbildung 44 links zeigt die NH_4 -Fracht in Abhängigkeit zur Zulaufmenge als Punktwolke. Dafür werden Daten der 10-jährigen Zeitreihe der Kläranlage Siggerwiesen verwendet. Die NH_4 -Fracht ist auf den Mittelwert der Trockenwetterfrachten normiert. Als Trockenwetterzufluss werden Zuläufe kleiner als das 85 %-Perzentil aller Zulaufmengen definiert. Abbildung 44 rechts erlaubt eine einfachere Interpretation der Punktwolke. Hierfür wurden normierte Werte in Perzentildarstellung bezüglich der Zulaufwerte geplottet. Die Darstellung erfolgt wiederum als 50 %-Perzentilwert mit Konfidenzintervall (5 % und 95 %). Aufgrund von Mischwasserüberläufen und Verdünnungseffekten ist bei höheren Zuläufen oberhalb des 90 %-Perzentils (grau hinterlegt) eine deutliche Abnahme der NH_4 -Fracht erkennbar. Daher sollten Messwerte, die bei Zuläufen oberhalb des 90 %-Perzentils genommen wurden, als potentielle Ausreißer betrachtet und gegebenenfalls eliminiert werden.

Abbildung 44: Normierte NH_4 -Fracht in Abhängigkeit vom Zufluss für das Einzugsgebiet Siggerwiesen. Der Datensatz entspricht einer Zeitreihe von 10 Jahren.



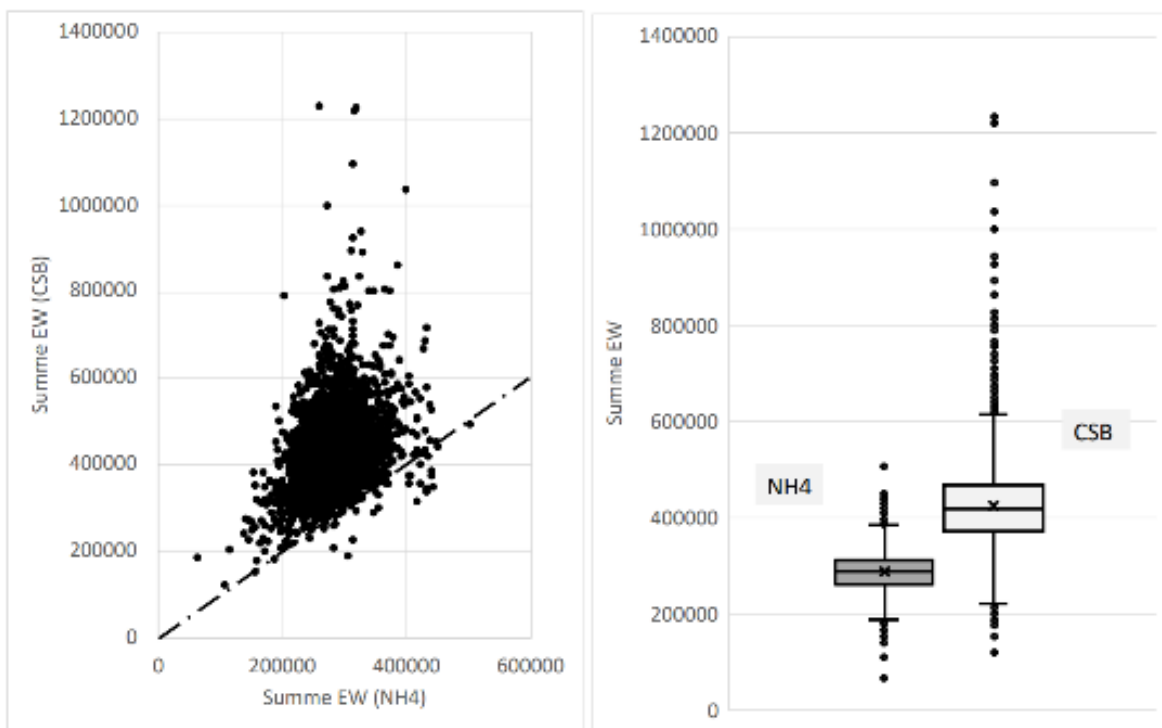
Links: Punktwolkendarstellung. Rechts: x-Achse: Perzentildarstellung (berechnet in Klassen) bezüglich des Zuflusses. Die x-Achse stellt die Perzentilniveaus innerhalb der jeweiligen Perzentilklassen dar.

Quelle: Rauch et al. 2021.

7.4.2 Bestimmung der Einwohnerwerte

Mit den gemessenen Konzentrationen von NH_4 und CSB können nun die Einwohnerwerte berechnet werden. Dafür wurden als populationspezifische Frachten 8 g $\text{NH}_4\text{-N}/\text{EW}/\text{Tag}$ bzw. 11 g $\text{N}_{\text{ges}}/\text{EW}/\text{Tag}$ oder 120 g $\text{CSB}/\text{EW}/\text{Tag}$ verwendet. Für das Fallbeispiel Siggerwiesen mit ca. 300.000 EW werden aus den 10-jährigen Zulaufdaten nur jene Datenpunkte benutzt, die einen Zulauf unterhalb des 90%-Perzentils aufweisen.

Abbildung 45: Berechnete Einwohnerwerte bzgl. der Populationsgrößenmarker NH_4 und CSB. Die Daten beziehen sich auf eine 10-jährige Zeitserie von Siggerwiesen.



Links: Korrelation der berechneten Einwohnerwerte bzgl. NH_4 und CSB. Rechts: Boxplotdarstellung der berechneten Einwohnerwerte aus NH_4 und CSB.

Quelle: Rauch et al. 2021.

In Abbildung 45 links sind die berechneten Einwohnerwerte bezüglich NH_4 und CSB gegenübergestellt. Bei perfekter Korrelation der beiden Populationsmarker müssten die Werte auf einer 45°-Geraden liegen – es ist aber eine systematische Abweichung bzw. Überschätzung durch den Marker CSB gegeben. In Abbildung 45 rechts sind die berechneten Einwohnerwerte nochmals in einem Boxplot dargestellt. Die Grenzen der Box zeigen das erste (Q_1) und dritte Quartil (Q_3), wobei die mittlere Markierung für den Median steht. Die Ausreißergrenzen werden über den Interquartilsabstand ($\text{IQA} = Q_3 - Q_1$) mit

$Q_1 - 1,5 * IQA$ bzw. $Q_3 + 1,5 * IQA$ berechnet. Die Berechnungen mit NH_4 ergeben im Median in etwa 300.000 EW, was ein realistisches Ergebnis darstellt. Die Berechnungen mit dem Populationsmarker CSB zeigt sowohl eine Überschätzung des EWals auch eine höhere Variation. Dies deutet auf einen stark schwankenden Einfluss von Industrie bzw. Indirekteinleitern hin. Obwohl auch nicht vollständig humaninduziert, ist der Kennwert NH_4 als Populationsgrößenmarker geeigneter (siehe auch Been et al., 2014). Mit den Ausreißergrenzen aus der Boxplotdarstellung liegen zudem Grenzen für die EW Berechnung vor.

7.4.3 Datenglättung

Neben den identifizierbaren Einflüssen (Abbauprozesse durch Mikroorganismen und Temperaturabhängigkeiten, Verdünnung durch Regenereignisse, Schwankungen in der Virenausscheidung und unterschiedliche Messmethoden der Analyselabore) weist das Virensignal im Abwasser auch zufällige Fluktuation auf. Dieses Rauschen kann in weiterer Folge zu Fehlinterpretationen der Ergebnisse führen. Deshalb ist es die Aufgabe einer Datenglättung, das Rauschen einer Zeitserie herauszufiltern, andererseits aber keine relevanten Signale zu glätten. In Folge wurden 13 Glättungsmethoden für die Virensignale der vier Kläranlagen aus Tabelle 10 untersucht (Arabzadeh et al., 2021). Die Glättungsmethoden sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Auflistung der Glättungsmethoden.

Glättungsmethode	Abkürzung
Adaptive Degree Polynomial Filter	ADP
Auto Regressive Mode	ARI
Fast Fourier Transform Filtering	FFT
Friedman's Super Smoother	SUP
Generalized Additive Mode	GAM
Kalman Filtering	KAF
Kernel Smoother	KER
Locally-weighted polynomial	POL

Glättungsmethode	Abkürzung
Robust Running Medians	RRM
Savitzky-Golay Filters	SGF
Simple Moving Average	SMA
Spline	SPL
Tukey Smoother	TUK

Quelle: Arabzadeh et al. 2021

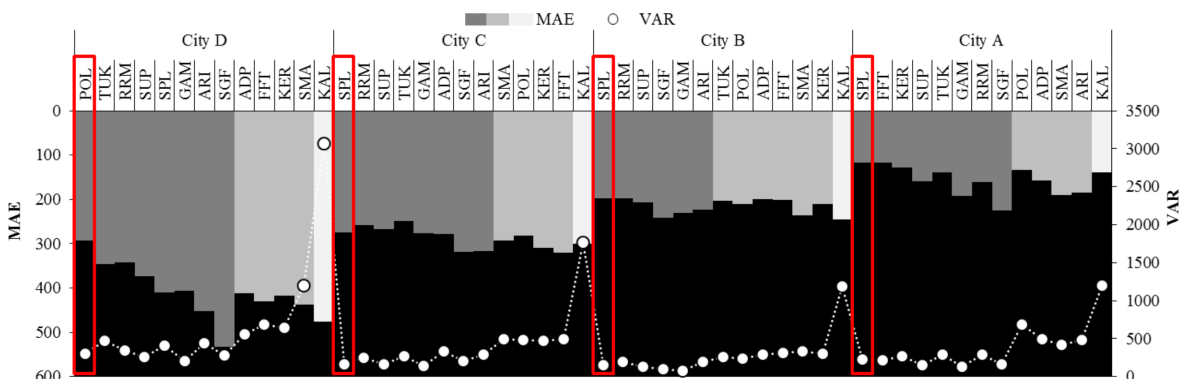
Die Parameter für die einzelnen Methoden wurden durch ein Optimierungsverfahren bestimmt. Als Metriken wurden hierfür der mittlere Absolut-Fehler und die Varianz verwendet:

$$MAE = \frac{\sum_{i=1}^n |\hat{x}_i - x_i|}{n}$$

$$VAR = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

Abbildung 46 zeigt die Ergebnisse bezüglich der vier Messstandorte aus Tabelle 10. Die Balken in schwarz zeigen den mittleren Absolut-Fehler und die weißen Punkte die Varianz der jeweiligen Glättungsmethoden.

Abbildung 46: Optimierungsmetriken der jeweiligen Glättungsmethoden. Der mittlere Absolut-Fehler MAE ist als schwarzer Balken dargestellt, die Varianz VAR als weiße Punkte.

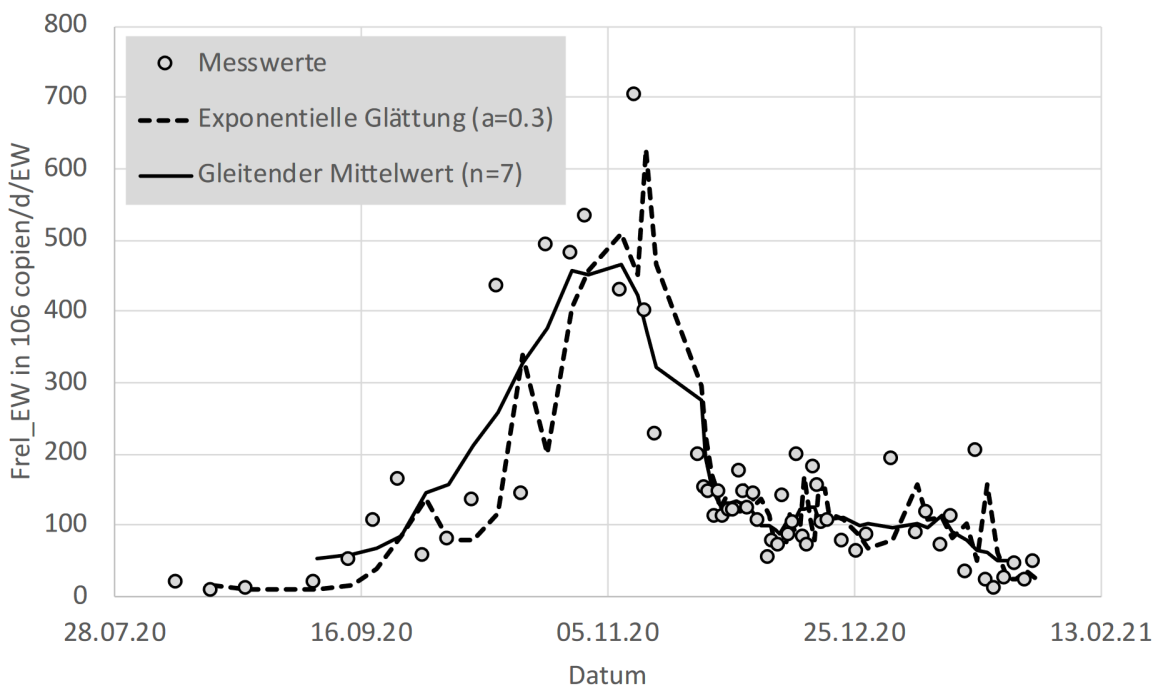


Quelle: Arabzadeh et al. 2021

Laut dieser Studie zeigen SPL, GAM und SUP in diesem Zusammenhang die besten Ergebnisse. In drei von vier Kläranlagen war SPL ein robuster Ansatz zur Datenglättung. Auch GAM liefert eine robuste Glättung gegenüber Extremwerten und Ausreißern, erfordert jedoch entweder eine große Anzahl an Parametern oder neigt – als nicht parametrische Methode – potentiell zum Überfitten. Insgesamt entsprechen aber alle Filtermethoden dem generellen Zweck der Datenglättung. Die Wahl der Methode ist abhängig von der Anwendung. Arabzadeh et al. (2021) empfehlen die SPL Methode zur Glättung eines SARS-CoV-2 Signals, da es die besten Ergebnisse bezüglich der Optimierungsmetriken lieferte.

In Abbildung 47 werden grundsätzliche Zusammenhänge nochmals beispielhaft anhand sehr einfacher Glättungsmethoden (exponentielle Glättung – Dämpfungsfaktor 0,3 und zentralisierter Mittelwert über sieben Werte) gezeigt. Allgemein lässt sich sagen, dass bei höheren Dämpfungsfaktoren längerfristige Trends klarer hervorgehoben werden, jedoch können dadurch auch kurzfristige Informationen verloren gehen.

Abbildung 47: Relative Virenfracht einer ARA mit ca. 40.000 EW im Zeitraum der zweiten Pandemiewelle. Die Datenpunkte sind mit einer exponentiellen Glättung und mit einem gleitenden Mittelwert geglättet.



Quelle: Universität Innsbruck

7.5 Inzidenzmodellierung

Ein Inzidenzmodell stellt eine Korrelation zwischen dem Abwassersignal und der Anzahl der aktiv Erkrankten aus den Humantestungen dar. Wie bereits ausgeführt, handelt es sich hier um zwei verschiedene statistische Mengen, insofern als bei den Humantests die Dunkelziffer der Erkrankungen (d. h. die Anzahl der unbemerkten bzw. nicht durch Test erfassten Erkrankungen) fehlt. Eine Korrelation der beiden Zeitserien bzw. ein perfektes Modell müssen also inhärent davon ausgehen, dass die Dunkelziffer konstant ist. Die Inzidenzmodellierung ist aber dennoch höchst informativ: es lässt sich damit der (empirisch bekannte) Zeitversatz zwischen Abwassersignal und Tests quantifizieren und es stellen Änderungen in der Korrelation auch eine Änderung der generellen pandemischen Situation dar – entweder eine Änderung der Dunkelziffer bzw. der Teststrategie oder eine Änderung der Dynamik der Virenausscheidung durch Virusmutanten.

Das Inzidenzmodell stellt sich wie folgt dar:

$$AK = f(c_V * Q) \text{ bzw. } f(F_{V_rel}),$$

mit AK = Anzahl aktiv Erkrankter laut Humantest. Statt den aktiv Erkrankten kann auch der Inzidenzwert als Summe der aktiv Erkrankten über sieben bzw. 14 Tagen verwendet werden.

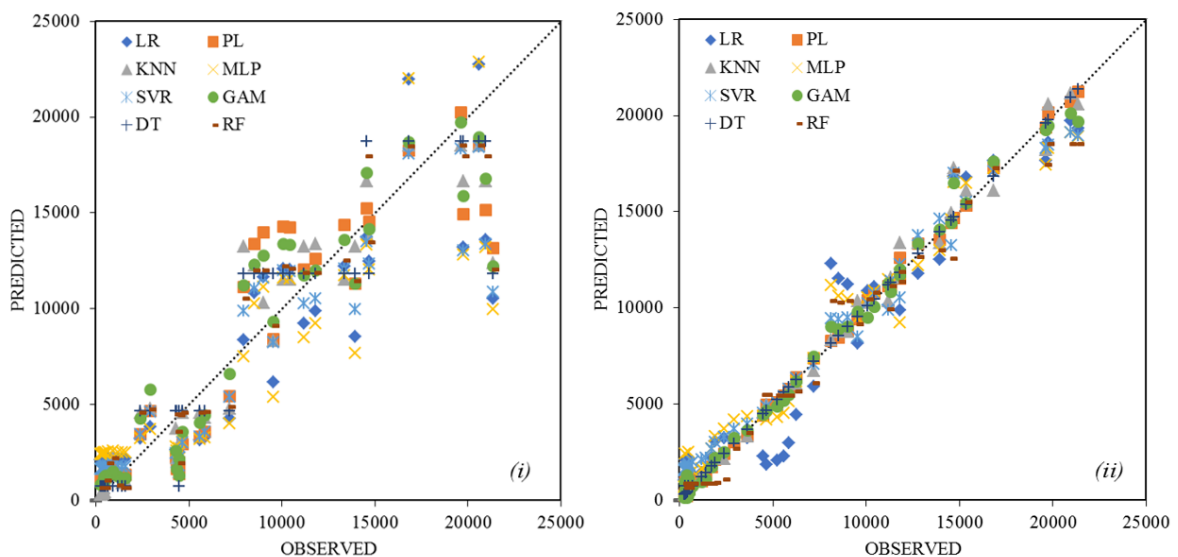
Aberi et al. (2001) zeigen verschiedene Regressionsmodelle und Untersuchungen dazu anhand der bereits vorgestellten vier prototypischen Kläranlagen. Man beachte, dass für die Kläranlage Salzburg-Siggerwiesen die detaillierten Daten der Individualtests und der Testanzahl nur für einen Teil des Einzugsgebiets (d. h. für das Stadtgebiet Salzburg) vorliegen. Der Vergleich der Ergebnisse mit einem größeren Teil des Einzugsgebiets (Stadt Salzburg inklusive Umlandgemeinden) zeigt aber nur minimale Unterschiede, sodass im Weiteren mit dem detaillierten Datensatz gearbeitet wird. Das Verhältnis zum gesamten Gebiet ist als linear anzunehmen.

Aberi et al. (2001) untersuchen den Zeitversatz mit Hilfe von multivarianten Regressionsmodellen – wobei angenommen wird, dass das Abwassersignal dem Ergebnis der Individualtestung vorlaufen kann. Das optimale Modell für jede Kläranlage – bzw. konkret für jede Zeitserie – wird mittels ANOVA als zwischen zwei und sieben Tagen schwankend bestimmt.

Als nächster Schritt werden sieben verschiedene Regressionsmodelle auf ihre Eignung für diese Problemstellung untersucht. Um den Datensatz für Kalibrierung und Validierung optimal zu nutzen, wird die Untersuchung mittels 9-facher Kreuzkorrelation durchgeführt. In Abbildung 48 ist ersichtlich, dass eine multivariate Information das Ergebnis der Modelle wesentlich verbessert.

Insgesamt sind alle untersuchten Korrelationsmodelle zur Anwendung als Inzidenzmodell geeignet, wobei aber die K-nearest Neighbor (KNN) Methode und die Polynomische Regression (PL) die beste Übereinstimmung erzielen.

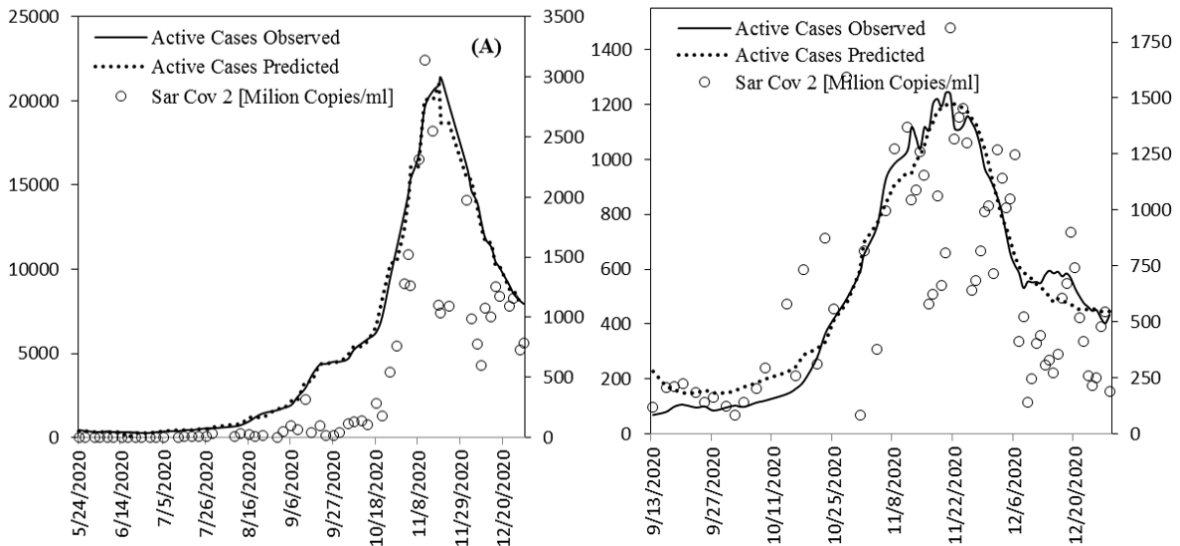
Abbildung 48: Visualisierung der Ergebnisse für Kläranlage Wien c Trainingsdaten.



Links univariates Modell (nur Abwassersignal). Rechts: multivariates Modell (Abwassersignal, Zeitversatz und Testanzahl).

Quelle: Universität Innsbruck

Abbildung 49: Ergebnis der Regressionsmodelle für die Zeitserien der aktiven Erkrankungen: Gegenüberstellung der Messwerte zu den Modellergebnissen auf Basis des Abwassersignals (hier in 10^6 Genkopien pro EW pro Tag).



Links: Kläranlage Wien. Rechts: Kläranlage Salzburg-Siggerwiesen.

Quelle: Universität Innsbruck

7.6 Prävalenzmodell

Eine detaillierte deterministische Berechnung der Prävalenz würde ein komplexes Modell der Virenausscheidung, des Eintrags und Transports der Viren im Kanalnetz sowie der gesamten Mess- und Analysemethodik beinhalten. Aus heutiger Sicht und Datenlage kann ein derartiges Modell (noch) nicht kalibriert werden und ist damit wenig zielführend.

Ein sehr vereinfachter Ansatz ist durch die Umformulierung der bereits bekannten Prävalenzgleichung möglich:

$$PZ = \frac{C_v \cdot Q}{EZ \cdot F_v} = \frac{C_v \cdot Q}{EZ \cdot N_{RNA} \cdot f_L} = \frac{F_{v_rel}}{N_{RNA} \cdot f_L}$$

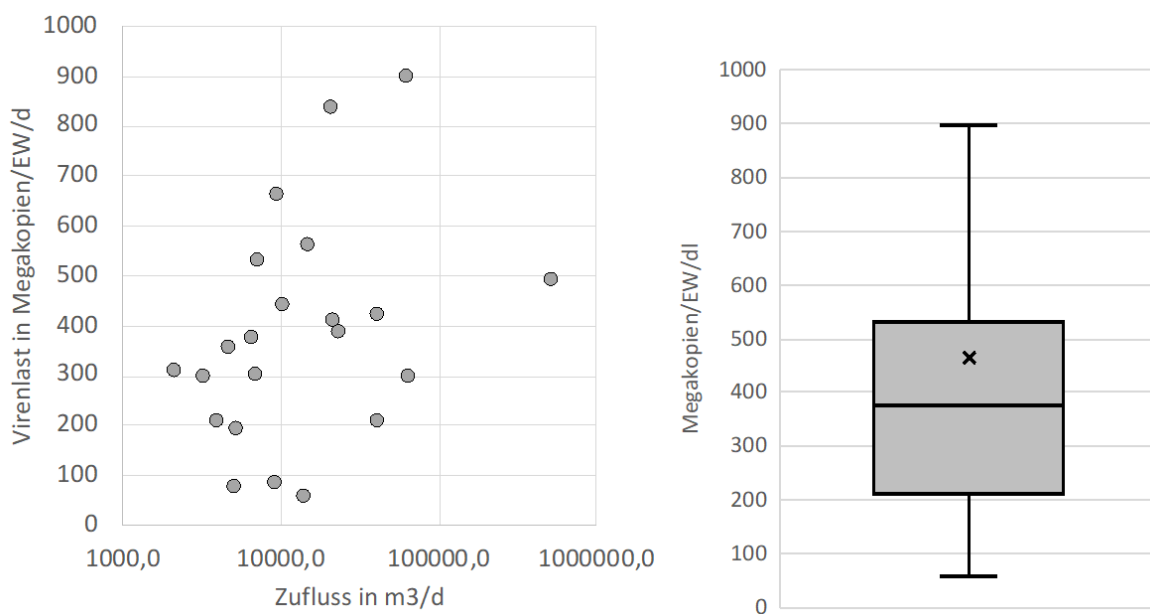
N_{RNA} ist hier die Virenfracht, die pro infizierter Person und Tag ausgeschieden wird (F_v ist die Fracht, die am Messpunkt ankommt). Sehr vereinfacht wird hier auch davon ausgegangen, dass N_{RNA} sowohl zeitlich konstant über den Krankheitsverlauf ist, als auch konstant

für alle infizierten Personen. Diese (sehr stark) vereinfachende Annahme vernachlässigt, dass bis zu 50 % der infizierten Personen asymptomatisch sein können.

Der Faktor f_L ist ein fallspezifischer Verlustfaktor, der die Abbauvorgänge im Kanal bzw. allgemeiner, die gesamten Verluste der Virenfracht während Transport und Probennahme inkludiert. Die Einführung des Verlustfaktors erlaubt einen direkten Bezug auf die jeweilige Fallstudie. Der Verlustfaktor könnte durch den Einbezug der Abwassertemperatur verbessert werden, hier wird darauf verzichtet.

7.6.1 Abschätzung N_{RNA}

Abbildung 50: Relative Virenlast F_{V_rel} für 23 Kläranlagen des Coron-A Projekts im Zeitraum der vierten Prävalenzstudie (12.–15. November 2020).



Links: Messdaten in Relation zum Zufluss. Rechts: Boxplotdarstellung.

Quelle: Universität Innsbruck

Die allgemeingültige Bestimmung des N_{RNA} -Wertes ist nicht möglich (auch klinische Studien sind hier zu unsicher), aber ein erster Hinweis kann sich aus der Situation im Zeitraum der vierten Prävalenzstudie (12. bis 15. November 2020) ergeben. Die relative Virenlast in

diesem Zeitraum wurde für die 23 Kläranlagen des Coron-A Projekts (für welche in diesem Zeitraum Daten vorlagen) berechnet und in Abbildung 50 dargestellt:

- Gewichtetes Mittel: $485 \cdot 10^6$ Genkopien/EW/d,
- Quartile nach (ungewichteter) Boxplotdarstellung: 25 %: 210 und 75 %: 532 – jeweils in 10^6 Genkopien/EW/d.

Für die Abschätzung der Virenlast pro infizierter Person N_{RNA} wurde eine Bayessche Inferenzmodellierung (Box und Tiao, 2011) mit dem Prävalenzmodell angewandt. Die relative Virenlast wurde dafür als normalverteilt um den gewichteten Mittelwert ($\mu=485$ und $\sigma=80$ – jeweils in 10^6 Genkopien/EW/d) und die weiteren Parameter des Modells als gleichverteilt in den folgenden Grenzen angenommen:

- | | | | |
|----------------|--------------------|--------------------------|--------------|
| • N_{RNA} | 10^8-10^{13} | Kopien/infiz.Person/d | (Prior) |
| • f_L | 0,3–1,0 | dimensionslos | |
| • F_{V_rel} | $N(\mu, \sigma^2)$ | in 10^6 Genkopien/EW/d | |
| • PZ | 2,6–3,5 | % | (Likelihood) |

Damit erhält man für den – posterior – N_{RNA} Wert 1010.39 Kopien/infizierte Person/d (50 %-Perzentil) mit dem Vertrauensintervall [1010,15–1010,70] (5 %–95 %). Dies kann auch im Sinne eine Lognormalverteilung mit $\mu = 10,39$ und $\sigma = 0,12$ dargestellt werden. Es ist aber klar, dass dieser Wert gemäß seiner Ableitung aus der österreichischen Gesamtsituation nur einen groben Anhaltspunkt darstellen kann.

7.6.2 Prävalenzmodell Beispiel Wien

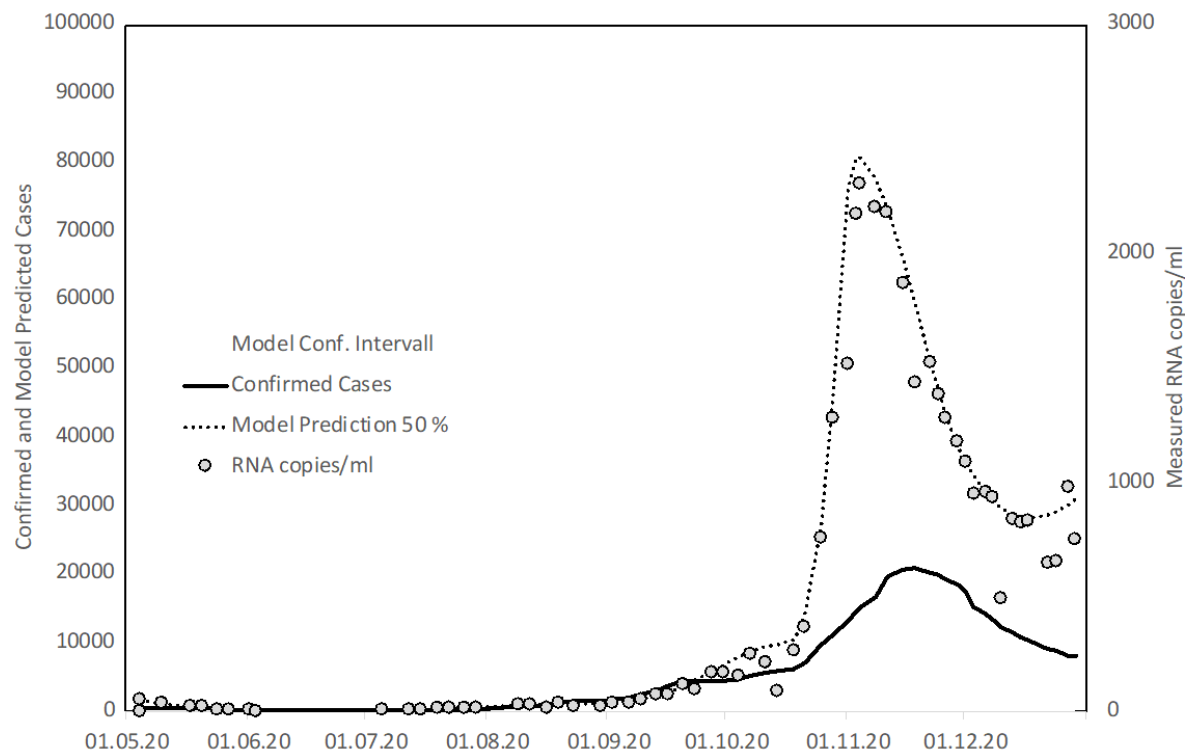
Das einfache Modell wird nun an dem Fallbeispiel Wien getestet. Als erster Schritt wird mit der oben ermittelten LogNorm Verteilung für N_{RNA} ($\mu = 10,39$ und $\sigma = 0,12$) für die bereits bekannte Situation der vierten Prävalenzstudie (12.–15. November 2020) eine lokale Abschätzung des Verlustwertes mit $f_L = 0.56$ errechnet. Die Kalibrierung erfolgte hier mit einer jeweiligen Monte Carlo Simulation (10^6 Samples) der Prävalenz und einer Optimierung mittels Genetischem Algorithmus (Whitley, 1994).

Damit sind alle Parameter des einfachen Modells für die Fallstudie bekannt:

- f_L 0,56 Verlustfaktor dimensionslos
- N_{RNA} LN (10,39; 0,12) RNA Kopien pro Inf. Person / d
- F_{V_rel} Eingabewert Virenfracht in 10^6 Genkopien/EW/d

Der Inputparameter F_{V_rel} wurde gemäß eingangs erwähnter Darstellung auf Basis von NH_4 normiert und dann mittels SPLINE-Methode geglättet. In Abbildung 51 ist das Ergebnis der Prävalenzmodellierung (hier berechnet als Anzahl von infizierten Personen) den aktiven Fallzahlen gegenübergestellt. Das Prävalenzmodell ist stochastisch (Berechnung des N_{RNA} -Wertes mit Monte Carlo Simulation) und das Ergebnis für die Zeitserie kann daher als 50 %-Perzentilwert und 5 %-95 % Konfidenzintervall dargestellt werden.

Abbildung 51: Prävalenzmodell für das Fallbeispiel Wien.



Links: berechnete Infizierte Personen (50%-Perzentil und Vertrauensintervall 5 %-95 %) sowie aktive Fälle (d. h. Inzidenzwert aus Messungen). Rechts: mit Biomarker NH_4 normiertes Messsignal Anzahl Genkopien pro mL.

Quelle: Universität Innsbruck

Das Ergebnis des Prävalenzmodells bildet das reale pandemische Geschehen sehr gut ab, mit dem bereits bekannten zeitlichen Verlauf von mehreren Tagen. Hier sieht man auch, dass – für diese Fallstudie – der Höhepunkt des Krankheitsverlaufs nicht Mitte November 2020 stattfand, sondern eher bereits Anfang November.

Das hier entwickelte und stark vereinfachte Prävalenzmodell wurde nur prototypisch für das Fallbeispiel Wien dargestellt, kann jedoch analog für andere Situationen angewandt werden. Es ist jedoch zu beachten, dass für kleine Einzugsgebiete der zugrundeliegende Datensatz der vierten Prävalenzstudie weniger zuverlässig ist.

7.6.3 Weiterentwicklung

Es ist zu beachten, dass dieses einfache Prävalenzmodell von einem zeitlich konstanten und vom Krankheitsverlauf unbeeinflussten Ausscheideverhalten der infizierten Personen ausgeht. Diese Annahme ist bei Auftreten von Mutationen zumindest zu überprüfen. Dazu liegen aber keine unmittelbaren Studienergebnisse (im Sinne von Prävalenzuntersuchungen) vor. Im Rahmen des Projekts konnten daher keine weitergehenden Untersuchungen zu dieser Fragestellung gemacht werden. Die Auswirkungen von Mutationen bzw. von Maßnahmen auf die Prävalenz sind jedoch von größter Bedeutung. Diese Ursache-Wirkungsmechanismen sollten Gegenstand von weiteren Untersuchungen sein.

8 Prognosesysteme

Die vorangegangenen Ergebnisse wurden über mehreren Datenaufbereitungsschritte für die Entwicklung eines statistischen Analyse- und Vorhersageinstrumentes genutzt. Für die statistische Kurzfristprognose wurden unterschiedliche methodische Wege untersucht und mit Ansätzen des Machine Learnings optimiert. Aufgrund der sehr zufriedenstellenden Vorhersagequalität konnte ein rein auf Abwasserdaten basierender abwasserepidemiologischer Ansatz entwickelt werden.

8.1 Zusammenfassung

Ziel der Arbeiten war es, auf Basis der in den vorangegangenen Arbeiten gewonnenen Abwasserdaten, ein statistisches Analyse- und Vorhersageinstrument zu erarbeiten. Hier waren eine Reihe von Datenaufbereitungsschritten erforderlich. Insbesondere war die Kläranlagenliste zu aktualisieren und deren Gemeinde- bzw. Katastralgemeindezuordnung so zu strukturieren, dass eine Verknüpfung mit den Zahlenangaben für die Humaninzidenzen möglich war. Des Weiteren erfolgte eine Ergänzung aktueller Bevölkerungszahlen. Seitens des Institutes für Infektionsepidemiologie & Surveillance der AGES wurden wöchentlich Tagesinzidenzen aus dem Humanmonitoring auf Gemeindeebene zur Verfügung gestellt, die den Einzugsgebieten der jeweiligen Abwasserreinigungsanlagen zugeordnet wurden. Dies ermöglichte eine kläranlagenbezogene Auswertung der Inzidenzdaten, die mit einem HTML-basierten Reportingsystem umgesetzt wurde.

Für die Analyse der Abwasserdaten war eine Zusammenführung der unterschiedlich strukturierten Dateninputs der Labore notwendig. Aus diesen Daten wurden Abwasserindikatoren berechnet, von denen einige auch die aktuelle Größe der ausscheidenden Bevölkerung berücksichtigen. Diese populationsbezogenen Virenbelastungswerte wurden visualisiert, wobei auch unterschiedliche Glättungsansätze untersucht wurden. Der zeitliche Verlauf der Abwasserindikatoren wurde der Entwicklung der Humaninzidenzen gegenübergestellt, woraus sich ergab, dass sich im Abwasser Trendänderungen frühzeitig zeigen.

Für die statistische Kurzfristprognose wurden unterschiedliche methodische Wege untersucht, wobei sich Generalisierte Additive Modelle (GAM) als sehr flexibles Instrument erwiesen. Damit konnten Trendprognosen für die einzelnen Anlagen erstellt werden, deren

statistische Unsicherheit mittels Konfidenzintervallen berücksichtigt wurde. Die statistische Modellierung wurde anlagenspezifisch durchgeführt und mit Ansätzen des Machine Learnings optimiert. Die statistische Modellevaluierung, aber auch der Vergleich mit den Humaninzidenzen, zeigten eine sehr zufriedenstellende Vorhersagequalität. Damit konnte ein abwasserepidemiologischer Ansatz entwickelt werden, der ausschließlich auf Abwasserdaten beruht. Des Weiteren wurden die Einzeltrends mathematisch zu Bundesländer-trends aggregiert.

Zur Darstellung der Einzelverläufe und Prognosen sowie der Trendübersichten wurde eine webbasierte interaktive Applikation entwickelt. Abschließend wurden gewisse Limitationen des gewählten Prognoseansatzes sowie Anforderungen an ein abwasserbasiertes statistisches Analyse- und Prognosesystem definiert.

