

Abwasserbasierte Epidemiologie und Surveillance am Beispiel des Nachweises von  
SARS-CoV-2 aus Krankenhausabwasser:

Etablierung der absoluten Quantifizierung mittels digital-PCR

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Basten, Peter Karl  
aus Mönchengladbach

Gießen 2025

**Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Institut für Hygiene und Umweltmedizin

Gutachter: Prof. Dr. Eugen Domann

Gutachter: Prof Dr. Volker Achim Winstel

Tag der Disputation: 08.12.2025

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
1.1	Ausbruch einer Pandemie .....	1
1.2	Aufbau des SARS-CoV-2 .....	2
1.3	Die Nomenklaturen des Virus.....	3
1.4	Übertragungswege.....	4
1.5	Infektion der menschlichen Zelle .....	5
1.6	Die COVID-19-Erkrankung.....	7
1.7	Abwasserbasierte Surveillance - Baustein zur Eindämmung von Erkrankungen .....	10
1.8	Ziele .....	14
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	15
2.1	Sicherheitsmaßnahmen und Sterilitätsbedingungen.....	15
2.2	Chemikalien .....	15
2.3	Verbrauchsmaterialien .....	16
2.4	Geräte.....	16
2.5	Software.....	17
2.6	Laborspezifische Begriffe .....	18
2.7	Probengewinnung .....	19
2.8	Polyethylenglykol Fällung.....	19
2.9	RNA Extraktion und DNase- Verdau .....	20
2.10	Transkription der RNA in cDNA.....	22
2.11	Qubit™-Konzentrationsbestimmung der cDNA.....	22
2.12	Allgemeiner SARS-CoV-2 Nachweis mit dem EvaGreen PCR Kit/ Versuche mit cDNA aus der umgeschriebenen RNA.....	23
2.12.1	Funktionsweise von QIAcuity® One und EvaGreen PCR Kit .....	23
2.12.2	Thermocycling.....	25
2.12.3	Imaging .....	26
2.12.4	Herstellung der Kontrollen .....	29
2.12.4.1	Transformieren und Isolieren der Plasmide .....	31
2.12.4.2	Linearisierung der Plasmid-DNA .....	31
2.12.4.3	Transkription der linearisierten DNA in RNA.....	32
2.12.4.4	Template-DNA Entfernung durch DNase-Verdau .....	33
2.12.4.5	RNA-Aufreinigung nach DNase-Verdau .....	33
2.12.4.6	Transkription der gereinigten RNA in cDNA für das QIAcuity® EG PCR Kit .....	35
2.12.5	Primer QIAcuity® EG PCR Kit für den allgemeinen SARS-CoV-2 Nachweis .....	35
2.12.6	Etablierung der Kontrollen des molekularen Nachweises .....	39

2.12.7	Versuch zum Nachweis von SARS-CoV-2 im Abwasser .....	40
2.13	Variantennachweis mit dem QIAcuity® One- Step Viral RT- PCR Kit .....	41
2.13.1	Funktionsweise QIAcuity® One und One-Step Viral RT-PCR Kit mit Primer/ Tagman-Sonden .....	41
2.13.2	Thermocycling und Imaging .....	42
2.13.3	Etablierung der Positiv- und Negativkontrollen des molekularen Nachweises.....	43
2.13.4	Primer .....	46
2.13.5	Nachweis der Omikron-Variante im Abwasser.....	49
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>50</b>
3.1	Etablierung der Plasmide als Kontrollen .....	50
3.1.1	Berechnung der Plasmidkonzentrationen .....	50
3.1.2	Etablierung der Kontrollen für den allgemeinen SARS-CoV-2 Nachweis mit dem QIAcuity® EvaGreen PCR Kit.....	51
3.1.3	Etablierung der Kontrollen für den Variantennachweis mit dem QIAcuity® One-Step Viral RT-PCR Kit .....	52
3.2	Konzentrationsbestimmung der cDNA aus der extrahierten und umgeschriebenen total RNA .....	54
3.3	Nachweis von SARS-CoV-2.....	56
3.4	Variantennachweis der „Variant of Concern“ Omikron.....	60
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>62</b>
4.1	Etablierung der Kontrollen .....	62
4.1.1	Interpretation.....	62
4.1.2	Vergleich .....	62
4.1.3	Limitationen.....	65
4.1.4	Schlussfolgerungen.....	65
4.2	Genereller Virusnachweis .....	65
4.2.1	Interpretation.....	65
4.2.2	Vergleich .....	65
4.2.3	Limitationen.....	72
4.2.4	Schlussfolgerungen.....	73
4.3	Variantennachweis Omikron.....	74
4.3.1	Interpretation.....	74
4.3.2	Vergleich .....	75
4.3.3	Limitationen.....	77
4.3.4	Schlussfolgerungen.....	78
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>80</b>
6	Summary.....	82
7	Abkürzungsverzeichnis .....	84
8	Tabellenverzeichnis.....	85
9	Abbildungsverzeichnis.....	86

