



Technischer Leitfaden zur Abwassersurveillance

Stand: 11.2025



Inhalt

1	Hintergrund	2
2	Probenahme von Abwasser	3
2.1	Allgemeine Hinweise	3
2.2	Probenahmestelle	3
2.3	Probenahmetechniken	3
2.4	Probenahmezeiten	4
2.5	Abfüllen der Probe	4
2.6	Probenlogistik	4
2.7	Zu erfassende Parameter	5
3	Molekularbiologische Analytik	6
3.1	Allgemeine Hinweise	6
3.2	Probenbehandlung (Lagerung, Homogenisierung)	6
3.3	Konzentrierung der Abwasser-Probe	6
3.4	Nukleinsäure-Extraktion	7
3.5	Quantifizierung der viralen Genomkopien mittels (RT)-PCR	7
3.6	Qualitätskontrolle der PCR-Messergebnisse	8
4	Datenübermittlung	9
4.1	Allgemeine Hinweise	9
4.2	Datenblätter	9
4.3	Verantwortlichkeiten	11
5	Datenverarbeitung	12
5.1	Einleitung	12
5.2	Verrechnung der PCR-Daten	12
5.3	Normalisierung der PCR-Daten	13
5.4	Statistische Analysen	13
5.5	Software	14
6	Abkürzungen	15
7	Weitere Informationen	16
8	Anhang	17
8.1	Anhang 1: Leistungsbeschreibung Probenehmer	17

1 Hintergrund

Im Vorhaben AMELAG (Abwassermanagement für die epidemiologische Lagebewertung) arbeiten das Umweltbundesamt (UBA) und das Robert Koch-Institut (RKI) zusammen mit Gesundheits- und Umweltbehörden der Länder, Laboren und den Betreibern von Kläranlagen an der Durchführung einer bundesweiten Abwassersurveillance. Das Vorhaben wird vom Bundesministerium für Gesundheit finanziert. In AMELAG werden das *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2* (SARS-CoV-2), Influenzaviren und das Respiratorische Synzytialvirus (RSV) im Abwasser überwacht.

Dieser Leitfaden vermittelt die Grundlagen zum Vorgehen bei der Abwassersurveillance in AMELAG. Er beschreibt die verschiedenen Arbeitsschritte, die notwendig sind, um von der Rohabwasserprobe zu einer zentralen Datenverwertung zu kommen. Die Arbeitsschritte umfassen die Probenahme auf der Kläranlage, die molekularbiologische Analytik auf SARS-CoV-2, Influenzaviren und RSV, die Datenübermittlung sowie die Datenverarbeitung.

Das Ziel dieses Leitfadens ist es, eine deutschlandweit weitestgehend harmonisierte Vorgehensweise zu erreichen. Somit erhöht sich die Vergleichbarkeit der erzeugten Daten und ihr Nutzen für die Surveillance. Das beschriebene Vorgehen spiegelt die Erfahrung des Vorhabens AMELAG wider, welches gemeinsam von RKI und UBA koordiniert wird.

Tabelle 1: Adressat*innen der unterschiedlichen Kapitel

Adressat*in	Wichtige Kapitel
Kläranlagen	2 Probenahme, 4 Datenübermittlung
Labore	3 Molekularbiologische Analytik, 4 Datenübermittlung
Länder	4 Datenübermittlung, 5 Datenverarbeitung
Datennutzende	4 Datenübermittlung, 5 Datenverarbeitung

2 Probenahme von Abwasser

Dieser Abschnitt vermittelt die Anforderungen an die Probenahme von Rohabwasser am Zulauf der Kläranlage. Um eine einheitlich-repräsentative Probenahme in Bezug auf die zu ermittelnden Genfragmente zu ermöglichen, sind einige Faktoren auf der Kläranlage zu berücksichtigen. Diese beziehen sich insbesondere auf die Probenahmestelle und -techniken, die Handhabung der Mischprobe sowie auf den Probentransport. Weiterhin sind für die Qualitätssicherung der Rohdaten einige Begleitparameter zur Probenahme zu ermitteln. Der Prozess der Datenübermittlung ist im Detail in Abschnitt 4 beschrieben.

2.1 Allgemeine Hinweise

Abwasser ist in der Regel mit pathogenen Mikroorganismen und Viren kontaminiert. Es gelten die entsprechenden Arbeitsschutzbestimmungen und -richtlinien (z.B. TRBA 220: Abwassertechnische Anlagen: Schutzmaßnahmen der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin oder Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung: DGUV-Regel 103-602). Alle relevanten Hygienemaßnahmen, die im Zuge der Probenahme von Rohabwasser auf der jeweiligen Kläranlage notwendig sind, sind zu beachten. Generell müssen die verschiedenen Arbeitsschritte von geschultem und qualifiziertem Personal durchgeführt werden.

Die Probenahmen im Zuge der Abwassersurveillance sind grundsätzlich in Analogie zu den geltenden Bestimmungen der Abwasserverordnung vorzunehmen. Dazu zählt insbesondere die Berücksichtigung folgender Normen:

- Probenahme von Abwasser DIN 38402-11 (A11) (Ausgabe Februar 2009)
- Vorbehandlung, Homogenisierung und Teilung heterogener Wasserproben DIN 38402-30 (A30) (Ausgabe Juli 1998)
- Konservierung und Handhabung von Wasserproben DIN EN ISO 5667-3 (A21) (Ausgabe Juli 2019)

Darüber hinaus gelten die Grundsätze der DIN EN 16479 zur Leistungsanforderung und Konformitätsprüfung von automatischen Probenehmern (Ausgabe September 2012) sowie die DIN EN ISO 5667-16 Probenahme für biologische Testverfahren (Ausgabe März 2016).