8.2 Datenaufbereitungsschritte

8.2.1 Kläranlagenliste

Die Datengrundlage zu den Kläranlagen bildete die vom Umweltbundesamt aus dem Emissionsregister Oberflächengewässer (EMREG-OW, Jahr 2018) zur Verfügung gestellte Liste von kommunalen Kläranlagen mit mindestens 2.000 Einwohnerwerten ($EW_{60} \geq 2000$). EW_{60} ist ein Vergleichswert für die in Abwässern enthaltenen Schmutzfrachten, mit dem sich die Belastung einer Kläranlage ausdrücken lässt.⁵

Die Originalliste enthält 633 Kläranlagen und größtenteils Informationen über angeschlossene Gemeinden bzw. Katastralgemeinden (Teilgebiete von Gemeinden). Bei 67 Kläranlagen fehlten jedoch diese Informationen. Bei diesen Kläranlagen wurde einerseits die Standortgemeinde der Kläranlage ergänzt bzw. durch Recherche auf den Internetseiten der Abwasserverbände weitere angeschlossene Gemeinden hinzugefügt. Für die angegebenen Katastralgemeinde-Nummern wurden aus dem Katastralgemeinde-Verzeichnis (Datenstand 9.1.2020) die zugehörige politische Gemeindekennzahl (GKZ) ermittelt, da die GKZ die Verknüpfungsebene mit den Infektionszahlen laut EMS bildete.

⁵ vgl. [info.bml.gv.at/themen/wasser/wasserqualitaet/abwasserreinigung/masseinheiten.html](https://www.info.bml.gv.at/themen/wasser/wasserqualitaet/abwasserreinigung/masseinheiten.html)

8.2.2 Infektionszahlen

Mit dem Institut für Infektionsepidemiologie & Surveillance der AGES war im Juni 2020 vereinbart worden, dass für das Coron-A Projekt wöchentlich montags ein Datenexport aus dem Epidemiologischen Meldesystem (EMS) bereitgestellt wurde. Diese Datei enthielt die Anzahl gemeldeter COVID-19-Fälle auf Gemeindeebene (je GKZ) von Freitag bis Donnerstag in der vorangegangenen Woche (je Datum). Als Datumsangabe wurde das Datum des ersten positiven Laborbefunds vereinbart. Wurde bei der Meldung eines positiven Falls ein Aufenthaltsort im EMS angegeben, wurde diese GKZ verwendet, sonst die GKZ des Hauptwohnsitzes der Person. Fehlte die GKZ, wurde nur die Bezirkskennzahl (BKZ) angegeben.

8.2.3 Zusatzinformationen Gemeinden bzw. Bezirke

Die COVID-19-Infektionszahlen wurden über die politischen Gemeinden (GKZ) den Kläranlagen zugeordnet. Dazu und für weitere Auswertungen wurden Informationen der Gemeinden, wie Gemeindename, Bezirk, Bundesland, Bevölkerungsanzahl benötigt.⁶ Verwendet wurden die Gemeindekennziffern zum Gebietsstand 2020 und die Bevölkerungszahlen zum Stand 1.1.2019.

8.2.4 Wöchentliche Auswertung der Meldezahlen

Aus den aktuellen Infektionszahlen, der Kläranlagenliste und den Gemeindeinformationen wurde dem Projektteam ab Juni 2020 wöchentlich montags ein interaktives HTML-Dokument über die aktuellen Meldezahlen auf den folgenden Aggregationsebenen bereitgestellt:

- österreichweit,
- je Bundesland,
- je Bezirk (inkl. Wiener Stadtbezirke),
- je Gemeinde,
- je Kläranlage.

⁶ vgl. Statistik Austria, [statistik.at](https://www.statistik.at) (download 16.06.2020)

Um eine Abschätzung der aktiv Erkrankten bzw. potenziellen Virus-Ausscheiden zu erhalten, wurden gemeldete positive Fälle nach 14 Tagen vom Meldedatum (Datum erster positiver Laborbefund) als genesen angenommen. Die Anzahl aktiver positiver Fälle zu einem gewissen Zeitpunkt ergab sich durch Abziehen der bis zu diesem Zeitpunkt geschätzten Genesenen von den positiven Fällen (kumuliert). Diese Zahl entspricht der Summe der gemeldeten neuen Fällen in den letzten 14 Tagen, also der 14-Tage-Inzidenz (in absoluten Zahlen).

Abbildung 52: Ausschnitt aus wöchentlichem Meldezahlenbericht, Infektionslage auf Bundeslandebene.

Aktueller Stand nach Bundesländern

Die meisten Neuinfektionen in Kalenderwoche 19 (Meldungen bis Donnerstag, 13 Mai 2021 berücksichtigt) gab es im Bundesland Wien.

Aktuelle Infektionskennzahlen je Bundesland laut EMS (Stand: KW 19, Meldungen bis Donnerstag, 13 Mai 2021 berücksichtigt)

BL	Jahr	KW	Neue positive Fälle	Aktive positive Fälle	Wachstumsrate aktive Fälle	Positive Fälle kumuliert	Neue positive Fälle pro 100.000 Einwohner*innen	Aktive positive Fälle pro 100.000 Einwohner*innen	Positive Fälle kumuliert pro 100.000 Einwohner*innen
W	2021	19	1367	3415	-32.5%	136996	72.0	180.0	7,219.8
ST	2021	19	1253	3038	-23.6%	78466	100.8	244.4	6,312.4
OOE	2021	19	1192	3147	-29.3%	114566	80.4	212.3	7,730.0
NOE	2021	19	966	2312	-29.9%	106024	57.6	137.8	6,320.2
V	2021	19	549	1317	-24.3%	29213	139.2	334.0	7,408.9
K	2021	19	485	1172	-25.8%	39535	86.5	208.9	7,048.0
T	2021	19	472	1406	-38.4%	61545	62.5	186.3	8,154.8
S	2021	19	364	975	-38.0%	50243	65.6	175.6	9,049.2
B	2021	19	121	312	-34.0%	17760	41.2	106.3	6,052.5

Showing 1 to 9 of 9 entries

Quelle: AGES

Wie in Abbildung 52 ersichtlich, wurden nicht nur die absoluten Zahlen der neuen positiven Fälle und der aktiven positiven Fälle (14-Tage-Inzidenz) ausgegeben, sondern auch in Relation zur Bevölkerung gesetzt. Des Weiteren wurde die Wachstumsrate der aktiven Fälle ausgewiesen. Die Wachstumsrate spiegelt die prozentuelle Veränderung einer Kennzahl im Vergleich zum vorigen Zeitpunkt wider. Ist der vorhergehende Wert 0, ergibt sich eine Division durch 0, und die Wachstumsrate ist dann nicht definiert.

Die Kennzahlen wurden pro Woche („KW“) angegeben, die in Anpassung an den Datenexport immer mit einem Freitag beginnend und an einem Donnerstag endend festgelegt

wurde. Die Woche 1 eines Jahres beginnt nach dieser Definition am ersten Freitag im Jänner.

Die wöchentliche Auswertung der Infektionszahlen auf Gemeinde- bzw. Kläranlagenebene war vor allem zu Beginn des Projekts wesentlich, um herauszufinden, wo es ein COVID-19-Infektionsgeschehen gibt und bei welchen Kläranlagen eine Probenahme sinnvoll ist. Zum Vergleich des Verlaufs der Abwassermessungen an einer Kläranlage wurde die Auswertung auf Tagesbasis generiert und wöchentlich aktualisiert zur Verfügung gestellt.

8.2.5 Abwassermessungen

Die Ergebnisse der Abwassermessungen wurden gemäß einer Vorlage von den Laboren übermittelt und enthielten folgende Informationen:

- Messstelle (als Identifikationsnummer der Kläranlage wurde der uww-Code laut Meldepflicht gemäß Kommunaler Abwasserrichtlinie verwendet),
- Probenahmedatum (Beginn der 24h-Mischprobe),
- Laborinterne Proben-ID,
- Genkopien [Anzahl pro mL],
- Chemischer Sauerstoffbedarf (CSB) [mg pro Liter],
- Zulaufmenge [m³ pro Tag].

Optional wurden folgende Parameter übermittelt:

- Sammeldauer [Stunden], Standard = 24h-Mischprobe,
- Lagertemperatur [°C],
- Extraktionsdatum,
- Zulauftemperatur [°C],
- Gesamtstickstoff [mg pro Liter],
- Ammonium-Stickstoffmg pro Liter],
- Absetzbare Stoffe [mL pro Liter].

Die übermittelten Ergebnisse der Labore wurden montags in einheitlicher Form zusammengefügt. Nicht-nachweisbare Ergebnisse hinsichtlich Genkopien wurden von den drei Laboren unterschiedlich gemeldet:

- TU Wien: Wert 10^{-5} ,
- MU Innsbruck: Wert 0,
- Universität Innsbruck: verschiedene Werte, die vom Analysegerät ausgegeben wurden, alle Werte <20 Genkopien pro mL wurden als nicht-nachweisbar betrachtet.

Für nicht-nachweisbare Ergebnisse aller drei Labore wurde einheitlich der Wert 10^{-5} eingesetzt.

Aus den Daten wurden u. a. folgende Abwasserindikatoren und Kennzahlen berechnet:

- Virusfracht [Genkopien] = Genkopien [Anzahl pro mL] * Zulaufmenge [m^3 pro Tag] * 10^6 ,
- CSB-Fracht [kg pro Tag] = (CSB [mg pro Liter]/ 10^3) * Zulaufmenge [m^3 pro Tag],
- Einwohnerwert ($\text{EW}_{\text{CSB}_{120}}$) = (10^3 *CSB-Fracht [kg pro Tag]) / 120 [g CSB/(EW*Tag)],
- Virusfracht pro $\text{EW}_{\text{CSB}_{120}}$ = Virusfracht [Genkopien] / Einwohnerwert ($\text{EW}_{\text{CSB}_{120}}$)
 $= 120*10^6*$ Genkopien [Anzahl(pro mL) / CSB [mg pro Liter],
- Abstand [Tage] zwischen den Proben,
- Wochentag der Probenahme.

8.2.6 Datenverknüpfung

Die Abwassermessungen (vgl. Kapitel 8.2.5) und die Infektionsszahlen (vgl. Kapitel 8.2.4) wurden für die beprobten Kläranlagen auf Tagesbasis verknüpft. Die Infektionsszahlen waren täglich verfügbar. Das Beprobungsintervall beim Abwasser war je nach Kläranlage sehr unterschiedlich.

Sämtliche beschriebene Datenaufbereitungsschritte wurden mit der Software R (R Core Team, 2018) durchgeführt.

Tabelle 12: Übersicht über Beprobungshäufigkeit und -intervall der Kläranlagen.

uwvCode	Bundes-land	Name	Betreuung durch	Beprobungs- häufigkeit	Status	Anzahl Proben	Erste Probe	Letzte Probe	Abstand zwischen den Proben (Median)
ATTP_1-00000010	B	Eisenstadt Eisbachtal	Kreuzinger	2x Monat	fix im Projekt CoronA				
ATTP_1-00000051	B	Podersdorf	Kreuzinger	2x Monat	fix im Projekt CoronA				
ATTP_2-K1931629	K	Klagenfurt	Insam	2x Monat	fix im Projekt CoronA				
ATTP_2-K1939997	K	Villach	Insam	2x Monat	fix im Projekt CoronA	13	03.08.2020	09.11.2020	7
ATTP_2-K1944050	K	Velden (Wörthersee West)	Insam	2x Monat	fix im Projekt CoronA	45	27.07.2020	06.11.2020	2
ATTP_2-K1949374	K	Spittal (Millstättersee)	Oberacher	seit 28.7. täglich; ab 7.9. 2x Monat	fix im Projekt CoronA	35	28.07.2020	31.08.2020	1
ATTP_3-1022	NÖ	Guntramsdorf	Kreuzinger	2x Monat	fix im Projekt CoronA				
ATTP_3-29	NÖ	Baden	Kreuzinger	2x Monat	fix im Projekt CoronA				
ATTP_3-34	NÖ	Bad Vöslau	Kreuzinger	2x Monat	fix im Projekt CoronA				
ATTP_3-47	NÖ	St. Pölten	Kreuzinger	2x Monat	fix im Projekt CoronA				
ATTP_4-40201001	OÖ	Steyr	Kreuzinger	2x Monat	fix im Projekt CoronA				
ATTP_4-40428001	S	Salzach-Pongau	Insam	2x Monat	fix im Projekt CoronA				
ATTP_4-40601002	OÖ	Freistadt	Kreuzinger	2x Monat	fix im Projekt CoronA				
ATTP_4-41812001	OÖ	ABV Welser Heide	Kreuzinger	2x Monat	fix im Projekt CoronA				
ATTP_5-A1699622R154	S	Siggerwiesen	Insam	wöchentlich	fix im Projekt CoronA	31	03.08.2020	08.11.2020	3
ATTP_5-A1844668R161	S	Zell am See	Insam	wöchentlich	fix im Projekt CoronA	21	03.08.2020	08.11.2020	4,5
ATTP_6-M3489301R0	St	Graz	Oberacher	2x Monat	fix im Projekt CoronA				
ATTP_6-M3647058R0	St	Kapfenberg	Oberacher	2x Monat	fix im Projekt CoronA	24	07.08.2020	30.08.2020	1
ATTP_6-M3691867R0	St	Bad Aussee	Oberacher	2x Monat	fix im Projekt CoronA	21	10.08.2020	30.08.2020	1
ATTP_7-7101301	T	Innsbruck	Oberacher	täglich	fix im Projekt CoronA	168	02.06.2020	17.11.2020	1
ATTP_7-7309302	T	Fritzens	Oberacher	täglich	fix im Projekt CoronA	67	10.09.2020	17.11.2020	1
ATTP_7-7411204	T	Kitzbühel	Oberacher	täglich	fix im Projekt CoronA	2	11.11.2020	16.11.2020	5
ATTP_7-7513103	T	Kufstein	Oberacher	täglich	fix im Projekt CoronA	69	08.09.2020	17.11.2020	1
ATTP_7-7930111	T	Strass	Oberacher	täglich	fix im Projekt CoronA	68	09.09.2020	17.11.2020	1
ATTP_8-Bregenz	V	Bregenz	Insam	2x Monat	fix im Projekt CoronA	19	03.08.2020	08.11.2020	5,5
ATTP_8-Hohenems	V	Hohenems	Insam	2x Monat	fix im Projekt CoronA	19	27.07.2020	08.11.2020	5
ATTP_9-HKA-Simmering	W	Wien	Kreuzinger	8x Monat	fix im Projekt CoronA	55	04.05.2020	15.11.2020	3,5

Quelle: AGES

8.3 Modellierung

8.3.1 Deskriptive Analyse und Visualisierung Abwassermessungen

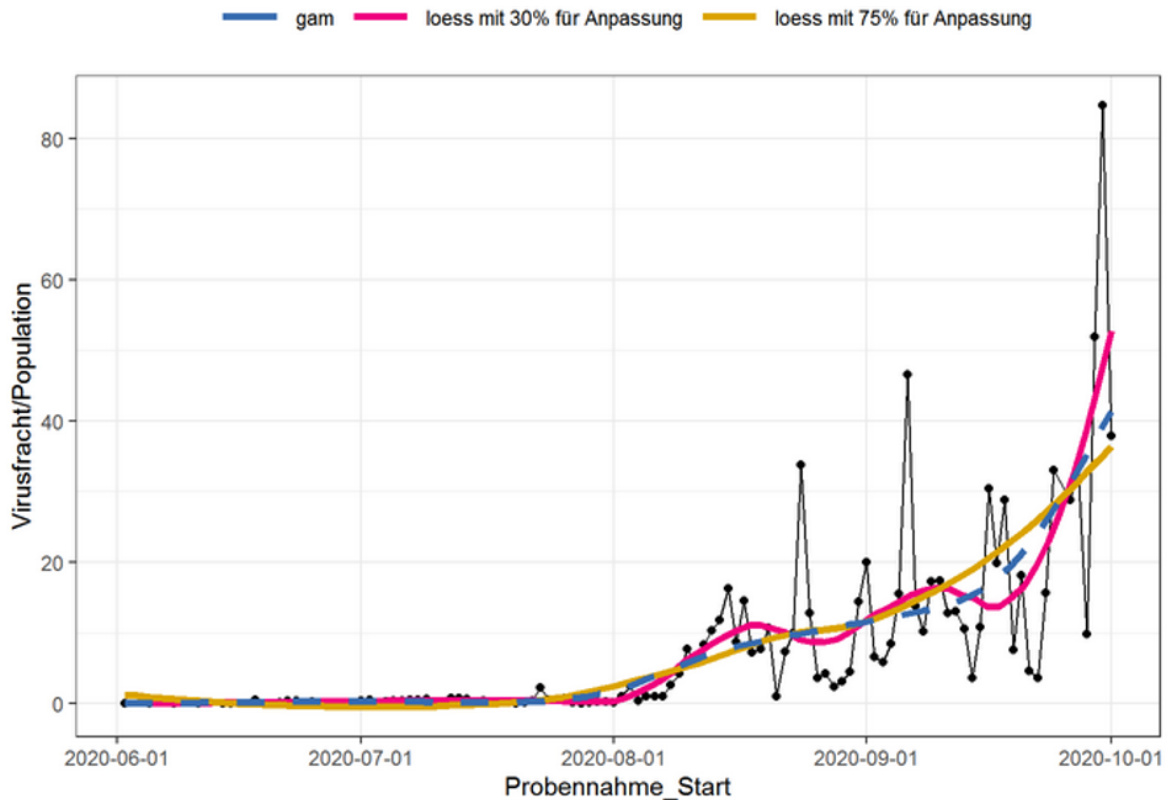
Das Abwassersignal bei einer Kläranlage kann einerseits rein über die Viruskonzentration (Anzahl Genkopien pro mL) bzw. Virusfracht (Anzahl Genkopien im Tageszulauf) andererseits auf sogenannte Populationsmarker bezogen dargestellt werden. Dieser Populationsmarker dient zur Abschätzung, von wie vielen Personen die Ausscheidungen im Abwasser einer Kläranlage stammen und wird als Einwohnerwert (EW) bezeichnet. Dies ist insbesondere für Gemeinden mit hohem touristischen Bevölkerungsanteil bzw. mit hohem Pendelanteil von Relevanz. Als Populationsmarker gibt es mehrere chemische Alternativen. Neben dem CSB (1 EW = 120 g) (vgl. Kapitel 8.2.5) wurden im Projekt noch die Populationsmarker Ammonium (1 EW = 8 g) und Gesamtstickstoff (1 EW = 11 g) betrachtet (siehe Kapitel 4).

- Virusfracht pro $EW_{CSB_120} = \text{Virusfracht [Genkopien]} / \text{Einwohnerwert (} EW_{CSB_120} \text{)}$
 $= 120 * 10^6 * \text{Genkopien [Anzahl pro mL]} / \text{CSB [mg pro Liter]},$
- Virusfracht pro $EW_{NH4_8} = \text{Virusfracht [Genkopien]} / \text{Einwohnerwert (} EW_{NH4_8} \text{)}$
 $= 8 * 10^6 * \text{Genkopien [Anzahl pro mL]} / \text{NH4 [mg pro Liter]},$
- Virusfracht pro $EW_{N_11} = \text{Virusfracht [Genkopien]} / \text{Einwohnerwert (} EW_{N_11} \text{)}$
 $= 11 * 10^6 * \text{Genkopien [Anzahl pro mL]} / \text{N [mg pro Liter]}.$

Ein Vorteil der Verwendung der populationsbezogenen Virenfracht im Abwasser ist, dass die Messungen an verschiedenen Tagen besser vergleichbar werden (Abfangen von Wochenend-, Tourismuseffekten) und auch Kläranlagen unabhängig von ihrer Größe (Anzahl an angeschlossenen Einwohner:innen) besser miteinander verglichen werden können. Der Nachteil bei Verwendung der Populationsmarker ist, dass bei fehlender Meldung des Populationsmarkers seitens der Kläranlage weitere Lücken im Abwassersignal entstehen. Am einfachsten verfügbar war bei den meisten Kläranlagen der CSB, deshalb wurde der Fokus bei der Auswertung auf die Virusfracht pro EW_{CSB_120} gelegt.

Für die Darstellung des Abwassersignals wurden verschiedene Glättungsmethoden für die Kläranlagen Innsbruck (ATTP_7-7101301), Wien (ATTP_9-HKA-Simmering) und Wörthersee West (ATTP_2-K1944050) getestet (vgl. Abbildung 53). Diese drei Kläranlagen wurden für die Entwicklung von Darstellung und Modellierung ausgewählt, da hier schon im Sommer 2020 einige Abwassermessungen zur Verfügung standen. Damit konnten auch alle drei Labore (MU Innsbruck, TU Wien, Universität Innsbruck) und unterschiedliche Beprobungsintervalle (täglich bzw. 2–3 Tage) sowie unterschiedliche Kläranlagengrößen berücksichtigt werden.

Abbildung 53: Virusfracht pro EW_{CSB_120} der ARA Innsbruck mit einfachen Glättungsmodellen.



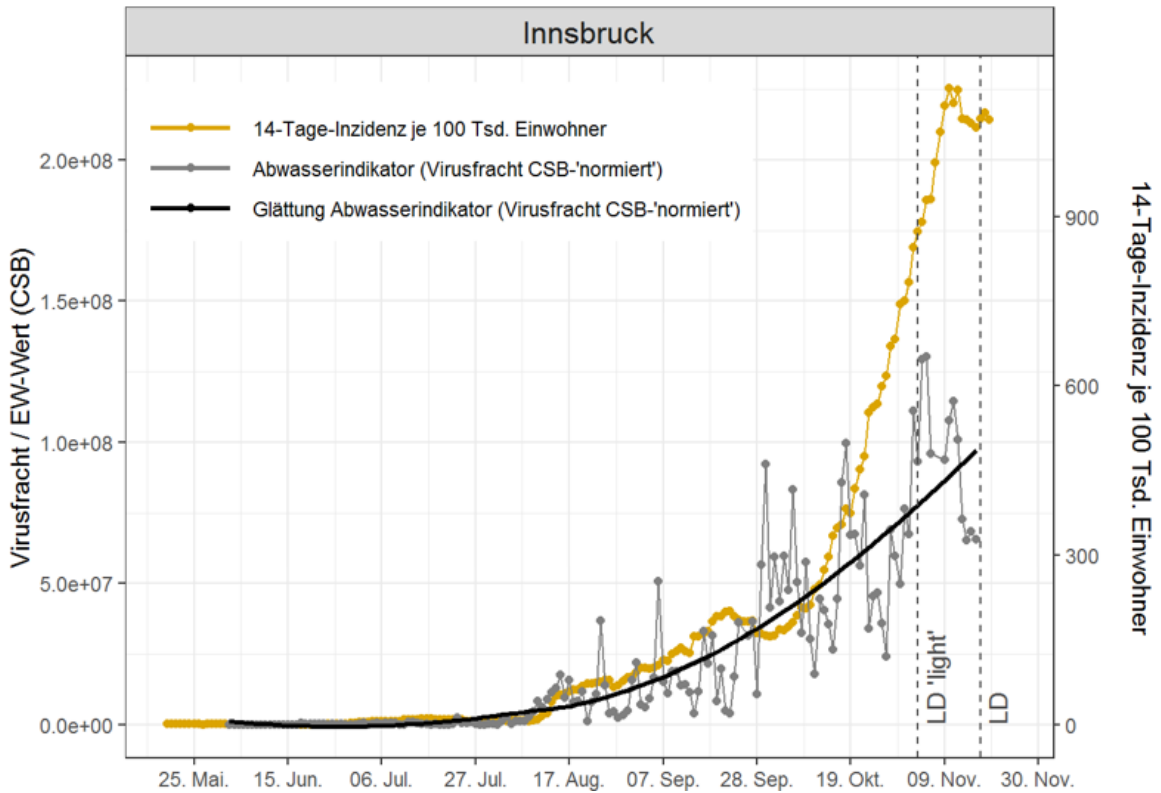
Quelle: AGES

Als Glättungsmethoden wurden LOESS (Locally estimated scatterplot smoothing) und GAM (Generalized Additive Model) getestet und mittels des Fehlermaßes RMSE (Root Mean Square Error) evaluiert. Aufgrund der Flexibilität wurde für die Modellierung letztendlich GAM gewählt (vgl. Kapitel 8.3.2).

Um die Entwicklung des Abwassersignals mit der Entwicklung der Inzidenzzahlen vergleichen zu können, wurden beide Signale in einer Grafik dargestellt. Dabei spielt die Art der Skalierung bzw. die Wahl des Achsenverhältnisses eine wesentliche Rolle, welches Bild vermittelt wird. In welchem Verhältnis das Abwassersignal (Virusfracht pro EW_{CSB_120}) zu der 14-Tage-Inzidenz gut darstellbar ist, war von Kläranlage zu Kläranlage unterschiedlich (Abbildung 54 und Abbildung 55) und veränderte sich auch über die Zeit. Das lässt sich dadurch erklären, dass die Entwicklung der Meldedaten bzw. Inzidenzzahlen stark von der aktuellen und lokalen Teststrategie abhängt. Informationen über Testzahlen sind aber nicht auf der Ebene der Kläranlagen verfügbar, sondern liegen nur auf Bundeslandebene vor. Aus diesem Grund, aber auch, weil der abwasserepidemiologische Ansatz datenmäßig

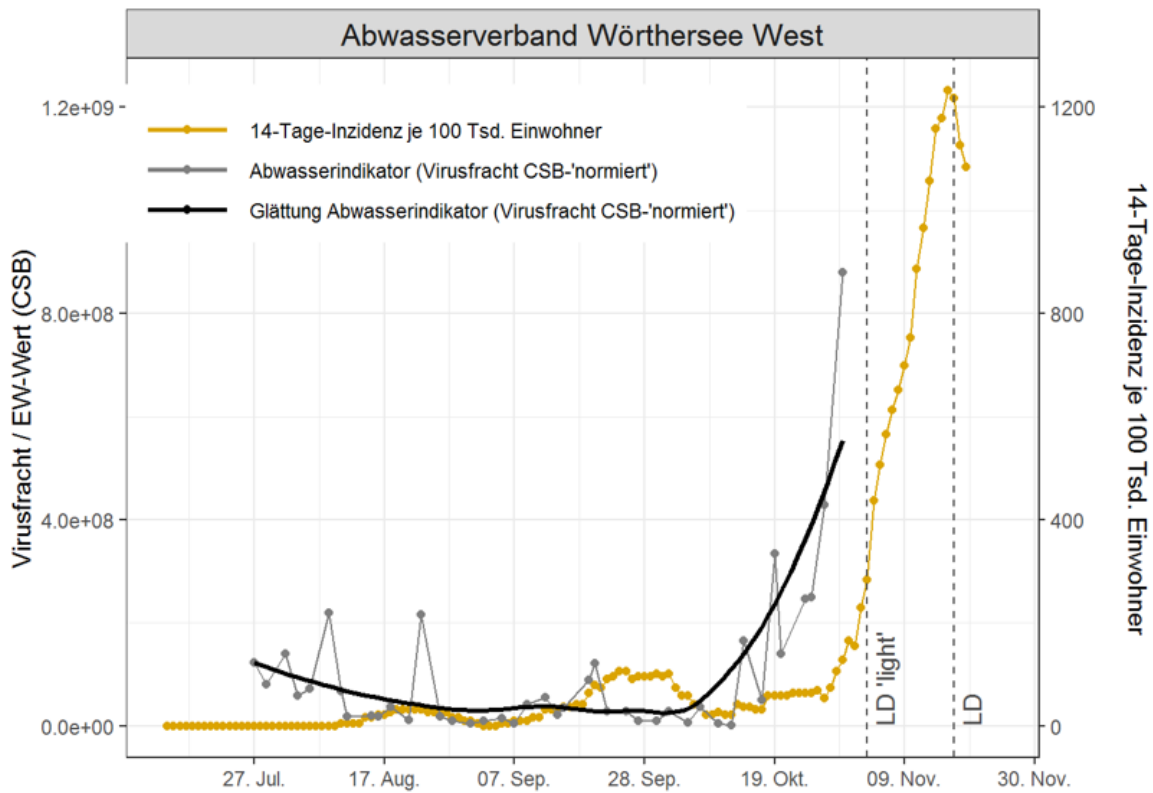
selbständig funktionieren sollte, wurde bei der Modellierung des Abwassersignals für eine Prognose darauf verzichtet, die Meldezahlen bzw. Inzidenzzahlen datenanalytisch zu verwenden.

Abbildung 54: Darstellung Virusfracht pro EW_{CSB_120} mit LOESS-Glättung und 14-Tage-Inzidenz für ARA Innsbruck.



Quelle: AGES

Abbildung 55: Darstellung Virusfracht pro EW_{CSB_120} mit LOESS-Glättung und 14-Tage-Inzidenz für Abwasserverband Wörthersee West.



Quelle: AGES

8.3.2 GAM-Ansatz: Rolling Window

Als Grundmodell für den zeitlichen Trend des Abwassersignals wurde ein Generalisiertes Additives Modell (GAM) gewählt. Der Vorteil zu alternativen Glättungsmethoden, wie z. B. LOESS, ist die große Flexibilität, die penalisierte Regression Splines bieten und die Ähnlichkeit zur herkömmlichen linearen Regression. Im Gegensatz zu LOESS kann ein GAM wie ein lineares Modell behandelt werden und neben der zeitlichen Variable können zusätzliche erklärende Variablen aufgenommen werden. Überdies können eine Kovarianzstruktur oder Zufallseffekte gesetzt werden. Von reinen Zeitreihenmodellen, wie z. B. ARIMA, wurde aufgrund der unregelmäßigen Messfrequenz und dem primären Ziel einer Trendschätzung abgesehen.

Für vier verschiedene Zielvariablen wurde jeweils ein GAM entwickelt, nämlich für die Virusfracht und die drei auf die Populationsmarker bezogenen Varianten. In allen vier

Fällen wurde der Faktor 10^6 weggelassen, um die Modellschätzung numerisch effizienter zu halten. Außerdem wurden die Variablen logarithmiert (Basis 10). Zum einen wird so versucht, der Verteilungsannahme eines additiven Modells mit normalverteilten Fehlern gerecht zu werden, zum anderen aber auch, die stark streuenden Genkopien zu dämpfen. Überdies ermöglicht die logarithmische Transformation rein positive Vorhersagewerte.

$$Y_1 = \log_{10} \left(\frac{\text{Virusfracht [Genkopien]}}{10^6} \right) = \log_{10} (\text{Genkopien [Anzahl pro ml]} * \text{Zulaufmenge [m}^3 \text{ pro Tag]})$$

$$Y_2 = \log_{10} \left(\frac{\text{Virusfracht pro EW}_{\text{CSB}_{120}}}{10^6} \right) = \log_{10} \left(120 * \frac{\text{Genkopien [Anzahl pro mL]}}{\text{CSB [mg pro Liter]}} \right)$$

$$Y_3 = \log_{10} \left(\frac{\text{Virusfracht pro EW}_{\text{NH}_4_{8}}}{10^6} \right) = \log_{10} \left(8 * \frac{\text{Genkopien [Anzahl pro mL]}}{\text{NH}_4 \text{ [mg pro Liter]}} \right)$$

$$Y_4 = \log_{10} \left(\frac{\text{Virusfracht pro EW}_{\text{N}_{11}}}{10^6} \right) = \log_{10} \left(11 * \frac{\text{Genkopien [Anzahl pro mL]}}{\text{N [mg pro Liter]}} \right)$$

Der Modellierungsansatz ist für alle vier Zielvariablen der gleiche, deshalb wird im Folgenden die allgemeine Bezeichnung „Genkopien“ verwendet.

Die Modellformel:

$$\log_{10}(\text{Genkopien}_i) = \beta_0 + s(t_i) + \epsilon_i$$

$$\epsilon_i \sim N(0, \sigma_\epsilon^2)$$

beschreibt das angewendete additive Modell. Dabei gibt β_0 den Intercept und damit das Grundniveau der logarithmierten Genkopien an. Der Zeitpunkt einer Messung t_i wird als Parameter einer Glättungsfunktion $s(\cdot)$, der Klassen thin plate regression splines oder cubic regression splines (Wood, 2017) im Modell berücksichtigt. Die endgültige Klasse der Glättungsfunktion $s(\cdot)$ wird in späterer Folge mit einer angepassten Kreuzvalidierung ermittelt. Die verbleibende Schwankung in den logarithmierten Genkopien, die nicht durch den Intercept und Glättungsfunktion erklärt werden kann, wird durch ϵ_i im Modell repräsentiert. Für diesen Fehlerterm wird eine Normalverteilung mit Erwartungswert 0 und Varianz σ_ϵ^2 angenommen. Um wieder auf die ursprüngliche Skala der Genkopien [in Mio.] zu kommen, werden die Modellvorhersagen des additiven Modells mit der Anti-Log Funktion (Basis 10) zurücktransformiert:

$$\widehat{\text{Genkopien}}_i = 10^{\hat{\beta}_0 + \hat{s}(t_i)}$$

Die Varianz des zeitlichen Trends wird nach der Rücktransformation mittels Delta-Methode (Casella und Berger 2002) berechnet. Die Kovarianz-Matrix der rücktransformierten Vorhersagen nimmt folgende Form an:

$$\text{var}(\widehat{\text{Genkopien}}) = DV_{\beta}D^t,$$

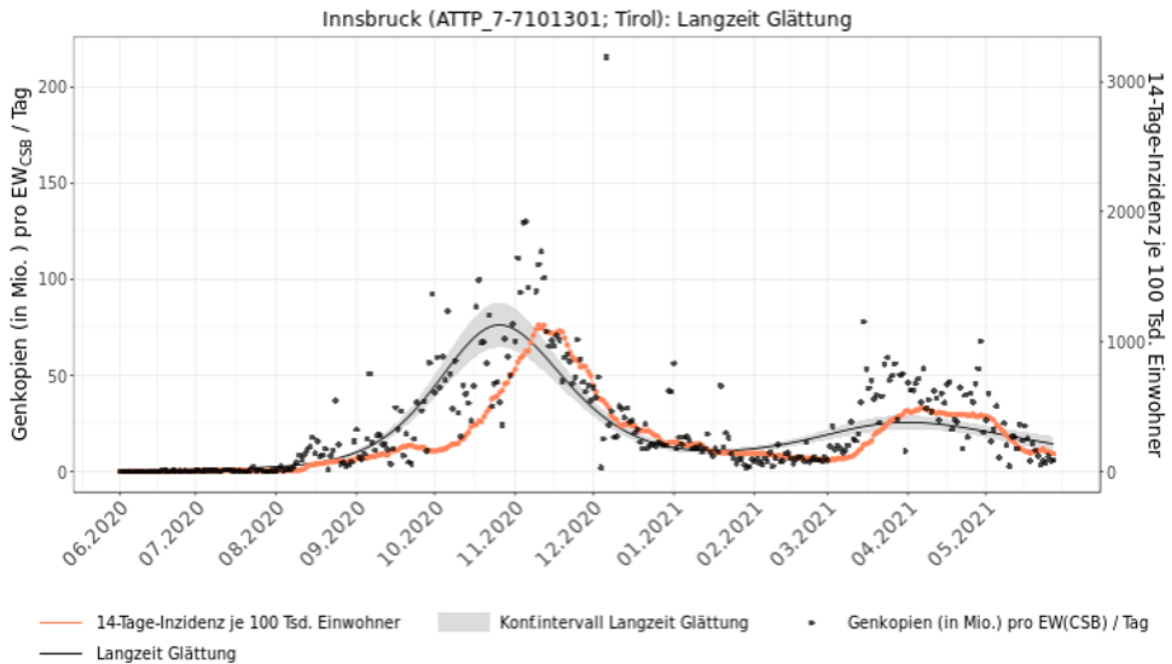
wo D die Matrix erster Ableitungen der rücktransformierten Modellvorhersagen bzw.

$$\left[(\partial 10^{x_i^t \beta} / \partial \beta_j) \right]_{i,j}$$

ist. V_{β} repräsentiert die Kovarianz-Matrix der geschätzten Koeffizienten vom log-transformierten additiven Modell. Die Konfidenzintervalle für die Trendlinie werden anhand der Standardfehler, die Wurzel der diagonalen Elemente von $\text{var}(\widehat{\text{Genkopien}})$, und einem Konfidenzniveau von 95 % berechnet. So kann ein Unsicherheitsbereich der Trendlinie gezeigt werden bzw. überdecken die Konfidenzintervalle die Trendlinie mit 95 %. Zu beachten ist, dass die so berechneten Konfidenzintervalle stark vom Level bzw. der Richtung der Trendlinie abhängig sind. Durch die Transformation mit der logarithmischen Funktion bzw. dem Anti-Log, können die Konfidenzintervallgrenzen bei fallendem Trend stark gegen null zusammengedrückt werden bzw. bei steigendem Trend explodieren. Da die Varianzen durch die Delta-Methode berechnet werden, und diese auf einer asymptotischen Normalverteilung basiert, sind die Konfidenzintervalle trotz Transformation immer symmetrisch. Untergrenzen der Konfidenzintervalle können somit auch negativ sein.

In der Praxis werden zwei Modellierungsansätze verwendet, die beide auf dem oben beschriebenen additiven Modell basieren. Im ersten Ansatz wird ein Modell an die gesamte Zeitreihe einer Messstation angepasst. Dieser Ansatz wird in weiterer Folge als Langzeit Glättung bezeichnet. In der Langzeit Glättung werden vorübergehende Schwankungen weniger stark berücksichtigt, da alle Messdaten herangezogen werden. Abbildung 56 zeigt eine Langzeit Glättung für die Messstation Innsbruck (ATTP_7-7101301) für CSB normierte Genkopien. Die schwarze Linie zeigt den Trend, der durch das additive Modell berechnet wurde und der graue Korridor die Konfidenzintervalle für die Trendlinie.

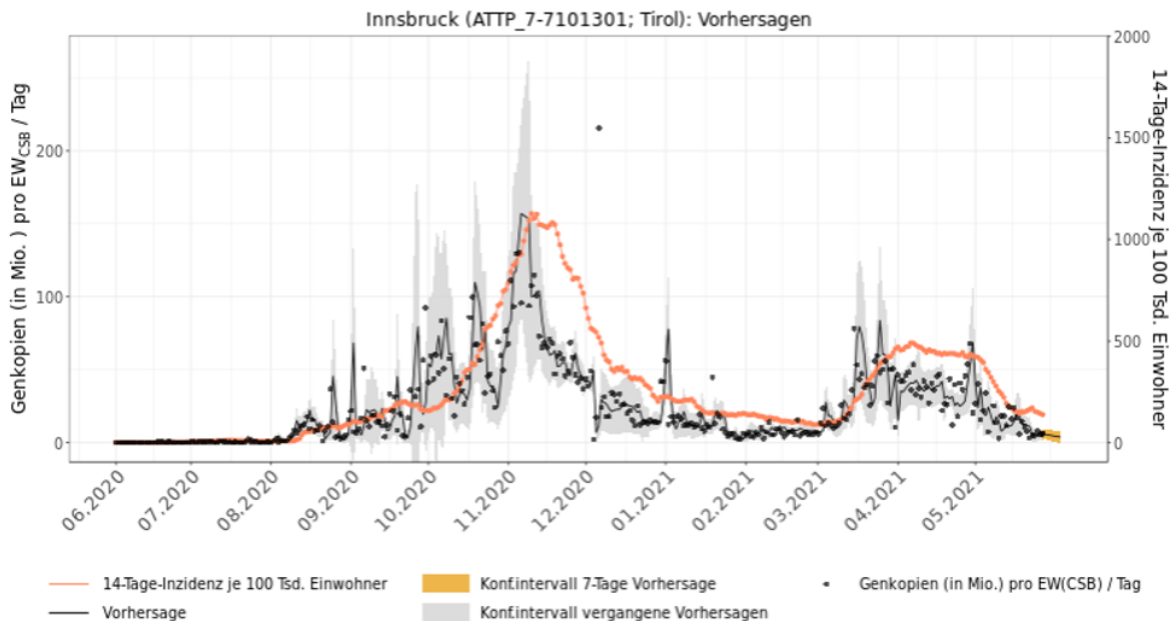
Abbildung 56: Langzeit Glättung.