## Inhaltsverzeichnis

---

10	Literaturverzeichnis .....	88
11	Anhang.....	99
12	Ehrenwörtliche Erklärung .....	161
13	Danksagung.....	162

## **Abwasserbasierte Epidemiologie und Surveillance: Nachweis von SARS-CoV-2 aus Krankenhausabwasser – Etablierung der absoluten Quantifizierung mittels digital-PCR**

### **1 Einleitung**

#### **1.1 Ausbruch einer Pandemie**

Die Ausbreitung der COVID-19-Erkrankung wurde ab dem 11. März 2020 durch die Weltgesundheitsorganisation zur Pandemie erklärt. Erreger dieser Erkrankung ist das Corona-Virus SARS-CoV-2 (Weltgesundheitsorganisation 2023a). Das Leben vieler Teile der Weltbevölkerung wurde seither durch die COVID-19-Pandemie beeinflusst. Der erste deutsche Patient wurde am 27. Januar 2020 im Landkreis Starnberg, Bayern, registriert (Bundesministerium für Gesundheit 2023). Konkrete Einschränkungen im Alltag wurden für die meisten Bundesbürger ab dem 23. März 2020 spürbar, nachdem das Kabinett der Bundesregierung den initialen „Entwurf eines Gesetzes zum Schutz der Bevölkerung bei einer epidemischen Lage von nationaler Tragweite“ verabschiedete (Bundesministerium für Gesundheit 2020). Das darin enthaltene Maßnahmenpaket wurde beschlossen, um der pandemischen Entwicklung in Deutschland entgegenzutreten. Von da an wurden verschiedenste Beschränkungen dynamisch dem Pandemieverlauf in Deutschland angepasst und entweder verschärft oder gelockert (Bundesministerium für Gesundheit 2023). Trotz aller Bemühungen sind bei der Weltgesundheitsorganisation 174.979 Menschen registriert (Stand August 2023), die an oder mit einer SARS-CoV-2-Infektion gestorben sind (Bundesministerium für Gesundheit 2020). Die Weltgesundheitsorganisation hat am 05. Mai 2023 die „gesundheitliche Notlage internationaler Tragweite“ aufgehoben, aber darauf verwiesen, dass die Pandemie noch nicht beendet sei (Stand August 2023) (Weltgesundheitsorganisation 2023b). Diese Datenlage begründet die näheren Untersuchungen von SARS-CoV-2 in der hier vorliegenden Forschungsarbeit.

Bei dem ursprünglich als 2019-nCoV bezeichneten, und später von der „Coronaviridae Study Group (CSG) of the International Committee on Taxonomy of Viruses“ als SARS-CoV-2 benannten, Virus handelt es sich um ein neuartiges Corona-Virus. SARS-CoV-2 steht hier als Akronym für die vom Coronavirus verursachte Erkrankung, dem „Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Coronavirus 2“. Die Zwei am Ende des Namens verweist darauf, dass es sich hier um eine Schwesterklade des 2003 entdeckten SARS-CoV handelt (Gorbalenya et al. 2020).