2.2 Probenahmestelle

Die Entnahme der Rohabwasserproben ist an einer geeigneten Stelle am Zulauf der Kläranlage, möglichst nach dem Sandfang durchzuführen. Sollte eine Probenahme nur an anderer Stelle, z.B. vor dem Sandfang möglich sein, ist die Probenahmestelle bei der Übermittlung der Stammdaten der Kläranlagen zu übermitteln (siehe Abschnitt 4 Datenübermittlung).

Für die Dauer der Teilnahme an der Abwassersurveillance darf die Probenahmestelle nicht verändert werden. Sollte eine Veränderung der Probenahmestelle zwingend notwendig sein, so ist die neue Probenahmestelle in den Stammdaten der Kläranlage zu aktualisieren sowie eine Information per Mail (abwassersurveillance@uba.de) zu versenden (siehe Abschnitt 4 Datenübermittlung).

2.3 Probenahmetechniken

Die Beprobung von Rohabwasser im Zulauf von Kläranlagen ist zweimal wöchentlich als 24 h-Mischprobe mit einem automatischen Probenehmer durchzuführen. Stichproben sind nicht zulässig. Anforderungen zum Gerät sind in Anlage „Probenehmer“ erläutert (Anhang 1).

Während der Entnahme der 24 h-Mischprobe müssen die Proben gekühlt bzw. temperiert werden (5 ± 3 °C). Die Beprobung kann zeit- oder abflussproportional erfolgen, wobei eine abflussproportionale¹ Probenahme empfohlen wird. Die Probenahmefrequenz soll hierbei möglichst hoch sein. Dies ist bei der Übermittlung der Monitoringdaten zu vermerken (siehe Abschnitt 4 Datenübermittlung). Das Probenvolumen der 24 h-Mischprobe sollte mindestens 3 Liter betragen.

2.4 Probenahmezeiten

Es erfolgen zwei Probenahmen pro Woche. Diese sollen jeweils montags und mittwochs beginnen und 24 Stunden später, dienstags und donnerstags, dem Probenehmer entnommen werden. Die Zeiten der Probenahme sollten über den gesamten Untersuchungszeitraum nicht verändert werden. Die Uhrzeiten von Beginn und Ende der Probenahme werden in den Monitoringdaten angegeben (siehe Abschnitt 4 Datenübermittlung).

2.5 Abfüllen der Probe

Sollte die Mischprobe in Einzelgefäßen gesammelt worden sein, werden die Einzelproben am Ende des Probenahmezeitraumes in ein geeignetes Gefäß überführt. Vor Abfüllung in das Transportgefäß wird die Mischprobe gründlich homogenisiert (hierbei ist insbesondere auch eine Homogenisierung der Feststoffe über die gesamte Probe zu berücksichtigen). Anschließend wird 1 L der Mischprobe in die bereitstehende 1-Liter-Probenflasche überführt. Hierbei ist zu beachten, dass keine Außenkontamination des Gefäßes erfolgt. Sollte es dennoch zu einer Außenkontamination kommen, ist die Probenflasche nach Verschließen zu reinigen und zu desinfizieren.

2.6 Probenlogistik

Die Probenflaschen (Polyethylen mit Schraubdeckel) werden mit einem Aufkleber, der folgende Angaben enthält, versehen und an das jeweilige PCR-Analysenlabor versendet:

- Name der Kläranlage
- Probenidentifikationsnummer der Kläranlage
- Datum und Uhrzeit der Probenabfüllung

Die Probe muss gekühlt / temperiert transportiert werden, wobei eine Temperaturstabilität von 5°C ± 3°C-sicherzustellen ist, insbesondere an sehr kalten und sehr warmen Tagen.

Die Probe muss das Labor spätestes 24 h nach Bereitstellung durch die Kläranlage erreichen. Geplant ist, diese Transportzeit zu verringern, idealerweise so, dass ein Analysenergebnis der Probe innerhalb von 48 h bis 60 h in die Datenbank des UBA eingespeist werden kann.

Die Probengebinde (Probenflasche, Isolierung, Kühlakkus) sind durch das Labor/ die Bundesanalytik bereitzustellen und an die Kläranlagen zu versenden. Sie können entsprechend gereinigt wiederverwendet werden. Es muss dann sichergestellt werden, dass die Gefäße noch dicht schließen.

¹ Mit Inkrafttreten der Neufassung der EU-Kommunalabwasserrichtlinie 2024/3019 ist eine 24h-Mischprobe abflussproportional zu entnehmen. Dies muss voraussichtlich bis 31. Juli 2027 umgesetzt werden. Eine notwendige Umstellung von zeit- auf abflussproportional erfolgt möglichst im Sommer 2026 und ist im Stammdatenblatt Kläranlage zu vermerken (siehe Abschnitt 4 Datenübermittlung).

2.7 Zu erfassende Parameter

Zur Qualitätssicherung der Rohdaten ist es bei jeder Probenahme notwendig, kläranlagenspezifische Messwerte verschiedener Parameter zu erfassen. Für die entnommene Abwasserprobe sollen folgende Daten erfasst werden:

- Name der Kläranlage
- Probenidentifikationsnummer der Kläranlage
- Datum und Uhrzeit der Probenabfüllung
- Zufluss zur Kläranlage (mittlerer Volumenstrom über die Dauer der Probenahme, in L/s)
- Leitfähigkeit (in $\mu\text{S}/\text{cm}$)
- Temperatur (in $^{\circ}\text{C}$)
- pH-Wert
- Optional: Abfiltrierbare Stoffe (in mg/L)

Diese Daten werden mit den Monitoringdaten übermittelt (siehe Abschnitt 4 Datenübermittlung).