Quelle: AGES

Der zweite Ansatz, in weiterer Folge auch Vorhersage oder Rolling Window genannt, versucht im Gegensatz zum ersten Ansatz kurzfristige Trends zu modellieren. Da für kurzfristige Trends bzw. aktuelle Vorhersagen alte Messungen weniger Bedeutung haben, wird das additive Modell nur an einen Ausschnitt der Messdaten angepasst. Konkret wird ein Fenster (Rolling Window) definiert, das über den Messzeitraum um eine Einheit geschoben wird. In jedem Fenster wird ein Modell anhand aller darin liegenden Messdaten berechnet und der nächste Messzeitpunkt, der außerhalb des Fensters liegt, vorhergesagt. Eine Vorhersage für die nächsten sieben Tage kann anhand des letzten Fensters generiert werden. Hier wird im letzten Fenster mit dem additiven Modell nicht ein weiterer Tag, sondern sieben weitere Tage vorhergesagt. Konfidenzintervalle können ähnlich wie für die Langzeit Glättung berechnet werden. Abbildung 57 zeigt den Rolling Window Ansatz für die Messstation Innsbruck.

Abbildung 57: Rolling Window.



Quelle: AGES

Zusätzlich zum grauen Korridor wird hier noch ein goldener Korridor für die 7-Tage-Vorhersage abgebildet. Im Vergleich zu Abbildung 56 sieht man hier deutlich, dass die Vorhersagen viel volatil und stark von den aktuellen Werten in den jeweiligen Fenstern abhängig sind. Andererseits spielen vergangene Ereignisse, wie z. B. politische Maßnahmen oder das Level der Genkopien, kaum eine Rolle und die Vorhersagen spiegeln die momentane Situation abhängig von der Länge des Schiebefensters wider. Im Fall Innsbruck würde man für die nächsten sieben Tage einen Abfall der CSB-normierten Genkopien vorhersagen. Die Länge der Schiebefenster wird ähnlich wie die Wahl der Glättungsfunktion mit einer Kreuzvalidierung, die im nächsten Abschnitt beschrieben wird, getroffen.

Nicht alle Messstationen wurden in der Langzeit Glättung und Rolling Window Vorhersage berücksichtigt. Als Mindestanforderung für eine Modellierung wurden 23 verfügbare Messungen festgelegt. Das heißt, Messstationen mit weniger als 23 Messzeitpunkten wurden nicht berücksichtigt und es wurde keine Langzeit Glättung oder Vorhersage berechnet. Grund dafür ist, dass das additive Modell einige Parameter schätzen muss und bei den Anlagen mit relativ wenigen Messungen zu viele Freiheitsgrade benötigt werden bzw. sich die Sinnhaftigkeit einer Modellierung erübrigt. Tabelle 13 zeigt jene Messstationen bei denen alle vier Zielvariablen verfügbar waren und modelliert wurden. Anstatt mehrfacher Messungen bzw. mehrerer Einträge zu Genkopien an einem Tag, die in

der Datenbank bei manchen Messstationen vorkamen, wurden in der Modellierung Tages-Mittelwerte der Genkopien verwendet.

Tabelle 13: Messstationen und Anzahl Messwerte für Modellierung, Stand 28.05.2021.

Messstation	Bundesland	# Genkopien	# NH ₄ normiert	# N Normiert	# CSB normiert
Wörthersee Ost	Kärnten	78	74	75	75
Villach	Kärnten	83	70	68	70
Wörthersee West	Kärnten	117	114	111	111
Millstätter See	Kärnten	53	-	-	53
Bad Vöslau	Niederösterreich	30	29	29	29
An d. Traisen	Niederösterreich	27	27	27	27
Wolfgangsee-Ischl	Oberösterreich	38	38	38	37
Tennengau-Süd-Kuchl	Salzburg	66	61	60	61
Siggerwiesen	Salzburg	111	106	60	102
Salzach-Pongau	Salzburg	72	32		32
Saalachtal-Saalfelden	Salzburg	50	36	35	36
Zeller-Becken	Salzburg	69	58	51	58
Graz	Steiermark	53	-	-	53
Kapfenberg	Steiermark	87	-	-	87
Bad Aussee	Steiermark	73	-	-	73
Innsbruck	Tirol	350	-	-	348
Fritzens	Tirol	191	-	-	190
Kitzbühel	Tirol	51	-	-	49
Kufstein	Tirol	193	-	-	191
Strass	Tirol	191	-	-	188
Bregenz	Vorarlberg	98	94	86	47

Messstation	Bundesland	# Genkopien	# NH ₄ normiert	# N Normiert	# CSB normiert
Dornbirn	Vorarlberg	92	54	25	32
Hofsteig	Vorarlberg	70	37	29	-
Hohenems	Vorarlberg	110	106	98	55
Wien	Wien	115	115	115	115

Quelle: AGES

Da neben den Genkopien auch noch andere Variablen bei einigen Messstationen verfügbar sind, wurde versucht, diese als erklärende Variablen ins Modell mit aufzunehmen, mit der Absicht, das Modell zu verbessern und genauere Vorhersagen zu erzielen. Diese möglichen relevanten Variablen sind Zulauftemperatur, Starkregenereignis und die zeitliche Differenz zwischen Probenahme und Extraktion. Eine Aufnahme der Zulauftemperatur wurde mit einem möglichen Einfluss des Zulaufwassers auf die gemessene Virenkonzentration (Genkopien) gerechtfertigt. Starkregenereignisse können möglicherweise einen verdünnenden Effekt auf das Abwasser haben, wohingegen die Differenz zwischen Probenahme und Extraktion auf die Logistik der Messanalytik rückschließen lässt. Diese Variablen wurden in den Modellen für die Langzeit Glättung als weitere erklärende Variablen neben der zeitlichen Glättungsfunktion in das additive Modell gespeist. Anhand Vorhersagefehler, geschätzter Modellvarianz und den geschätzten Koeffizienten dieser Variablen wurde beurteilt, ob eine Aufnahme einer oder mehrerer erklärender Variablen sinnvoll ist. Es konnte keine signifikante Verbesserung der Vorhersagefehler, Modellvarianzen und auch keine signifikanten Parameter festgestellt werden. Darüber hinaus konnten diese Variablen nicht immer im Vorhersage oder Rolling Window Modell verwendet werden, da es bei der Variable Starkregenereignis oft nicht genug Ausprägungen in den Schiebefenstern gab. Da die weiteren erklärenden Variablen keinen signifikanten Einfluss auf die Vorhersagen hatten und auch nicht einheitlich bei allen Messstationen verfügbar sind, wurde auf weitere Analysen und Modellierungsversuche mit mehreren erklärenden Variablen im additiven Modell verzichtet.

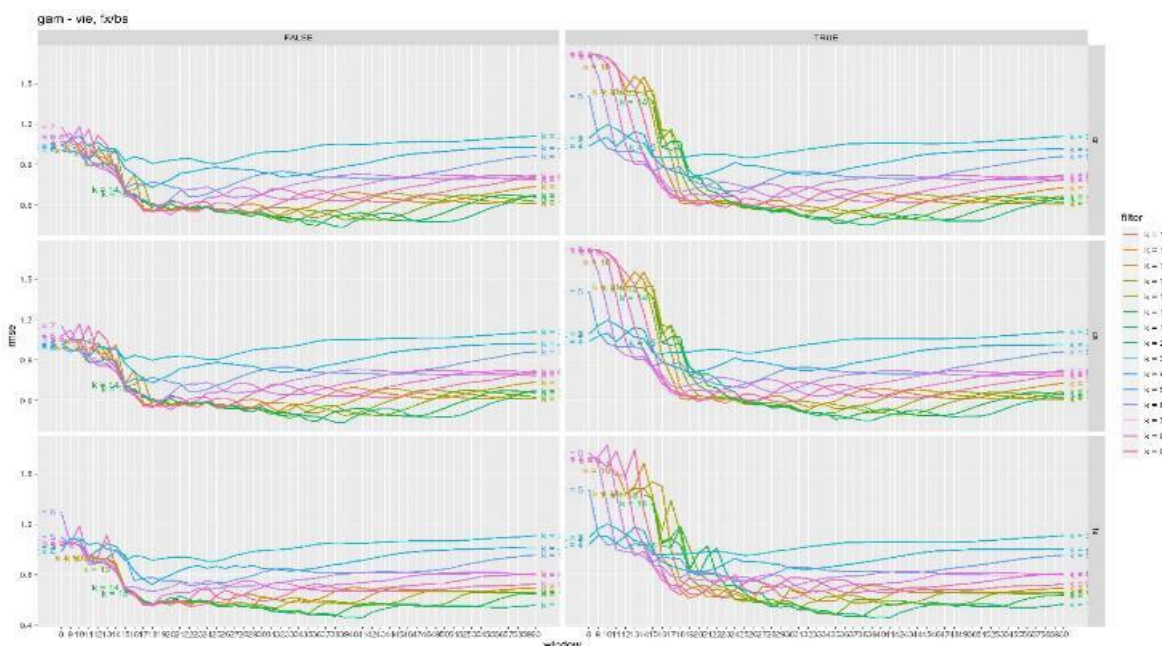
Alle Berechnungen wurden mit der Software R (R Core Team, 2018) durchgeführt. Für die Anpassung der additiven Modelle wurde das R Paket ‚mgcv‘ (Wood, 2017) verwendet.

8.3.3 Hyperparametertuning

Da ein GAM mehrere Hyperparameter erfordert, kann eine Änderung der Standardparameter die Genauigkeit des Modells erhöhen. Diese Optimierung der Hyperparameter wird in der Machine Learning Terminologie „Hyperparametertuning“ genannt und wurde hier für drei Parameter (k, fx und bs) durchgeführt. Der Hyperparameter k stellt die Dimension der Basis dar, die verwendet wird, um den Smoothing-Term zu repräsentieren. Die hier getesteten Werte waren positive ganze Zahlen von 1 bis 15. Der Hyperparameter fx gibt an, ob es sich bei dem Term um einen fixen Regressionsspline (fx = TRUE) oder um einen penalisierten Regressionsspline (fx = FALSE) handelt. Der Hyperparameter bs definiert die Glättungsbasis. Optionen sind tp für isotrope Glättungen mit niedrigem Rang für eine beliebige Anzahl von Kovariaten, ts als tp mit einer Modifikation der Glättungsstrafe, cr für Cubis-Spline und cs für die Schrumpfungsversion von cr. Eine zusätzliche Option beim GAM ist die Länge des zeitlichen Fensters, das für die Modellierung herangezogen wird (Fenstergröße).

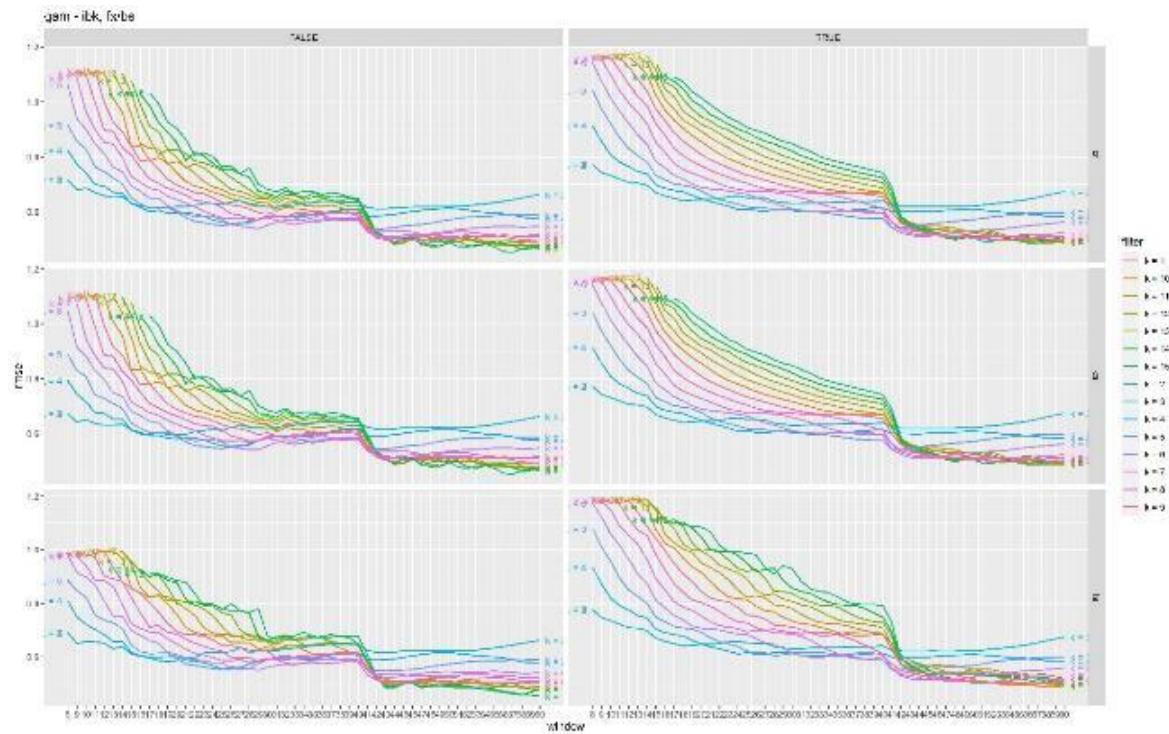
Zum ersten Mal wurde ein GAM mit diesen drei Hyperparametern und unterschiedlicher Fenstergröße durchgeführt. Einige der Ergebnisse werden hier vorgestellt.

Abbildung 58: Hyperparametrisierung – Ergebnisse für die Kläranlage Wien.



Quelle: AGES

Abbildung 59: Hyperparametrisierung – Ergebnisse für die Kläranlage Innsbruck.



Quelle: AGES

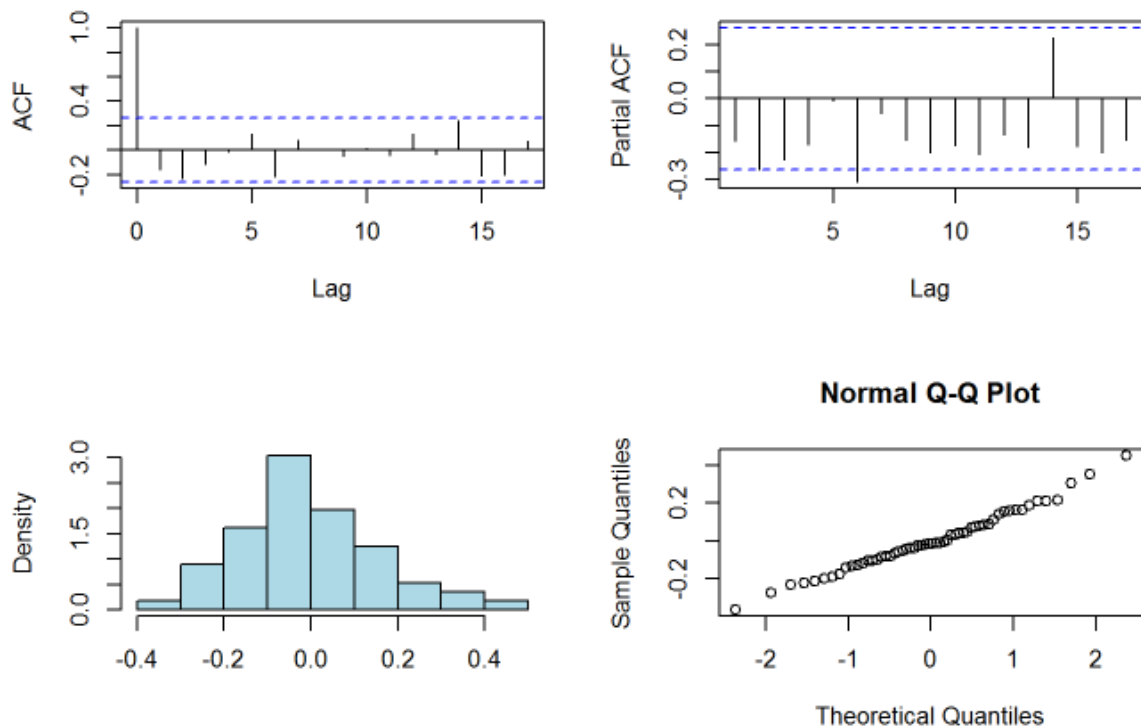
Daraus ist ersichtlich, dass verschiedene Kläranlagen unterschiedliche optimale Hyperparameter und Fenstergrößen haben. Deshalb muss die Suche nach den besten GAM-Parametern für jede Kläranlage einzeln durchgeführt werden. Da zahlreiche Dateninputs wöchentlich erfolgten, wurde die Hyperparametrisierung der GAM ebenfalls wöchentlich durchgeführt.

8.3.4 Modellevaluierung

Die additiven Modelle in der Langzeit Glättung und Rolling Window/Vorhersage wurden einer Residuenanalyse unterzogen. Dabei werden die Abweichungen zwischen Modellvorhersagen und tatsächlich beobachteten Werten (= Residuen) näher untersucht. Hier wurde primär darauf geachtet, ob die Residuen signifikante Autokorrelationen aufweisen und ob die Verteilung der Residuen der Modellannahme entspricht. Die Residuenanalyse konnte aber nur bedingt durchgeführt werden, da im Rolling Window Ansatz jedes einzelne Modell eines Fensters überprüft werden müsste. Da die Anzahl der Fenster bei den verschiedenen Messstationen durchaus unterschiedlich war, konnten nur die Residuen

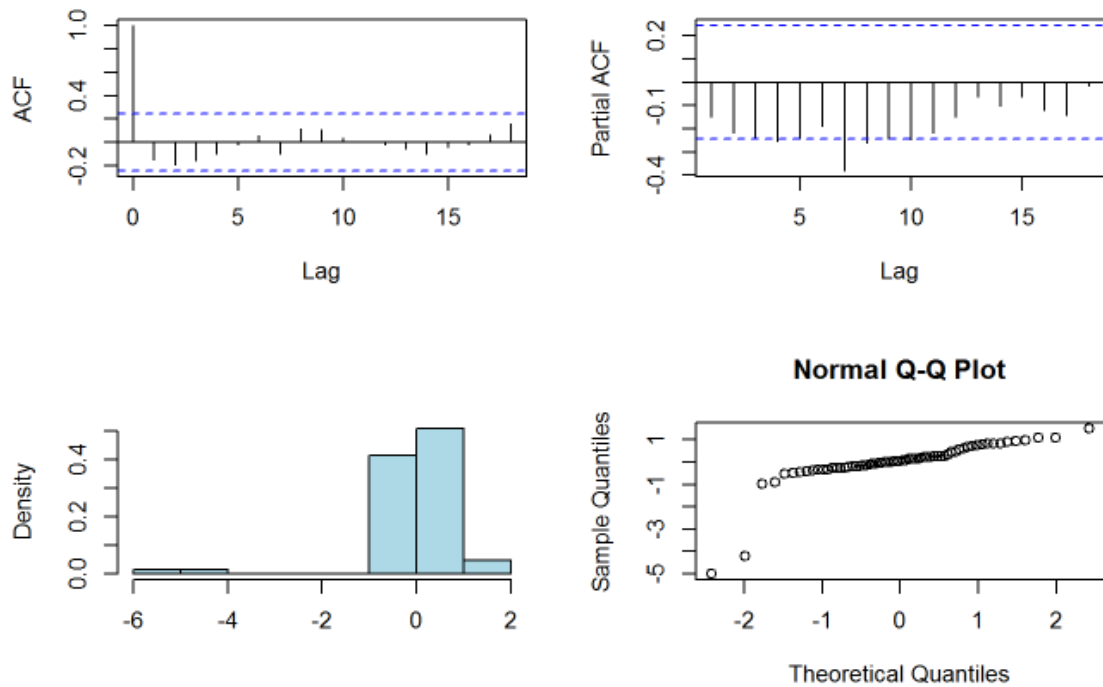
des letzten Fensters, das auch für die 7-Tage-Vorhersage verwendet wird, überprüft werden. Abbildung 60 zeigt die Langzeit Glättung Residuendiagnostik für die Messstation Innsbruck. Hier konnte keine signifikante Autokorrelation in den Residuen festgestellt werden. Generell konnte auch bei den anderen Messstationen keine signifikante Autokorrelation beobachtet werden. Jedoch hängt diese Diagnostik auch stark mit der gewählten Fenstergröße und Anzahl an Messungen zusammen. Bei Stationen mit weniger Messungen bzw. einer geringeren Messfrequenz können die Verteilungsannahmen oft nicht direkt anhand der Residuen bestätigt werden. Hier kann es zu Ausreißern in den Residuen durch die geringe Anzahl an Messungen kommen. Auch in diesen Fällen sind die Autokorrelationen generell nicht signifikant, obwohl einzelne Autokorrelationen und partielle Autokorrelationen leicht in den Signifikanzbereich hineingehen. Die Messstation Kapfenberg in Abbildung 61 ist hierfür ein gutes Beispiel. Aufgrund des Fehlens einer einheitlich auftretenden Autokorrelation in den Residuen, wurde in der Modellierung kein Residuenzeitreihenprozess definiert und mit der Annahme normalverteilter und unkorrelierter bzw. unabhängiger Fehler fortgefahren.

Abbildung 60: Residuendiagnostik Messstation Innsbruck: Langzeit Glättung.



Quelle: AGES

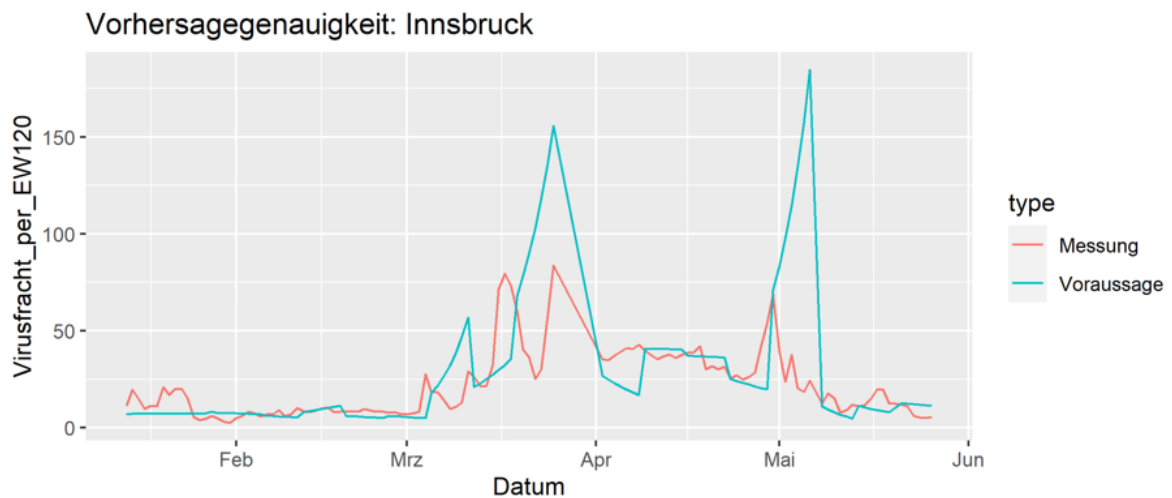
Abbildung 61: Residuendiagnostik Messstation Kapfenberg: Langzeit Glättung.



Quelle: AGES

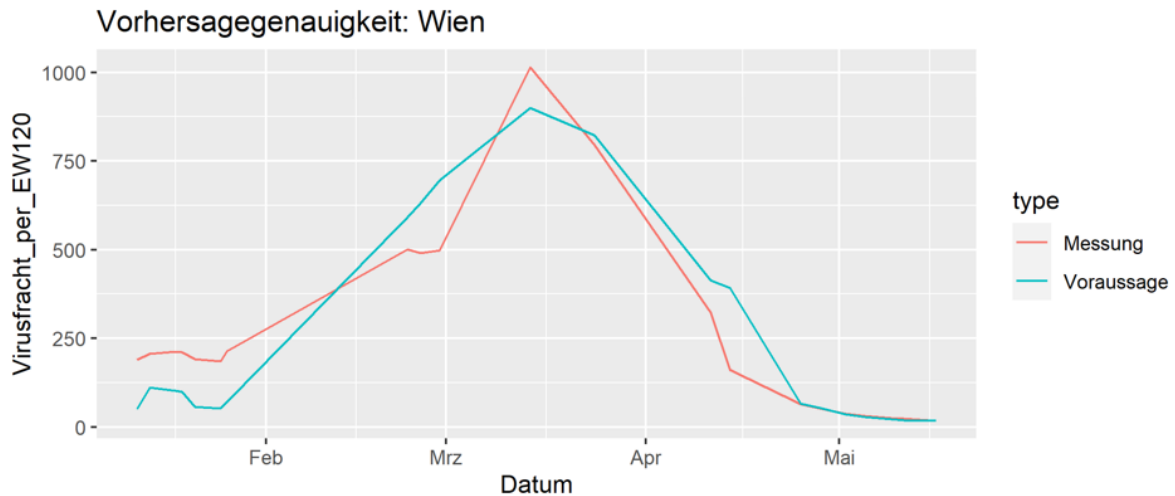
Die folgenden Abbildungen zeigen Vorhersagen und tatsächliche Daten für zwei Kläranlagen.

Abbildung 62: Messungen und Vorhersagen für die Kläranlage Innsbruck.



Quelle: AGES

Abbildung 63: Messungen und Vorhersagen für die Kläranlage Wien.



Quelle: AGES

Für Innsbruck ergibt sich ein mittlerer relativer Fehler von ca. 52 %, wobei ein großer Teil dieses Prozentsatzes auf Daten bis März zurückzuführen ist, wo die Werte niedrig sind, und ein kleiner Fehler einen großen Anteil am Prozentsatz ausmacht, was der mittlere Fehler von ca. 11,6 bestätigt. Wien hat einen mittleren relativen Fehler von ca. 44 %, und einen mittleren Fehler von ca. 101,8. Der mittlere Gesamtfehler von ganz Österreich beträgt ca. 218,6 und der mittlere relative Fehler liegt bei ca. 34 %.

8.3.5 Trendzusammenfassungen

Für jede Kläranlage wurde ein prognostizierter Steigungswert berechnet. Das heißt, es wird eine letzte bekannte Messung und eine Vorhersage nach sieben Tagen ab der Messung genommen und man berechnet damit den k-Wert mit der Gleichung

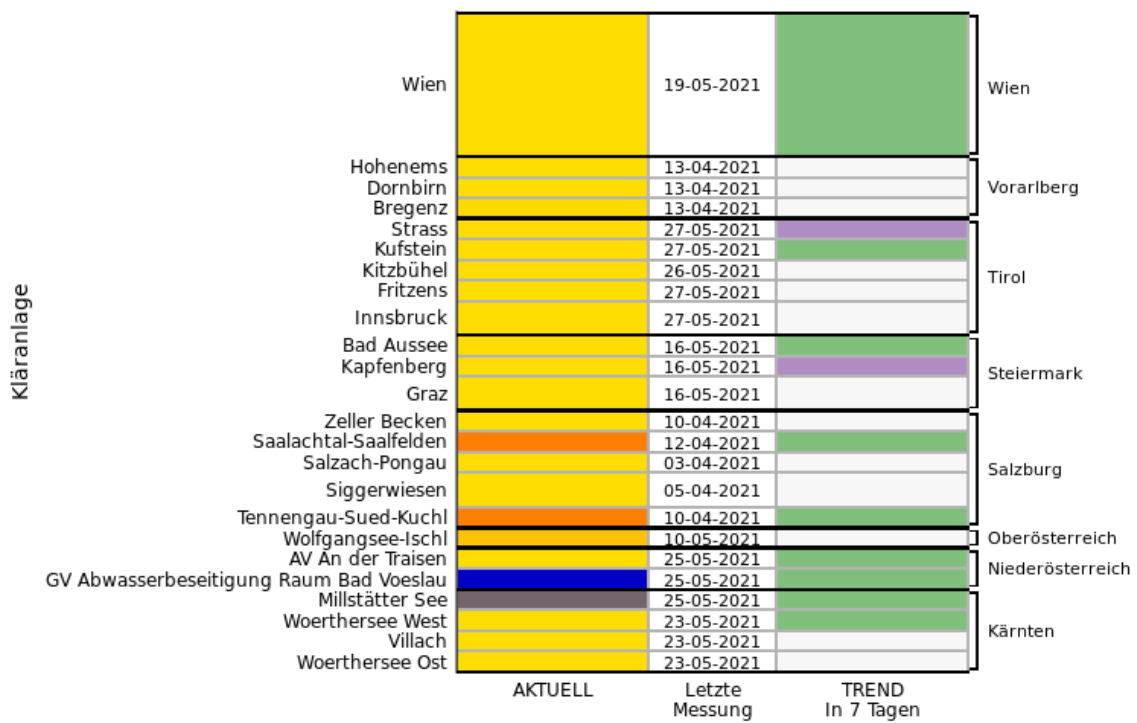
$$k = \frac{y_{n+7} - y_n}{7 \cdot y_n},$$

wobei $y_{\{n\}}$ die letzte bekannte Messung EW_{CSB} ist, und $y_{\{k+7\}}$ die Vorhersage von EW_{CSB} 7 Tage später darstellt. Damit wird die erwartete relative tägliche Änderung ermittelt. Jede der Kläranlagen wurde dann basierend auf diesen k-Werten Kategorien zugeordnet. Wenn $k < -0,05$ ist, wird erwartet, dass der EW_{CSB} täglich durchschnittlich um mindestens 5 % sinkt. Dies wird dann der Kategorien „sinkend“ zugeordnet. Wenn $k > 0,05$, dann wird die

Kläranlage in die Kategorie „steigend“ eingestuft, und für alle Werte dazwischen in die Kategorie „gleich“.

Darauf aufbauend wurden Grafiken (Heatmaps) erstellt, welche den letzten verfügbaren Wert und die Trendkategorie enthalten.

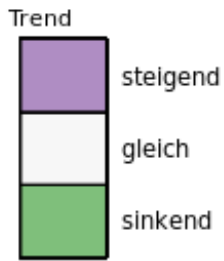
Abbildung 64: Beispiel einer regionalen Trenddarstellung auf Basis ausgewählter Kläranlagen.



Quelle: AGES

Die Klasse einer bestimmten Kläranlage bestimmt die Färbung für den Trend in sieben Tagen. Die Farben werden in der folgenden Skala dargestellt.

Abbildung 65: Trend-Skala.

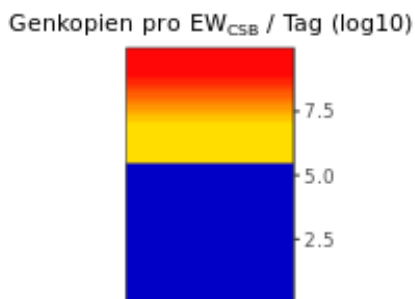


Quelle: AGES

So ist jede Kläranlage mit einem erwarteten täglichen Anstieg von mindestens 5 % in der Klasse „steigend“ und wurde lila eingefärbt. Kläranlagen mit niedrigem Steigungswert erhielten grün und Kläranlagen mit Werten dazwischen weiß.

Die jeweils aktuellen, letztverfügbaren Werte wurden ebenfalls eingefärbt. Das nächste Bild zeigt die Skala der Einfärbung der aktuellen Werte.

Abbildung 66: Aktuell-Skala.



Quelle: AGES

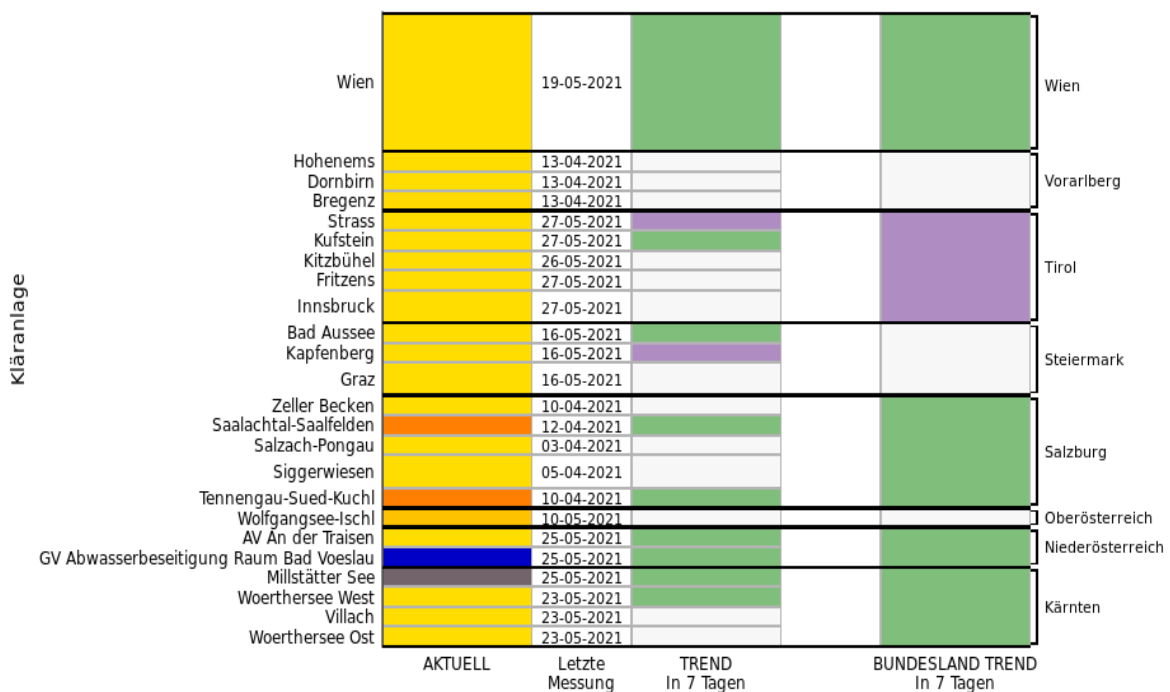
Jede Kläranlage wurde entsprechend ihrem aktuellen Wert \log_{10} von Genkopien pro EW_{CSB}^7 eingefärbt. Die Farben werden auf folgende Weise ermittelt:

⁷ Vereinfachte Bezeichnung im Dashboard - vollständiger Name des Indikators: EW_{CSB}_{120} .

- von 0 bis 5,4 ist die Farbe #0000C6 (blau),
- von einschließlich 5,5 bis 7,0 ist ein Übergang von #FFDD00 (gelb) zu #FFC000 (orange),
- von 7,0 bis 9,0 ist ein Übergang von #FFC000 (orange) zu #FF0707 (rot),
- über 9,0 ist #FF0707 (rot).

Die Grafik enthält auch die Information, welche Kläranlage sich in welchem Bundesland befindet. Es besteht aber auch die Möglichkeit, für jedes Bundesland Trendwerte zu erhalten. Zunächst wird für jedes Bundesland ein gewichteter Mittelwert aus aktuellem Wert und jedem prognostizierten Wert berechnet, wobei die Gewichte nach der Einwohnerzahl bestimmt werden, die jede Kläranlage abdeckt. Sobald für jedes Bundesland ein Wert pro Tag für aktuelle Werte und Vorhersagen vorliegt, werden die Steigungswerte auf die gleiche Weise wie für jede Kläranlage berechnet. Damit erhält man wieder Klassen wie bei den Einzelkläranlagen. Daraus ergibt sich die folgende Grafik.

Abbildung 67: Trendgrafik mit Bundesländern.

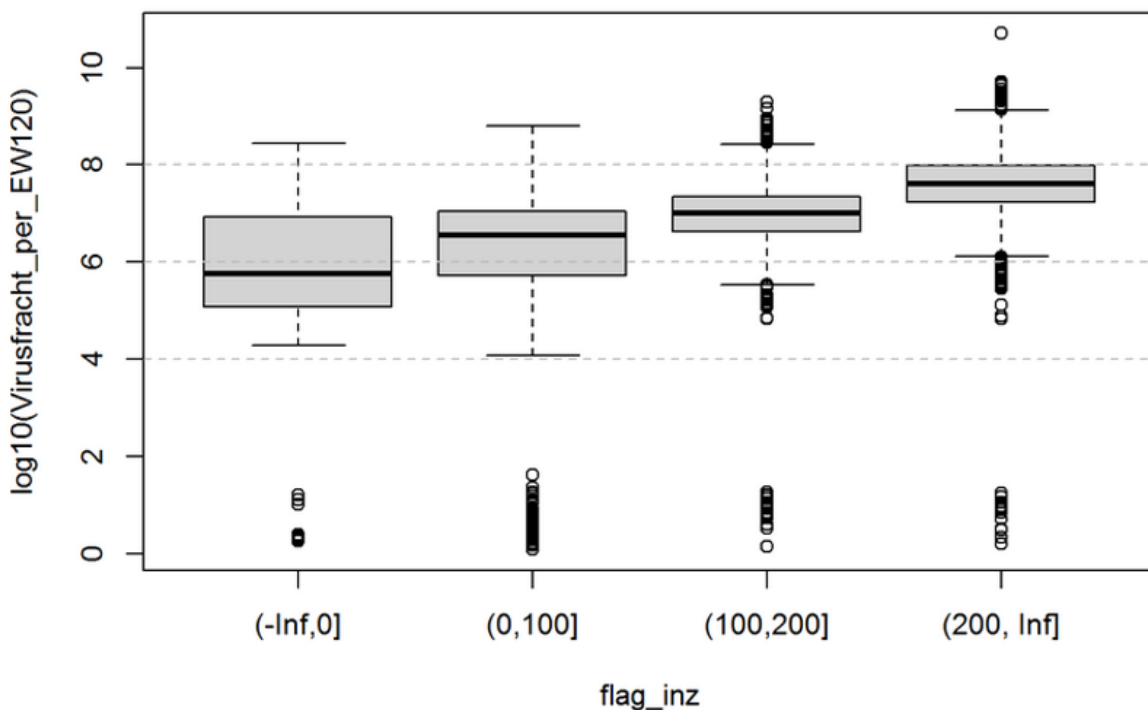


Quelle: AGES

8.3.6 Zusammenhangsanalyse mit Inzidenzen

Für die Diskussion, wie das Niveau des Abwassersignals an einer Kläranlage einzuordnen ist, wurde der Zusammenhang zwischen der Virusfracht pro $EW_{CSB_{120}}$ und 14-Tage-Inzidenz über alle Probenahmen analysiert. Als Richtwerte für Maßnahmen bzw. Lockerungen wurden häufig 7-Tage-Inzidenzen von 50 bzw. 100 pro 100.000 Einwohner:innen genannt. Umgerechnet auf 14-Tage-Inzidenz lägen die Richtwerte dann bei 100 bzw. 200 pro 100.000 Einwohner:innen. Deshalb wurde die Verteilung der Virusfracht pro $EW_{CSB_{120}}$ für die Klassen 0, (0, 100], (100, 200], (200, Inf] der 14-Tage-Inzidenz pro 100.000 Einwohner:innen ausgewertet (vgl. Abbildung 68). Die Wertebereiche der vier Klassen überlappen stark, jedoch steigen die Mediane bei höherer Inzidenzklasse an. Solche Überlegungen spielen eine wesentliche Rolle für die Darstellung der Messergebnisse über mehrere Kläranlagen im Vergleich z. B. in einer Heatmap.