## 1.2 Aufbau des SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 gehört zu den membranumhüllten Viren mit einer einzelsträngigen, positiven und nicht segmentierten RNA (+SS RNA). Das Genom umfasst in etwa 30.000 Basen und ist von einem Nukleokapsid-Protein (N-Protein) umhüllt. Auf der Oberfläche des Virus befinden sich mehrere Oberflächenglykoproteine. Zu denen gehört das Spike-Protein (S-Protein), welches durch seine Morphologie dem Virus in einer zweidimensionalen Aufnahme das „kronenähnliche“ Aussehen verleiht. Zu den Oberflächenglykoproteinen gehören das Envelope-Protein (E-Protein) und das Membran-Protein (M-Protein) (Fehr et al. 2015). Das Virus hat einen Durchmesser von 80-140 nm. Ein wichtiger Unterschied zu SARS-CoV ist, dass sich auf der Oberfläche von SARS-CoV-2 dreißig Prozent weniger Spike-Proteine befinden (Laue et al. 2021). Durch Änderungen des Erbguts existieren Unterschiede zwischen einzelnen Varianten. Diese können alle Strukturen des Virus betreffen. In der Regel verändern Variationen nicht automatisch die Eigenschaften des Virus, können dies allerdings, sobald sie an bestimmten Stellen der Virusbestandteile auftreten (Weltgesundheitsorganisation 2023c). So ist das Spike-Oberflächenprotein ein häufiger Ort für Mutationen, welche die Eigenschaften des Virus beeinflusst. Evolutionär setzen sich dann Varianten durch, die eine höhere Transmissibilität, also eine höhere Übertragbarkeit, aufweisen (Korber et al. 2020). Die Konformationsänderung des Spike-Oberflächenproteins erlaubt dem Virus eine bessere Bindung an den ACE2-Rezeptor. So kann das Virus besser in die Wirtszelle eindringen (Yurkovetskiy et al. 2020).

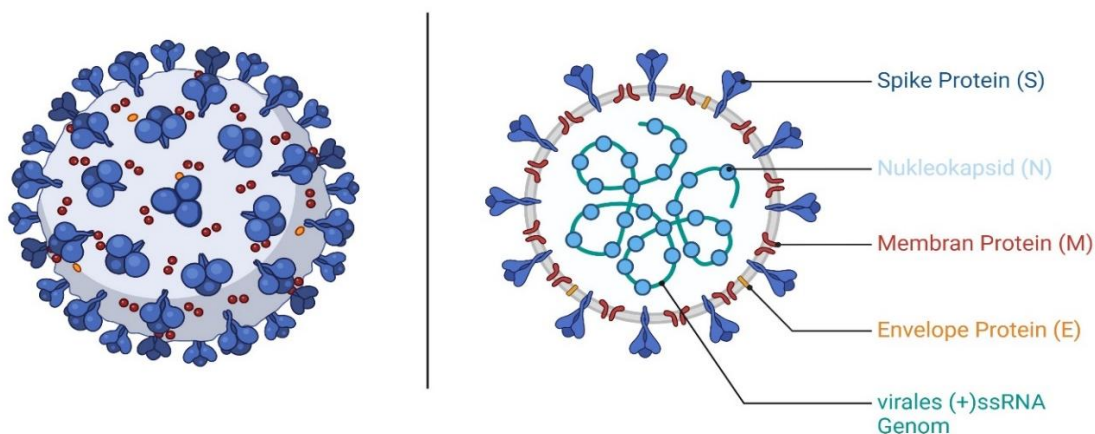


Abbildung 1: Modifizierte Vorlage von Jerry Gu des schematischen Aufbaus SARS-CoV-2 mit den wichtigsten Strukturen. (Bergmann et al. 2020). Gegenüberstellung von SARS-CoV-2 in einer dreidimensionalen und zweidimensionalen Form. Erstellt mit BioRender.com.