3 Molekularbiologische Analytik

Dieser Abschnitt vermittelt die Grundlagen für das Vorgehen zum quantitativen Nachweis spezifischer Genfragmente der Viren SARS-CoV-2, Influenza-A- und Influenza-B-Virus, RSV-Gruppe A und B und ubiquitär in Fäkalien nachweisbare Viren (fäkale Bezugsviren) mittels molekularbiologischer Nachweismethoden, d.h. mittels (reverse Transkriptase) Polymerasekettenreaktion ((RT)-PCR). Dieser Abschnitt beschreibt zudem die wichtigsten Kontrollparameter, die für eine qualitätsgesicherte Analytik beachtet werden müssen.

3.1 Allgemeine Hinweise

Die verschiedenen Arbeitsschritte der Nukleinsäure-Extraktion und (RT)-PCR-Analysen müssen von molekularbiologisch geschultem und qualifiziertem Personal durchgeführt werden. Außerdem muss eine räumliche Trennung der Bearbeitungsphasen (Homogenisierung, Probenkonzentrierung und Virusreicherung, Nukleinsäure-Extraktion vs. Nukleinsäure-Amplifikation und Detektion) beachtet werden. Kontaminationen müssen vermieden werden, indem sterile Nuklease- und Nukleinsäure-freie Verbrauchsmaterialien und Reagenzien verwendet werden. Zudem sind Maßnahmen zu regelmäßiger Desinfektion und Handschuhwechsel zu treffen. Alle Protokolle müssen von den Laboren so optimiert und evaluiert werden, dass eine Quantifizierung der zu detektierenden Nukleinsäuren auch bei niedrigen Viruslasten in den Abwasserproben möglich ist. Weiterhin müssen Wiederfindungsraten sowie Nachweisgrenze (NG; Englisch: Limit Of Detection, LOD) und Bestimmungsgrenze (BG; Englisch: Limit Of Quantification, LOQ) für jedes Zielgen bestimmt werden.

3.2 Probenbehandlung (Lagerung, Homogenisierung)

Nach der Probenahme muss die Abwasserprobe möglichst zeitnah bearbeitet werden. Eine gekühlte Zwischenlagerung bei 4°C ist für wenige Tage möglich. Eine Bearbeitung innerhalb von 48 Stunden wird jedoch dringend empfohlen. In der Fachliteratur wird bei gekühlten Proben – abhängig vom jeweiligen Virus – eine Stabilität der Genfragmente von bis zu neun Tagen beschrieben (Markt et al. 2021). Die Abwasserprobe darf nicht gefroren werden, da dies zu deutlichen Verlusten viraler Nukleinsäuren führen kann.

Im Labor wird eine automatisierte Homogenisierung der Proben im Überkopfschüttler für 15 min empfohlen. Erst dann sollten Teilproben für die weitere Analytik entnommen werden.

3.3 Konzentrierung der Abwasser-Probe

Die Konzentrierung von Viruspartikeln bzw. Virusbestandteilen kann durch verschiedene Methoden erfolgen. In Tabelle 1 sind die drei am häufigsten angewandten Methoden im Rahmen von AMELAG zusammengefasst.

Feststoffpartikel aus dem Rohabwasser werden bei vielen Protokollen durch einen ersten Zentrifugationsschritt (z.B. 15 - 45 min, 4.000 – 5.000 x g) abgetrennt (z.B. bei Verwendung von Filtereinheiten oder zentrifugaler Ultrafiltration). Danach wird mit der wässrigen Phase der Probe weitergearbeitet.

Tabelle 1: Methoden zur Konzentrierung von Viruspartikeln

Methode	Ausgangsvolumen	Optionen
Fällung mit Polyethylenglycol (PEG)	40 mL - 1 L	Polyethylenglycol 8000 (PEG 8000) (10% m/V) (oder Polyethylenglycol 6000 (PEG 6000)), zusätzlich wird NaCl (2,25% m/V) zugegeben
Druck- oder vakuumbasierte Filtration	40 mL - 1 L	Negativ oder positiv geladene Filtermembran, Porengröße 0,1 µm bis 0,45 µm
Zentrifugale Ultrafiltration	40 mL - 200 mL	Verschiedene Filtertypen und Rotationsgeschwindigkeiten

Je nach verwendeter Methode und Ausgangsvolumen unterscheiden sich die Wiederfindungsraten der Zielgenabschnitte und die Wiederfindungsraten gespikter Kontrollviren (siehe unten). Wichtige Parameter für die Wahl der Konzentrierungsmethode sind (i) das Abwasser-Volumen, welches mit der jeweiligen Methode bearbeitet werden kann, (ii) die Effizienz der Methode, (iii) die Eignung der Methode für die zu untersuchenden Viren sowie (iv) die vorhandene Laborausstattung.

3.4 Nukleinsäure-Extraktion

Nach der Konzentrierung der Viruspartikel bzw. -Bestandteile aus der Abwasserprobe müssen virale oder generell Gesamt-Nukleinsäuren in guter Qualität extrahiert werden. Die häufigsten dafür verwendeten Techniken beruhen auf der organischen Extraktion mit Phenol/ Chloroform, Wasser und Alkohol sowie Bindung an Silica-Matrices und werden von vielen Firmen als kommerzielle Kits angeboten. Die Nukleinsäuren werden dabei meistens in einem Volumen von 50 - 200 µL eluiert. Eine Quantifizierung der extrahierten Nukleinsäuren erfolgt photometrisch bei 260 nm, fluorometrisch oder durch Fragmentanalysen. Die Reinheit der Probe kann photometrisch bei 230 und 280 nm kontrolliert werden oder durch Fragmentanalysen. Die Effizienz der Extraktionsmethode kann durch das Mitführen einer bekannten Zahl von inaktivierten Viruspartikeln eines weiteren Virus als Prozesskontrolle, wie z.B. des Bakteriophagen MS2 oder des Murinen Hepatitis Virus (MHV), überprüft werden.