Abbildung 68: Wertebereich Virusfracht pro $EW_{CSB_{120}}$ für verschiedene Kategorien der 14-Tage-Inzidenz.



Quelle: AGES

Der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman zwischen Virusfracht pro $EW_{CSB_{120}}$ und der 14-Tage-Inzidenz von allen Messungen beträgt 0,64 (Stand 31.5.2021). Bei der Analyse

zweier Signale interessiert auch die sogenannte Kreuzkorrelation, die die Korrelation zwischen den Signalen bei unterschiedlicher Zeitverschiebung beschreibt.

Da die 14-Tage-Inzidenz täglich verfügbar war, wurden von diesen Daten für jede Kläranlage Lag-Variablen generiert und zwar bis zu 21 Tage nach vorne und 14 nach hinten verschoben. Dieser Datensatz wurde dann mit dem Abwassersignal verknüpft. Dabei bedeutet „lag-1“, dass das Humantestsignal um einen Tag hinter das Abwassersignal verschoben wurde. Hingegen bedeutet „lag-3“, dass das Humantestsignal um drei Tage vor das Abwassersignal verschoben wurde. „lag-0“ heißt, dass keine Verschiebung gemacht wurde.

- lag-1: z. B. Virusfracht pro EW_{CSB_120} vom 5.4.2020 verglichen mit 14-Tage-Inzidenz vom 6.4.2020,
- lag-3: z. B. Virusfracht pro EW_{CSB_120} vom 5.4.2020 verglichen mit 14-Tage-Inzidenz vom 2.4.2020,
- lag-0: z. B. Virusfracht pro EW_{CSB_120} vom 5.4.2020 verglichen mit 14-Tage-Inzidenz vom 5.4.2020.

Für eine Kläranlage wurden die paarweisen Korrelationen von \log_{10} (Virusfracht pro EW_{CSB_120}) und der zeitlich verschobenen 14-Tage-Inzidenz berechnet. Da der Pearson-Korrelationskoeffizient den linearen Zusammenhang zwischen zwei Variablen beschreibt und deshalb abhängig von Transformationen ist, empfiehlt sich eher die skaleninvarianten Maße Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman bzw. Übereinstimmungsmaß Kendall zu betrachten, da diese für Virusfracht pro EW_{CSB_120} auf Originalskala das gleiche Ergebnis liefern.

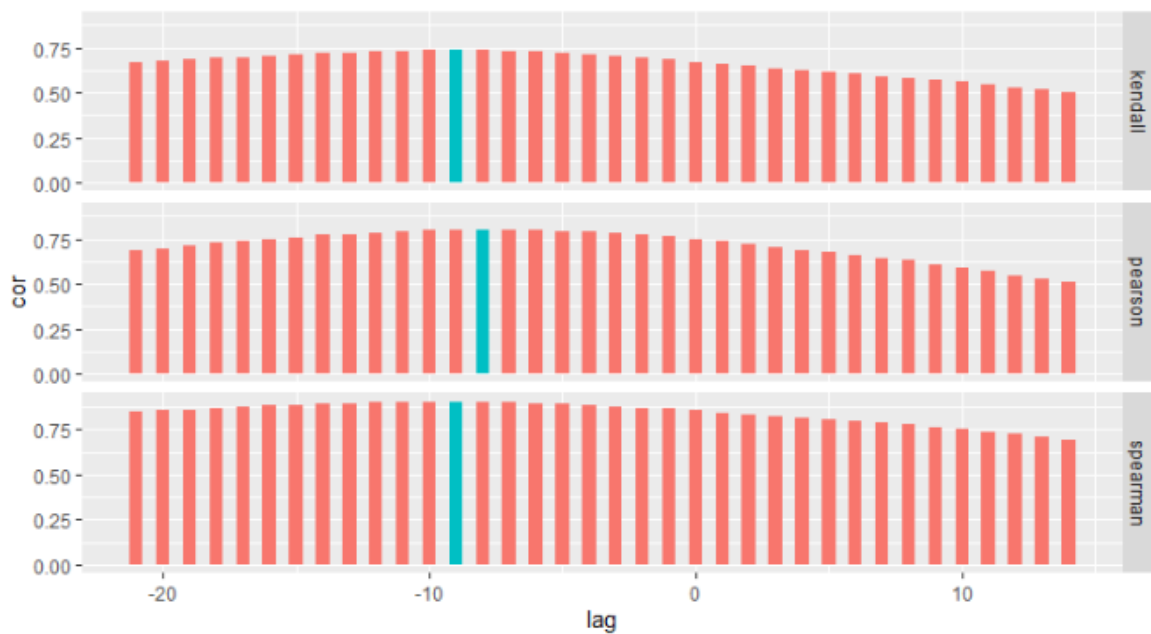
Für die Kläranlage Innsbruck zeigte sich bei Betrachtung aller bis zum 31.5.2021 verfügbaren Daten die höchste Rangkorrelation nach Spearman von 0,91, wenn die 14-Tage-Inzidenz mit der Virusfracht pro EW_{CSB_120} von neun Tagen davor (lag-9) verglichen wurde (vgl. Abbildung 69). Für die Kläranlage Wien lag die höchste Rangkorrelation nach Spearman von 0,78 bei elf Tagen davor (lag-11, vgl. Abbildung 70) und bei der Kläranlage Wörthersee West mit 0,63 bei 14 Tagen davor (lag-14, vgl. Abbildung 71).

Das Muster der Kreuzkorrelation an einer Kläranlage separat nach Monaten betrachtet, wies stärkere Unterschiede auf, was auch zu erwarten war, da es unterschiedliche Phasen des Infektionsgeschehens und auch der Teststrategien gab. Dennoch zeigte sich in den

meisten Fällen die höchste Kreuzkorrelation, wenn ein Abwassersignal zeitlich vor der 14-Tage-Inzidenz bemerkbar war.

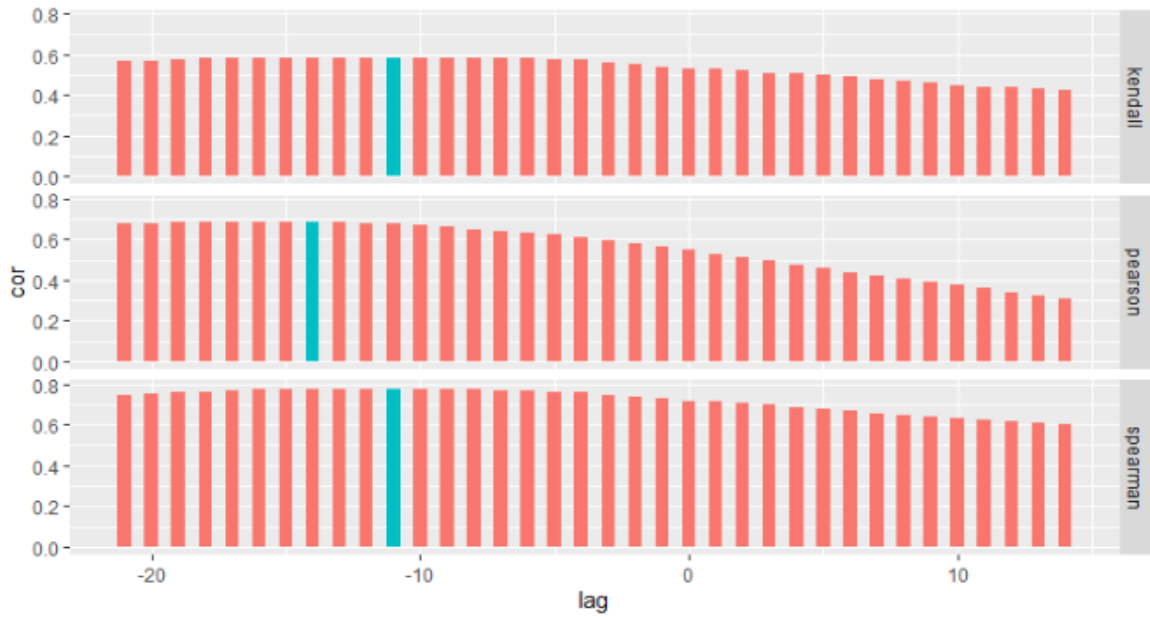
Die Korrelationsanalyse wurde auch mit dem geglätteten Abwassersignal (Langzeit Glättung) durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Korrelationswerte höher ausfielen. Durch die Glättung werden die starken Schwankungen im Abwassersignal gedämpft und der Zusammenhang mit der 14-Tage-Inzidenz fällt stärker aus.

Abbildung 69: Kreuzkorrelation zwischen \log_{10} (Virusfracht pro $EW_{CSB_{120}}$) und 14-Tage-Inzidenz an der Kläranlage Innsbruck (Stand 31.05.2021).



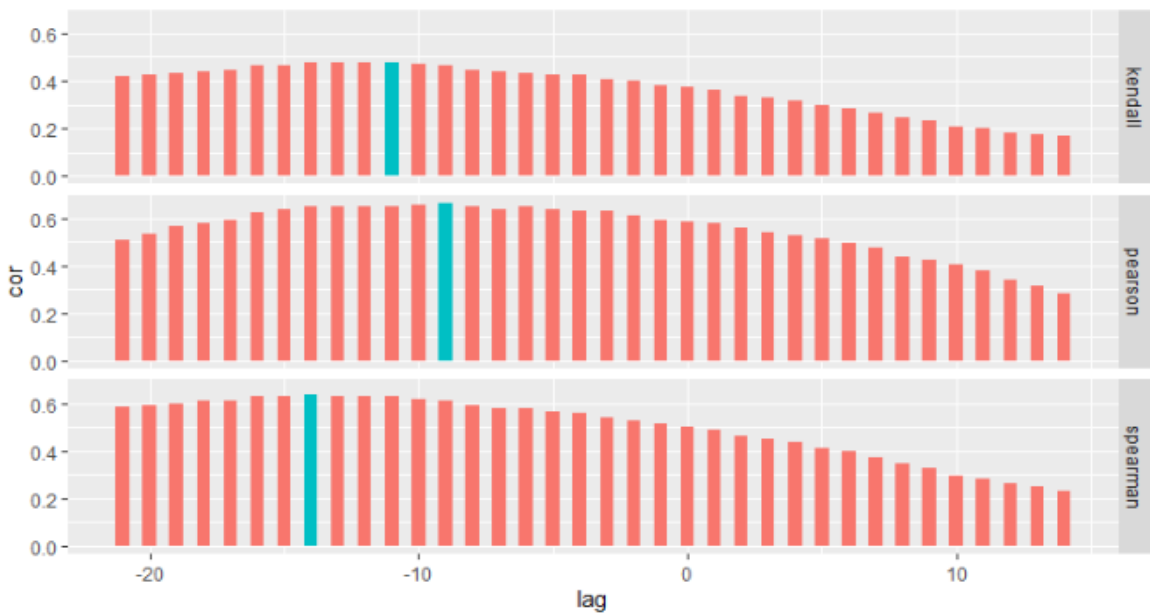
Quelle: AGES

Abbildung 70: Kreuzkorrelation zwischen \log_{10} (Virusfracht pro EW_{CSB_120}) und 14-Tage-Inzidenz an der Kläranlage Wien (Stand 31.05.2021).



Quelle: AGES

Abbildung 71: Kreuzkorrelation zwischen \log_{10} (Virusfracht pro EW_{CSB_120}) und 14-Tage-Inzidenz an der Kläranlage Würthersee West (Stand 31.05.2021).

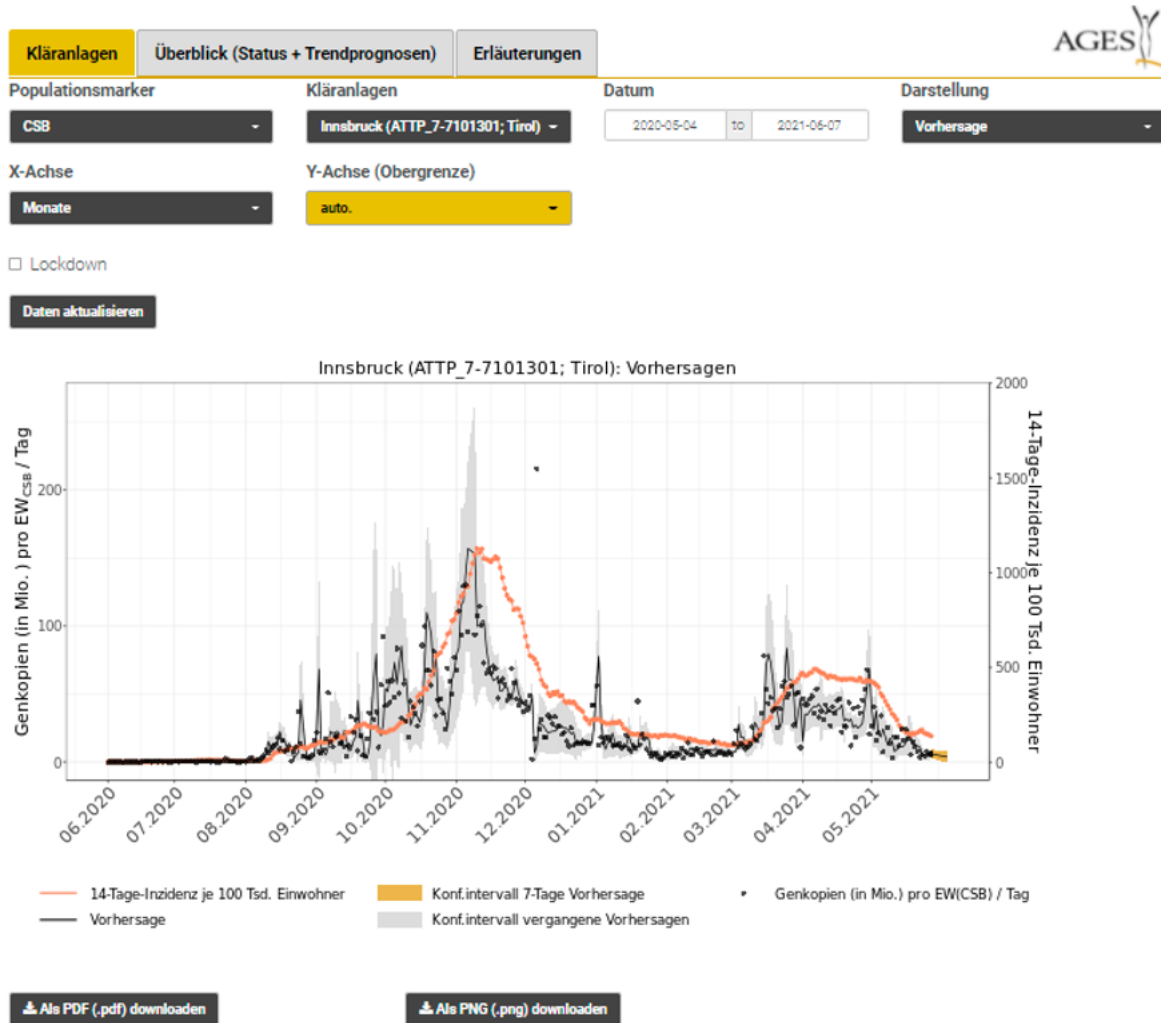


Quelle: AGES

8.4 Interaktive Web-Applikation der AGES

Um die Ergebnisse aller Messstationen visualisieren zu können, wurde mit dem R Paket ‚shiny‘ (Winston et al., 2018) eine interaktive Web-Applikation erstellt. Die App ermöglicht im Reiter „Kläranlagen“ eine vereinfachte Ansicht der zwei verschiedenen Modellvarianten, Langzeit Glättung vs. Vorhersage, und bietet weitere Einstellungsmöglichkeiten, wie z. B. Populationsmarker, der zur Normierung der Genkopien herangezogen werden soll, eine Angabe zum Zeitraum (x-Achse in Tagen oder Monaten) und Obergrenzen für die y-Achse. Alle erstellten Grafiken können generell als PDF oder PNG Dateien heruntergeladen werden. Die Zeitreihen der jeweiligen Kläranlagen werden mit zwei x-Achsen dargestellt. Auf der linken Achse sind die Genkopien und auf der rechten Achse die 14-Tage-Inzidenz. Um diese noch besser unterscheiden zu können werden die jeweiligen Elemente in der Legende beschrieben. Abbildung 72 zeigt die Web-App mit dem Reiter „Kläranlagen“ für Innsbruck.

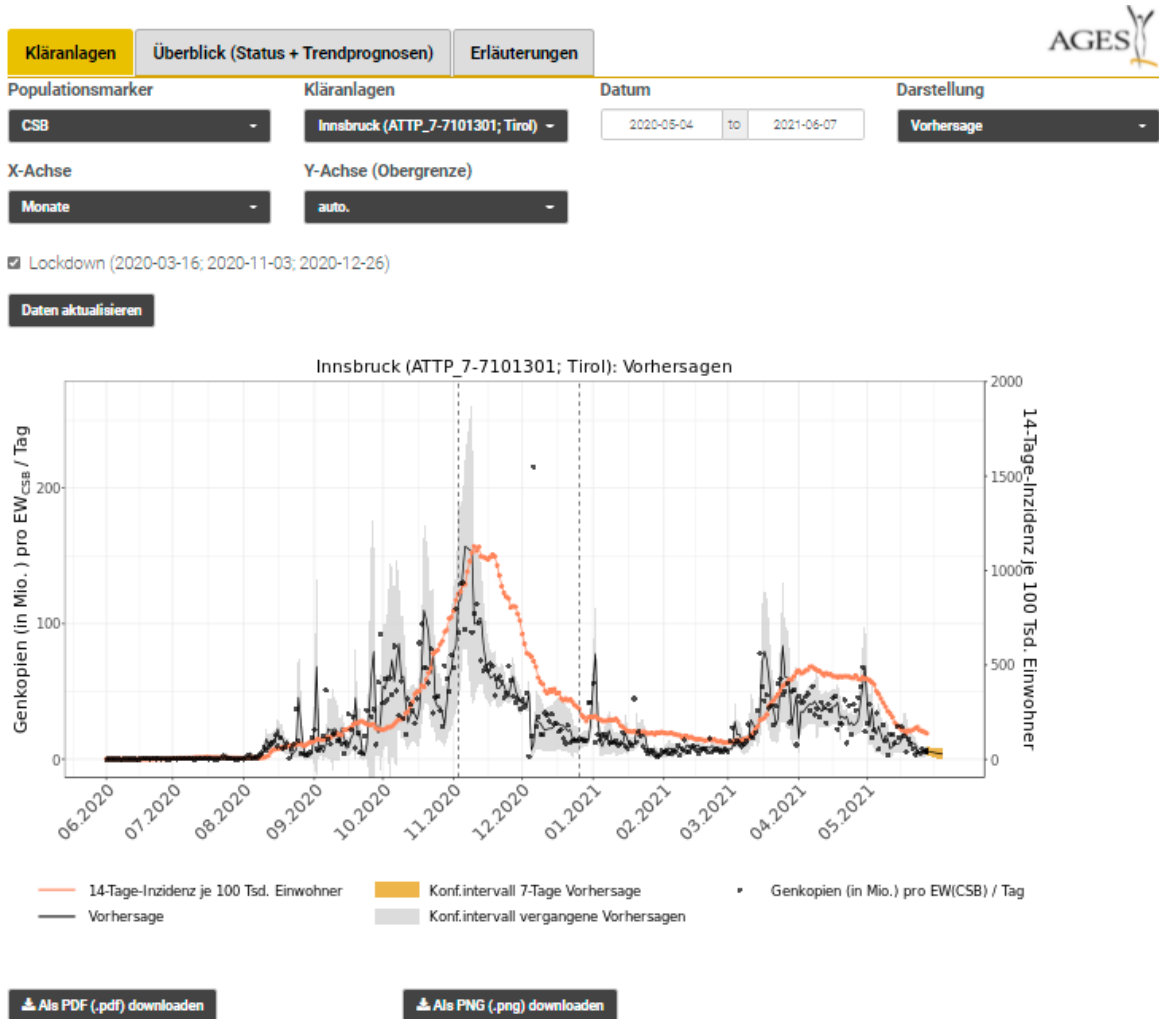
Abbildung 72: Web-App, Reiter „Kläranlagen“.



Quelle: AGES

Die Drop-Down Menüs „Populationsmarker“ und „Kläranlagen“ sind voneinander abhängig. Das heißt, bei Wahl eines anderen Populationsmarkers setzt sich die Auswahl der Kläranlage wieder zurück. Die anderen Auswahlfelder sind unabhängig und ändern sich nicht bei der Auswahl von anderen Parametern. Um politische Maßnahmen, wie z. B. Lockdowns, abbilden zu können, bietet die Checkbox „Lockdown“ vertikale gebrochene Linien, die das Start- und Enddatum der Lockdowns zeigen (siehe Abbildung 73).

Abbildung 73: WebApp, Checkbox „Lockdown“.

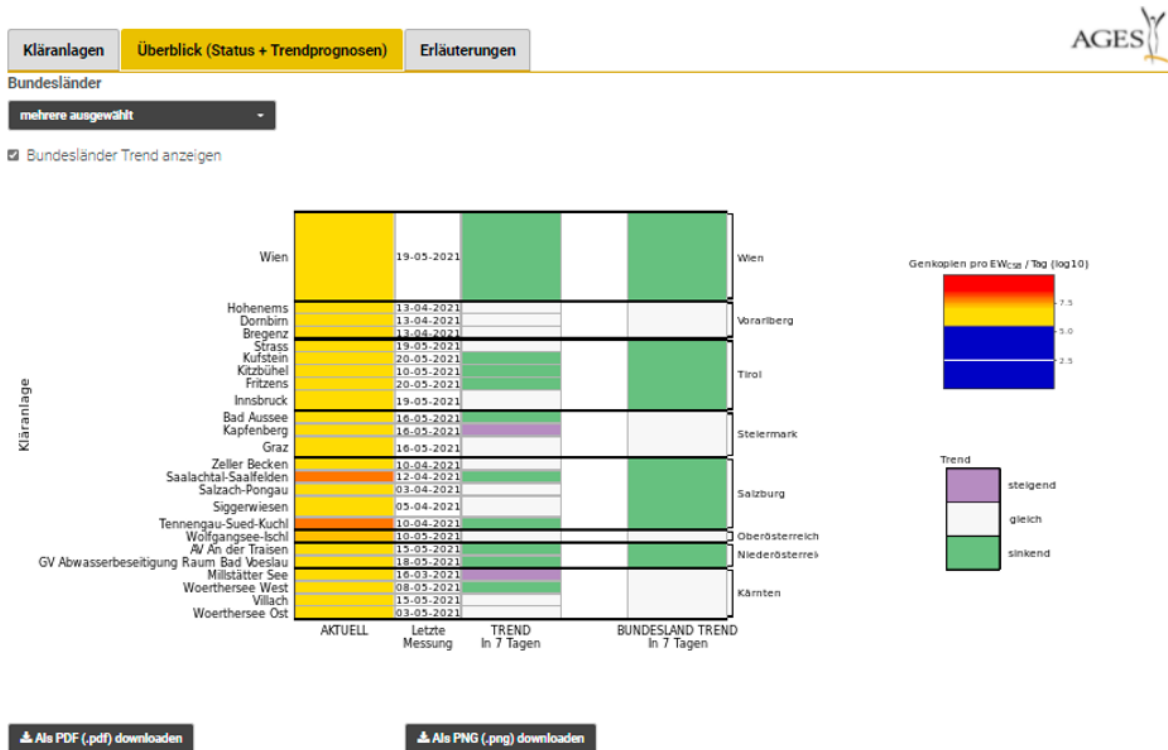


Quelle: AGES

Der Reiter „Überblick (Status + Trendprognosen)“ (siehe Abbildung 74) zeigt die Übersichtsgrafiken der Messstationen und dazugehörige Bundesland-Trends. Hier können Bundesländer, in denen die jeweiligen Anlagen liegen, mit einem Button ausgewählt werden und Bundesland-Trends mit einer Checkbox aktiviert werden. Der Bundesländer-Trend erscheint als eigene Spalte. Alle Zellen der Übersichtsgrafik sind farblich hinterlegt mit dazugehörigen Legenden auf der rechten Seite. Die Spalte „AKTUELL“ gibt das momentane Level der logarithmierten letzten vorhergesagten Messung an und kommt mit einer eigenen Farblegende. Mit einem Blick kann so festgestellt werden, wo sich der letzte Wert ungefähr befindet. Die Trendspalten sind durch drei unterschiedliche Farben für einen steigenden, gleichbleibenden oder sinkenden Trend gekennzeichnet. Der letzte

Reiter „Erläuterungen“ beinhaltet eine Beschreibung der Kläranlagen- und Überblicks-Abbildungen.

Abbildung 74: Web-App, „Überblick“.



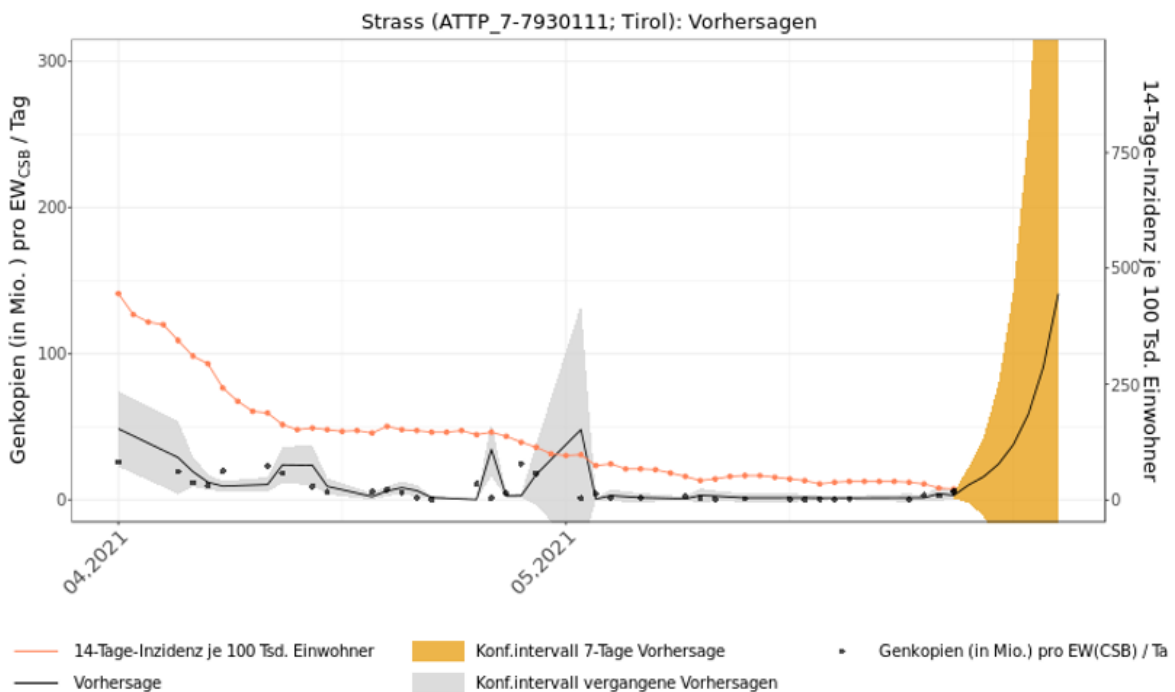
Quelle: AGES

8.5 Limitationen

Die Vorgangsweise, ein GAM für jede Kläranlage zu schätzen und wöchentlich die Modellparameter (Hyperparameter) anzupassen, liefert auf Messstellenebene eine gute Einschätzung des aktuellen Abwassersignals und dessen Entwicklung in den nächsten Tagen. Die Güte der Prognose hängt aber stark von den verfügbaren Messungen ab. Wie in Kapitel 8.3.2 beschrieben, wurde nur für Messstellen mit mindestens 23 vorhandenen Messwerten auch Prognosen erstellt, da sonst zu viele Parameter im Verhältnis zu den Messwerten geschätzt werden müssen. Eine Prognose für eine Messstelle ist mit diesem Ansatz bei täglicher Messung erst nach ca. drei Wochen möglich. Werden Proben mit mehr als einem Tag Abstand genommen, dauert es entsprechend länger.

Wie oben beschrieben, wird eine Vorhersage anhand des letzten Schiebefensters berechnet und hängt stark von der Anzahl der Messungen und dem daraus resultierenden Additiven Modell ab. Durch die Rücktransformation der logarithmierten Genkopien können in Kombination mit steigenden letzten Messwerten darüber hinaus explosiv ansteigende Vorhersagen entstehen (siehe Kläranlage Strass in Abbildung 75). Brüche in der Vorhersage (siehe Kläranlage Graz in Abbildung 76) sind möglich, da die Vorhersagen der letzten Messung und die der nächsten sieben Tage verbunden werden und recht unterschiedliche Werte annehmen können.

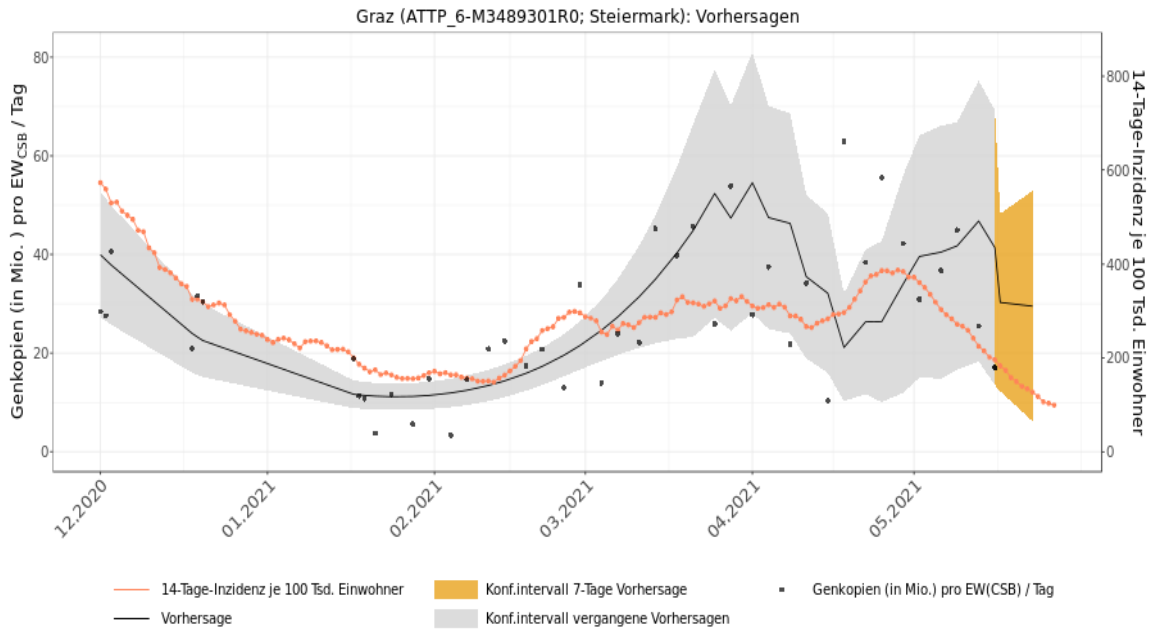
Abbildung 75: Explosive Vorhersagen, Kläranlage Strass.



Quelle: AGES

Eine Vorhersage ist dadurch nur für die nächsten drei bis höchstens sieben Tage nach der letzten Abwassermessung sinnvoll. Um den Vorlauf des Abwassersignals vor den Human-testergebnissen nutzen zu können, ist es erforderlich, dass die Viruskonzentration, die Zulaufmenge und die Populationsmarker möglichst zeitnah zur erfolgten Probenahme auch in das Prognosemodell eingespeist werden.

Abbildung 76: Brüchige Vorhersagen, Kläranlage Graz.



Quelle: AGES

Die Vorgehensweise im Coron-A Projekt war nicht so konzipiert, dass bei Eingabe der Messergebnisse automatisch das Modell angepasst und die Prognose ausgegeben wurde, sondern die Aktualisierung der Modelle und Prognosen für alle Messstellen wurde einmal wöchentlich durchgeführt.

Falls die Prognose auf einer anderen Ebene, z. B. für Bezirk oder Bundesland, erforderlich ist, gibt es zwei mögliche Ansätze: entweder durch Aggregation der Messstellenprognosen (wie z. B. in Kapitel 8.3.5 beschrieben) oder durch Modellierung auf der Ebene Bezirk bzw. Bundesland unter Einbeziehen der Messungen von mehreren Messstellen – einer sogenannten Longitudinaldatenanalyse. In beiden Fällen ist die Zusammensetzung der betrachteten Messstellen und die Vergleichbarkeit der Messergebnisse wesentlich. Idealerweise wird an allen Messstellen die Probe auf die gleiche Art gezogen und die Viruskonzentration im Abwasser mit der gleichen Messmethode gemessen, sodass für alle Messungen die gleiche Nachweisgrenze gilt.

Das entwickelte Prognosesystem ist allein auf die Abwassermessungen ausgerichtet. Die 14-Tage-Inzidenz aus den Humantestungen wurde nur zum Vergleich sowie zur Plausibilisierung und Bewertung des abwasserbasierten Ansatzes betrachtet.

8.6 Anforderungen an ein abwasserbasiertes, statistisches Analyse- und Prognosesystem

Aus den Projekterfahrungen sowie generellen statistischen Überlegungen lassen sich Kernanforderungen an ein abwasserbasiertes, statistisches Analyse- und Prognosesystem ableiten. Davor ist aber festzuhalten, dass ein solches Prognosesystem ebenfalls Voraussetzungen hat, damit es in einem zeitlich dichten Umfeld möglichst effizient funktionieren kann. Eine wesentliche Grundlage sind harmonisierte Abwassermessdaten, die zentral und in eindeutiger Struktur vorliegen sollten. Darüber hinaus ist festzulegen, in welcher Frequenz (z. B. wöchentlich oder täglich) und mit welchen Abwasserindikatoren ein Reporting erfolgen soll. Zudem ist der Nutzungs- und Adressatenkreis der Prognoseergebnisse zu definieren, damit die inhaltliche und technische Berichtsform darauf abgestimmt werden kann.

Darauf aufbauend erscheinen folgende Anforderungen an ein abwasserbasiertes, statistisches Analyse- und Prognosesystem sinnvoll:

- Datenqualitätsprüfung: Auch im Falle des Vorhandenseins gut definierter Daten sollten Prüfelemente zur Sicherstellung der Datenqualität vorgesehen werden.
- Programmgestützte Datenaufbereitung und -analyse: Die Datenverarbeitung muss mit programmierbarer Software erfolgen, die zudem Automatisierungsmöglichkeiten bietet, was insbesondere bei zeitlich engen Berichtsfrequenzen zum Tragen kommt.
- Ein statistisches Prognosesystem muss die Vorhersage der kurzfristigen Entwicklung von quantitativen Abwasserindikatoren ermöglichen unter Berücksichtigung von statistischer Unsicherheit mittels Konfidenzintervallen.
- Im Prognoseansatz müssen die Spezifika einer Messstelle berücksichtigt werden.
- Das Vorhersagemodell muss bei Vorliegen neuer Daten angepasst werden.
- Für die Darstellung der Analyse- und Prognoseergebnisse müssen zielgruppenspezifische Visualisierungen (inkl. Glättungen) und sonstige Berichtselemente automatisiert erstellt werden können.
- Die Ermittlung von überregionalen Trends durch Aggregation von Einzelvorhersage-Trends soll ermöglicht werden.

Als abschließender Hinweis sei noch darauf verwiesen, dass das Thema Mutationen/Varianten in diesem Forschungsprojekt nur eine Randbedeutung hatte. Für ein österreichweites Monitoring System werden diese aber sicherlich eine Rolle spielen. Daraus

könnte sich die Notwendigkeit einer zusätzlichen Berücksichtigung dieser Daten in einem Prognosesystem ergeben.

9 Epidemiologische Evaluierung

Ziel der epidemiologischen Evaluierung war festzustellen, welchen Beitrag ein abwasser-epidemiologischer Ansatz (AEA) zur Pandemiebeobachtung bzw. -bekämpfung leisten kann. Nutzungsmöglichkeiten für das Pandemiemanagement wurden identifiziert.

9.1 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Humantestungen und Abwassermonitoring zwei sich ergänzende Instrumente der Pandemiebeobachtung und -bekämpfung sind. Die Individualdiagnostik ermöglicht eine Absonderung und Contact-Tracing. Das Abwassermonitoring dient primär einer kollektiv-orientierten Betrachtung. Es kann einfach, schnell und zeitnah zeitliche Trends und regionale Unterschiede im Pandemiegeschehen abbilden.

9.2 Zielsetzung der Evaluierung

Ziel der Arbeiten für eine Epidemiologische Evaluierung war die Untersuchung, welchen Beitrag ein abwasserepidemiologischer Ansatz (AEA) zur Pandemiebeobachtung bzw. -bekämpfung leisten kann. Dies erfolgte vor allem auch aus dem Blickwinkel eines humanbasierten Monitoringansatzes (HBA), da dieser seit dem Ausbruch der Pandemie die Grundlagen für die Lageberichterstattung und das Krisenmanagement in Österreich bildet. Unter humanbasiertem Ansatz werden hier alle Ergebnisse aus direkten COVID-Tests bei Menschen sowie Befragungen, wie sie im Zuge des Contact-Tracings durchgeführt werden, verstanden.

9.3 Evaluationskriterien

Folgende Bewertungskriterien wurden verwendet, um den humanbasierten Ansatz mit dem abwasserepidemiologischen Ansatz zu vergleichen:

- Zielpopulation und Stichprobenansatz: Welcher Populationsanteil wird mit dem jeweiligen Ansatz erfasst? Gibt es systematische Verzerrungen in den datenbasierten Aussagen? Welche Stichprobenvariabilität und Aussagengüte impliziert ein Ansatz?
- Möglichkeit der Clusterabklärung: Hilft ein Ansatz bei der Abklärung von Clustern?
- zeitliche Verfügbarkeit: Wie schnell liegen Ergebnisse vor? Wie rasch geben die Ergebnisse Auskunft über die aktuelle Pandemiesituation?
- logistischer Aufwand: Wie komplex gestaltet sich die Kette von der Messung bis hin zum Reporting?
- regionale Eingrenzung: Wie einfach lassen sich die Ergebnisse regional zuordnen?
- Prognosefähigkeit: Wie geeignet sind die jeweiligen Ansätze um kurzfristige Prognosen für den weiteren Pandemieverlauf durchzuführen?
- Mutationen/Varianten: Lassen die Ansätze Aussagen über das aktuelle Mutations-/Variantenspektrum bzw. dessen Entwicklung zu?