### 1.3 Die Nomenklaturen des Virus

Um Varianten und Abstammungen besser zu verfolgen und Sequenzierungsdaten besser in Verbindung zueinander zu setzen, wurde 2020 die Nomenklatur und das Softwaretool „Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak Lineages“ (PANGOLIN) eingeführt (Rambaut et al. 2020). Es liegen noch zusätzliche Nomenklaturen für die Benennung und Klassifizierung von SARS-CoV-2 Viren vor. Weitere Nomenklaturesysteme, die sich ebenfalls auf die Erbinformation des Virus beziehen und so phylogenetische Zusammenhänge herstellen können, sind die des „Global Initiative on Sharing All Influenza Data“ (GISAID) (Khare et al. 2021) und Nextstrain (Bedford et al. 2021). Diese Nomenklaturen bestehen aus Buchstaben- und Zahlenkombinationen. Leider können leicht Verwechslungen und Unklarheiten entstehen, besonders wenn in einer Pandemie auch Entscheidungsträger, die keine wissenschaftliche Vorbildung genossen haben, wissen müssen, um welche Variante es sich handelt. Darum musste eine verständlichere Nomenklatur gefunden werden, die neben den oben genannten Systemen existiert. Zudem fehlten in den bisherigen Nomenklaturen Charakteristika wie beispielsweise Infektiösität und Krankheitsschwere der infizierten Individuen durch das entsprechende Virus. Ab Mai 2021 hat die Weltgesundheitsorganisation sich dazu entschlossen „Variants of Interest“ (VOI) und „Variants of Concern“ (VOC) zu benennen. Diese sollten dann auch die oben beispielhaft genannten Charakteristika widerspiegeln. Die entsprechenden Viruskladen wurden dann mit den Wörtern für die Buchstaben des griechischen Alphabets benannt. (Konings et al. 2021; Weltgesundheitsorganisation 2023d). „Variants of Interest“ sind wie folgt definiert: „SARS-CoV-2-Varianten, über deren genetische Veränderungen man annimmt oder weiß, dass sie die Übertragbarkeit, Virulenz oder Immunevasion, welche die therapeutischen sowie die diagnostischen Qualitäten beeinträchtigen, beeinflussen. Weiterhin müssen diese Varianten Überlegenheiten gegenüber aktuell zirkulierenden Varianten aufweisen, die in mehr als einer geografischen Region auftreten, in welcher es im zeitlichen Verlauf eine wachsende Prävalenz sowie eine steigende Anzahl an Fällen gibt. Oder es lässt sich anderweitig ein epidemiologischer Einfluss ableiten, welcher als Risikofaktor für die globale Gesundheit betrachtet werden kann“ (Weltgesundheitsorganisation 2023c). Als „Variant of Concern“ wird eine SARS-CoV-2-Variante benannt, welche sowohl die Kriterien einer „Variant of Interest“ erfüllt, als auch zusätzliche Kriterien. Darunter fallen: „Zunahme der allgemeinen Krankheitsschwere, oder Veränderungen der COVID-19-Epidemiologie in einer Art, wie Gesundheitssysteme überlasten werden. COVID-19-Patienten sowie Patienten mit anderen Erkrankungen können nicht mehr ausreichend versorgt werden. Dadurch werden Interventionen notwendig. Oder es

wird eine abnehmende Wirksamkeit der verfügbaren Impfstoffe beobachtet“ (Weltgesundheitsorganisation 2023c). Seit dem 15. März 2023 ist diese Nomenklatur allerdings nur noch den „Variants of Concern“ vorbehalten. (Weltgesundheitsorganisation 2023c).

Nachfolgend wird in dieser Arbeit die PANGOLIN-Nomenklatur verwendet, wenn spezifische Untervarianten der einzelnen „Variants of Concern“, beispielsweise Omikron, beschrieben werden. Ansonsten werden die „Variants of Concern“ nach der WHO-Nomenklatur nach dem griechischen Alphabet benannt. Die wichtigsten Varianten sind hier der Vollständigkeit halber aufgeführt zusammen mit den zugehörigen PANGOLIN-Bezeichnungen. Dies soll noch einmal hervorheben, dass alle Nomenklaturen auch die „Variants of Concern“ benannt haben:

Alpha (B.1.1.7) - Beta (B.1.351) - Gamma (P.1) - Delta (B.1.617.2) - Omikron (B.1.1.529) (Choi et al. 2021; Thakur et al. 2022).