Die extrahierten Nukleinsäuren können mittelfristig ohne Konzentrationsverlust bei -20°C gelagert werden. Zur Langzeitlagerung empfiehlt sich das Einfrieren von Aliquots bei -80°C in geeigneten Reaktionsgefäßeln (z.B. low binding).

3.5 Quantifizierung der viralen Genomkopien mittels (RT)-PCR

Die Quantifizierung der Viren geschieht mittels Polymerasekettenreaktion (Englisch: polymerase chain reaction, PCR). Je nach Virustyp kommen unterschiedliche Verfahren zum Einsatz. RNA-Viren erfordern eine vorgelagerte Reverse Transkription (RT), bei der die virale RNA in komplementäre DNA (Englisch „complementary“ cDNA) umgeschrieben wird. Dieser Schritt kann in einem kombinierten One-Step- oder einem zweistufigen Two-Step-Verfahren erfolgen. RNA ist im Abwasser besonders anfällig gegenüber Abbau und Inhibitoren, weshalb die RT ein kritischer Teil des Nachweises ist. Geeignete Inhibitionskontrollen (z. B. externe RNA-Standards) sind daher obligatorisch. DNA-Viren können hingegen direkt mittels PCR nachgewiesen werden. Sie sind im Allgemeinen stabiler in der Umwelt und weniger störanfällig in der Analytik, was jedoch die Mitführung geeigneter Positiv- und Negativkontrollen nicht ersetzt. Für die Quantifizierung werden üblicherweise (RT)-qPCR (relative Quantifizierung mit Hilfe von Standardkurven) oder digitale (RT)-

PCR-Verfahren (dPCR, ddPCR) eingesetzt. Letztere ermöglichen eine absolute Quantifizierung ohne Standardkurven, was insbesondere für komplexe Umweltmatrices vorteilhaft sein kann.

Unabhängig vom Virustyp sind für eine belastbare Datenbasis folgende Grundsätze einzuhalten:

- Geeignete Positiv- und Negativkontrollen zur Erkennung falsch-positiver oder falsch-negativer Ergebnisse sind mitzuführen.
- Bei (RT)-qPCR soll die Analyse der Proben mindestens in technischer Duplikation erfolgen.
- Nachweisgrenzen (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) sind zu berücksichtigen und zu dokumentieren.
- Die Ergebnisse sollen in standardisierter Form berichtet werden, in der Regel als „Genomkopien pro Liter Abwasser“.

Die Auswahl geeigneter Zielregionen im Genom sowie die Validierung der eingesetzten Assays obliegt generell den Laboren. Im Sinne einer einheitlichen Verfahrensweise wird jedoch die Verwendung der in Anhang 2 aufgeführten Oligonukleotide empfohlen.

3.6 Qualitätskontrolle der PCR-Messergebnisse

Die Qualitätssicherung in der molekularbiologischen Analytik erfordert den Einsatz geeigneter Kontrollen, um falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse zu vermeiden und die Vergleichbarkeit zwischen Laboren sicherzustellen. Wesentliche Elemente sind:

- 1) Prozesskontrollen, d.h. mitgeführte Surrogatviren oder Nukleinsäuren zur Überprüfung der Effizienz von Aufkonzentrierung und Extraktion.
- 2) Interne Amplifikationskontrollen, d.h., Marker, die ubiquitär im Abwasser vorkommen (z. B. fäkale Bezugsviren wie der Darm-assoziierte Bakteriophage CrAssphage oder das Pflanzenvirus Pepper-Mild-Mottle Virus (PMMoV). Diese dienen zur Beurteilung von (RT)-PCR-Inhibition und Datenqualität.
- 3) Positiv- und Negativkontrollen, welche in jeder (RT)-PCR-Laufserie obligatorisch sind, um unspezifische Signale oder Kontaminationen zu erkennen.
- 4) Replikate - mindestens technische Duplikate bei (RT)-(qPCR oder ausreichende Partitionen bzw. Droplets bei (RT)-dPCR/ und (RT)-ddPCR - gewährleisten die statistische Belastbarkeit.



Im Rahmen einer Messreihe für einen Kläranlagenstandort dürfen sowohl die Probenahme, die Aufkonzentrierungsmethoden als auch die nachfolgenden Detektionsmethoden nicht signifikant verändert werden, um die einzelnen Messwerte der Kläranlage über die Zeit vergleichen zu können. Sollte eine Änderung der Methoden zwingend notwendig sein, so ist dies über das Stammdatenblatt Labor zu übermitteln, sowie eine Information per Mail (abwassersurveillance@uba.de) versenden (siehe Abschnitt 4 Datenübermittlung).

4 Datenübermittlung

Dieser Abschnitt erläutert die Übermittlung der generierten Daten auf elektronischem Wege mittels des PiA-Monitors. Für die Abwassersurveillance sind einheitliche und qualitätsgesicherte Daten maßgebend. Hierzu werden die erfassten Daten der Kläranlagen, der Labore und die Monitoringdaten in vorgegebenen Datenblätter übermittelt (siehe Übersicht in Abbildung 1). Weiterhin werden in diesem Abschnitt die Verantwortlichkeiten der Datenübermittlung beschrieben.