9.4 Humanbasierter Ansatz (HBA)

Um den abwasserepidemiologischen Ansatz zu bewerten, ist es hilfreich auszuführen, welche Funktionen ein ausschließlich humanbasierter Ansatz erfüllen kann, und welche Limitationen hier vorhanden sind.

Zusammengefasst erfüllt der HBA folgende Funktionen, wobei zwischen individuen-orientierten Aspekten einerseits und epidemiologisch-orientierten Nutzungsformen andererseits unterschieden werden muss:

Individualdiagnostik: Die Testung von Einzelpersonen ermöglicht die Absonderung, daran anschließend das Contact-Tracing sowie die individuelle Mutations-/Variantenbestimmung.

Limitationen: Bezüglich der diagnostischen Tests ist mittlerweile eine heterogene Situation zu Probenahmeverfahren und der analytischen Bestimmung zu verzeichnen. Dies führt zu einer Bandbreite der diagnostischen Testcharakteristika (Sensitivität, Spezifität).

Clusterabklärung und -aufklärung: Durch eine Kombination von diagnostischen Tests und Befragungen können allfällige Infektionsketten beschrieben und analysiert werden. Diese

Abklärung ist mit erheblichem personellen Aufwand verbunden. Sie stößt ab einer gewissen Anzahl von Clustern sowohl kapazitätsmäßig wie auch hinsichtlich der tatsächlichen Rückverfolgbarkeit an ihre Grenzen.

Epidemiologische Analyse von offiziellen Individualdaten: Wenn individuelle Testergebnisse in Datenbanken von Gesundheitsbehörden aufgenommen werden, dann sind dadurch auch statistische Aussagen über Personenkollektive möglich. Darauf beruhen u. a. die bekannten Inzidenzauswertungen aber auch mittlerweile Übersichten zum Variantenspektrum des Virus. Diese kollektiv-orientierten Betrachtungen bilden dann die Basis für Risikomanagement-Maßnahmen.

Limitationen: Die epidemiologische Nutzung der individuellen Testdaten wird durch mehrere Aspekte eingeschränkt. Zum einen handelt es sich bei den getesteten Personen im Regelfall nicht um eine repräsentative Stichprobe der Population. Die Ergebnisse sind stark dadurch beeinflusst, welche Teststrategie gewählt wird: Fokus auf Verdachtsfälle, Massentests, zugelassene Testverfahren etc. Weil dadurch der stichprobenbasierte Blick auf den Pandemieverlauf verändert wird, spiegeln sie den Verlauf in der Population nicht mehr adäquat wider. Im Verlauf der Pandemie wurden mehrere Prävalenzstudien durchgeführt, deren Aufwand u. a. durch die angestrebte Sicherstellung der Repräsentativität für die österreichische Bevölkerung bzw. Teilen davon, begründet war. Auch haben analytische und behördliche Logistikabfolgen eine zeitliche Verzögerung zur Folge, bis Ergebnisse in offiziellen Datenbanken zur Verfügung stehen. Damit sind Indikatoren, die darauf beruhen, als nachhinkend zu betrachten.

Regionale Zuordnung und Eingrenzung: Durch die Verwendung von Meldedaten können epidemiologische Aussagen auf regionaler Ebene (Bezirke, Gemeinden) getätigt werden. Des Weiteren sind durch dezentrale Testmöglichkeiten regionale Schwerpunktsetzungen gegeben.

Limitationen: Unschärfen bei der regionalen Zuordnung ergeben sich durch berufs- oder freizeitbedingte Mobilität, welche über Gemeindegrenzen hinausführt. Abhängig von den jeweiligen Mobilitätseinschränkungen lassen sich somit durch ausschließlich meldedatenbasierte Zuordnungen nicht mehr so leicht regionale Schlüsse ziehen.

Mutationen/Varianten: Durch diverse genomorientierte Verfahren lassen sich zusätzlich zum qualitativen Virennachweis auch spezifische Mutationen/Varianten nachweisen. Im Variantenbericht der AGES wird die Entwicklung dieses Variantenprofils beschrieben.

9.5 Abwasserepidemiologischer Ansatz (AEA)

Grundlage des abwasserepidemiologischen Ansatzes zur Pandemiebeobachtung (AEA) ist die Bestimmung der Fracht an Viren im zu einer Abwasserreinigungsanlage (ARA) zulaufenden Abwasser. Die folgenden Punkte charakterisieren diesen Ansatz, zeigen die Nutzungsmöglichkeiten aber zum Teil auch die Limitationen auf.

Vollerhebung: Hinsichtlich der ausscheidenden Bevölkerung handelt es sich um eine Vollerhebung und keine Stichprobenerhebung. Es werden alle Personen erfasst, die in das Abwassersystem dieser ARA ausscheiden (= Einzugsgebiet). Dies ist auch völlig unabhängig von der Teststrategie im Humanbereich. Dort betrachtet man gewissermaßen nur die Spitze des Eisbergs. Zudem handelt es sich hierbei um eine nicht-invasive Art der Probenerhebung, und es ist keine Zustimmung der Proband:innen erforderlich.

Epidemiologische Betrachtung: Die Abwasserproben sind Sammelproben des Einzugsgebiets und erlauben daher keine Individualdiagnostik, sondern sind epidemiologisch fokussiert. Die Kosten dieser Sammelprobe für ein Einzugsgebiet von z. B. 100.000 Einwohner:innen sind im Vergleich zu den Kosten von 100.000 Einzeltestungen **minimal**.

Stichprobe: Da nur ein minimaler Teil des Abwassers untersucht werden kann, handelt es sich natürlich hinsichtlich des Abwasservolumens um eine Zufalls-Stichprobe. Bei einer mengenproportionalen 24h-Mischprobe ist diese als repräsentativ anzusehen. Zugleich geht damit eine Stichprobenvariabilität einher, die allerdings durch Messungen mit höherer zeitlicher Dichte reduziert werden kann.

Nachweisempfindlichkeit: Jede:r Einwohner:in trägt zur Gesamtabwassermenge bei. Die Virenfracht stammt aber nur von einem Teil der Gesamtbevölkerung. Fremdwasser kann zu einer weiteren Verdünnung führen. Ergebnisse des Coron-A Projekts weisen darauf hin, dass **eine virenausscheidende Person in 10.000 Personen detektiert** werden kann.

Zeitnaher Indikator: Das Abwassermessergebnis ist als sehr zeitnah anzusehen. Erfahrungen aus den Abwassermonitoringprogrammen der Bundesländer zeigen, dass selbst in einem Regelbetrieb die Auswertung von Abwasserproben innerhalb von 12 bis 48 Stunden erfolgen kann. Die Zeitspanne zwischen dem Ende der Probennahme und dem Vorliegen eines interpretierbaren Analyseergebnisses hängt letztlich von der Probenlogistik, der Analysendauer sowie der Datenlogistik ab.

Zeitlicher Vorsprung: Das Sammeln der Mischproben erfolgt über einen Zeitraum von 24h. Das beprobte Abwasser braucht je nach Größe des Einzugsgebiets mehrere Stunden bis Tage um in die Kläranlage zu gelangen. Nichtsdestotrotz konnte sowohl international als auch national gezeigt werden, dass Abwasserdaten einen zeitlichen Vorlauf von bis zu sieben Tagen gegenüber den Humandaten aufweisen können. Dieser zeitliche Vorsprung gegenüber dem epidemiologischen Humanergebnis ist allerdings abhängig von der Probenlogistik, der Analysendauer sowie der Datenlogistik.

Abwasserbasierter COVID-Indikator: Das Abwassermessergebnis liefert zum einen den *qualitativen* Nachweis (ob überhaupt Viren nachgewiesen werden können). Zum anderen lässt sich aber auch ein *quantitativer* Indikator ableiten, der in Relation zur Menge an Virenausscheidern des Einzugsgebiets steht. Der quantitative Ansatz wird z. B. im Rahmen des Tiroler- und Salzburger Abwassermonitoringprogramms angewendet, um so etwas wie „Fallzahlen“ aus den Abwassermesswerten ableiten zu können. Damit steht eine Kenngröße zur Verfügung, mit der sich zeitliche und örtliche Trends ableiten lassen, und die aufgrund der direkten Vergleichbarkeit mit Prävalenzzahlen auch Nichtexpert:innen eine schnelle Lageeinschätzung auf Basis der vorliegenden Monitoringergebnisse erlaubt.

Prognosefähigkeit: Wenn bei ARA Messungen für einen längeren Zeitraum (für den in Kapitel 8 beschriebenen Ansatz wurden als Untergrenze 23 Messzeitpunkte festgelegt) vorliegen, lassen sich damit kurzfristige **Vorhersagen** tätigen. Mittels dieser Trendprognosen lässt sich abschätzen, ob ein abwasserbasierter Indikator gleichbleibt, steigt oder sinkt. In Phasen niedriger Inzidenz kann dies **als Frühwarn-Instrument für Inzidenzsteigerungen** dienen. In Phasen erhöhter Inzidenz kann dies aber auch Trendveränderungen zeigen. Schließlich lässt sich ein abwasserbasiertes Prognosesystem auch **als Entwarnungswerkzeug nutzen**.

Die Voraussetzung für solche kurzfristigen Prognosen ist eine zeitlich enge Messdichte (mehrere Messungen pro Woche). Die Prognosen gelten in erster Linie für das Einzugsgebiet der spezifischen ARA. Gibt es mehrere Messpunkte in einem überregionalen Gebiet (Bezirk, Bundesland, Bundesgebiet) können die Einzeltrends auch zu Gesamttrendprognosen verdichtet werden.

Regionale Zuordnung und Eingrenzung: Auch bei einem abwasserbasierten Monitoring sind regionale Zuordnungen möglich. Dies gilt grundsätzlich für das Einzugsgebiet der jeweiligen Abwasserreinigungsanlage. Darüber hinaus sind aber auch vorgelagerte Probenahmen in Kanalteilsträngen möglich, wie dies in Wien und Innsbruck praktiziert wurde.

Verdachtsorientierte Ad-hoc-Untersuchungen sind umsetzbar, erfordern aber eine logistische Flexibilität.

Mutationen/Varianten: Die im Zuge der quantitativen RT-PCR gewonnene RNA lässt sich wie bei Humanproben auch zur Bestimmung von Virenmutationen/-varianten nutzen. Im Gegensatz zu einer Humanprobe ist allerdings bei der Sammelprobe aus dem Abwasser ein wesentlich heterogeneres Bild zu verzeichnen. Aufgrund dieser Variantenbandbreite ergibt sich hier eine nachweisthechnische Herausforderung. Umgekehrt kann man aber auch sagen, dass Variantennachweise aus dem Abwasser eine sehr klare epidemiologische Aussage über die ausscheidende Humanpopulation zulassen.

Geringes Datenvolumen: Die Anzahl an Abwasserreinigungsanlagen ist relativ klein, insbesondere wenn der Fokus auf größeren Anlagen liegt. Daraus ergibt sich im Vergleich zu den Humandaten ein sehr geringes Datenvolumen und in weiterer Folge ein geringer Datenmanagementaufwand. Zudem fallen keine personenbezogenen Daten an, was die Anforderungen an den Datenschutz wesentlich reduziert.

Betrachtet man die Kosten der Humantestungen, bietet ein abwasserbasiertes Monitoring eine wesentlich kostengünstigere Alternative. Je breiter die regionale Verteilung bei den ARAs gewählt wird, desto besser lassen sich auch regional spezifische Maßnahmen ableiten.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass Humantestungen und Abwassermonitoring zwei sich ergänzende Instrumente der Pandemiebeobachtung und -bekämpfung sind. Die Individualdiagnostik ermöglicht eine Absonderung und Contact-Tracing. Das Abwassermonitoring dient primär einer kollektiv-orientierten Betrachtung. Es kann einfach, schnell und zeitnah zeitliche Trends und regionale Unterschiede im Pandemiegesehen abbilden.

9.6 Nutzungsmöglichkeiten des AEA durch Gesundheitsbehörden

Wie in den vorangegangenen Abschnitten der epidemiologischen Evaluierung ausgeführt wurde, kann ein abwasserbasiertes Monitoringsystem den humanbasierten Ansatz nicht vollständig ersetzen. Dies betrifft alle Aspekte der Individualdiagnostik sowie die Clusterabklärung. Für die epidemiologische Nutzung bietet ein abwasserbasiertes Monitoring aber zahlreiche Vorteile.

Voraussetzungen für die Nutzung eines abwasserbasierten COVID-Monitoringsystems durch die Gesundheitsbehörden zur epidemiologischen Einschätzung der Pandemieentwicklung sind:

- verteiltes Netzwerk an Messstellen bei den Abwasserreinigungsanlagen,
- zeitliche Dichte der Probenahmen, Messungen und des Datenreportings,
- harmonisierte Messverfahren.

Generell lassen sich folgende Nutzungsmöglichkeiten für das Pandemiemanagement erkennen:

- frühzeitiger verbesserter Dateninput für die Humanprognose-Modelle,
- frühzeitige Konzeption bzw. Umsetzung von diversen Management-Maßnahmen,
- vorbereitende Kommunikation von Entwicklungen,
- bei regional flächendeckendem Monitoring lassen sich verdachtsorientiert auch regionalspezifische Maßnahmen ableiten, wie z. B. lokale Testinitiativen, Einschränkungen oder Lockerungen,
- Entwarnfunktion.

10 Öffentlichkeitsarbeit und internationale Vernetzung

Um in diesem aktuellen Forschungsthema am Wissensaustausch mit der weltweit dazu tätigen Forschungsgemeinschaft teilhaben zu können, wurde von Beginn an die Einbindung der am Forschungsvorhaben Coron-A beteiligten Institutionen in internationalen Aktivitäten angestrebt.

Dieses derzeit sehr dynamische Forschungsfeld des Einsatzes von abwasserepidemiologischen Ansätzen spiegelt sich auch international in einer Vielzahl von laufenden Initiativen zur Generierung von Wissen wider. Das Coron-A Projektkonsortium ist einer Einladung der WHO zur Teilnahme an der „Expert consultation on public health needs related to surveillance of SARS-CoV-2 virus in wastewater“ am 30.11.2020 durch die Teilnahme von Coron-A Projektpartnern nachgekommen (AGES, Medizinische Universität Innsbruck – Agenda siehe Anhang). An die WHO wurde in Folge ein Questionnaire mit Erfahrungen aus Sicht der Coron-A Projektpartner übermittelt. Dies wurde in der Publikation „Expert consultation on public health needs related to surveillance of SARS-CoV-2 in wastewater, WHO European Centre for Environment and Health, Copenhagen 2021.“ veröffentlicht.

Es konnten während der Projektlaufzeit des nationalen Forschungsprojekts „Coron-A“ folgende internationale Kontakte aufgebaut und etabliert werden und eine aktive Mitarbeit der Coron-A Projektteammitglieder sichergestellt werden:

- WHO- Regionalbüro für Europe/Europäische Kommission „Expert consultation on public health needs related to surveillance of SARS-CoV-2 virus in wastewater“
[WHO – Regionla Office for Europe/Coronavirus disease \(COVID-19\) outbreak - Rapid expert consultation on environmental surveillance of SARS-CoV-2 in wastewater: summary report \(2020\)](#)
- Europäische Kommission (JRC-Townhall Initiative „EU Sewage Sentinel System for SARS-CoV-2 (EU4S)“)
ec.europa.eu/jrc/en/event/webinar/eu4s-town-hall-meeting

- Deutsche CoroMoni-Forschungsinitiative
Corona-Früh- und Entwarnsystem aus dem Abwasser – BMBF
de.dwa.de/de/coromoni.html?msckid=d76dbbe7a92311ecb6fb9985153d31b8
- NORMAN – Netzwerk von Referenzlaboratorien, Forschungszentren und verwandten Organisationen zur Überwachung von neu auftretenden Umweltstoffen.
norman-network.net

Weitere veröffentlichte wissenschaftliche Arbeiten, die aus dem Coron-A Projekt hervorgegangen sind, finden sich auch im Literaturverzeichnis. Weitere Publikationen sind derzeit in Vorbereitung.

Abschließend wird auf Anhänge dieses Berichtes hingewiesen, die als Verfahrensbeschreibungen (Anhang A) und als Factsheets (Anhang B) vorliegen. Diese Zusatzinformationen sollen einer vereinfachten Kommunikation der Projektergebnisse und der bewährten Abläufe dienen, für ihren Einsatzes für ein Frühwarnsystem, sowohl für Praktiker:innen in der Anlytik als auch für Vertreter:innen von Gesundheitsbehörden.

11 Anhang A – Weiterführende Methodenbeschreibungen

11.1 Ablauf der quantitativen Analyse von SARS-CoV-2 in Abwasserproben am Beispiel der Labore der Medizinischen Universität Innsbruck

11.1.1 Zusammenfassung

An der Medizinischen Universität Innsbruck werden die Abwasseranalysen im akkreditierten Prüflabor des Instituts für Gerichtliche Medizin durchgeführt. Die Methoden und Abläufe wurden optimiert, standardisiert, automatisiert und validiert.

Die an der Medizinischen Universität Innsbruck etablierten Methoden und Abläufe erfüllen die für SARS-CoV-2 Quantifizierung und Ergebnisnormalisierung vorgegebenen Qualitätsstandards der Europäischen Kommission. Offen sind lediglich die Punkte Teilnahme an Leistungstests und Verwendung von (zertifizierten) Referenzmaterialien. Aktuell gibt es weder Leistungstests noch zertifizierte Referenzmaterialien. Diese Instrumente der Qualitätskontrolle befinden sich erst in der Entwicklung. Erste Laborvergleichsstudien wurden unter Federführung der Medizinischen Universität Innsbruck sowohl in Österreich als auch in Deutschland durchgeführt. Hinsichtlich Referenzmaterial ist die Medizinische Universität Innsbruck in Kontakt mit dem National Institute of Standards and Technology in Gaithersburg, MD, USA (NIST)

11.1.2 Hintergrund

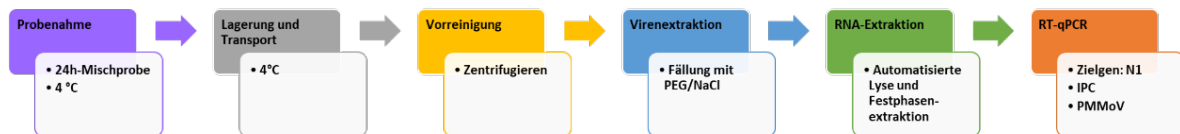
An der Medizinischen Universität Innsbruck wurden die quantitativen Analysen von SARS-CoV-2 in Abwasserproben in den Laboren des Instituts für Gerichtliche Medizin durchgeführt. Die Methodenentwicklung erfolgte durch Expert:innen in den Bereichen Abwasserepidemiologie und Molekularbiologie. Unterstützt wurden sie dabei durch Kolleg:innen des Instituts für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie. Hauptverantwortlich für die Abwicklung von Monitoringstudien war das nach ISO EN ÖNORM 17025 akkreditierte Prüflabor.

11.1.3 Ablauf der Laboranalyse

Der prinzipielle Ablauf des Virennachweises ist in Abbildung 77 dargestellt. 250 mL Abwasser werden zunächst durch Zentrifugieren vorgereinigt. Das gereinigte Abwasser wird mit Kochsalz und Polyethylenglykol versetzt. Die Viren können in der Folge mittels Zentrifugation abgetrennt werden. Aus dem erhaltenen Niederschlag wird die Virus-RNA mittels Lyse und Extraktion gewonnen. Der schlussendliche Virennachweis erfolgt mittels RT-qPCR. Jede Probe wird in zwei parallelen Reaktionen ausgetestet.

Lyse und Extraktion erfolgen vollautomatisch. Ursprünglich wurde dafür ein System von Roche verwendet. Aufgrund von Lieferschwierigkeiten von Chemikalien musste Anfang September 2020 die Plattform gewechselt werden. Mittlerweile wird ein System von Qiagen (Biorobot EZ1 Advanced XL mit EZ1 Virus Mini Kit v2.0, Abbildung 78a) verwendet. Damit können in einer Serie 14 Proben aufgearbeitet werden.

Abbildung 77: Prinzipieller Ablauf der Quantifizierung von SARS-CoV-2 in Abwasserproben.



Quelle: Medizinische Universität Innsbruck

Der SARS-CoV-2 Nachweis und die Quantifizierung erfolgen mittels RT-qPCR nach den Vorgaben des U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (CDC 2021). Das Zielgen ist N1.

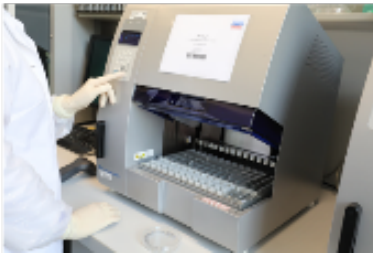
Als weiteres Target dient ein Genomabschnitt des Pepper Mild Mottle Virus (PMMoV). PMMoV ist ein Pflanzenpathogen, das ubiquitär auf Paprika zu finden ist. Das Virus wird über die Nahrung aufgenommen und gelangt über den Stuhl ins Abwasser, wo es als Fäkalmarker dient (Kitajima et al. 2018). In diesem Ansatz dient PMMoV als Gesamtprozesskontrolle.

Jeder Ansatz wird mit einer synthetischen DNA-Amplifikationspositivkontrolle (IPC) dotiert. Die IPC dient als Prozesskontrolle für den PCR-Schritt.

Jede Probe wird im Duplikat analysiert. Das Reaktionsvolumen ist 20 Mikroliter. Pro Reaktion werden sechs Mikroliter des Extraktes eingesetzt. Das Pipettieren der Lösungen übernimmt ein Robotersystem (Tecan Freedom Evo 100, Abbildung 78b). Die Analyse erfolgt im 96er Mikrotiterplattenformat auf einem Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Abbildung 78c). DNA- und RNA-Standards mit bekannter Konzentration dienen als Kalibrierstandards sowie Qualitätskontrollen.

Abbildung 78: Übersicht über die wichtigsten zur Analyse von Abwasserproben benötigten Geräte und Instrumente.

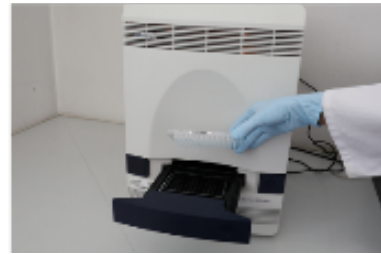
(a) Biorobot EZ1 Advanced XL



(b) Tecan Freedom Evo 100



(c) Applied Biosystems 7500 Fast Real-time PCR System



Quelle/©: Medizinische Universität Innsbruck

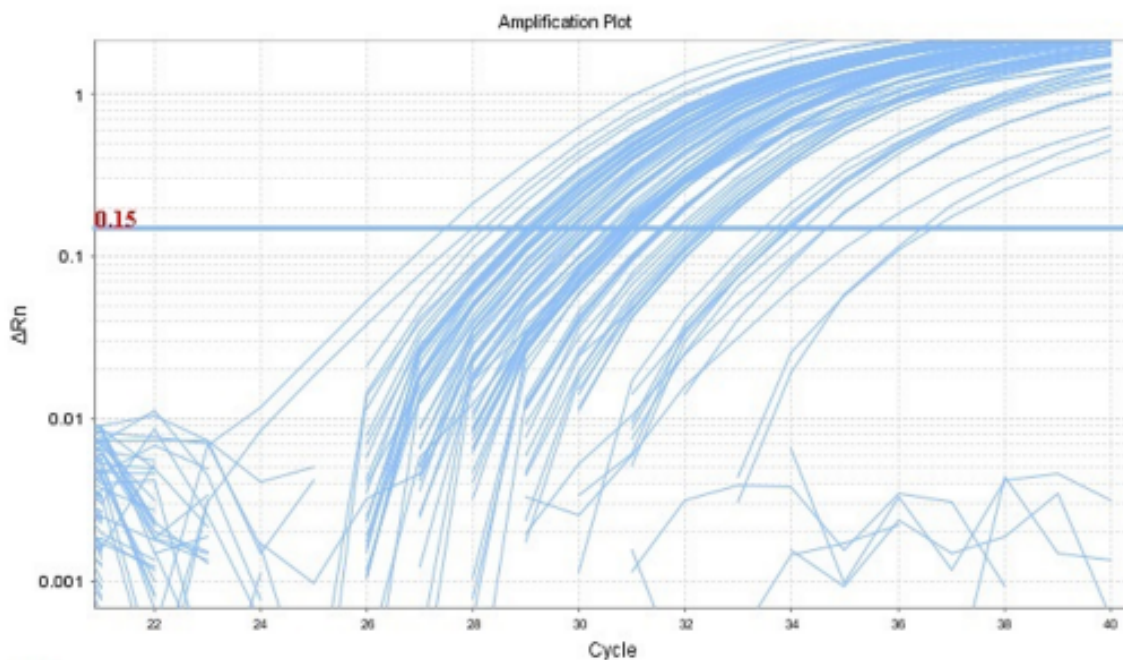
11.1.3.1 Optimierung der Quantifizierungsmethode

Das Analysenverfahren wurde bzw. wird kontinuierlich weiterentwickelt und verbessert. Meilensteine im Bereich Methodenoptimierung waren unter anderem:

- Wechsel der Plattform für die automatisierte Lyse und Extraktion von RNA mit höherer Extraktionsausbeute und größerem Probendurchsatz.
- Wechsel der RT-qPCR-Plattform zur Steigerung des Probendurchsatzes.
- Erhöhung des Ausgangsvolumens von 50 mL auf 250 mL unter Beibehaltung des Probendurchsatzes.
- Implementierung von Prozesskontrollen (PMMoV, IPC) zum Erkennen von Problemen bei der Probenvorbereitung bzw. von Hemmungen der PCR-Reaktion.
- Wiederkehrende Quantifizierung von extrahierten Proben zur Kontrolle der RT-qPCR.
- Umstellung des Referenzstandards zur Quantifizierung der RNA-Mengen auf lineare DNA- und RNA-Standards.
- Kalibrierung der Referenzstandards.

Die Punkte 1–3 dienen zur Standardisierung der Abläufe, zur Erhöhung des Probendurchsatzes und zur Herabsetzung der Nachweisgrenzen. Die Implementierung der Qualitäts- und Prozesskontrollen (Punkt 4 und 5) sind Maßnahmen des Qualitätsmanagements. Mit Umsetzung der Punkte 6 und 7 konnte die Zuverlässigkeit der Quantifizierung verbessert werden.

Abbildung 79: Amplifikationsplots von Abwasserproben zur Veranschaulichung der Bestimmung von CT-Werten. Der Schwellenwert wurde auf 0,15 gesetzt.



Quelle: Medizinische Universität Innsbruck

Bei quantitativen Methoden dienen Referenzstandards zur Erstellung von Kalibrationen. Die Kalibrationsfunktionen werden in der Folge verwendet, um den Gehalt der analysierten Proben aus dem Messsignal abzuleiten. Bei der qPCR ist das Messsignal der CT-Wert (cycle threshold). Der CT-Wert wird ermittelt, indem die Fluoreszenzstärke und die Anzahl der Zyklen gegeneinander aufgetragen werden (Abbildung 79). Bei jenem Punkt der Kurve, in dem die Fluoreszenz über den Hintergrund- bzw. Schwellenwert ansteigt (in dem also die Ordinate des Punkts gleich dem Schwellenwert ist), entspricht die Abszisse dem CT-Wert.

Die Kalibration wird durch Analyse von Standards mit definierter und steigender Konzentration erstellt. Für eine richtige und reproduzierbare Kalibrierung müssen die Konzentrationswerte der Standards stimmen und zeitlich stabil sein. Es wurde die Beobachtung gemacht, dass nicht jeder kommerziell erhältliche Standard diese Qualitätskriterien erfüllt. So scheinen RNA-Standards stabiler als DNA-Standards zu sein und einzelsträngige Standards zuverlässigere Kalibrationsfunktionen als doppelsträngige Standards zu ergeben. Aufgrund dessen wurde dazu übergegangen, einzelsträngige DNA- und RNA-Moleküle als Referenzstandards und Qualitätskontrollen zu verwenden.

Um die Richtigkeit der verwendeten Standards zu überprüfen, wurde ein Referenzmaterial vom National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA) verwendet (RGTM 10169, [nist.gov/programs-projects/sars-cov-2-research-grade-test-material](https://www.nist.gov/programs-projects/sars-cov-2-research-grade-test-material), created June 3, 2020, updated July 1, 2020).

11.1.4 Validierung der Quantifizierungsmethode

Das Analysenverfahren wurde validiert, um dessen Tauglichkeit für den Einsatz im Abwassermonitoring zu zeigen. Im Rahmen der Validierung wurden die Parameter Kalibrationsmodell, Nachweis- und Detektionslimits, Selektivität, Richtigkeit und Präzession bestimmt.

Als Messwerte für die Bestimmung der RNA-Konzentration dienen die aus den Kurven der RT-qPCRs abgeleiteten CT-Werte. Zwischen dem Logarithmus der Konzentration und den CT-Werten besteht ein linearer Zusammenhang, der zur Erstellung von Kalibrationsfunktionen dienen kann. Zur Ableitung der Qualität des Kalibrationsmodells bzw. Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden fünfzehn Kalibrationen im Bereich von 0,5 bis 5800 Kopien pro μl RT-qPCR-Ansatz ausgewertet. Die Bestimmungsgrenze lag bei sechs Kopien pro μl . Dort konnten zumindest 88 % der Standards mit einer Abweichung innerhalb von ± 30 % quantifiziert werden. Standards mit 0,5 Kopien pro μl lieferten in der Regel noch einen positiven Nachweis. Es konnten aber nur 31 % der Standards zuverlässig mit einer Abweichung innerhalb von ± 30 % quantifiziert werden.

Auf das Abwasser bezogen liegt die Bestimmungsgrenze somit bei 2,6 Kopien pro mL.

Die Reproduzierbarkeit des Gesamtprozesses wurde durch wiederholte Analyse von zwei Proben an zwei aufeinanderfolgenden Tagen untersucht. An jedem Tag wurden die Proben dreifach aufgearbeitet und die einzelnen Extrakte jeweils im Triplikat quantifiziert. Die relative Standardabweichung war für beide Proben kleiner als 8 %.

Durch mehrfache Aufarbeitung und Analyse von sieben Aliquote einer gefällten Probe wurde die Reproduzierbarkeit der nachfolgenden Arbeitsschritte untersucht. Die relative Standardabweichung war kleiner als 8 %.

Die Reproduzierbarkeit der RT-qPCR wurde durch wiederholte Quantifizierung von extrahierten Proben untersucht. Dazu wurden 23 Proben im Schnitt sechsmal hintereinander verteilt auf 39 Läufe quantifiziert. Die Konzentrationen der untersuchten Proben lagen zwischen 3,6 und 285 Kopien pro μl Extrakt. Die relative Standardabweichung lag für alle Proben inklusive der zwei Proben mit Konzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenze zwischen 5 % und 22 %.

Im Schnitt wurde nach jeder hundertsten Probe eine Leerprobe prozessiert. Außerdem wurden in jeder RT-qPCR-Serie Leerproben mitquantifiziert. Keine dieser Kontrollen wurde positiv getestet.

11.2 Vorgangsweise und Protokoll für die Extraktion von SARS-CoV-2 RNA aus Abwasserproben mittels PEG-Präzipitation

11.2.1 Zusammenfassung

Das PEG-Konzentrationsverfahren in den beiden ausgeführten Detaillierungen hat sich bezüglich der Effizienz bewährt und liefert eine gute Vergleichbarkeit mit vielen international durchgeführten Studien. Das von der TU Wien und der Universität Innsbruck verwendete Verfahren erwies sich nicht nur für die Detektion und Quantifizierung der SARS-CoV-2 Virenfragmente als geeignet, sondern auch für nachfolgende Ganzgenom-Sequenzierungen, die sogar bei hohen CT-Werten geringe Ausfallsraten zeigten.

11.2.2 Vorgangsweise

Basis sind bei $+4^{\circ}\text{C}$ gelagerte Proben (siehe Kapitel 1.1). 70 g Probe werden in ein 80 mL Zentrifugenröhrchen (Oak Ridge Typ 3118, NalgeneTM) überführt und mit einem transgenen, virusähnlichen Partikel auf Basis des MS2-Phagen als interne Kontrolle für die Probenvorbereitung und RT-qPCR (quantitative Echtzeit PCR) Analyse versetzt. Um Partikel zu entfernen, wird das Röhrchen anschließend 30 Min. bei 4.500 g (4508 R Kühlzentrifuge, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) ohne Bremsung zentrifugiert (Medema et al.,

2020). 65 mL des Überstandes werden dann in ein weiteres Zentrifugenröhrchen überführt und mit 6,5 g Polyethylenglykol (PEG 8000; ROTIPURAN®) und 1,46 g Natriumchlorid versetzt. Zur Lösung des PEG wird das Röhrchen mit einem Kipp-/Rollenmischer (RS-TR 05, Phönix Instrument) für 10 Min. bei Raumtemperatur gemischt. Zum Austarieren der Zentrifugenröhrchen wird RNase-freies Wasser verwendet. Die Proben werden dann weiter bei 12.000 g für 99 Min. ohne abschließende Bremsung zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig entfernt, wobei ein kleines transparentes Pellet zurückbleibt. 800–1.000 µl Lysepuffer werden zu dem Pellet gegeben, gefolgt von 15 Sek. Behandlung im Vortexmischer (Reagenzglasschüttler) bei 2.500 U/min und einer weiteren Zentrifugation bei 2.000 g für einige Sekunden (mit Bremsung), um alle Lysepuffertröpfchen am Boden des Zentrifugenröhrchens (Falcon-Röhrchen) zu sammeln. Die gesamte Lösung wird dann in ein Eppendorf-Mikroreaktionsröhrchen überführt. RNA wird in der Folge aus dem lysierten Pellet unter Verwendung des Monarch TM total RNA Miniprep Kits (New England Biolabs, Ipswich, USA) gereinigt.

11.2.3 Protokoll

Untenstehendes Protokoll wird von den Laboren an der TU Wien und der Universität Innsbruck in leicht unterschiedlicher Form verwendet, die beiden Optionen sind dargelegt.

	Protokoll Option 1	Protokoll Option 2
1	Basis sind bei 4 °C gelagerte Proben aus dem Zulauf von Kläranlagen.	
2	-	Mit Pipette 40 mL Abwasser-Zulauf in ein 50 mL Falcon-Zentrifugenröhrchen überführen.
3	Probe mit einem virusähnlichen Partikel auf Basis des MS2-Phagen (≈ 104 Partikel pro Probe) als interne Prozesskontrolle (IPC) für die Probenvorbereitung und RT-qPCR (quantitative Echtzeit PCR) Analyse versetzen.	Alternativ: IPC erst vor der RNA-Extraktion dazugeben.
4	Zentrifuge auf 4 °C abkühlen.	
5	Um Grobpartikel und andere Biomasse zu entfernen, das Röhrchen anschließend 30' bei 4.500 g (ohne Bremsung) zentrifugieren.	
6	-	Während der Wartezeit 3,25 g Polyethylenglykol (PEG 8000; ROTIPURAN®) und 0,73 g Natriumchlorid in ein 40 mL Falcon-Röhrchen einfüllen.

Protokoll Option 1		Protokoll Option 2
7	-	40 mL des Überstandes in das vorbereitete Falcon-Röhrchen überführen.
8	Zur Lösung des PEG den Inhalt des Röhrchens mit einem Kipp-/Rollenmischer für 10' bei Raumtemperatur mischen.	Zur Lösung des PEG den Inhalt des Röhrchens händisch mischen und für 15' bei Raumtemperatur stehen lassen.
9	Prüfen, ob die Zentrifugenröhrchen austariert werden müssen; wenn ja, zum Austarieren der Zentrifugenröhrchen RNase-freies Wasser verwenden.	
10	Die Röhrchen bei 12,000 g für 90-99' ohne abschließende Bremsung zentrifugieren.	
11	Den Überstand vorsichtig dekantieren und die Probe nochmals bei 12,000 g für 5' mit Bremsung zentrifugieren, wobei ein kleines transparentes Pellet zurückbleibt.	
12	Die restliche Flüssigkeit mit der 1000 µl Kolbenhub-Pipette entfernen.	
13	Anschließend das Pellet in 800-1000 µl Lysepuffer lösen und für 15'' vortexen.	
14	Optional: Nach der Lyse die Röhrchen ein weiteres Mal bei 2000 g für einige Sekunden (mit Bremsung) zentrifugieren, um sämtliche Lösung am Boden des Falcon-Röhrchens zu sammeln	
15	Die gesamte Lösung in ein Mikroreaktionsröhrchen (Eppi) überführen.	
16	RNA wird anschließend aus dem lysierten Pellet unter Verwendung des Monarch TM total RNA Miniprep Kits (New England Biolabs, Ipswich, USA) oder einem geeigneten alternativen Kit extrahiert bzw. aufgereinigt.	

11.3 Abwasserproben als Basis für Ganzgenomsequenzierungen

Das Auftreten neuer SARS-CoV-2 Varianten führte während der zweiten pandemischen Welle dazu, dass die Verbreitung und Abundanz sogenannter Variants of Interest (VOI) und insbesondere der Variants of Concern (VOC) zunehmend die Aufmerksamkeit von Wissenschaftlern, Gesundheitsbehörden und der Öffentlichkeit erweckte. Seitens des Instituts für Mikrobiologie der Universität Innsbruck konnte für das Coron-A Projekt eine Zusammenarbeit mit dem Labor Bergthaler (CeMM – Center for Molecular Medicine of the Austrian Academy of Sciences) auf informeller Basis begründet werden. Weltweit möglicherweise einzigartig, werden weitgehend flächendeckend SARS-CoV-2 Varianten erfasst. Die Variantenerfassung wird zunehmend als wichtige Zusatzinformation aus dem Abwassermonitoring angesehen, da sie eine tiefergehendere Überwachung des pandemischen Geschehens ermöglicht als die reine Quantifizierung viraler RNA.

11.3.1 Methodische Voraussetzungen

Für erfolgreiche Sequenzierungen hat sich das Protokoll bewährt, das von den Laboren der TU Wien (N. Kreuzinger) und der Universität Innsbruck (H. Insam) verwendet wird. Die Rate der erfolgreichen Sequenzierungen lag im Verlauf der Studie bei rund 90 %, während andere Aufbereitungsmethoden eine geringere Erfolgsquote (rd. 40 %) aufwiesen. Der Sequenziererfolg wird zudem sehr stark vom CT-Wert beeinflusst, wobei CT-Werte höher als 32 die Erfolgsquote verringern. Aus diesem Grund waren die Raten der erfolgreichen Sequenzierungen in den Monaten Juni und Juli auch deutlich niedriger als zuvor, bei noch höheren Virenkonzentrationen im Abwasser.