#### 1.4 Übertragungswege

Der Hauptübertragungsweg von SARS-CoV-2 erfolgt über die Atemwege (Carlos et al. 2020). Dabei werden Aerosole, die das Virus enthalten, beim Ausatmen, Husten oder bei feuchter Aussprache im Raum verteilt. Dies geschieht in einer Entfernung von ca. 1,5 - 2 m (Ather et al. 2020). Diese Aerosole verbleiben in der Luft, bis sie zu Boden sinken. Andere Individuen nehmen diese Aerosole aus der Luft in ihre Atemwege auf und können sich so über Schleimhautkontakt infizieren (Sharma et al. 2021; Puhach et al. 2023). Ein weiterer Übertragungsweg sind Kontakt- und Schmierinfektionen, bei denen das Virus nicht über die Luft sondern von den Händen auf die Schleimhäute gelangt (van Doremalen et al. 2020; Kampf et al. 2020). Das Virus kann bei Raumtemperatur von mehreren Tagen bis zu ca. zwei Wochen in Ausscheidungen des Körpers überdauern (Sputum, Fäzes je fünf Tage, Urin 10 Tage, Blut 15 Tage). Aber auch auf trockenen Oberflächen wie Glas oder Papier überdauert das Virus über mehrere Tage (Zhang et al. 2020). Beide Übertragungswege spielen vor allem bei nosokomialen Infektionen, häufig Sekundärinfektionen, eine Rolle (Sharma et al. 2021). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das Virus über Aerosole und kontaminierte Flächen übertragen werden kann. Andere Übertragungswege gelten als sehr selten, unwahrscheinlich oder wurden schlicht noch nicht beschrieben. Letzteres gilt auch für Infektionen mit SARS-CoV-2 über Abwasser. (Centers for Disease Control and Prevention 2022).

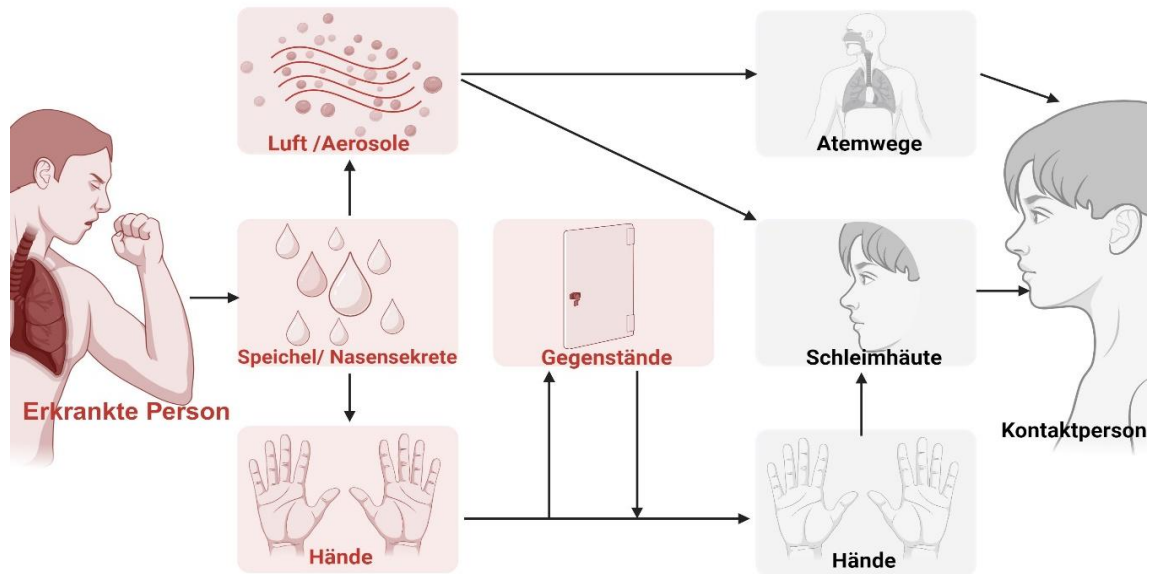


Abbildung 2: Modifizierte Abbildung der Übertragungswege von Atemwegsinfektionen. (Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung (BZgA) 2021) Erstellt mit BioRender.com.