4.1 Allgemeine Hinweise

Die Datenbank PiA-Monitor in der alle notwendigen Daten für die Virusnachweise in Abwasserproben zusammengetragen sind, ist über eine Web-Anwendung (<https://app.pia-monitor.de/>) erreichbar. Der Import der Monitoringdaten ist entweder unmittelbar über die Web-Anwendung oder eine Programmierschnittstelle (API) möglich. Zur Datenübermittlung über die Web-Anwendung sind spezifische Templates (Excel, CSV) zu verwenden. Diese können beim UBA angefragt werden oder stehen über das Hilfe-Wiki zur Web-Anwendung zum Download zur Verfügung (<https://wiki.pia-monitor.de/de/Datenimport>). Die zu verwendenden Datenformate sind innerhalb des Daten-Templates festgelegt. Die Struktur der Templates darf nicht verändert werden, da bereits bei der Datenübermittlung eine erste Plausibilitätsprüfung der Daten erfolgt. Zur Nutzung der Import-API, ist ein Import-Authentication-Token notwendig. Dieser kann entweder über das UBA oder direkt beim technischen Support angefordert werden. Eine Beschreibung der Import-API ist im Hilfe-Wiki zur Web-Anwendung hinterlegt.

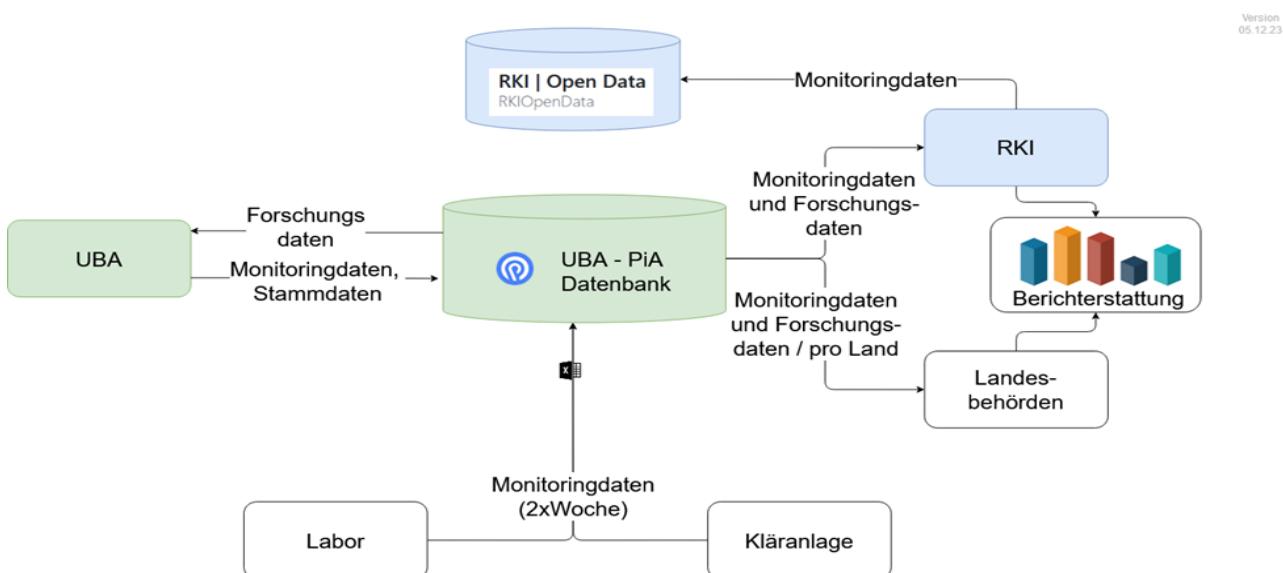


Abbildung 1: Datenfluss in AMELAG

4.2 Datenblätter

In den Datenblättern ist ein Teil der zu übermittelnden Daten als Pflichtfelder ausgelegt, ein Teil als optional auszufüllende Felder. Eine Erläuterung dazu sowie zu den Parametern der Plausibilitätsprüfung ist unmittelbar in der Excel-Version des Monitoring-Templates und im Hilfe-Wiki (<https://wiki.pia-monitor.de/de/Datenimport>) hinterlegt.

Neben den Monitoringdaten werden Stammdaten zu den Kläranlagen und den Laboren erhoben. Die Bereitstellung dieser Stammdaten durch die Labore und Betreiber sowie das Einpflegen dieser

Informationen in die Datenbank (erfolgt durch UBA) sind Voraussetzung für den Import von Monitoringdaten:

Stammdatenblatt Kläranlage: In diesem werden die unveränderlichen Parameter der Kläranlage abgefragt. Dazu gehören u.a.:

- EU Identifikation-Code der Kläranlage (DEPT Schlüssel nach Berichterstattung UWWTD (KommunalabwasserRL), vorausfüllbar durch UBA sofern nicht bekannt)
- Kontaktdaten Kläranlage
- Ausbaugröße, angeschlossene Einwohnerzahl
- Zusammensetzung Abwassermenge (Gesamt, Indirekteinleiter, Anteil Fremdwasser)
- Information zu Probenahmestelle, Probenehmer
- Volumen der Einzelprobe

Weitere Erläuterungen der Parameter finden sich in der Excel-Version des Stammdaten-Templates im Reiter „Beschreibung“. Das Stammdatenblatt wird zum Beginn der Abwasserüberwachung einmalig an das UBA übermittelt, oder erneut aktualisiert, wenn sich technische Daten signifikant ändern.

Stammdatenblatt Labor: In diesem werden die unveränderlichen Parameter des Labors abgefragt. Dazu gehören u.a.:

- Identifikation-Code des Labors (Festlegung durch das UBA)
- Kontaktdaten Labor
- Verwendete PCR Methode, analysierte Gensequenzen
- Anzahl Replikate und Kontrollen, Standards
- Verwendete Konzentrierungsmethode
- eingesetztes Abwasservolumen für die Konzentrierung
- eingesetztes Volumen RNA/Nukleinsäureextrakt in der PCR
- eingesetztes PCR-Kit (inkl. Hersteller)

Weitere Erläuterungen der Parameter finden sich in der Excel-Version des Stammdaten-Templates im Reiter „Beschreibung“. Das Stammdatenblatt wird zum Beginn der Abwasserüberwachung einmalig an das UBA übermittelt. Wenn sich der Laborablauf der Analytik signifikant ändert, oder wenn sich das untersuchende Labor ändert, sind die Laborstammdaten zu aktualisieren.