11.3.2 Analyisierte Varianten

Bei den Ganzgenomsequenzierungen (es sind über 3.000 Mutationen bekannt) wird die Darstellung in diesem Bericht auf die VOC, VOI und die Variants under Monitoring laut European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) beschränkt, dazu gehören B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.617.2, B.1.525, B.1.427, B.1.429, P.3, B.1.616, B.1.617.1, B.1.620, B.1.621, B.1.617.3, B.1.214.2, A.27, A.28, C.16, C.37, C.36, AT.1, B.1.526, B.1.526.1, B.1.526.2, B.1.1.318, P.2, B.1.1.519, AV.1.

Tabelle 14: Variants of Concern.

WHO label	Lineage + additional mutations	Country first detected (community)	Spike mutations of interest	Year and month first detected	Evidence for impact on transmissibility	Evidence for impact on immunity
Alpha	B.1.1.7	United Kingdom	N501Y, D614G, P681H	September 2020	Yes (v)(1)	No
	B.1.1.7 +E484K	United Kingdom	E484K, N501Y, D614G, P681H	December 2020	Yes (v)(1)	Neutralisation (v)(4,5)
Beta	B.1.351	South Africa	K417N, E484K, N501Y, D614G, A701V	September 2020	Yes (v)(6)	Escape (v)(6,7)
Gamma	P.1	Brazil	K417N, E484K,	December 2020	Yes (v)(9)	Neutralisation (v)(10)

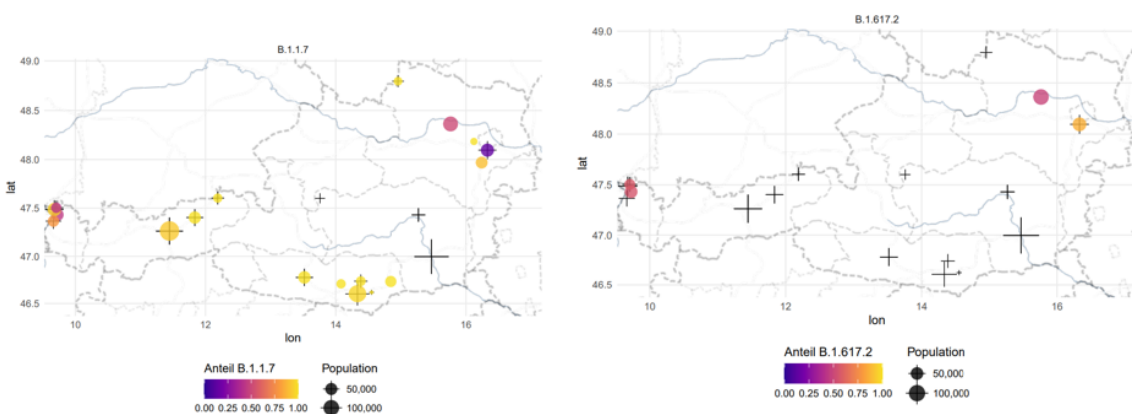
WHO label	Lineage + additional mutations	Country first detected (community)	Spike mutations of interest	Year and month first detected	Evidence for impact on transmissibility	Evidence for impact on immunity
			N501Y, D614G, H655Y			
Delta	B.1.617.2	India	L452R, T478K, D614G, P681R	December 2020	Yes (v)(11)	Escape (v)(12-14)

Quelle: European Center for Disease Prevention and Control (ECDC)

11.3.3 Ergebnisse

Im wöchentlichen Variantenreport des CeMM (Amman et al., 2021) wird in Übersichtskarten wöchentlich der Status der einzelnen Varianten in den beprobten Kläranlagen dargestellt, in diesem Bericht die Version von Juni 2021 (Abbildung 80). Es ist deutlich zu sehen, dass in Kläranlagen in Tirol und Kärnten die vor Kurzem allseits dominante Alpha-Variante noch vorherrschte, während im Nordosten Österreichs sowie in Vorarlberg bereits die Delta-Variante dominierte.

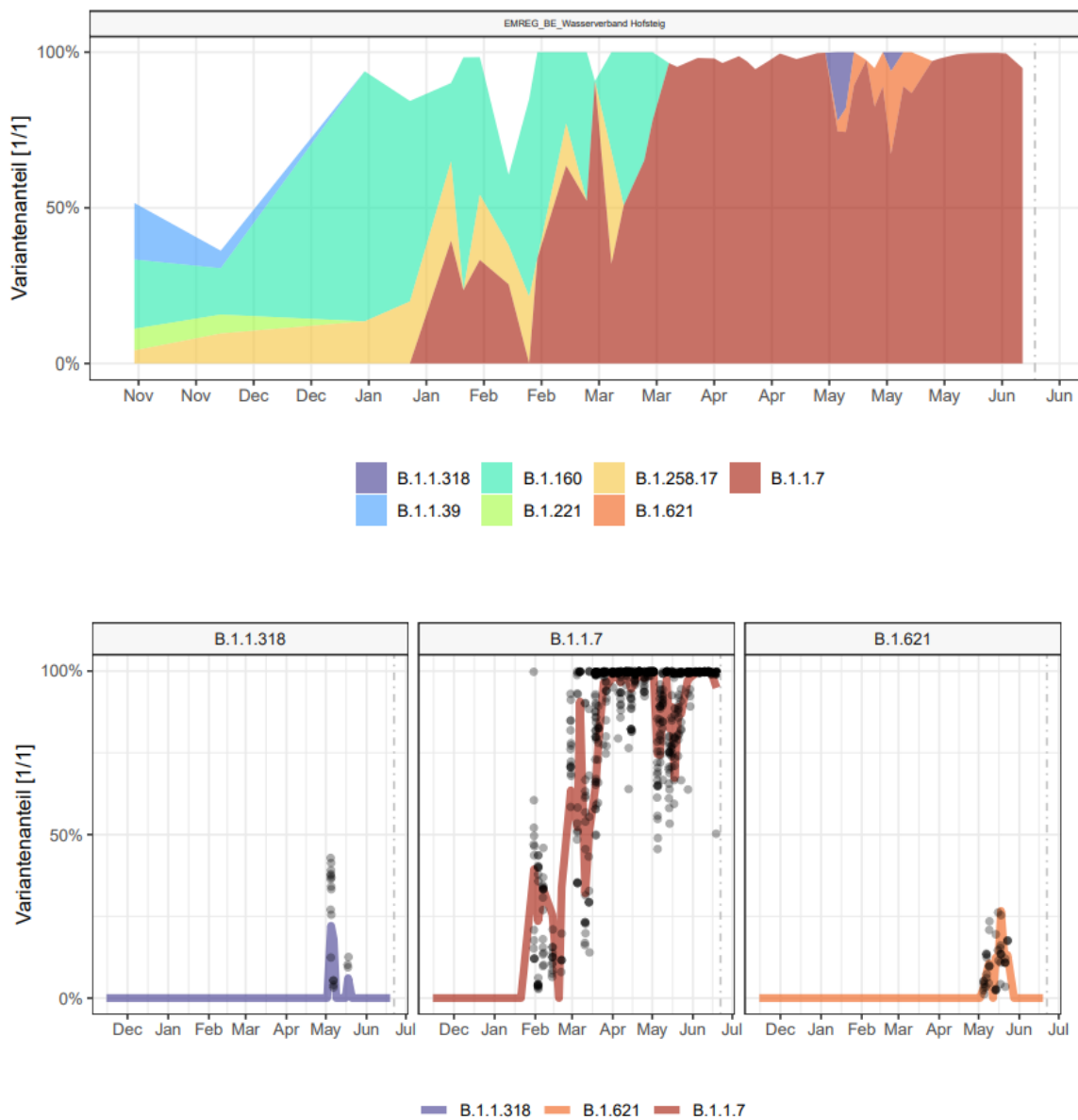
Abbildung 80: Übersichtskarte des wöchentlichen Status der einzelnen Varianten in den beprobten Kläranlagen in Österreich – Stand Juni 2021.



Quelle: Amman et al., 2021

In der Folge werden einige ausgewählte Beispiele der Ergebnisse aus der Ganzgenomsequenzierung dargestellt. Abbildung 81 zeigt am Beispiel der Kläranlage Hofsteig, Vorarlberg, was möglich wäre, wenn überall durchgehende Datensätze zur Verfügung stünden.

Abbildung 81: Oben: Relative Häufigkeit der detektierten Varianten für die gesamte Messzeitreihe an der Kläranlage Hofsteig, Vorarlberg. Unten: Abgeleitete relative Häufigkeit aller detektierten VOC/VOI Variante(n) und der gemessenen Allelfrequenz der dazugehörigen Markermutationen.



Quelle: Amman et al., 2021

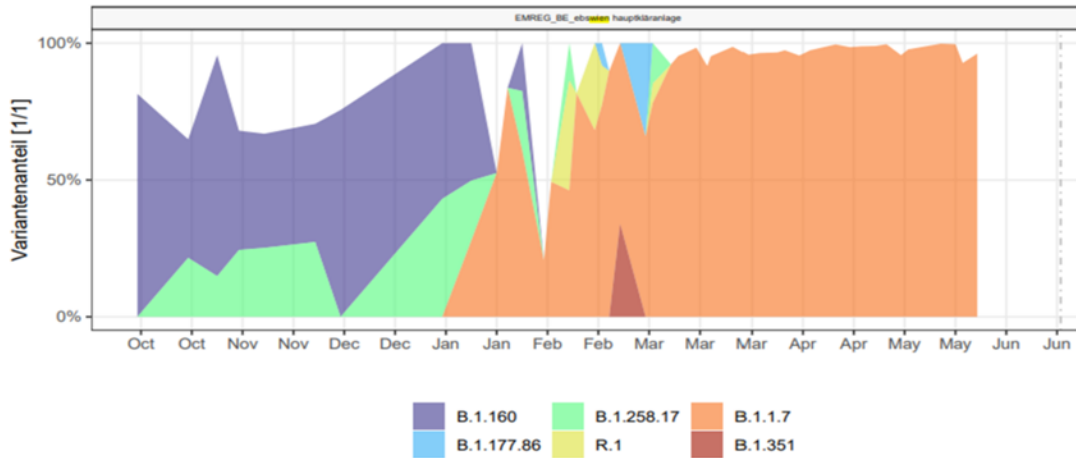
Für Hofsteig ist die relative Häufigkeit der detektierten Varianten für die gesamte Messzeitreihe seit November 2020 dargestellt, sowie die abgeleitete relative Häufigkeit aller detektierten VOC/VOI Variante(n) und der gemessenen Allelfrequenz der dazugehörigen Markermutationen. Mitte Jänner erschien erstmals die Alpha-Variante (B.1.1.7.), die sehr schnell dominant wurde. Im Mai 2021 wurde die kolumbianische VOI kurzfristig beobachtet, die jedoch schnell wieder zurückgedrängt wurde. Interessant sind die Varianten jedenfalls auch in Zusammenhang mit Prognosemodellen, da davon auszugehen ist, dass die Virenfracht im Abwasser durch Varianten, die eine verstärkte Virenausscheidung verursachen, erhöht wird (Markt et al., 2021).

Abbildung 82 zeigt eine Übersicht über die relative Häufigkeit der detektierten Varianten für die Hauptkläranlage in Wien sowie einige Beispiele aus den Bundesländern. Bis auf die Bundesländer Tirol und Steiermark liegen für ganz Österreich lange und dichte Zeitreihen vor, für Salzburg wurden die Messreihen seit April nicht mehr fortgesetzt.

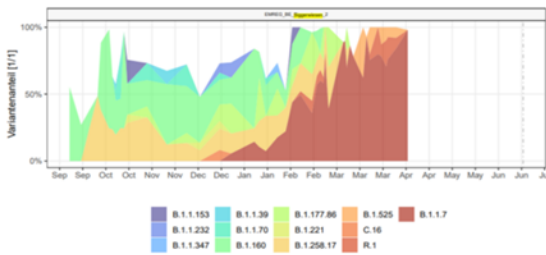
Zukünftiges Abwassermonitoring sollte jedenfalls die Möglichkeit der Bestimmung der Abundanz neuer Mutationen und Varianten nutzen und dadurch die Aussagekraft erhöht und Prognosemöglichkeiten verbessert werden. Zusätzlich zu Ganzgenomsequenzierungen wird auch die schnellere PCR-basierte Variantenerfassung empfohlen.

Abbildung 82: Relative Häufigkeit aller detektierten Varianten für die gesamte Messzeitreihe für ausgewählte Kläranlagen. Bei den angegebenen Zeitachsen ist zu beachten, dass diese nicht für alle untersuchten Kläranlagen dieselben Zeitabschnitte aufweisen.

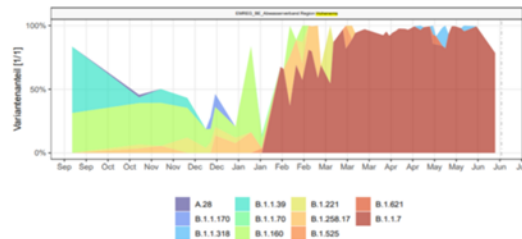
Wien-Hauptkläranlage



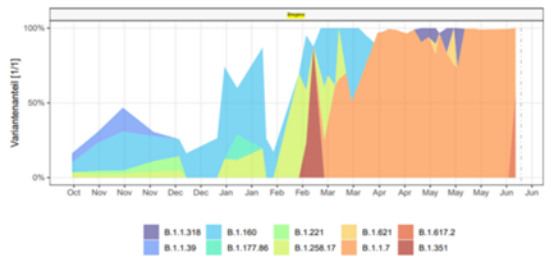
Salzburg



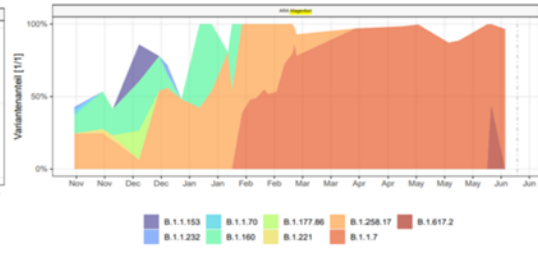
Hohenems



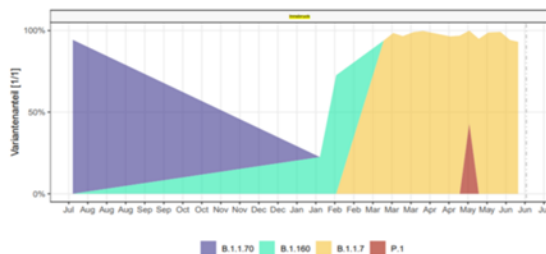
Bregenz



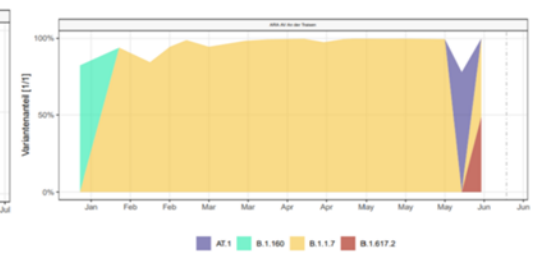
Klagenfurt



Graz



An der Traisen



Quelle: Amman et al., 2021

11.3.4 Verwendete Literatur

Markt et al. (2021): Markt, R., Endler, L., Amman, F., Schedl, A., Penz, T., Büchel-Marxer, M., Grünbacher, D., Mayr, M., Peer, E., Pedrazzini, M., Rauch, W., Wagner, A.O., Allerberger, F., Bergthaler, A., Insam, H. (2021). Detection and abundance of SARS-CoV-2 in wastewater in Liechtenstein, estimation of prevalence and impact of the B.1.1.7 variant. Sci Total Envir

Amman et al. (2021): Amman, F., Endler, L., Schedl, A., Triska, P., Thornton, M., Bergthaler, A. (2021) CeMM – Coron-A Abwasser-Monitor: SARS-CoV-2 Varianten Report, 09.07.2021

ECDC, 2021: ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern. Accessed 09.07.2021

11.4 Das Konzept der „Fiktiven Ausscheider“ – Medizinische Universität Innsbruck

11.4.1 Hintergrund

Sinn und Zweck des SARS-CoV-2 Abwassermonitorings ist es, Daten und Informationen für die Lagebeurteilung durch die dafür zuständigen Gesundheitsbehörden zur Verfügung zu stellen. Die Monitoringergebnisse sollen dabei in einer Form übermittelt werden, die es erlaubt:

- den Schweregrad der Pandemie in einer Region einzuschätzen,
- zeitliche Trends zu erkennen,
- regionale Unterschiede zu erfassen und
- einen direkten Vergleich mit anderen epidemiologischen Kennzahlen durchzuführen.

Die Darstellung der Ergebnisse in Form von Virenkonzentrationen oder -frachten scheinen zur Erreichung der Ziele nur bedingt geeignet zu sein. Daher hat sich das Team der Medizinischen Universität Innsbruck dazu entschieden, aus den Messwerten abgeleitete Größen („Anzahl der fiktiven Ausscheider“) für die Ergebnisdarstellung zu verwenden.

11.4.2 Herleitung des Konzeptes der „Fiktiven Auscheider“

Die große Stärke der Abwasserepidemiologie ist es, einen räumlichen und zeitlichen Vergleich von Monitoringergebnissen zu ermöglichen. Als Vergleichsgrößen im Bereich des Abwassermonitorings von Drogen werden Prokopffrachten verwendet. Diese werden mithilfe folgender Formeln berechnet:

$$\text{Prokopffracht} = \text{CONC} \times F \times P^{-1} \quad (1)$$

CONC ist die Konzentration der untersuchten Substanz (ng/L). F ist die Zulaufmenge (m³/Tag). P ist die Anzahl der Einwohner:innen im Einzugsgebiet der Kläranlage.

Die Prokopffrachten bilden den Ausgangspunkt für die Abschätzung des Anteils der Bevölkerung, der eine bestimmte Substanz konsumiert. Dies erfolgt mit folgender Formel:

$$\text{Konsumierender Bevölkerungsanteil} = \text{Prokopffracht} \times \text{CF} \times \text{Dosis}^{-1} \quad (2)$$

CF ist ein Korrekturfaktor, mithilfe dessen der Grad der Verstoffwechslung der Substanz im menschlichen Körper korrigiert wird. Dosis ist die mittlere Dosis, die ein Konsument pro Tag einnimmt.

Ein alternativer Ansatz, um aus der Prokopffracht den Bevölkerungsanteil, der eine Droge konsumiert, zu ermitteln, verwendet die mittlere durch einen Konsumenten ausgeschiedene Menge des entsprechenden Konsummarkers. Die Berechnung erfolgt anhand folgender Formel:

$$\text{Konsumierender Bevölkerungsanteil} = \text{Prokopffracht} \times \text{Ausgeschiedene Menge}^{-1} \quad (3)$$

D. h. unter Kenntnis der mittleren pro Konsumenten ausgeschiedenen Menge an Konsummarker kann aus dessen Fracht auf die Anzahl der Konsumenten geschlossen werden.

Umgelegt auf das SARS-CoV-2 Monitoring würde das bedeuten, dass es durch experimentelle Bestimmung der Virenfracht möglich sein sollte, unter Kenntnis der von einer

infizierten Person im Mittel ausgeschiedenen Menge an Viren, die Anzahl der virenausscheidenden Personen abzuschätzen. Eine virenausscheidende Person wird im Folgenden als „fiktiver Ausscheider“ bezeichnet.

Die Anzahl der „fiktiven Ausscheider“ berechnet sich folgendermaßen aus der gemessenen Virenkonzentration:

$$\text{Anzahl „fiktive Ausscheider“} = \text{CONC} \times F \times \text{ausgeschiedene Menge}^{-1} \quad (4)$$

Die Viruskonzentration lässt sich mithilfe der bereits beschriebenen Analysemethoden experimentell bestimmen. Die Abwassermenge wird durch geeignete Messgeräte am Zulauf zur Kläranlage erfasst. Eine unbekannte Größe ist die typischerweise von infizierten Personen ausgeschiedene Virenmenge. Laut Literatur liegen die über den Stuhl ausgeschiedenen Mengen an Virengenomen bei 10^4 – 10^8 Kopien pro g Stuhl. Wenn man davon ausgeht, dass eine Person 200–300 g Stuhl pro Tag produziert, ergibt das eine maximale Virusmenge von 2×10^{10} Kopien pro Ausscheider (Lescure et al., 2020; Wolfel et al., 2020).

Aufgrund der großen Schwankungsbreite der Literaturwerte wurde der Umrechnungsfaktor experimentell durch Korrelation der Abwasserdaten mit der Anzahl der aktiv positiv getesteten Personen ermittelt.

Das Konzept der „Fiktiven Ausscheider“ hat Limitationen. Die ausgeschiedene Menge an Viren kann von Person zu Person schwanken und selbst bei ein und derselben Person zeitlich nicht stabil sein. Des Weiteren wurde bei der Ermittlung des Umrechnungsfaktors die Dunkelziffer nicht berücksichtigt. Alleine schon aus diesen zwei Gründen kann die berechnete Anzahl an fiktiven Ausscheidern nur eine Näherung der Wirklichkeit darstellen.

11.4.3 Ableitung der Menge an ausgeschiedenen Viren und Evaluierung des Konzeptes der „Fiktiven Ausscheider“

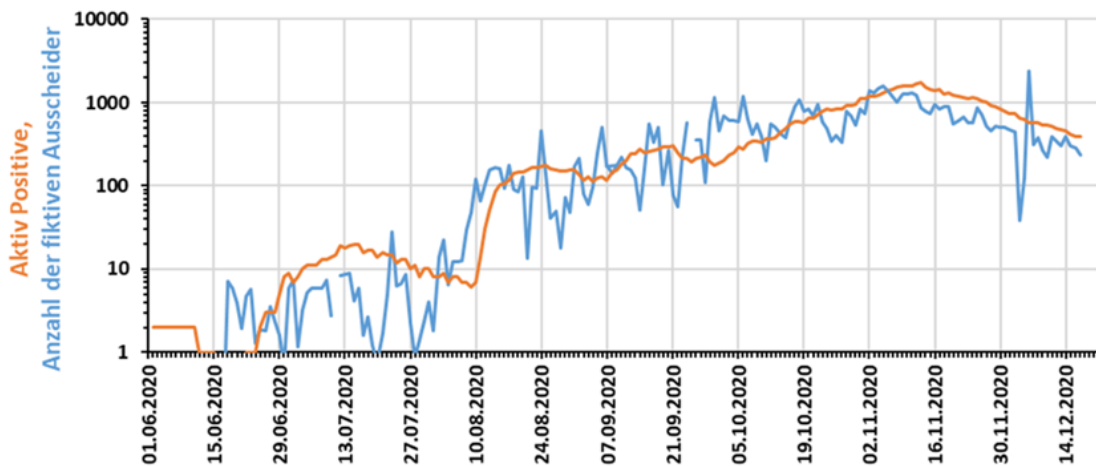
Zur Ableitung der mittleren ausgeschiedenen Virenmenge pro infizierte Person und in weiterer Folge zur Evaluierung des abwasserepidemiologischen Modells wurden die von der Kläranlage Innsbruck im Zeitraum 1.6.–14.12.2020 gesammelten Daten (Abbildung 83) sowie die Daten des tirolweiten Abwassermonitorings vom 24.8.2020 (Abbildung 84) verwendet.

Der Vergleich der Ergebnisse des Innsbrucker Abwassermonitorings mit den Zahlen aus dem Epidemiologischen Meldesystem weist auf eine gute Übereinstimmung der beiden Kennzahlen hin (Abbildung 83). Nichtsdestotrotz können Einzelwerte größere Abweichungen aufweisen. Es hat sich gezeigt, dass vor allem Starkregenereignisse das System stören können. Als Beispiel dafür wären die zwischen dem 4. und 6.12.2020 beobachteten Ausreißer zu nennen. An diesen Tagen wurden Niederschlagsmengen in der Höhe von bis zu 67 l/m² verzeichnet und die Abwassermengen hatten sich mehr als verdreifacht.

Abbildung 83: Vergleich der für die Region Innsbruck ermittelten „Anzahl an fiktiven Ausscheider“ mit der jeweiligen Anzahl an „aktiv Positiven“ im Zeitraum 1.6.–17.12.2020.

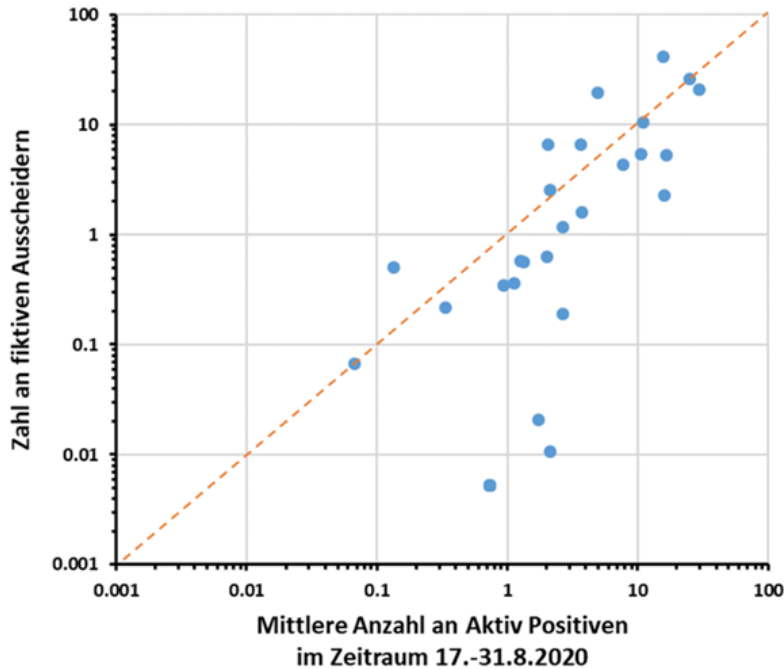
Kläranlage Innsbruck:

Innsbruck und 14 Umlandgemeinden
 174.000 Einwohner
 260.000 Einwohneräquivalente



Quelle: Medizinische Universität Innsbruck

Abbildung 84: Vergleich der „Anzahl an fiktiven Ausscheidern“ mit der mittleren Anzahl an „aktiv Positiven“ im Zeitraum 17.–31.8.2020 für die im Rahmen des tirolweiten Abwassermonitorings untersuchten Kläranlagen.



Quelle: Medizinische Universität Innsbruck

Auch bei dem am 24.8.2020 durchgeführten tirolweiten Monitoring scheinen die Kennzahlen miteinander zu korrelieren (Abbildung 84). Nichtsdestotrotz wurden bei einigen Kläranlagen größere Abweichungen beobachtet. Dazu gehören die Kläranlagen Fritzens (16 zu 41,8), Stubaital (2 zu 19,6), Schwaz (17 zu 9,2) und Strass (20 zu 11,0).

In der Region Stubaital wurde mithilfe des Abwassermonitorings am 24.8.2020 ein Cluster entdeckt. Die Detektion erfolgte noch ehe sich der Cluster in einem Anstieg der an das digitale Informationssystem Corona (ISCO) übermittelten Fälle manifestierte. Der Cluster umfasste rund 30 Personen, die sich zum Großteil im Rahmen einer privaten Feier mit etwa 200 Teilnehmer:innen in Seefeld angesteckt hatten.

Die Abwassermonitoringergebnisse der Regionen Schwaz und Strass lagen niedriger als die jeweiligen Fallzahlen. Eine mögliche Ursache dafür könnte an einer teilweisen Inhibition der RT-qPCR-Reaktion durch eine vergleichsweise hohe Schmutzlast liegen.

Eine plausible Erklärung für die Abweichungen der Kennzahlen in der Region Fritzens konnte nicht gefunden werden.

11.4.4 Überregionale Ergebnisdarstellung

Ein großer Vorteil der Verwendung eines aus der Virenfracht abgeleiteten Parameters ist die Möglichkeit des Zusammenfassens von Ergebnissen aus verschiedenen Regionen. Durch einfaches Addieren der in einzelnen Regionen beobachteten Mengen an fiktiven Ausscheidern lassen sich aussagekräftige Kenngrößen für Bezirke, Länder oder das gesamte Bundesgebiet ableiten.

11.4.5 Anwendung in Monitoringprogrammen

Das Konzept der „Fiktiven Ausscheider“ wurde erfolgreich bei den in Tirol und Salzburg etablierten Monitoringprogrammen verwendet, um tagesaktuelle Informationen zur Pandemielage in den 59 gemonitorten Regionen an die zuständigen Gesundheitsbehörden übermitteln zu können.

11.4.6 Zusammenfassung

Das Team der Medizinischen Universität Innsbruck hat das Konzept der „Fiktiven Ausscheider“ entwickelt. Diese Kenngröße leitet sich aus der Virenfracht ab. Ein „Fiktiver Ausscheider“ entspricht der Menge an Viren, die eine infizierte Person im Mittel pro Tag zur Gesamtmenge an Viren im Abwasser beiträgt. Der Umrechnungsfaktor wurde durch Korrelation von in 43 Kläranlagen gemessenen Virenfrachten und der dazugehörigen Anzahl an aktiv positiv getesteten Personen ermittelt. Die Anzahl der fiktiven Ausscheider dient somit der groben Abschätzung der aktuellen Prävalenzzahl in einer untersuchten Region.

Das Konzept der „Fiktiven Ausscheider“ hat folgende Stärken:

- Man arbeitet mit einer Kenngröße, deren Zahlenwert im Bereich der Anzahl der aktiv positiv getesteten Personen liegt. Das erleichtert die Lageeinschätzung und ermöglicht den direkten Vergleich mit anderen epidemiologischen Kenngrößen.
- Zeitliche Trends und regionale Unterschiede können sehr einfach abgeleitet werden.
- Regionale Daten können sehr einfach zusammengefasst werden. So können Informationen zu Entwicklungen auf Bezirks- und Länderebene generiert werden.

- Die Umrechnung kann zur Harmonisierung der von unterschiedlichen Laboren generierten Ergebnissen verwendet werden. Auch wenn aufgrund der Verwendung von unterschiedlichen Arbeitsabläufen Labore unterschiedliche Konzentrationswerte bestimmen, können diese durch Verwendung laborspezifischer Umrechnungsfaktoren auf gleich gebracht werden.

12 Anhang B – Factsheets

12.1 Factsheet 1 – Zweckmäßigkeit eines abwasserepidemiologischen Ansatzes

Argumente, um die Gesundheitsbehörden von der Zweckmäßigkeit des Abwassermonitorings zu überzeugen: Einsatzmöglichkeiten Abwassermonitoring auf SARS-CoV-2 für Gesundheitsbehörden – wo liegt die wirkliche Stärke des Abwassermonitorings, Für und Wider

Verfasser: Arbeitspaketleiter des Coron-A Projekts Dr. Hans-Peter Stüger (AGES) und Assoc. Prof. Dr. Herbert Oberacher (Medizinische Universität Innsbruck)

Um die Zweckmäßigkeit eines abwasserepidemiologischen Ansatzes (AEA) zur Pandemiebeobachtung bzw. -bekämpfung zu bewerten, ist es hilfreich auszuführen, welche Funktionen ein ausschließlich humanbasierter Ansatz (HBA) erfüllen kann, und welche Limitationen hier vorhanden sind. Unter humanbasiertem Ansatz werden hier alle Ergebnisse aus a) direkten COVID-Tests bei Menschen und b) Befragungen, wie sie im Zuge des Contact-Tracings durchgeführt werden, verstanden.

Zusammengefasst erfüllt der **HBA** folgende Funktionen, wobei zwischen individuenorientierten Aspekten einerseits und epidemiologisch orientierten Nutzungsformen andererseits unterschieden werden muss:

- **Individualdiagnostik:** ermöglicht Absonderung + Contact-Tracing + individuelle Mutations-/Variantenbestimmung
Limitationen: Bezüglich der diagnostischen Tests ist mittlerweile eine heterogene Situation zu Probenahmeverfahren und der analytischen Bestimmung zu verzeichnen.
- **Clusterabklärung und -aufklärung:** Durch eine Kombination von diagnostischen Tests und Befragungen können allfällige Infektionsketten beschrieben und analysiert werden.
- **Epidemiologische Analyse** von offiziellen Individualdaten: Wenn individuelle Testergebnisse in Datenbanken von Gesundheitsbehörden aufgenommen werden, dann

sind dadurch auch statistische Aussagen über Personenkollektive möglich. Darauf beruhen u. a. die bekannten Inzidenzauswertungen aber auch mittlerweile Übersichten zum Variantenspektrum des Virus. Diese kollektiv-orientierten Betrachtungen bilden dann die Basis für Risikomanagement-Maßnahmen.

Limitationen: Die epidemiologische Nutzung der individuellen Testdaten wird durch mehrere Aspekte eingeschränkt. Zum einen handelt es sich bei den getesteten Personen im Regelfall nicht um eine repräsentative Stichprobe der Population. Die Ergebnisse sind stark dadurch beeinflusst, welche Teststrategie gewählt wird: Fokus auf Verdachtsfälle, Massentests, zugelassene Testverfahren etc. Weil dadurch der stichprobenbasierte Blick auf den Pandemieverlauf verändert wird, spiegeln sie den Verlauf in der Population nicht mehr adäquat wider. Weiters haben analytische und behördliche Logistikabfolgen eine zeitliche Verzögerung zur Folge, bis Ergebnisse in offiziellen Datenbanken zur Verfügung stehen. Damit sind Indikatoren, die darauf beruhen, als nachhinkend zu betrachten.

- **Regionale Zuordnung und Eingrenzung:** Durch die Verwendung von Meldedaten können epidemiologische Aussagen auf regionaler Ebene (Bezirke, Gemeinden) getätigt werden. Weiters sind durch dezentrale Testmöglichkeiten regionale Schwerpunktsetzungen gegeben.
- **Mutationen/Varianten:** Durch diverse genomorientierte Verfahren lassen sich zusätzlich zum qualitativen Virennachweis auch spezifische Mutationen/Varianten nachweisen. Im Variantenbericht der AGES wird die Entwicklung dieses Variantenprofils beschrieben.

Grundlage des **abwasserepidemiologischen Ansatzes** zur Pandemiebeobachtung (**AEA**) ist die Bestimmung der Fracht an Viren im zu einer Abwasserreinigungsanlage (ARA) zulaufenden Abwasser. Die folgenden Punkte charakterisieren diesen Ansatz, zeigen die Nutzungsmöglichkeiten aber zum Teil auch die Limitationen auf.

- **Vollerhebung:** Hinsichtlich der ausscheidenden Bevölkerung handelt es sich im Wesentlichen um eine Vollerhebung und keine Stichprobenerhebung. Es werden alle Personen erfasst, die in das Abwassersystem dieser ARA ausscheiden (= Einzugsgebiet). Dies ist auch völlig unabhängig von der Teststrategie im Humanbereich. Dort betrachtet man gewissermaßen nur die Spitze des Eisbergs. Zudem handelt es sich hierbei um eine nicht-invasive Art der Probenerhebung, und es ist keine Zustimmung der Probanden erforderlich.
- **Epidemiologische Betrachtung:** Die Abwasserproben sind Sammelproben des Einzugsgebiets und erlauben daher keine Individualdiagnostik, sondern sind

epidemiologisch fokussiert. Die **Kosten** dieser Sammelprobe für ein Einzugsgebiet von z. B. 100.000 Einwohner:innen sind im Vergleich zu den Kosten von 100.000 Einzeltestungen **minimal**.

- **Stichprobe:** Da nur ein minimaler Teil des Abwassers untersucht werden kann, handelt es sich hinsichtlich des Abwasservolumens um eine Zufallsstichprobe. Bei einer mengenproportionalen 24h-Mischprobe ist diese als **repräsentativ** anzusehen. Zugleich geht damit eine Stichprobenvariabilität einher, die allerdings durch Messungen mit höherer zeitlicher Dichte reduziert werden kann.
- **Nachweisempfindlichkeit:** Jede:r Einwohner:in trägt zur Gesamtabwassermenge bei. Die Virenfracht stammt aber nur von einem Teil der Gesamtbevölkerung. Fremdwasser kann zu einer weiteren Verdünnung führen. Ergebnisse des Coron-A Projekts weisen darauf hin, dass **eine virenausscheidende Person in 10.000 Personen detektiert** werden kann.
- **Zeitnaher Indikator:** Das Abwassermessergebnis ist als **sehr zeitnah** anzusehen. Erfahrungen aus den Abwassermonitoringprogrammen der Bundesländer zeigen, dass selbst in einem Regelbetrieb die Auswertung von Abwasserproben innerhalb von 12 bis 48 Stunden erfolgen kann. Die Zeitspanne zwischen dem Ende der Probenahme und dem Vorliegen eines interpretierbaren Analyseergebnisses hängt letztlich von der Probenlogistik, der Analysendauer sowie der Datenlogistik ab.
- **Zeitlicher Vorsprung:** Das Sammeln der Mischproben erfolgt über einen Zeitraum von 24h. Das beprobte Abwasser braucht je nach Größe des Einzugsgebiets mehrere Stunden bis Tage um in die Kläranlage zu gelangen. Nichtsdestotrotz konnte sowohl international als auch national gezeigt werden, dass Abwasserdaten **einen zeitlichen Vorlauf von bis zu 7 Tagen gegenüber den Humandaten** aufweisen können. Dieser zeitliche Vorsprung gegenüber dem epidemiologischen Humanergebnis ist allerdings abhängig von der Probenlogistik, der Analysendauer sowie der Datenlogistik.
- **Abwasserbasierter COVID-Indikator:** Das Abwassermessergebnis liefert zum einen den **qualitativen** Nachweis, ob überhaupt Viren nachgewiesen werden können. Zum anderen lässt sich aber auch ein **quantitativer** Indikator ableiten, der in Relation zur Menge an Virenausscheidern des Einzugsgebiets steht. Der quantitative Ansatz wird z. B. im Rahmen des Tiroler und Salzburger Abwassermonitoringprogramms angewendet, um so etwas wie „Fallzahlen“ aus den Abwassermesswerten ableiten zu können. Damit steht eine Kenngröße zur Verfügung, mit der sich zeitliche und örtliche Trends ableiten lassen, und die aufgrund der direkten Vergleichbarkeit mit Prävalenzahlen auch Nichtexpert:innen eine schnelle Lageeinschätzung auf Basis der vorliegenden Monitoringergebnisse erlaubt.