## 1.5 Infektion der menschlichen Zelle

Um in die Zelle einzudringen, nutzt SARS-CoV-2 den ACE2-Rezeptor auf humanen Wirtszellen und das viruseigene Spike-Oberflächenglykoprotein. Dieses besteht aus einer S1- und einer S2-Untereinheit. Dabei bindet die S1-Untereinheit, auch „rezeptor binding domain“ (RBD) an den Angiotensin-converting enzym 2 (ACE2)-Rezeptor (Li 2016). Die Transmembranprotease „Transmembrane protease, serine 2“ (TMPRSS2) der Wirtszelle kann nun das Spike-Protein am Übergang zur S2-Untereinheit spalten, an der sogenannte Furinspaltstelle. So kann das Virus über seine S2-Untereinheit mit der Zellmembran der Wirtszelle fusionieren. SARS-CoV-2 gibt so die Virusbestandteile ins Innere der Wirtszelle frei und infiziert die Zelle. Das Virus nutzt für die eigene Replikation die Zellorganellen der Wirtszelle um sich zu vermehren und wird dann wieder über Exozytose freigesetzt. Bis das Virus die nächste Wirtszelle infiziert und der Replikationszyklus wiederholt sich von neuem (V'kovski et al. 2021).

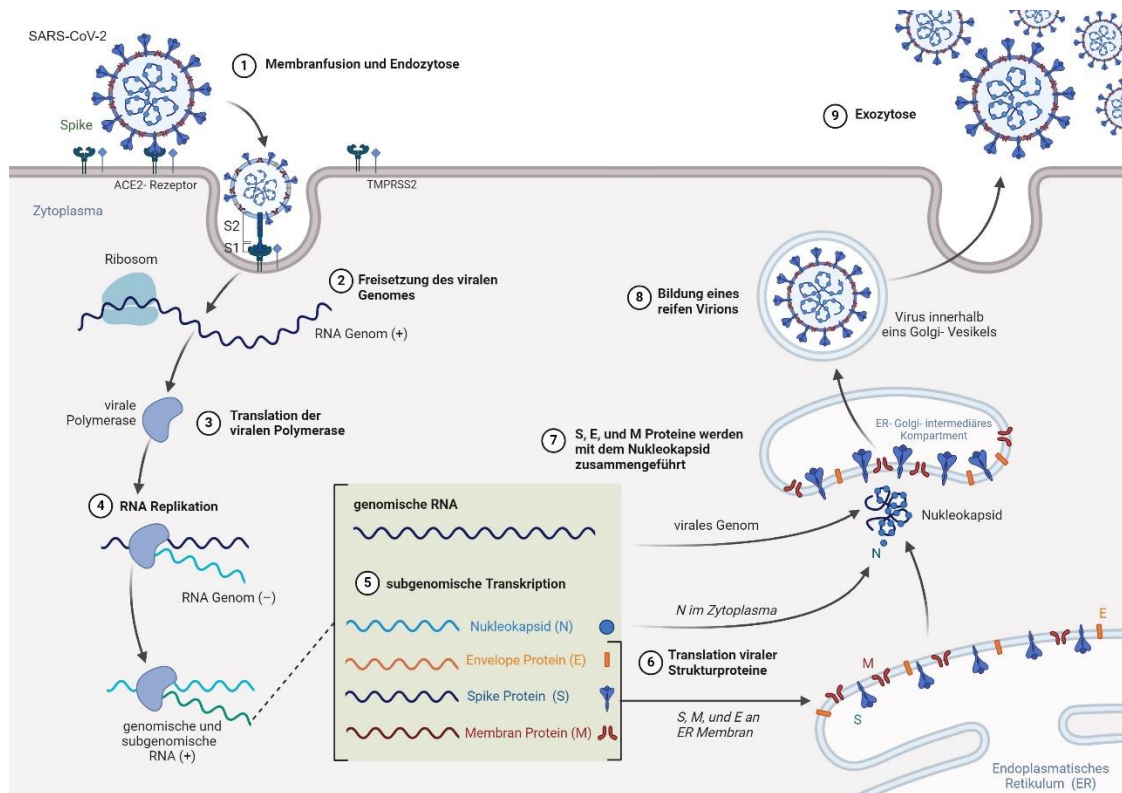


Abbildung 3: Replikationszyklus von SARS-CoV-2. Modifizierte Vorlage von Benjamin Goldman-Israelow (Harrison et al. 2020) und V'kovski et al. (V'kovski et al. 2021). Erstellt mit BioRender.com

Diese Fähigkeit hat das Virus wahrscheinlich durch die so genannte homologe Rekombination erworben. Coronaviren sind durch persistierende Infektionen in Reservoiren des Tierreiches, z. B. Fledermäuse, Larvenroller und Marderhunde in der Lage, ihr Wirtsspektrum zu erweitern und auch andere Säugetiere, wie den Homo Sapiens, zu infizieren (Graham et al. 2010). Bereits vor der Pandemie wurden Fledermäuse als natürliche Reservoire für Betacoronaviren beschrieben (Watanabe et al. 2010). In diesen Reservoiren kann das Virus zunehmend mutieren. Hier sprechen wir nicht nur von Spontanmutationen, sondern auch über die oben bereits erwähnte Rekombination. Rekombination von Erbmateriale ist bei Betacoronaviren häufig (Trémeaux et al. 2023; Bolze et al. 2022; Bobay et al. 2020). Hierfür muss eine Zelle