Monitoringdaten: Die Monitoringdaten zu den Pathogenen werden mit der Zuordnung zum Standort (Kläranlage) und dem untersuchenden Labor übermittelt, hinzu kommen Daten zur Qualitätskontrolle der Arbeitsabläufe. Dazu gehören Informationen zur Probenahme am jeweiligen Standort, u.a.:

- Kläranlage Standort (DEPT Schlüssel, Name)
- Tag / Uhrzeit der Probenahme, Volumen der Probe
- Mittlerer Volumenstrom im Zeitraum der Probenahme
- pH-Wert, Leitfähigkeit, Temperatur, abfiltrierbare Stoffe

und Daten der Laboranalytik, u.a.:

- Labor ID, Proben ID
- Temperatur bei Ankunft im Labor, Zeitpunkt Beginn Probenaufbereitung
- Detektierte Genkopien der verschiedenen Viren, Bestimmungsgrenzen
- Detektierte Genkopien Surrogatviren (PMMoV, CrAssphage)

Der Datenimport kann für eine beliebige Anzahl an Proben und Kläranlagen gleichzeitig erfolgen. Datenkorrekturen nach erfolgtem Datenimport sind in einem begrenzten Rahmen möglich:

- Löschen eines aktuelle Importvorgangs/einer Importdatei sofern die Daten noch nicht an RKI berichtet wurden,
- Korrektur von Begleitparametern und
- Reimport bereits älterer Daten auf Anfrage (bei UBA und RKI).

Eine Beschreibung der Korrektur- bzw. Reimportmöglichkeiten findet sich im Hilfe-Wiki zur Web-Anwendung (<https://wiki.pia-monitor.de/>).

4.3 Verantwortlichkeiten

Je nach Ablauf in einem Bundesland kann die Verantwortlichkeit für die Datenübermittlung direkt bei der zentralen Bundeslandstelle liegen oder auch bei den einzelnen Kläranlagen/ Laboren (dezentrale Lösung).

Im Falle einer zentralen Verantwortung bei einer Bundeslandstelle, ist es der Bundeslandstelle freigestellt, in welcher Form sie die Daten von Kläranlage/n und Labor/en erhält, um sie anschließend entweder mittels Datenblatt direkt über die Anwendung oder über die Import-API in die UBA-Datenbank zu importieren.

Im Falle einer dezentralen Lösung ist der jeweilige Datenfluss und die Datenbereitstellung von der jeweiligen Kläranlage/ dem jeweiligen Labor im Vorfeld zu klären. Im Falle der Beteiligung der Kläranlage an der Bundesanalytik übermittelt die Kläranlage ihre Daten mit Hilfe des Datenblattes an das Labor der Bundesanalytik. Das Labor übernimmt die Übermittlung der Monitoringdaten in die UBA-Datenbank.

Jederzeit und uneingeschränkt können die jeweils übermittelnden Partner ihre Daten einsehen und für eigene Zwecke nutzen.

Die Zugangsdaten zum PiA-Monitor sowie die spezifischen Datenblätter werden auf Anfrage an das UBA bereitgestellt (abwassersurveillance@uba.de). Damit verbunden ist auch ein Zugang zum Hilfe-Wiki und zur Beschreibung der Web-Anwendung, der Importdaten und der Importmöglichkeiten.

Die Daten sind regelmäßig und zeitnah zu übermitteln.

5 Datenverarbeitung

Dieser Abschnitt beschreibt die Verfahren zur Datenqualitätsprüfung, der Datenberechnung sowie der statistischen Analysen im Rahmen der Abwassersurveillance. Diese Schritte werden durch UBA und RKI durchgeführt.

5.1 Einleitung

Der Rohabwasserzufluss zu Kläranlagen unterliegt tageszeitlichen, wochentagsbedingten sowie auch jahreszeitlichen Schwankungen. Hinzu kommen Änderungen des Zuflusses durch kontinuierliche oder diskontinuierliche Indirekteinleiter, Fremd- und Niederschlagswasser. Diese Veränderungen im Volumenstrom haben eine Verdünnung der jeweiligen Untersuchungsparameter zur Folge und beeinflussen so auch die Gehalte von Genfragmenten verschiedener Viren.

Eine Normalisierung kann gegebenenfalls die Schwankungen in den Rohdaten ausgleichen. Allerdings zeigte die Auswertung langer Zeitreihen in AMELAG, dass eine Normalisierung für SARS-CoV-2 keine allgemeine Verbesserung der Datenqualität erzielte (Saravia et al. 2024). Die Normalisierung von SARS-CoV-2 mit dem mittleren Volumenstrom zum Zulauf der Kläranlage wurde deshalb zum 01.08.2025 beendet. Somit werden aktuell ausschließlich nicht normalisierte Daten ausgewertet. Normalisierte Daten werden aber weiterhin zur Verfügung gestellt, siehe Abschnitt 5.3. Die Daten von Influenzaviren und RSV werden aktuell ebenfalls nicht normalisiert, da sich keine verbesserte Datenqualität durch Normalisierung feststellen ließ. Weitere Normalisierungsmethoden (z.B. mit fäkalen Bezugsviren oder chemischen Humanmarkern) werden in AMELAG untersucht, finden aktuell aber keine Anwendung in der Ergebnisdarstellung.