- **Prognosefähigkeit:** Wenn bei einer ARA Messungen für einen längeren Zeitraum (mind. 23 Messzeitpunkte) vorliegen, lassen sich damit kurzfristige **Vorhersagen** tätigen. Mittels dieser Trendprognosen lässt sich abschätzen, ob ein abwasserbasierter Indikator gleichbleibt, steigt oder sinkt. In Phasen niedriger Inzidenz kann dies **als Frühwarn-Instrument für Inzidenzsteigerungen** dienen. In Phasen erhöhter Inzidenz kann dies aber auch Trendveränderungen zeigen. Schließlich lässt sich ein abwasserbasiertes Prognosesystem auch **als Entwarnungswerkzeug** nutzen. Die Voraussetzung für solche kurzfristigen Prognosen ist eine zeitlich enge Messdichte (mehrere Messungen pro Woche). Die Prognosen gelten in erster Linie für das Einzugsgebiet der spezifischen ARA. Gibt es mehrere Messpunkte in einem überregionalen Gebiet (Bezirk, Bundesland, Bundesgebiet) können die Einzeltrends auch zu Gesamttrendprognosen verdichtet werden.
- **Regionale Zuordnung und Eingrenzung:** Auch bei einem abwasserbasierten Monitoring sind regionale Zuordnungen möglich. Dies gilt grundsätzlich für das Einzugsgebiet der jeweiligen Abwasserreinigungsanlage. Darüber hinaus sind aber auch vorgelagerte Probenahmen in Kanalteilsträngen möglich, wie dies z. B. bereits in Wien, Innsbruck und Bregenz praktiziert wurde. Verdachtsorientierte Ad-hoc-Untersuchungen sind umsetzbar, erfordern aber eine logistische Flexibilität.
- **Mutationen/Varianten:** Die im Zuge der quantitativen RT-PCR gewonnene RNA lässt sich wie bei Humanproben auch zur Bestimmung von Virenmutationen/-varianten nutzen. Im Gegensatz zu einer Humanprobe ist allerdings bei der Sammelprobe aus dem Abwasser ein wesentlich heterogeneres Bild zu verzeichnen. Aufgrund dieser Variantenbandbreite ergibt sich hier eine nachweisthechnische Herausforderung. Umgekehrt kann man aber auch sagen, dass Variantennachweise aus dem Abwasser eine sehr klare epidemiologische Aussage über die ausscheidende Humanpopulation zulassen.
- **Geringes Datenvolumen:** Die Anzahl an Abwasserreinigungsanlagen ist relativ klein, insbesondere, wenn der Fokus auf größeren Anlagen liegt. Daraus ergibt sich im Vergleich zu den Humandaten ein sehr geringes Datenvolumen und in weiterer Folge ein geringer Datenmanagementaufwand. Zudem fallen keine personenbezogenen Daten an, was die Anforderungen an den Datenschutz wesentlich reduziert.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass Humantestungen und Abwasser CorMonitoring zwei sich ergänzende Instrumente der Pandemiebeobachtung und -bekämpfung sind. Die Individualdiagnostik ermöglicht eine Absonderung und Contact-Tracing. Das Abwassermonitoring dient primär einer kollektiv-orientierten Betrachtung. Es kann

einfach, schnell und zeitnah zeitliche Trends und regionale Unterschiede im Pandemiegeschehen abbilden.

Voraussetzungen für die Nutzung eines abwasserbasierten COVID-Monitoringsystems durch Gesundheitsbehörden zur epidemiologischen Einschätzung der Pandemieentwicklung sind:

- verteiltes Netzwerk an Messstellen bei den Abwasserreinigungsanlagen,
- zeitliche Dichte der Probenahmen, Messungen und des Datenreportings,
- harmonisierte Messverfahren.

Generell lassen sich folgende Nutzungsmöglichkeiten für das Pandemiemanagement erkennen:

- frühzeitiger verbesserter Dateninput für die Humanprognose-Modelle,
- frühzeitige Konzeption bzw. Umsetzung von diversen Managementmaßnahmen,
- vorbereitende Kommunikation von Entwicklungen,
- bei regional flächendeckendem Monitoring lassen sich verdachtsorientiert auch regionalspezifische Maßnahmen ableiten, wie z. B. lokale Testinitiativen, Einschränkungen oder Lockerungen,
- Entwarnfunktion.

Aufgrund der zunehmenden Kosten der Humantestungen bietet ein abwasserbasiertes Monitoring somit eine wesentlich kostengünstigere Alternative. Je breiter die regionale Verteilung bei den ARAs gewählt wird, desto besser lassen sich auch regional spezifische Maßnahmen ableiten.

12.2 Factsheet 2 – Kompakte Arbeitsanweisung für analysierende Labore (SOPs)

Verfasser: Arbeitspaketleiter des Coron-A Projekts – Univ. Prof. Dr. Heribert Insam (Universität Innsbruck) und Rudolf Markt, MSc (Universität Innsbruck)

Der molekularbiologische (PCR) Nachweis von SARS-CoV-2 aus Abwasser kann in vier Schritte unterteilt werden: Probenahme, Aufkonzentrierung, Extraktion des genetischen Materials und PCR-Nachweis. Parallel zum PCR-Nachweis müssen noch weitere Parameter des Abwassers (Nebenparameter) bestimmt werden.

- **Probenahme**
 - Unter Verwendung eines Mischprobenehmers zur durchflussproportionalen Probenahme, soll eine 24h-Mischprobe vom Zulauf der Kläranlage bezogen werden.
 - Die Probe ist bis zur weiteren Verarbeitung maximal für 7 Tage bei ca. 4 °C haltbar. Die Probe darf nicht eingefroren werden.
- **Aufkonzentrierung**
 - Die Aufkonzentrierung ist bei 4 °C durchzuführen.
 - Vor Beginn der Aufkonzentrierung muss zu einem gut gerührten Aliquot der Probe (40–70 ml) eine Prozesskontrolle zugegeben werden. Die Prozesskontrolle ist dabei als Virus- oder virusähnlicher Surrogat-Partikel zu wählen.
 - Entfernung von Grobpartikeln und störender Biomasse durch Zentrifugation bei 4500 g für 30 Min. Der klare Überstand wird für die weitere Aufkonzentrierung herangezogen.
 - Den klaren Überstand (ca. 40–60 ml) mit 10 m/v % mit Polyethylenglycol (PEG 8000) und 0.9 m/v % Natriumchlorid versetzen. Beide Substanzen mit Hilfe von mehrmaligem Invertieren oder unter Zuhilfenahme eines Rollenmischers vollständig lösen. Im Anschluss die Probe bei 12.000 g für 100 Minuten zentrifugieren. Virusfragmente lagern sich nun als Pellet ab.
 - Den Überstand vollständig entfernen und das Pellet in weniger als 1 ml Lysepuffer lösen und damit stabilisieren. Das somit gewonnene Konzentrat kann nun equivalent zu einem Individualtest (z. B. Rachenabstrich) mittels PCR analysiert werden.

- **Extraktion des genetischen Materials**

- Das Konzentrat sofort oder nach Lagerung bei 4° C innerhalb 24 h weiterverarbeiten. Dazu entsprechend den Vorgaben der Hersteller der Extraktionskits vorgehen. Es eignen sich nur Extraktionskits, welche die Darstellung eines ausreichend reinen und von PCR-Inhibitoren freien genetischen Materials ermöglichen. Dies ist nicht immer durch Extraktionskits, die in der Humanmedizin eingesetzt werden zu erreichen, da das Abwasser eine besondere Matrix darstellt, aus der genetisches Material extrahiert werden soll.
- Das genetische Material in einem finalen Volumen von 40–100 µl eluieren. Im Eluat ist eine Aufkonzentrierung von 400–1.600 x anzustreben.

- **PCR-Nachweis von SARS-CoV-2 und Prozesskontrolle**

- Mittels RT-PCR (z. B. RT-qPCR oder RT-dPCR) die Viruslast im Eluat quantitativ bestimmen. Für SARS-CoV-2 eignet sich hierbei die Region des N-Gens.
- Zur Qualitätsicherung abseits der Prozesskontrolle sind sowohl mehrere Positivkontrollen in mindestens vier Konzentrationsstufen als auch Negativkontrollen durchzuführen. Weiters sollen die Labore regelmäßig an nationalen oder international organisierten Ringversuchen teilnehmen.
- Für den PCR-Nachweis sind die Qualitätsstandards laut Empfehlung (EU) 2021/472 einzuhalten.

Zusammenfassung und Ansprüche an die Methodik

Der quantitative Nachweis von SARS-CoV-2 aus Abwasser ist ein vierstufiges Analyseverfahren (Probenahme, Aufkonzentrierung, Extraktion des genetischen Materials und PCR-Nachweis). Die Proben sollten möglichst durchflussproportionale 24h-Mischproben des Kläranlagenzulaufes sein. Für einen ausreichend guten Nachweis sollen die Proben 400- bis 1.600-fach aufkonzentriert werden. Die Extraktion des genetischen Konzentrates soll auch aus der schwierigen Matrix einer Abwasserprobe ausreichend reine RNA zur Verfügung stellen. Der RT-PCR Nachweis sollte den EU 2021/472 Qualitätsanforderungen entsprechen. Die Analysen sollen quantitative Daten zur SARS-CoV-2 Last im Abwasser von mindestens 10–50 Genkopien pro ml Abwasser erreichen. Damit kann ein Monitoring der Pandemie bei einer 7-Tage-Inzidenz von mindestens ca. 5–10 Infizierten pro 100.000 erreicht werden.

Zu beachten: Unter Berücksichtigung des Anhangs der Empfehlung (EU) 2021/472 und unter Angabe von Qualitätskriterien und Verfahrenskenndaten!

12.3 Factsheet 3 – Mindestanforderung für Labore

Welche Mindestanforderungen sind an analysierende Labore zu stellen (Qualitätsanforderungen)?

Verfasser: Arbeitspaketleiter des Coron-A Projekts Univ. Prof. Dr. Heribert Insam (Universität Innsbruck) und Assoc. Prof. DI Dr. Norbert Kreuzinger (TU Wien)

Die in weiterer Folge ausgeführten **Rahmenüberlegungen** basieren auf folgenden Annahmen **zur Probenanzahl** (keine Vorschlagsliste; Überlegung dient nur der Abschätzung der Anzahl der Anlagen!):

- 9 Landeshauptstädte (im Coron-A Projekt: n=9)
- Alle Anlagen > 100.000 tatsächlich angeschlossene Einwohner:innen (im Coron-A Projekt: n=7)
- Alle Anlagen > 50.000 aber < 100.000 tatsächlich angeschlossene Einwohner:innen (im Coron-A Projekt: n=15)
- Inkl. 1. Landeshauptstädte & 2. Anlagen > 100.000 angeschlossene Einwohner:innen (im Coron-A Projekt: n=23)
- 4,5 Mio. effektiv angeschlossene Einwohner:innen
- Alle Anlagen > 100.000 EW Ausbaugröße (im Coron-A Projekt: n=34) (siehe Tabelle unten) zuzüglich Eisenstadt und Bregenz (im Coron-A Projekt: n=36)
- 5 Mio. effektiv angeschlossene Einwohner:innen
- Spezielle „Points of Interest“ (z. B. Flughafen Wien)
- Bundesländer: Erfasser von Daten:

Burgenland	Abwasserband Bezirk Jennersdorf	Oberösterreich Linz Service GmbH für Infrastruktur und Kommunale Dienste
Burgenland	Wasserverband Wulkatal	Oberösterreich Abwasserband Weiser Heide
Kärnten	Landeshauptstadt Klagenfurt	Oberösterreich Reinhaltungsverband Steyr und Umgebung
Kärnten	Magistrat Villach	Oberösterreich Reinhaltungsverband Traunsee-Nord
Kärnten	Wasserverband Millstättersee	Salzburg Reinhaltungsverband Großraum Salzburg Stadt u.Umland
Kärnten	Reinhalteverband Mittleres Lavanttal	Salzburg Reinhaltungsverband Salzach-Pongau
Niederösterreich	Abwasserband Schwechat	Salzburg Reinhaltungsverband Salzburger Ennstal
Niederösterreich	Abwasserband An der Traisen	Steiermark Stadt Graz
Niederösterreich	Abwasserband Wr. Neustadt-Süd	Steiermark Abwasserband Grazerfeld
Niederösterreich	Gemeindeabwasserband Krems an der Donau	Tirol Innsbrucker Kommunalbetriebe AG
Niederösterreich	Gemeindeabwasserband Amstetten	Tirol Abwasserband Achenal-Inntal-Zillertal
Niederösterreich	Stadtgemeinde Groß-Enzersdorf	Tirol Abwasserband Hall in Tirol - Fritzens
Niederösterreich	Abwasserband Bruck a d Leitha - Neusiedl a See	Vorarlberg Abwasserband Region Feldkirch
Niederösterreich	Stadtgemeinde Mödling	Vorarlberg Wasserverband Hofsteig
Niederösterreich	Abwasserband Oberes Piestingtal	Vorarlberg Wasserverband Region Hohenems
Niederösterreich	Gemeindeverband Abwasserbeseitigung Raum Bad Vöslau	Vorarlberg Abwasserreinigungs- Gesellschaft mbH Dornbirn-Schwarzach
		Vorarlberg Abwasserband Region Bludenz
		Wien ebswien hauptkläranlage Ges.m.b.H.

Aus diesen Rahmenüberlegungen ergeben sich zwischen 30 und 40 Anlagen mit etwa 4,5–5 Millionen effektiv angeschlossenen Einwohner:innen.

Unter der Annahme einer 3x pro Woche durchgeführten Beprobung ergeben sich bis zu **120 Proben pro Woche**. Unter der Annahme einer 5-Tage-Woche resultieren daraus etwa 30 Proben pro Tag bei einer überlappenden Probenahme (z. B. So; Di; Do & Mo; Mi; Fr.) bzw. 40 Proben pro Tag bei gleichzeitiger Untersuchung aller Anlagen. Um etwaige Wiederholungen bzw. nicht zum vereinbarten Zeitpunkt übermittelte Proben zu berücksichtigen, wäre von einer **Tageskapazität von 50 Proben** auszugehen. Die Kapazität betrifft Probenaufbereitung, RNA-Extraktion und Quantifizierung.

Generelle Anforderungen zur notwendigen Sensitivität über den gesamten Workflow

Die Untersuchung des Kläranlagenzulaufs auf SARS-CoV-2 setzt sich zusammen aus einer Reduktion des Probenvolumens zur weiteren Verarbeitung der Virenpartikel („Anreicherungsschritt“ über das PEG-Konzentrationsverfahren oder weiterentwickelter Methoden), der RNA-Extraktion des viralen Erbguts sowie der Quantifizierung. Für die Quantifizierung über RT-qPCR ist durch entsprechende QA-Maßnahmen (Ringtests, Standards, Positivkontrollen etc.) ein Rahmen zu definieren, wobei CT=39 als Abbruchkriterium festzulegen ist.

Die Effizienz der Anreicherung sowie Extraktion sind zentrale Voraussetzungen für die PCR (& Sequenzierung) und nur schwer quantifizierbar, zumal es hierfür noch keine allgemein anerkannten Standards gibt. Eine alleinige Definition einer Sensitivität der PCR (z. B. als Kopien pro mL) ist keinesfalls ausreichend, da bei einer „wahren“ Abundanz von z. B. 1.000 Kopien/mL und einer Extraktionseffizienz von 10 % sowie 100 % PCR-Effizienz im Endergebnis 100 Kopien/mL erhalten sind, was jedoch auch das Ergebnis einer Extraktionseffizienz von 50 % und einer „wahren“ Abundanz von 200 Kopien/mL darstellen kann, was sich auf die Sensitivität des gesamten Workflows auswirkt.

Bei Anlagen > 50.000 angeschlossene Einwohner:innen (E) sollen auch bei einer 7-Tage-Inzidenz von 5 die Signale noch quantifizierbar sein. Qualitative Signale (ja/nein) sollen auch noch bei Inzidenzen im Bereich darunter messbar sein. Dies gilt auf Basis der Projektergebnisse auch für Anlagen ab 10.000 E. Bei kleineren Anlagen kann es aufgrund der Rahmenbedingungen (Tagesgang Abwasseranfall, Probeninhomogenität und Fluktuationen) zu geringeren Sensitivitäten kommen. Die auch international kolportierte Sensitivität eines Nachweises von 1 Ausscheider auf 10.000 Einwohner:innen stellt eine

gesichert einhaltbare Größe dar. Die Angabe der Sensitivität über eine 7 bzw 14-Tages-Inzidenz ist ebenfalls nicht eindeutig, da sich die für die einzelnen Anlagengrößen erhobenen Inzidenzen auf die Hochrechnung auf 100.000 Personen auswirkt. Ein Infizierter in einer 10.000 E Anlage entspricht einer Inzidenz von 10 pro 100.000 Personen; ein Infizierter in einer 100.000 E Anlage einer Inzidenz von 1. Wird nun die Sensitivität über die Inzidenzen definiert, ergeben sich für die unterschiedlichen Kläranlagengrößen unterschiedliche Richtwerte.

Durch die Auswahl von Anlagen im oben beschriebenen Bereich relativiert sich jedoch die Problematik und es wird (auch aus pragmatischen Gründen) der **Nachweis eines quantitativen Signals (> LOQ) ab einer 7-Tage-Inzidenz von 10 über den gesamten Workflow** gefordert. Wird etwa bei der Aufarbeitung eines bestimmten Probevolumens trotz darüber liegender Inzidenzen kein Signal in der PCR erhalten, so muss die verarbeitete Probenmenge bzw. der Workflow der Probenaufarbeitung dahingehend angepasst werden, dass die Konzentration des genetischen Material als Ausgangsprodukt für die PCR erhöht wird.

Bei der Extraktion ist darauf Bedacht zu nehmen, dass die aus den jeweiligen Proben extrahierte RNA für

- die quantitative PCR (RT-qPCR),
- die Bestimmung von 2 Schlüsselmutationen und
- Ganzgenomsequenzierung

in ausreichender Quantität und Qualität bereitgestellt werden muss. Zudem sollte auch ein **Aliquot von etwa 30 % jeder RNA-Extraktion als Rückstellprobe** für drei Monate auf geeignete Art und Weise aufbewahrt werden. Während die **RT-qPCR von jeder Probe** durchzuführen ist, soll die Bestimmung von **Schlüsselmutationen mittels PCR an einer** sowie die **Ganzgenomsequenzierung von je zwei Proben pro Woche** erfolgen.

Die quantitative Analytik hat mittels RT-qPCR oder dPCR zu erfolgen. Um sicherzustellen, dass die Spezifität des verwendeten PCR-Systems (bestehend aus Primern und anderen Sonden – z. B. TaqMan Probe) in Hinblick auf die hohe Mutagenität des SARS-CoV-2 gegeben ist, ist zu Beginn sowie nach jeweils 6 Monaten ein **Nachweis der Spezifität des verwendeten Quantifizierungssystems zu erbringen**. Diese Spezifität kann bei kommerziellen Systemen entweder über eine Bestätigung des Herstellers erfolgen oder

mittels Abgleich der Sequenzen (Primer 6 Probe) mit aktuellen Sequenzdatenbanken oder anderer geeigneter Methoden. Dies gilt für qPCR und dPCR.

Für die **Quantifizierung sind vorzugsweise Referenzstandards** einzusetzen oder es ist die Gleichwertigkeit der eingesetzten Standards sicherzustellen und zu dokumentieren. Kommt ein dPCR-System zum Einsatz, so kann dieser Punkt entfallen.

Hinweis: Die üblichen Sensitivitäten bei Ct < 39 und Extraktionseffizienzen (Anreicherung & RNA-Aufreinigung) im Bereich von 20 % liegen im Bereich einer LOQ von 10–20 Kopien pro mL bzw. einer LOD von 0,5–1,0 Kopien pro mL. Die Gesamteffizienz des Workflows sollte jedenfalls (heruntergebrochen auf die Schritte: Aufkonzentration; Extraktion und PCR) regelmäßig und bei unterschiedlichen anzunehmenden Abundanzen (vgl. 7-Tage-Inzidenzen) evaluiert werden.

Anforderungen für die Variantenbestimmung

Die aus dem für die Quantifizierung durchgeführten Workflow resultierende RNA-Anreicherung muss auch für die Variantenbestimmung geeignet sein. Ein eventueller Transport der RNA-Extrakte für die Variantenbestimmung hat auf eine Art zu erfolgen, die einen Abbau des Materials während des Transports verhindert. Die Proben sind im Rahmen der Möglichkeiten tagesaktuell der Variantenbestimmung zuzuführen.

Bestimmung von Schlüsselmutationen mittels PCR

Eine Probe pro Woche sollte für Hinweise auf das Vorhandensein von VOC auch einer Bestimmung von Schlüsselmutationen mittels PCR zugeführt werden, da dies raschere Ergebnisse liefert, als die Ganzgenomsequenzierung.

Die ausgewählten Schlüsselmutationen sollen sich nach jenen Kriterien orientieren, die zum jeweiligen Zeitpunkt auch für die Untersuchung der Humanproben zum Einsatz kommen.

Ganzgenomsequenzierung

Zwei Proben je Kläranlage und Woche sollten zur Absicherung des Auftretens von VOC sowie Hinweisen auf bis dato nicht im Fokus liegender Varianten einer Ganzgenom-

sequenzierung zugeführt werden, um einen Informationsverlust durch technischen Ausfall einer Probe zu verhindern bzw. zu kompensieren.

Die Coron-A Ergebnisse zeigen, dass bei CT-Werten bis 32 gute Voraussetzungen für die Sequenzierung gegeben sind. Daneben ist jedoch die Co-Extraktion potentieller Inhibitoren ausschlaggebend, sodass der CT-Wert alleine nicht als Qualitätskriterium ausreicht und eventuelle weitere Aufreinigungsschritte für die RNA notwendig sind. Die Quote erfolgreicher Sequenzierungen bei $CT \leq 32$ sollte höher als 80 % liegen. Aus der Erfahrung des Projekts werden auch bei höheren CT-Werten noch erfolgreiche Sequenzierungen durchgeführt, die jedoch oft keine vollständige Erfassung der Varianten erlauben, weil nicht das gesamte Genom sequenziert werden konnte.

Sicherheitsanforderungen

Das technische Prozedere und die Geräteausstattung des Analyselabors haben dem aktuellen wissenschaftlichen und technischen Stand und deren Verfahren zu entsprechen.

Für die Arbeiten darf nur nachweislich geeignetes Personal eingesetzt werden, die Einhaltung aller einschlägigen Protokolle ist zwingend erforderlich. Ersthandhabung von Proben wird in einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank oder in geschlossenen Apparaturen durchgeführt. Da keinerlei Arbeiten mit Virusvermehrung erfolgen und ausschließlich in geschlossenen Systemen gearbeitet wird, kann in geringerer Sicherheitsstufe als 2 gearbeitet werden. Es müssen geeignete Desinfektionsmittel eingesetzt werden, welche erwiesenermaßen gegen im Abwasser existierende pathogenen Mikroorganismen wirksam sind.

Anforderungen an Zertifizierungen

Abseits der üblichen Vorgaben für die Zulassung von mikrobiologischen und molekularbiologischen Laboren werden keine Zusatzanforderungen gestellt. Eine Implementierung von Guter Laborpraxis (GLP), Arbeitnehmerschutz sowie Sicherheitspläne für den Umgang mit infektiösem Material (Allgemeine Anforderungen für den Umgang mit Abwasser) werden vorausgesetzt.

Datenerfassung und Messwertnormierung

Die Messwerte (Genkopien pro mL Abwasser) sind per se unzureichend für sichere Prognosen. Daher obliegt es dem Auftragnehmer, notwendige Nebenparameter zu erfassen, die nicht nur für Normierungen (Virenlast pro Kopf und Tag), sondern auch für Plausibilitätsprüfungen notwendig sind (Abwasserfracht, Abwassertemperatur, Ammonium, Gesamtstickstoff und CSB). Die Nebenparameter können auch von den beteiligten Kläranlagen geliefert werden und müssen dann vom Auftragnehmer eingefordert werden.

Datenübermittlung

Messdaten sind in ein vorgegebenes EXCEL-Sheet einzutragen, das unmittelbar nach der erfolgten Messung auf eine vom Auftraggeber vorgegebene Datenbank hochzuladen ist. Die eingegebenen Daten werden dann vom System plausibilisiert und sofort in die Datenbank integriert. Alternativ können einzelne Messungen über ein Online-Formular eingetragen werden.

12.4 Factsheet 4 – Probenlogistik

Empfehlungen zur Probenlogistik: Welche Vorschläge gibt es, welche Vor- und Nachteile haben sie?

Verfasser: Arbeitspaketleiter des Coron-A Projekts Univ. Prof. Dr. Heribert Insam (Universität Innsbruck) und Assoc. Prof. Dr. Norbert Kreuzinget (TU Wien) und Assoc. Prof. Dr. Herbert Oberacher (Medizinische Universität Innsbruck)

Um den Monitoringansatz als Frühwarnsystem zu verwenden sollten Abwasserproben möglichst zeitnah analysiert werden. Idealerweise sollte das Ergebnis innerhalb von 48 Stunden bzw. spätestens am Beginn des dritten Arbeitstages nach erfolgter Probenahme an den jeweiligen Auftraggeber übermittelt werden.

Gesamtanalysendauer

Die Gesamtanalysendauer setzt sich aus vier Komponenten zusammen:

- Transport,
- Laboranalyse,
- Probenverwaltung,
- Datenauswertung und -übermittlung.

Je besser der Transport organisiert ist und je schneller die Proben im Labor sind, umso leichter kann auch bei einer entsprechend großen Probenanzahl die 48-Stunden-Frist eingehalten werden.

Transport von Proben

Für den Transport von Proben wurden folgende zwei Varianten erprobt: Transport durch die Post bzw. Paketdienstleistungsunternehmen und Transport durch einen Botendienst.

Variante 1: Transport durch die Post bzw. Paketdienstleistungsunternehmen

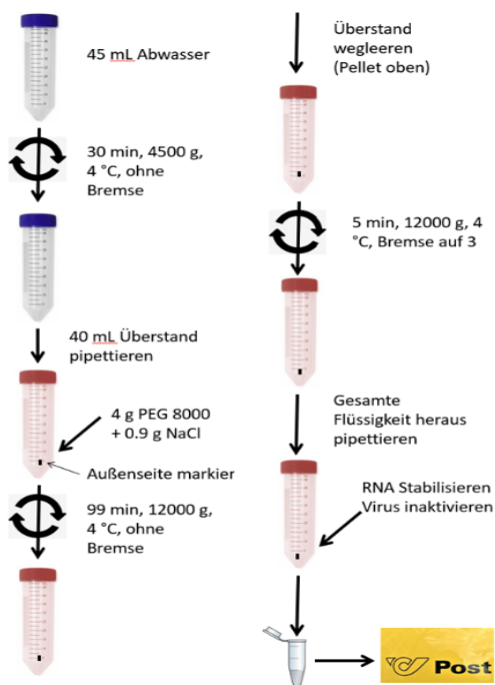
Abwasserproben können auch als Sammelpaket mittels Post oder Paketdienstleistungsunternehmen ins Labor verschickt werden. Die Sammlung der Proben aus den Kläranlagen

erfolgt morgens, und nach der Aufkonzentration der Proben und deren Stabilisierung werden die Eppendorf-Probenröhrchen mit Medlog über Nacht in tiefgekühltem Zustand verschickt. Am nächsten Tag können RNA-Extraktion und qPCR vorgenommen werden.

Für den Transport der Probengefäße werden isolierte Kühlboxen verwendet. Die Kühlung erfolgt mittels Kühlakkus, die an den Kläranlagenstandorten gelagert werden und täglich ausgetauscht und aufgeladen werden. So soll sichergestellt werden, dass die Kühlkette nicht unterbrochen wird.

Nachteile dieser Vorgehensweise sind zum einen der Zeitverlust von mindestens einem Arbeitstag und der hohe organisatorische Aufwand sowohl für die betroffenen Kläranlagenbetreibenden als auch das Analysenlabor.

Abbildung 85: Prozessablauf von der Probennahme über die Probenaufbereitung, dem Versand, der Extraktion und Analytik.

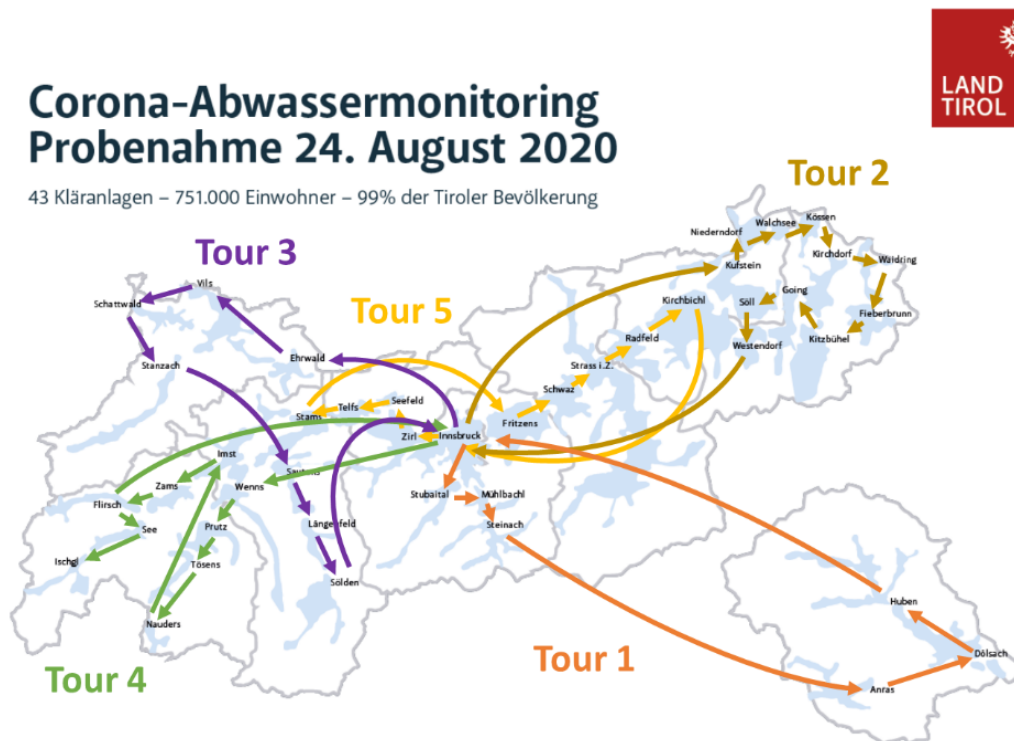


Quelle: Universität Innsbruck

Variante 2: Transport durch Botendienst

Durch den Transport durch den Botendienst gelangen alle Proben verlässlich noch am selben Tag des Abschlusses der Probennahme ins Labor. Spätestens am darauffolgenden Arbeitstag können damit von allen Proben die Analysenergebnisse vorliegen.

Abbildung 86: Beispiel der Organisation des Transportes von Abwasserproben mittels Botendienst im Rahmen einer tirolweiten Pilotstudie zum Analyzelabor nach Innsbruck.



Quelle: Medizinische Universität Innsbruck und Land Tirol

Versandeinheit

Eine Versandeinheit besteht beispielsweise aus:

- 500 mL HDPP vorbeschriftetes Probengebinde mit Möglichkeit der Ergänzung der Metadaten (Q, TN, etc.)
- Kühlakkus, die vor Ort bis zum Versand bei -20 °C gelagert werden. Die Anzahl bzw. die Kapazität der Kühlakkus wurde im Vorfeld über die Größe und Kühlkapazität der umhüllenden Styroporbox sowie Transportdauer (4 Tage) und Umgebungstemperatur

(30 °C) mittels vom Hersteller bereitgestelltem Online-Rechner erhoben. Die entsprechende Menge an Kühlakkus wurde der Verpackung beigelegt.

- Transportbox aus Styropor. Die Größe der Styroporbox wurde entsprechend der minimal notwendigen Größe zur Aufnahme des Probengefäßes und der Kühlakkus gewählt.
- Die umhüllende Kartonbox wurde über einen Onlineanbieter exakt für die Dimension der Styroporbox angefertigt und mit dem Absender sowie der Empfängeradresse vorbeschriftet, um den Aufwand der Kläranlagenbetreibenden zu minimieren.
- Beispiel: siehe Abbildung 87.

Abbildung 87: Vorbereitete, den Kläranlagen in Oberösterreich und Burgenland sowie St. Pölten zur Verfügung gestellte Versandeinheit mit Gebinde, Kühlakkus, Styroporbox und Überkarton mit Empfänger und Absender (einige Kühlakkus wurden für das Foto entfernt).



© TU Wien/Norbert Kreuzinger

Die Anzahl der im Rahmen des Projekts angeschafften Versandeinheiten orientiert sich nach der Anzahl der zu Beginn geplanten zu untersuchenden Kläranlagen sowie einem Bereitstellungszeitraum von zwei Monaten bei 14-tägiger Beprobung. Alle Einheiten der

Versandeinheit sind wiederverwendbar und wurden über mehr als ein Jahr wiederholt eingesetzt.

Beispielweise wurde erprobt, dass der Versand der jeweiligen „Donnerstagsprobe“ seitens der Kläranlagen üblicher Weise am Freitag erfolgt, wodurch die Proben am Montag Vormittag im Labor eintrafen und entweder noch am Montag oder am Dienstag in der Früh aufgearbeitet wurden.

12.5 Factsheet 5 – Abwassermarker

Welche Abwassermarker sollten in einem künftigen Routinemonitoring zwingend, welche optional miterfasst werden?

Verfasser: Arbeitspaketleiter des Coron-A Projekts Assoc. Prof. Dr. Herbert Oberacher (Medizinische Universität Innsbruck)

Aufgrund der naturgemäß hohen quantitativen und qualitativen Dynamik (Abwasseranfall, Zusammensetzung) infolge einer unterschiedlichen Zahl von Ausscheidern, Verdünnungen auf Grund von Mischwasserereignissen sowie Schwankungen des Abwasseranfalls in unterschiedlicher Periodizität (jahreszeitlich; saisonal, Wochentage), kommt es zu potentiell unterschiedlichen Verdünnungen des SARS-CoV-2 Signals im Zulauf der Kläranlage. Dadurch können auf die gemessenen Konzentrationen (#/mL) basierende Auswertungen an unterschiedlichen Analysentagen durch den qualitativen und quantitativen Abwasseranfall beeinträchtigt werden und somit etwa beobachtete Trends verfälscht werden. Um diese Problematik zumindest ansatzweise zu kompensieren, hat sich international eine „Normierung“ der SARS-Abundanzen mittels unterschiedlicher Parameter durchgesetzt. Dabei kommen unterschiedliche Marker zum Einsatz, deren Messwert natürlich für die jeweilige Probe bekannt sein muss.

Es gibt mehrere Ansätze die qualitative und quantitative Dynamik zu erfassen, zur Bestimmung der tatsächlich eintragenden Einwohnerzahl:

- die Ableitung aus routinemäßig erfassten abwasserchemischen Parametern,
- die Verwendung von im Abwasser bestimmbar chemischen Anthropogenmarkern,
- die Verwendung mikrobieller humaner Fäkalmarker.

Routinemäßig erfasste abwasserchemische Parameter

Aus den hydrochemischen Parametern können Einwohnerwerte (EW) berechnet werden. Der EW gibt das Einwohneräquivalent der Tagesschmutzfracht wieder und beruht auf der Berechnung auf Basis von Einwohnergleichwerten (EGW). Aus langjährigen empirischen Erfahrungen abgeleitet, trägt eine Person 60 g/Tag zum BSB, 120 g/Tag zum CSB, 8 g/Tag zum $\text{NH}_4\text{-N}$, 11 g/Tag zum N_{ges} und 1,8 g/Tag zum P_{ges} in das Abwasser ein, die dementsprechend als EGW_{60} , EGW_{120} , EGW_8 bzw. EGW_{11} bezeichnet werden. Die Umrechnung der

auf den Kläranlagen für diese Parameter ermittelten Tagesfrachten mittels EGW-Parameter ergibt die korrespondierenden EW-Parameter.

All diese Parameter weisen Vor- und Nachteile auf:

- EW_{120} und EW_{60}
In den meisten Kläranlagen sind die aus den organischen Parametern CSB und BSB abgeleitete EW höher als die aus den Melderegistern abgeleiteten Einwohnerzahlen. In Kläranlagen mit einem entsprechend hohen Anteil an Schmutzfracht aus Gewerbe, Industrie und Landwirtschaft können die Einwohnerzahl somit in einem weit höheren und damit unzulässigen Ausmaß überschätzt werden.
- EW_{11} und EW_8
Im Gegensatz zu den organischen Parametern, erfolgt der Stickstoffeintrag auf Kläranlagen primär über menschliche und tierische Ausscheidungen, sodass sich die Stickstoffparameter grundsätzlich besser für die Normierung auf menschliche Ausscheider eignen als die Summenparameter für Kohlenstoff. Einschränkungen bestehen für spezifische Fälle mit signifikant hohen andersartigen Einträgen z. B. aus der Sickerwasserbehandlung, stickstoffumsetzender Industrie oder Tierhaltung. Derart geprägte Anlagen stellen jedoch eher die Ausnahme dar. Der Unterschied zwischen Gesamtstickstoff und Ammonium liegt im Hydrolysegrad der organischen stickstoffhaltigen Verbindungen im Abwasser, der wesentlich von der Aufenthaltszeit und den Redoxbedingungen im Kanal abhängt, sodass das Verhältnis zwischen EW_{11} und EW_8 real und kläranlagenspezifisch vom rechnerischen Faktor von $1,375 \text{ g TN/NH}_4\text{-N}$ (EW_{11}/EW_8) abweicht. Der Gesamtstickstoff stellt dabei den „robusteren“ Parameter dar, da er sowohl die hydrolysierten als auch die nicht hydrolysierten Komponenten umfasst. Zudem kann er aus derselben homogenisierten Teilprobe ermittelt werden wie der CSB, wogegen eine Ammoniumbestimmung einen zusätzlichen Filtrations-schritt verlangt.
- $EW_{1,8}$
Der Gesamtphosphor eignet sich grundsätzlich ebenfalls zur Normierung der Abwasserparameter, wird jedoch international nicht eingesetzt, da er in deutlich niedrigeren Konzentrationen als der Stickstoff vorliegt und meist in den Zuläufen nicht routinemäßig gemessen wird.

Chemische Anthropogenmarker

Wie im Coron-A Bericht ausführlich dargestellt, eignen sich primär die beiden Parameter Cotinin (Abbauprodukt des Nikotins) und Koffein als chemische Marker, deren Frachten potentiell zur Ermittlung von effektiven Einwohnerwerten herangezogen werden können. Cotinin und Koffein sind in so hohen Konzentrationen im zulaufenden Abwasser enthalten, dass die quantitative Analyse mit nur minimaler Probenvorbereitung erfolgen kann. Die aus den Koffein- und Cotinifrachten berechneten Einwohnerwerte korrelieren sehr gut mit den aus den EW₁₂₀-basierten Einwohnerwerten und damit auch mit den Einwohnerzahlen. Die Abweichungen der verschiedenen Einwohnerwerte sind in der Regel kleiner als 25 %.

Mikrobielle humane Fäkalmarker

Für die Normierung des SARS-CoV-2 Signals im Zulauf von Kläranlagen werden auch häufig human ausgeschiedene mikrobielle Fäkalmarker verwendet. Dabei kommen zwei unterschiedliche Parameter zum Tragen:

- **Pepper mild mottle virus (PMMoV)**
PMMoV ist ein RNA-Virus (wie SARS-CoV-2), der den häufigsten RNA-Virus im menschlichen Stuhl darstellt, während er nur selten aus tierischen Ausscheidungen stammt. Wegen seiner hohen Stabilität im Abwasser und seinem globalen Auftreten, wurde er bereits vor SARS-CoV-2 als humaner Tracer verwendet. Die Konzentrationen im Abwasser liegen im Bereich von 10^8 bis 10^{10} Kopien pro mL. Die in Fäkalien auftretenden Konzentrationen liegen im Bereich von 10^5 bis 10^{10} Kopien pro Gramm Trockengewicht an Fäkalien und damit in einem stark schwankenden Bereich, was die Nutzung für eine Normierung stark einschränkt.
- **CrAssphage (cross-assembly phage)**
Es handelt sich hierbei um einen Bakteriophagen in den Fäkalien von Menschen, der erst vor kurzer Zeit „entdeckt“ wurde. Für diesen Marker gelten dieselben Überlegungen wie für PMMoV, zumal auch hier die Schwankungen im Zulauf einer Kläranlage zwischen 10^8 und 10^{12} Kopien pro mL schwanken.

Die Konzentration beider Viren schwankt somit stärker als die traditionellen Abwasserparameter bzw. die Zulaufmenge einer Kläranlage, weshalb sie zwar interessant für eine wissenschaftliche Untersuchung sind, für eine Normierung jedoch nur bedingt geeignet sind.

Zusammenfassung

Da es den „perfekten“ Parameter zur Normierung des SARS-CoV-2 Signals im Abwasser zur Kompensation der intrinsischen Fluktuationen im Zulauf von Kläranlagen nicht gibt, wird ein pragmatischer Ansatz vorgeschlagen, der sich an einfach und allgemein verfügbaren Parametern orientiert, die im Rahmen eines Routinemonitorings erhoben werden sollten und auch routinemäßig als Basismetadatensatz im Coron-A Projekt erhoben wurden:

- Q-Zulauf:
als Basis für Frachtberechnungen und zur Abschätzung des Mischwasseranfalls,
- Zulauftemperatur:
als Basis für temperaturabhängige Zerfallsraten des SARS-CoV-2 Virus im Abwasser,
- CSB:
als Basis für eine Normierung und weil leicht verfügbar,
- Ges-N:
als prioritärer Parameter für die Normierung,
- NH₄-N:
als Basis für eine Normierung und weil leicht verfügbar,
- Absetzbare Stoffe:
Da SARS-CoV-2 auch partikelassoziiert auftritt, kann auf Basis zukünftiger Modelle auch retrospektiv eventuell eine Gesamtfracht besser abgeschätzt werden.

Es steht zu befürchten, dass weitere, „optionale“ Abwassermarker nicht vollumfänglich zur Verfügung stehen werden und dadurch auch keinen gesteigerten Mehrwert bewirken können.

12.6 Factsheet 6 – Handout Kläranlagenbetreibende

Künftiges Handout an Kläranlagenbetreibende: Welche Vorgaben müssen bei einem Routinemonitoring an teilnehmende Kläranlagen bzgl. Probenahme, -aufbereitung und -konservierung kommuniziert werden?

Verfasser: Arbeitspaketleiter des Coron-A Projekts Assoc. Prof. Dr. Norbert Kreuzinger (TU Wien), Univ. Prof. Dr. Heribert Insam (Universität Innsbruck) und Assoc. Prof. Dr. Herbert Oberacher (Medizinische Universität Innsbruck)

Die seitens der Kläranlagen zu beachtenden Vorgaben orientieren sich an den Vorgaben der Eigenüberwachung lt. 1. AEV für kommunales Abwasser bzw. der Methodenverordnung Wasser. Zudem werden alle wesentlichen und zu beachtenden Details im ÖWAV Merkblatt

Probenvorbereitung – Arbeitsanleitung zur Durchführung von Abwasseranalysen auf kommunalen Kläranlagen im Rahmen der Eigenüberwachung (Stand: Jänner 2020)

dargestellt. Die im Merkblatt zusammengefassten Schritte gewährleisten auch für die SARS-CoV-2 Untersuchungen eine einheitliche Vorgangsweise, sind den Betreibern bekannt und stellen keinen Mehraufwand zusätzlich zur Probenvorbereitung für die routinemäßige Eigenüberwachung dar.

- **Probenahme**

Mittels automatischem Probenahmegerät als mengenproportionale (durchflussproportionale) Tagesmischprobe über einen Zeitraum von 24 Stunden.

Die Probe im Probenahmegerät ist auf eine Temperatur von ca. 4 °C zu temperieren

- **Probenvorbereitung**

Im Labor wird die Probe gut durchmischt. Das Durchmischen kann durch Umrühren, Schütteln oder Umleeren von einem Behälter in einen anderen Behälter erfolgen. Aus der gesamten Probe werden bei andauernder Durchmischung drei Teilproben durch Schöpfen entnommen und in Einzelgefäße übergeführt.

- **Probenmenge**

Für die SARS-CoV-2 Analysen werden zumindest 250 der im ÖWAV Merkblatt als „Probe 1“ (unbehandelte Rohprobe) bezeichneten Teilprobe in ein zur Verfügung gestelltes Gebinde transferiert.

- **Lagerung**

Die Probe muss bis zur weiteren Verwendung (Transport bzw. Aufarbeitung) auf 4 °C gekühlt werden. Die Weiterverarbeitung sollte zügig erfolgen und die Kühlkette darf nicht unterbrochen werden.

12.7 Factsheet 7 – Datenmanagement

Spezifikation Datenbanksetup und Datenbankinhalte sowie Homepage

Verfasser: Dipl.-Ing. Heiko Kinzel (hydro-IT)

Die im Projekt gesammelten Erfahrungen bestätigen den gewählten Ansatz für das Datenmanagementsystem. Auch bei kleineren bis mittleren Projekten, die auf unterschiedliche Datenquellen angewiesen sind, sollte der Fokus auf der Vernetzbarkeit des erstellten Systems liegen. Ein einheitliches Ablagesystem für Daten unterschiedlicher Quellen ist oft aus rechtlichen, technischen oder auch strategischen Gründen nicht möglich. Umso wichtiger ist es, über das erstellte System flexibel verschiedenste Datenquellen und -senken verknüpfen zu können. Diese Vorgangsweise sichert allen Beteiligten mit der entsprechenden Berechtigung, auch bei unterliegenden heterogenen Systemstrukturen im Projekt, Zugriff auf alle Datensätze.

Das Grundkonzept einer **webbasierten Anwendung mit Homepage** ist für ein Monitoring-Projekt wie Coron-A in jedem Fall die geeignetste Wahl. Es können die Daten so überall und zu jeder Zeit abgerufen werden. Erweiterungen durch fix installierbare Smartphone-Apps oder Desktopprogramme mit Zugriff auf die Datenbank sind in diesem Umfeld problemlos umsetzbar.



Quelle: hydro-IT

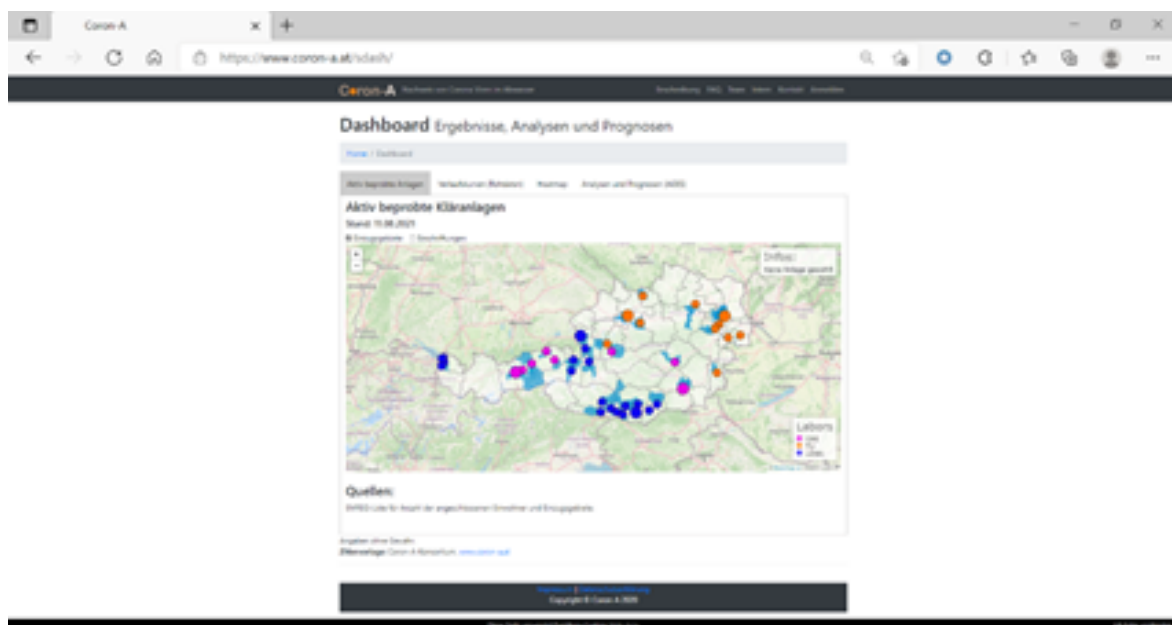
Die Daten aus den Laboren müssen ohne Zeitverzögerung den Anwender:innen gelangen. Dafür wurde die im Labor häufig verwendete **Datenerfassung mittels EXCEL** eingebunden. Vorgegebene Datenbögen können mit den Analyseergebnissen befüllt und ohne weitere Bearbeitung über die Webanwendung direkt in die Datenbank geladen werden („Datenupload“). Dort werden die **Daten automatisch auf Plausibilität geprüft** und stehen den

Anwender:innen dann sofort zur Betrachtung im Dashboard durch die **internen Auswertungstools** (wie z. B. im „Heatmapgenerator“) zur Verfügung.

Die **Inhalte der Datenbank müssen flexibel erweiterbar sein**, um auf einen Wandel der Rahmenbedingungen (z. B. das Auftreten von Varianten) schnell reagieren zu können.

Es sind folgende Eigenschaften für das Datenmanagementsystem anzustreben:

- **Datenbanksetup:** Design nicht als monolithischer Block, sondern als Daten-Baustein – aber auch als Projekt-Schaltzentrale – der Dateninfrastruktur. Zugriff auf alle wesentlichen Inhalte und Funktionen über Webseite/Web-App maximiert die Erreichbarkeit.
- **Datenbankinhalte:** Müssen flexibel an neue Rahmenbedingungen anpassbar sein. Metadaten des Projekts (wie z. B. die Geo-Daten der „Messstellenverwaltung“, Gebietsgrenzen, etc.) sollten im System gespeichert oder zugreifbar sein.



Quelle: hydro-IT

- Die **Homepage** ist als Einstieg für die Webanwendung notwendig, bildet aber auch eine sehr gute Möglichkeit, verschiedenste Stakeholdergruppen über Logins spezifisch über das Projekt zu informieren bzw. unterschiedliche Informations-/Auswerteebenen bereitzustellen.

12.8 Factsheet 8 – Statistisches Analyse- und Prognosesystem (abwasserbasiert)

Anforderungen an ein abwasserbasiertes, statistisches Analyse- und Prognosesystem

Verfasser: Arbeitspaketleiter des Coron-A Projekts Dr. Hans-Peter Stüger (AGES)

Aus den Projekterfahrungen sowie generellen statistischen Überlegungen lassen sich Kernanforderungen an ein abwasserbasiertes, statistisches Analyse- und Prognosesystem ableiten. Davor ist aber festzuhalten, dass ein solches Prognosesystem ebenfalls Voraussetzungen hat, damit es in einem zeitlich dichten Umfeld möglichst effizient funktionieren kann. Wesentliche Grundlage sind harmonisierte Abwassermessdaten, die zentral und in eindeutiger Struktur vorliegen sollten. Weiters ist festzulegen, in welcher Frequenz (z. B. wöchentlich oder täglich) und mit welchen Abwasserindikatoren ein Reporting erfolgen soll. Weiters ist der Nutzungs- und Adressatenkreis der Prognoseergebnisse zu definieren, damit die inhaltliche und technische Berichtsform darauf abgestimmt werden kann.

Darauf aufbauend erscheinen folgende **Anforderungen an ein abwasserbasiertes, statistisches Analyse- und Prognosesystem** sinnvoll:

- **Datenqualitätsprüfung:** Auch im Falle des Vorhandenseins gut definierter Daten sollten Prüfelemente und Plausibilisierungen zur Sicherstellung der Datenqualität vorgesehen werden.
- **Programmgestützte Datenaufbereitung und -analyse:** Die Datenverarbeitung muss mit programmierbarer Software erfolgen, die zudem Automatisierungsmöglichkeiten bietet, was insbesondere bei zeitlich engen Berichtsfrequenzen zum Tragen kommt.
- Ein statistisches Prognosesystem muss die **Vorhersage der kurzfristigen Entwicklung von quantitativen Abwasserindikatoren ermöglichen** unter Berücksichtigung von statistischer Unsicherheit mittels Konfidenzintervallen.
- Im Prognoseansatz müssen die **Spezifika einer Messstelle berücksichtigt** werden.
- Das **Vorhersagemodell** muss bei **Vorliegen neuer Daten angepasst** werden.
- Für die Darstellung der Analyse- und Prognoseergebnisse müssen **zielgruppenspezifische Visualisierungen** (inkl. Glättungen) und sonstige Berichtselemente automatisiert erstellt werden können.

- Eine **Ermittlung von überregionalen Trends** durch Aggregation von Einzelvorhersage-Trends soll ermöglicht werden.

Abschließend sei noch darauf verwiesen, dass das Thema Mutationen/Varianten in diesem Forschungsprojekt nur eine Randbedeutung hatte. Für ein österreichweites Monitoring-system werden diese aber sicherlich eine Rolle spielen. Daraus könnte sich die Notwendigkeit einer zusätzlichen Berücksichtigung dieser Daten in einem Prognosesystem ergeben.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Untersuchte Lagerungsbedingungen.	18
Tabelle 2: Übersicht über die zur Herstellung der Ringversuchsproben gesammelten Abwasserproben.....	24
Tabelle 3: Vergleich der quantitativen Methoden.....	25
Tabelle 4: Anzahl der Abwasseranalysen in der Coron-A Datenbank nach Kläranlage und Monat (Teil 1).	62
Tabelle 5: Anzahl der Abwasseranalysen in der Coron-A Datenbank nach Kläranlage und Monat (Teil 2).	64
Tabelle 6: Anzahl der Abwasseranalysen in der Coron-A Datenbank nach Bundesland und Monat.	66
Tabelle 7: Anzahl der durch die Kläranlagen angeschlossenen Einwohner:innen in der Coron-A Datenbank nach Bundesland und Monat – 2020.	68
Tabelle 8: Anzahl der durch die Kläranlagen angeschlossenen Einwohner:innen in der Coron-A Datenbank nach Bundesland und Monat – 2021.	68
Tabelle 9: Auf SARS-CoV-2 untersuchte Ablaufproben und errechnete Entfernungsraten.....	84
Tabelle 10: Vier Beispiele der beprobten Messstandorte mit dazugehöriger Population und Klimainformation.....	89
Tabelle 11: Auflistung der Glättungsmethoden.....	94
Tabelle 12: Übersicht über Beprobungshäufigkeit und -intervall der Kläranlagen.	110
Tabelle 13: Messstationen und Anzahl Messwerte für Modellierung, Stand 28.05.2021.	119
Tabelle 14: Variants of Concern.	158

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über den bisherigen Pandemieverlauf (aktive Fälle) März 2020 bis Dezember 2021.....	12
Abbildung 2: Schematische Darstellung der wesentlichen Schritte in der COVID-Abwasserepidemiologie.	17
Abbildung 3: Anzahl der Genkopien und RNA-Konzentrationen in Abwasser aus zwei Kläranlagen in Salzburg (links) und Tirol (rechts) Lagerung bei +4 °C und tiefgefroren (-18 °C) (n = 4, Median, Box: min-max).	19
Abbildung 4: Vergleich der Wiederfindungsrate bei Lagerung bei 4 °C sowie nach langsamem und schnellem Auftauen einer tiefgefrorenen Probe.....	19
Abbildung 5: Gliederung des analytischen Prozesses zur quantitativen Bestimmung von SARS-CoV-2 in Abwasserproben.....	23
Abbildung 6: Vergleich der mittels etablierten RT-qPCR-Methoden erhobenen quantitativen Ergebnisse von prozessierten Abwasserproben in den beteiligten drei Laboren.	26
Abbildung 7: Vergleich der quantitativen Ergebnisse der untersuchten Abwasserproben unter Verwendung von laborspezifischen Probenvorbereitungsprozessen und einer einheitlichen Quantifizierungsmethode (im Vergleich zur Eigenmessung der Medizinischen Universität Innsbruck (MUI)).	28
Abbildung 8: Vergleich der quantitativen Ergebnisse der untersuchten Abwasserproben unter Verwendung der in den teilnehmenden Laboren etablierten Prozesse (im Vergleich zur Eigenmessung der Medizinischen Universität Innsbruck (MUI)).	29
Abbildung 9: Prozessablauf von der Probennahme über die Probenaufbereitung, dem Versand, der Extraktion und Analytik.....	31
Abbildung 10: Erneuten Versand und der Vollsequenzierung ausgewählter Vorarlberger Proben.....	32
Abbildung 11: Organisation des Transportes von Abwasserproben im Rahmen einer tirolweiten Pilotstudie zum Analyselabor nach Innsbruck.....	33
Abbildung 12: Logistik der Kärntner Proben.	35
Abbildung 13: Vorbereitete, den Kläranlagen in Oberösterreich und Burgenland sowie St. Pölten zur Verfügung gestellte Versandeinheit mit Gebinde, Kühlakkus, Styroporbox und Überkarton mit Empfänger und Absender (einige Kühlakkus wurden für das Foto entfernt).	36
Abbildung 14: Ausschnitt aus dem Kontextmenü.....	40

Abbildung 15: Überblick der beprobten Anlagen als Bildschirmdarstellung der Coron-A Projektwebsite (Stand per 4.9.2020).....	41
Abbildung 16: Übersicht aktiv beprobter Kläranlagen mit Einzugsgebiet (Stand per 7.7.2021).....	42
Abbildung 17: Schematische Darstellung: Upload und Webzugriffrealisierung mit/über PostgreSQL.....	42
Abbildung 18: Dashboard und Ergebnisse – Übersicht über den aktuellen Projektstatus..	45
Abbildung 19: Dashboard und Ergebnisse – Heatmap.....	46
Abbildung 20: Menü für die Verlaufskurvendarstellung.....	47
Abbildung 21: Zwei Beispiele von Verlaufskurvendarstellungen.....	47
Abbildung 22: Gegenüberstellung der auf Basis der CSB ₁₂₀ -Werte errechneten mittleren Einwohnerwerte mit den aus dem Melderegister abgeleiteten Einwohnerzahlen.	55
Abbildung 23: Relative Standardabweichungen (RSD, in %) der Pro-Kopf-Frachten der Biomarkerkandidaten (in mg/Tag/1000 Einwohner:innen) für das Trainingsset bestehend aus 42 Proben von sechs Kläranlagen.....	56
Abbildung 24: Korrelation der auf Basis der Cotintinfrachten berechneten Einwohnerwerte mit jenen aus den CSB ₁₂₀ -Werten abgeleiteten Einwohnerwerten.	57
Abbildung 25: Korrelation der auf Basis der Koffeinfrachten berechneten Einwohnerwerte mit jenen aus den CSB ₁₂₀ -Werten abgeleiteten Einwohnerwerten.	58
Abbildung 26: Vergleich der aus CSB ₁₂₀ -Werten (Kreise), Koffeinfracht (Karas) und Cotininfracht (Dreiecke) abgeleiteten mittleren Einwohnerwerte für neun Kläranlagen.	59
Abbildung 27: Prävalenzen (Genkopien pro mL Abwasser) über die Zeit für die Kläranlagen Burgenland.....	70
Abbildung 28: Prävalenzen (Genkopien pro mL Abwasser) über die Zeit für die Kläranlagen Kärnten.	70
Abbildung 29: Prävalenzen (Genkopien pro mL Abwasser) über die Zeit für die Kläranlagen Niederösterreich.....	71
Abbildung 30: Prävalenzen (logarithmische Darstellung der Genkopien pro mL Abwasser) über die Zeit für die Kläranlagen Oberösterreich. Wegen eines einzelnen, besonders hohen Wertes wurde eine logarithmische Darstellung gewählt.71	71
Abbildung 31: Prävalenzen (Genkopien pro mL Abwasser) über die Zeit für die Kläranlagen Salzburg.....	72
Abbildung 32: Prävalenzen (Genkopien pro mL Abwasser) über die Zeit für die Kläranlagen Steiermark.....	72

Abbildung 33: Prävalenzen (Genkopien pro mL Abwasser) über die Zeit für die Kläranlagen Tirol (es stehen nur Daten bis Oktober 2020 zur Verfügung).	73
Abbildung 34: Prävalenzen (Genkopien pro mL Abwasser) über die Zeit für die Kläranlagen Vorarlberg.	73
Abbildung 35: Prävalenzen (logarithmische Darstellung der Genkopien pro mL Abwasser) über die Zeit für die Kläranlage Wien	74
Abbildung 36: Prävalenzen (logarithmische Darstellung der Genkopien pro mL Abwasser) über die Zeit für alle Kläranlagen in der Coron-A Datenbank	74
Abbildung 37: Prävalenzen (logarithmische Darstellung der Genkopien) über die Zeit für die Kläranlagen in Vorarlberg. Vergleich unterschiedlicher Normierungen: Rohdaten.....	76
Abbildung 38: Prävalenzen (logarithmische Darstellung der Genkopien) über die Zeit für die Kläranlagen in Vorarlberg. Vergleich unterschiedlicher Normierungen: normiert auf CSB (EW_{120}).	76
Abbildung 39: Prävalenzen (logarithmische Darstellung der Genkopien) über die Zeit für die Kläranlagen in Vorarlberg. Vergleich unterschiedlicher Normierungen: normiert auf NH_4-N (EW_8).	77
Abbildung 40: Prävalenzen über die Zeit für die Kläranlage Wolfgangsee-Ischl Vergleich unterschiedlicher Normierungen (Rohdaten; CSB (EW_{120}) TN (EW_{11}); NH_4-N (EW_8)).	78
Abbildung 41: Veränderung der Konzentration von SARS-CoV-2 RNA im Innsbrucker Abwasser im Zeitraum Juni bis September 2020 im Vergleich mit der Anzahl an aktiv positiven getesteten Personen im Einzugsgebiet der Kläranlage...	80
Abbildung 42: Zeitliche Entwicklung der Anzahl an „positiv getesteten Personen“ sowie der Anzahl an „fiktiven Ausscheidern“ in drei steirischen Regionen von Jänner bis Juni 2021.....	81
Abbildung 43: Zeitlicher Verlauf der Virenkonzentration und der aktiven Krankheitsfälle für die vier untersuchten Kläranlagen.....	90
Abbildung 44: Normierte NH_4 -Fracht in Abhängigkeit vom Zufluss für das Einzugsgebiet Siggerwiesen. Der Datensatz entspricht einer Zeitreihe von 10 Jahren.	92
Abbildung 45: Berechnete Einwohnerwerte bzgl. der Populationsgrößenmarker NH_4 und CSB. Die Daten beziehen sich auf eine 10-jährige Zeitserie von Siggerwiesen.	93
Abbildung 46: Optimierungsmetriken der jeweiligen Glättungsmethoden. Der mittlere Absolut-Fehler MAE ist als schwarzer Balken dargestellt, die Varianz VAR als weiße Punkte.	95

Abbildung 47: Relative Virenfracht einer ARA mit ca. 40.000 EW im Zeitraum der zweiten Pandemiewelle. Die Datenpunkte sind mit einer exponentiellen Glättung und mit einem gleitenden Mittelwert geglättet.	96
Abbildung 48: Visualisierung der Ergebnisse für Kläranlage Wien c Trainingsdaten.	98
Abbildung 49: Ergebnis der Regressionsmodelle für die Zeitserien der aktiven Erkrankungen: Gegenüberstellung der Messwerte zu den Modellergebnissen auf Basis des Abwassersignals (hier in 10^6 Genkopien pro EW pro Tag).	99
Abbildung 50: Relative Virenlast F_{V_rel} für 23 Kläranlagen des Coron-A Projekts im Zeitraum der vierten Prävalenzstudie (12.–15. November 2020).	100
Abbildung 51: Prävalenzmodell für das Fallbeispiel Wien.	102
Abbildung 52: Ausschnitt aus wöchentlichem Meldezahlenbericht, Infektionslage auf Bundeslandebene.	107
Abbildung 53: Virusfracht pro EW_{CSB_120} der ARA Innsbruck mit einfachen Glättungsmodellen.	112
Abbildung 54: Darstellung Virusfracht pro EW_{CSB_120} mit LOESS-Glättung und 14-Tage-Inzidenz für ARA Innsbruck.	113
Abbildung 55: Darstellung Virusfracht pro EW_{CSB_120} mit LOESS-Glättung und 14-Tage-Inzidenz für Abwasserverband Wörthersee West.	114
Abbildung 56: Langzeit Glättung.	117
Abbildung 57: Rolling Window.	118
Abbildung 58: Hyperparametrisierung – Ergebnisse für die Kläranlage Wien.	121
Abbildung 59: Hyperparametrisierung – Ergebnisse für die Kläranlage Innsbruck.	122
Abbildung 60: Residuendiagnostik Messstation Innsbruck: Langzeit Glättung.	123
Abbildung 61: Residuendiagnostik Messstation Kapfenberg: Langzeit Glättung.	124
Abbildung 62: Messungen und Vorhersagen für die Kläranlage Innsbruck.	124
Abbildung 63: Messungen und Vorhersagen für die Kläranlage Wien.	125
Abbildung 64: Beispiel einer regionalen Trenddarstellung auf Basis ausgewählter Kläranlagen.	126
Abbildung 65: Trend-Skala.	127
Abbildung 66: Aktuell-Skala.	127
Abbildung 67: Trendgrafik mit Bundesländern.	128
Abbildung 68: Wertebereich Virusfracht pro EW_{CSB_120} für verschiedene Kategorien der 14-Tage-Inzidenz.	129
Abbildung 69: Kreuzkorrelation zwischen \log_{10} (Virusfracht pro EW_{CSB_120}) und 14-Tage-Inzidenz an der Kläranlage Innsbruck (Stand 31.05.2021).	131

Abbildung 70: Kreuzkorrelation zwischen log ₁₀ (Virusfracht pro EW _{CSB_120}) und 14-Tage-Inzidenz an der Kläranlage Wien (Stand 31.05.2021).	132
Abbildung 71: Kreuzkorrelation zwischen log ₁₀ (Virusfracht pro EW _{CSB_120}) und 14-Tage-Inzidenz an der Kläranlage Wörthersee West (Stand 31.05.2021).	132
Abbildung 72: Web-App, Reiter „Kläranlagen“	134
Abbildung 73: WebApp, Checkbox „Lockdown“	135
Abbildung 74: Web-App, „Überblick“	136
Abbildung 75: Explosive Vorhersagen, Kläranlage Strass.	137
Abbildung 76: Brüchige Vorhersagen, Kläranlage Graz.	138
Abbildung 77: Prinzipieller Ablauf der Quantifizierung von SARS-CoV-2 in Abwasserproben.....	151
Abbildung 78: Übersicht über die wichtigsten zur Analyse von Abwasserproben benötigten Geräte und Instrumente.	152
Abbildung 79: Amplifikationsplots von Abwasserproben zur Veranschaulichung der Bestimmung von CT-Werten. Der Schwellenwert wurde auf 0,15 gesetzt.....	153
Abbildung 80: Übersichtskarte des wöchentlichen Status der einzelnen Varianten in den beprobten Kläranlagen in Österreich – Stand Juni 2021.....	159
Abbildung 81: Oben: Relative Häufigkeit der detektierten Varianten für die gesamte Messzeitreihe an der Kläranlage Hofsteig, Vorarlberg. Unten: Abgeleitete relative Häufigkeit aller detektierten VOC/VOI Variante(n) und der gemessenen Allelfrequenz der dazugehörenden Markermutationen.....	160
Abbildung 82: Relative Häufigkeit aller detektierten Varianten für die gesamte Messzeitreihe für ausgewählte Kläranlagen. Bei den angegebenen Zeitachsen ist zu beachten, dass diese nicht für alle untersuchten Kläranlagen dieselben Zeitabschnitte aufweisen.	162
Abbildung 83: Vergleich der für die Region Innsbruck ermittelten „Anzahl an fiktiven Ausscheidern“ mit der jeweiligen Anzahl an „aktiv Positiven“ im Zeitraum 1.6.–17.12.2020.	166
Abbildung 84: Vergleich der „Anzahl an fiktiven Ausscheidern“ mit der mittleren Anzahl an „aktiv Positiven“ im Zeitraum 17.–31.8.2020 für die im Rahmen des tirolweiten Abwassermonitorings untersuchten Kläranlagen.	167
Abbildung 85: Prozessablauf von der Probennahme über die Probenaufbereitung, dem Versand, der Extraktion und Analytik.....	184
Abbildung 86: Beispiel der Organisation des Transportes von Abwasserproben mittels Botendienst im Rahmen einer tirolweiten Pilotstudie zum Analyzelabor nach Innsbruck.....	185

Abbildung 87: Vorbereitete, den Kläranlagen in Oberösterreich und Burgenland sowie St. Pölten zur Verfügung gestellte Versandeinheit mit Gebinde, Kühlakkus, Styroporbox und Überkarton mit Empfänger und Absender (einige Kühlakkus wurden für das Foto entfernt). 186

Literaturverzeichnis

Aberi P., Arabzadeh R., Insam H., Markt R., Mayr M., Kreuzinger N., Rauch W. (2021): Quest for Optimal Regression Models in SARS-CoV-2 Wastewater Based Epidemiology. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2021; 18(20):10778. doi.org/10.3390/ijerph182010778.

Ahmed W., Bivins A., Bertsch P.M., Bibby K., Choi P.M., Farkas K., Gyawali P., Hamilton K.A., Haramoto E., Kitajima M., Simpson S.L., Tandukar S., Thomas K., Mueller J.F. (2020): Surveillance of SARS-CoV-2 RNA in wastewater: Methods optimisation and quality control are crucial for generating reliable public health information. Curr Opin Environ Sci Health. 2020 Sep 30. doi: 10.1016/j.coesh.2020.09.003.

Amman F., Markt R., Endler L., Hupfau S., Agerer B., Schedl A., Richter L., Zechmeister M., Bicher M., Heiler G., Triska P., Thornton M., Penz T., Senekowitsch M., Laine J., Keszei Z., Daleiden B., Steinlechner M., Niederstätter H., Scheffknecht C., Vogl G., Weichlinger G., Wagner A., Slipko K., Masseron A., Radu E., Allerberger F., Popper N., Bock C., Schmid D., Oberacher H., Kreuzinger N., Insam H., Bergthaler A. (2021): National-scale surveillance of emerging SARS-CoV-2 variants in wastewater, medRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2022.01.14.21267633>; this version posted January 14, 2022. Zur Veröffentlichung eingereicht, 2021.

Arabzadeh R., Grünbacher D.M., Insam H., Kreuzinger N., Markt R., Rauch W. (2021): Data filtering methods for SARS-CoV-2 wastewater surveillance. Water Sci Technol, 2021; 84 (6): 1324–1339. doi: doi.org/10.2166/wst.2021.343.

Balboa S., Mauricio-Iglesias M., Rodriguez S., Martínez-Lamas L., J. Vassallo F., Regueiro B, Lema L.M. (2021): The fate of SARS-COV-2 in WWTPS points out the sludge line as a suitable spot for detection of COVID-19, Science of The Total Environment, 772 doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145268.

Been F., Rossi L., Ort C., Rudaz S., Delémont O. and Esseiva P. (2014): Population normalization with ammonium in wastewater-based epidemiology: Application to illicit drug monitoring. Environmental science & technology, 48(14), pp.8162-8169.

Box G.E., Tiao G.C. (2011): Bayesian inference in statistical analysis (Vol. 40). John Wiley & Sons.

Buerge I.J., Kahle M., Buser H.R., Muller M.D., Poiger T. (2008): Nicotine derivatives in wastewater and surface waters: Application as chemical markers for domestic wastewater. *Environmental Science & Technology*. 2008; 42(17):6354-60.

Casella G., Berger R.L. (2002): *Statistical Inference*. Belmont, CA: Duxbury 2002.

Centre for Disease Control and Prevention (2020): Information for Laboratories about Coronavirus (COVID-19). 2020. Available from [cdc.gov/](https://www.cdc.gov/). Aufgerufen am 23. Juni 2021.

Chen C., Kostakis C., Gerber J.P., Tschärke B.J., Irvine R.J. and White J.M. (2014): Towards finding a population biomarker for wastewater epidemiology studies. *Science of the total environment*, 487, pp.621-628.

Choi P.M., Tschärke B.J., Donner E., O'Brien J.W., Grant S.C., Kaserzon S.L., Mackie R., O'Malley E., Crosbie N.D., Thomas K.V. and Mueller J.F. (2018): Wastewater-based epidemiology biomarkers: past, present and future. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 105, pp.453-469.

Daughton C.G. (2001): Illicit drugs in municipal sewage: Proposed new nonintrusive tool to heighten public awareness of societal use of illicit-abused drugs and their potential for ecological consequences. In book: *Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Scientific and Regulatory Issues* (pp.348-364) Edition: Symposium Series 791 Chapter: 20 Publisher: American Chemical Society: Washington, D.C. Editors: CG Daughton, TL Jones-Lepp.

Gao J., O'Brien J., Du P., Li X., Ort C., Mueller J.F., et al. (2016): Measuring selected PPCPs in wastewater to estimate the population in different cities in China. *Sci Total Environ*. 2016; 568:164-70.

Hou C.Z., Chu T.T., Chen M.Y., Hua Z.D., Xu P., Xu H., et al. (2021): Application of multi-parameter population model based on endogenous population biomarkers and flow volume in wastewater epidemiology. *Sci Total Environ*. 2021; 759.

Kitajima M., Sassi H.P., Torrey J. (2018): Pepper mild mottle virus as a water quality indicator. *Npj Clean Water*. 2018; 1.

Lai F.Y., Ort C., Gartner C., Carter S., Prichard J., Kirkbride P., et al. (2011): Refining the estimation of illicit drug consumptions from wastewater analysis: co-analysis of prescription pharmaceuticals and uncertainty assessment. *Water Res.* 2011; 45(15):4437-48.

Lescure F.X., Boudama L., Nguyen D., Parisey M., Wicky P.H., Behillil S. et al. (2020): Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: a case series. *Lancet Infectious Diseases.* 2020; 20(6):697-706.

Mackulak T., Birosova L., Grabic R., Skubak J., Bodik I. (2015): National monitoring of nicotine use in Czech and Slovak Republic based on wastewater analysis. *Environ Sci Pollut R.* 2015; 22(18):14000-6.

Markt R., Mayr M., Peer E., Wagner A.O., Lackner N., Insam H. (2021): Detection and Stability of SARS-CoV-2 Fragments in Wastewater: Impact of Storage Temperature. *Pathogens.* 2021; 10(9):1215. doi.org/10.3390/pathogens10091215.

Michael-Kordatou I., Karaolia P., Fatta-Kassinos D. (2020): Sewage analysis as a tool for the COVID-19 pandemic response and management: the urgent need for optimised protocols for SARS-CoV-2 detection and quantification, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, Volume 8, Issue 5, 2020, 104306, ISSN 2213-3437, doi.org/10.1016/j.jece.2020.104306.

O'Brien J.W., Thai P.K., Eaglesham G., Ort C., Scheidegger A., Carter S., et al. (2014): A Model to Estimate the Population Contributing to the Wastewater Using Samples Collected on Census Day. *Environmental Science & Technology.* 2014; 48(1):517-25.

R Core Team (2018): R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria 2018.

Rauch W., Arabzadeh R., Grünbacher D., Insam H., Markt R., Scheffknecht Ch. und Kreuzinger N. (2021): Datenbehandlung in der SARS-CoV-2 Abwasserepidemiologie. *Korrespondenz Abwasser*, 68, 547-55.

Reinstadler V., Ausweger V., Grabher A.L., Kreidl M., Huber S., Grandner J., et al. (2021): Monitoring drug consumption in Innsbruck during coronavirus disease 2019 (COVID-19) lockdown by wastewater analysis. *Sci Total Environ.* 2021; 757:144006.

Rico M., Andres-Costa M.J., Pico Y. (2017): Estimating population size in wastewater-based epidemiology. Valencia metropolitan area as a case study. *J Hazard Mater.* 2017; 323(Pt A):156-65.

Senta I., Gracia-Lor E., Borsotti A., Zuccato E., Castiglioni S. (2015): Wastewater analysis to monitor use of caffeine and nicotine and evaluation of their metabolites as biomarkers for population size assessment. *Water Res.* 2015; 74:23-33.

Tribus V. (2021): Nachweis von SARS-CoV-2 aus gefrorenen Abwasserproben, Masterarbeit Mikrobiologie, Univ. Innsbruck 2021.

Tscharke B.J., O'Brien J.W., Ort C., Grant S., Gerber C., Bade R., et al. (2019): Harnessing the Power of the Census: Characterizing Wastewater Treatment Plant Catchment Populations for Wastewater-Based Epidemiology. *Environmental Science & Technology.* 2019;53(17):10303-11.

van Nuijs A.L.N., Lai F.Y., Been F., Andres-Costa M.J., Barron L., Baz-Lomba J.A., et al. (2018): Multi-year inter-laboratory exercises for the analysis of illicit drugs and metabolites in wastewater: Development of a quality control system. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2018; 103:34-43.

van Nuijs A.L.N., Mougel J.F., Tarcomnicu I., Bervoets L., Blust R., Jorens P.G., et al. (2011): Sewage epidemiology - A real-time approach to estimate the consumption of illicit drugs in Brussels, Belgium. *Environ Int.* 2011; 37(3):612-21.

Whitley, D. (1994): A genetic algorithm tutorial. *Statistics and computing*, 4(2), pp.65-85.

WHO Regional Office for Europe (2020): Rapid expert consultation on environmental surveillance of SARS-CoV-2 in wastewater. Summary report. Virtual meeting, 23 July 2020. Copenhagen, 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Wolfel R., Corman V.V., Guggemos W., Seilmaier M., Zange S., Muller M.A., et al. (2020): Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature.* 2020; 581(7809):465-ff.

Wood, S.N. (2017): Generalized Additive Models: An Introduction with R (2nd ed.). Chapman and Hall/CRC. <https://doi.org/10.1201/9781315370279>.

Zuccato E., Chiabrando C., Castiglioni S., Bagnati R. and Fanelli R. (2008): Estimating community drug abuse by wastewater analysis. *Environmental health perspectives*, 116(8), pp.1027-1032.

Begriffe

Auf das gendern technisch standardisierter Begriffe wird im Text verzichtet, dies betrifft:

- Einwohneräquivalent
- Einwohnergleichwert
- Einwohnerwert
- Einwohnerzahl

Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Regionen und Wasserwirtschaft

Stubenring 1, 1010 Wien

bml.gv.at