Gemessene Viruslasten im Abwasser weisen in der Regel eine hohe Variation über die Zeit auf, sodass Trendberechnungen nicht auf den gemessenen (evtl. normalisierten) Messwerten basieren, sondern auf geglätteten Messwerten. Für die Glättung der Messwerte existieren verschiedene statistische Verfahren.

5.2 Verrechnung der PCR-Daten

Für SARS-CoV-2 werden in der Verarbeitung der Daten nur Proben berücksichtigt, die auf mindestens zwei unterschiedliche Genfragmente analysiert wurden, um falsch-positive Befunde auszuschließen. Liegen nicht zwei Messwerte, d.h. Werte für mindestens zwei Genfragmente vor, wird die Probe generell aus der weiteren Auswertung ausgeschlossen und als „nicht bestimmt“ gekennzeichnet.

Die Bestimmungsgrenzen der jeweils angewendeten Methoden werden bei der Datenübermittlung für die jeweiligen Genfragmente abgefragt.

Liegen die Messwerte oberhalb der Bestimmungsgrenze (BG) / Limit of Quantification (LOQ), erfolgt die weitere Auswertung wie unten beschrieben.

Liegt ein Messwert unterhalb der BG, wird der Wert durch $0,5 * BG$ ersetzt und so für die weiteren Analysen genutzt.

Aus (mindestens) zwei vorliegenden Werten für Genfragmente wird aktuell ein geometrisches Mittel errechnet:

$$\text{Gene gemittelt} = \sqrt[n]{x_1 * x_2 * \dots * x_n}$$

mit x_1, x_2, \dots, x_n : Genkopien/L je Genkonzentration

5.3 Normalisierung der PCR-Daten

Die Rohdaten der in AMELAG untersuchten Viren werden aktuell für die Auswertungen im AMELAG-Wochenbericht nicht normalisiert, da sich keine verbesserte Datenqualität durch die Normalisierung feststellen ließ, es werden jedoch auch normalisierte Daten für SARS-CoV-2 auf https://github.com/robert-koch-institut/Abwassersurveillance_AMELAG zur Verfügung gestellt.

Für die Normalisierung der Daten wurde der Trockenwetterzufluss der Kläranlage als Referenz verwendet. Der Trockenwetterzufluss ist der Volumenstrom, welcher weder durch Niederschlagsereignisse noch Tauwetter beeinflusst ist.

Bei der zuvor verwendeten Normalisierungsmethode wurde das Verhältnis aus Volumenstrom im Zulauf bezogen auf den Probenahmezeitraum ($Q_{KA, \text{aktuell}}$) und dem Trockenwetterzufluss gebildet und anschließend mit dem geometrischen Mittel der vorliegenden PCR-Messwerte (*Gene gemittelt*) multipliziert. Zur Bestimmung des Trockenwetterzuflusses wurde der Median aller bisher übermittelten Werte des Volumenstroms im Zulauf der Kläranlage ($Q_{KA, \text{median}}$) verwendet.

Auf Grundlage der beschriebenen Annahmen wurde der normalisierte Wert wie folgt berechnet:

$$\text{Gene normalisiert} = \frac{Q_{KA, \text{aktuell}}}{Q_{KA, \text{median}}} * \text{Gene gemittelt}$$

mit $Q_{KA, \text{aktuell}}$: Volumenstrom der Kläranlage im Probenahmezeitraum;

$Q_{KA, \text{median}}$: Median des Volumenstroms der Kläranlage

5.4 Statistische Analysen

Für einen Erreger in der Abwassersurveillance werden für jeden Standort geglättete Werte für eine Ausgleichskurve mittels eines generalisierten additiven Modells (GAM) mit adaptiver Glättung berechnet. Diese Berechnung erfolgt auf Basis der logarithmierten Viruslasten im Abwasser. Die adaptive Glättung ermöglicht es, dass der Glätte der Kurve im Laufe der Zeit variiert. Das bedeutet, dass das Verfahren automatisch mehr Flexibilität für Zeiträume zuweisen kann, in denen die Daten komplexe Muster aufweisen, und weniger Flexibilität für Zeiträume, in denen die Daten wenig variabel sind. Die Stärken der Glättung werden für jede Standort-Labor-Kombination mit Hilfe des Kreuzvalidierungskriteriums so festgelegt, dass die Vorhersagegüte der Kurve optimiert wird. Die dahinter ist, eine Balance zwischen einer hohen Anpassung der GAM-Kurve an die vorliegenden Daten und einer geringen Variabilität der GAM-Kurve, also einer möglichst glatten Kurve, zu finden.

Daraus ergibt sich für jeden Standort eine glatte Kurve und für jeden Zeitpunkt (auch zwischen den Messzeitpunkten) eine vorhergesagte Viruslast. Punktweise Konfidenzbänder werden dann mittels der t-Verteilung berechnet.

Um neben den einzelnen Standorten einen deutschlandweiten Verlauf der Viruslast eines Erregers im Abwasser zu erhalten, werden die Zeitreihen der Standorte aggregiert. Dazu wird zunächst der Mittelwert über die über eine Woche gemittelten logarithmierten Messwerte der einzelnen Standorte berechnet. Dann wird für jeden Standort für jede Woche die Differenz vom Wochenmittelwert über alle Standorte dieser Woche berechnet. Für jede Standort-Labor-Kombination wird der Mittelwert über diese Differenzen über alle Wochen gebildet, um diesen Mittelwert danach von den ursprünglich gemessenen Werten abzuziehen. Dadurch wird für mittlere

Unterschiede in den Viruslasten zwischen unterschiedlichen Standort-Labor-Kombinationen adjustiert. Abschließend wird in jeder Woche, in der für mindestens 20 Standorte Messwerte vorliegen, der Mittelwert über diese adjustierten Werte berechnet. Dabei wird nach den angeschlossenen Einwohnern der Kläranlage gewichtet. Die entstehende Zeitreihe wird ebenfalls mit einer GAM-Regression, wie oben beschrieben, geglättet.

5.5 Software

Die Verarbeitung der PCR Daten erfolgt in einer Browser-basierten Webanwendung: Pathogene im Abwasser (PiA; <https://app.pia-monitor.de>). Die Anwendung umfasst auch eine automatisierte Qualitätskontrolle der zu importierenden Daten. Die Login-Daten für die Anwendung und eine Beschreibung der Anwendung ist gesondert anzufordern.

Das für die Trendberechnung verwendete GAM-Verfahren ist in Statistiksoftwarepaketen wie R implementiert. Der in AMELAG verwendete Software-Code ist unter https://github.com/robert-koch-institut/Abwassersurveillance_AMELAG/ einsehbar.

6 Abkürzungen

AICc	Korrekturfaktor des Akaike-Kriteriums
AMELAG	Abwassermonitoring zur epidemiologischen Lagebewertung
API	Application Programming Interface, in etwa: Programmierschnittstelle
BG	Bestimmungsgrenze
BMG	Bundesministerium für Gesundheit
CDC	Center for Disease Control, zentrale Gesundheitsbehörde der USA
cDNA	Complementary DNA, komplementäre DNA
DGUV	Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung
dPCR	Digitale Polymerasekettenreaktion
KA	Kläranlage
LOESS	Locally Estimated Scatterplot Smoothing
LOD	Limit of Detection, Nachweisgrenze
LOQ	Limit of Quantification, Bestimmungsgrenze
PEG	Polyethylenglycol
PiA	Pathogene im Abwasser
PMMoV	Pepper Mild Mottle Virus
Q	Zufluss (hier: zur Kläranlage)
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
RKI	Robert Koch-Institut
RSV	Respiratorische Synzytialvirus
RT	Reverse Transkription
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
UBA	Umweltbundesamt
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation

7 Weitere Informationen

Kontakt	Umweltbundesamt, abwassersurveillance@uba.de Robert Koch-Institut, abwassersurveillance@rki.de
Websites	<u>https://www.umweltbundesamt.de/amelag</u> <u>https://www.rki.de/abwassersurveillance</u>
Danksagung	Die Inhalte des Technischen Leitfadens entstanden in Zusammenarbeit mit den beteiligten Laboren und Expertinnen und Experten des AMELAG Projektes.
Finanzierung	Das BMG fördert das Abwassermanagement im Rahmen des Vorhabens "Abwassermanagement für die epidemiologische Lagebewertung (AMELAG)".
Weitergehende Literatur	<p>Markt R, Mayr M, Peer E, Wagner AO, Lackner N, Insam H. Detection and Stability of SARS-CoV-2 Fragments in Wastewater: Impact of Storage Temperature. <i>Pathogens</i>. 2021 Sep 18;10(9):1215. doi: 10.3390/pathogens10091215.</p> <p>Marquar N, Pütz P, Buchholz U, Exner T, Fretschner T, Greiner T, Helmrich M, Lukas M, Marty M, Obermaier N, Saravia Arzabe C, Schattschneider A, Schneider B, Selinka H-C, Ullrich A, Walter B, Braun U., Schumacher J (2024). SARS-CoV-2-Abwassersurveillance in Deutschland im Rahmen des Projekts AMELAG. <i>Epidemiologisches Bulletin</i> 34:16-26.</p> <p>Saravia CJ, Pütz P, Wurzbacher C, Uchaikina A, Drewes J, Braun U, Bannick CG, Obermaier N. Wastewater-based Epidemiology: Deriving a SARS-CoV-2 Data Validation Method to Assess Data Quality and to Improve Trend Recognition. <i>Frontiers in Public Health</i> 2024, 12:1497100.</p> <p>Schattschneider A, Greiner T, Beyer S, Hans J, Correa Martinez C, Eckmanns T, Diercke M, Schumacher J (2024). Abwasser enthält Informationen für die öffentliche Gesundheit: Mögliche Anwendungen für eine Abwassersurveillance. <i>Epidemiologisches Bulletin</i> 34:3-15.</p>

8 Anhang

8.1 Anhang 1: Leistungsbeschreibung Probenehmer

Es gelten die Anforderungen aus EN 16479, im Besonderen:

Technische Anforderungen (erforderlich)

Vollautomatischer, stationärer Probenehmer zur diskontinuierlichen zeit- und mengenproportionaler Probenahme

Eignung für den Außenbetrieb

Probentemperierung bei einstellbarer Innenraumtemperatur (Umgebungstemperaturen von -20°C bis +40°C)

Druck-Vakuum-Probenahmesystem mit Dosiergefäß für variable Einzelproben von mindestens 50 mL - 200 mL

Das kleinste Probennahmeintervall muss mindestens 5 min betragen

Platz für mindestens 12 x 2 l Flaschen oder mindestens 20 l Einzelgefäß

Technische Anforderungen (wünschenswert)

Eignung zur durchflussproportionaler Probenahme

GSM-Modem, Fernsteuerung, SMS und Programmstart per Mobiltelefon bzw. Vollzugriff auf Probenehmersoftware per PC/Notebook

X-Y-Verteiler zum direkten Abdosieren der Probe in die Probenflasche mit freier Eingabe von beliebigen Flaschenpositionen direkt an der Steuerung

Türkontakt gekoppelt mit der Steuerung (beim Öffnen der Tür soll das Programm unterbrochen werden und der X-Y-Verteiler in eine Parkposition zur Entnahme der Probenflaschen fahren)