mit zwei Virusvarianten infiziert sein. Während des Replikationszyklus kann so Virusmaterial der Varianten verknüpft werden und ein Mischgenom entstehen. Es können auch Eigenschaften der einzelnen Varianten gegenseitig aufeinander übertragen werden, wie es an Betacoronaviren bereits beobachtet wurde (Schroeder et al. 2021; Wells et al. 2023). Bei Kontakt können diese Viren wieder auf den Menschen übertreten. Wie aktuell angenommen wird, geschah dies auf einem Markt für lebendige Fledermäuse (*Rhinolophus affinis*) und weitere Zwischenwirte für SARS-CoV-2 in Wuhan, China, im Jahre 2019 (Holmes et al. 2021; Mallapaty 2020). Bereits beschriebene natürliche Übertragungen von Infektionen auf Haustiere in Deutschland, wie Hunde und Katzen, (Sharun et al. 2021), unterstreichen noch einmal

die Notwendigkeit, die Infektionstätigkeit und Mutation des Virus über Surveillance Systeme in Deutschland weiter aufmerksam zu verfolgen.

## 1.6 Die COVID-19-Erkrankung

SARS-CoV-2 kann bei einem infizierten Menschen verschiedene Krankheitssymptome hervorrufen. Der ACE2-Rezeptor ist in den Atemwegen stark ausgeprägt, was die effektive Infektion dieser Strukturen durch das Virus erklärt (Sungnak et al. 2020; Baric et al. 1999). Obwohl eine Infektion häufig mit keinen bis milden Erkältungssymptomen einhergeht, kann eine Infektion in einem „Acute Respiratory Distress Syndrom“ (ARDS) gipfeln. Diese Erkrankung stellt eine Dekompensation des respiratorischen Systems dar und ist lebensbedrohlich (Swenson et al. 2021). Das ARDS ist eine pulmonale Manifestation der Erkrankung COVID-19. Der genaue Pathomechanismus von COVID-19 wird aktuell noch erforscht, aber momentan geht man von mehreren Faktoren aus, welche in Summe die Symptomatik begründen. Hier seien exemplarisch einige benannt: Zytolyse der Wirtszelle durch das Virus, eine überschießende und fehlregulierte Immunantwort, welche in einem „Zytokinsturm“ gipfeln kann (Zanza et al. 2022; Schulte-Schrepping et al. 2020). Diese führt dann zu organspezifischen Entzündungen. Beim erwähnten ARDS ist die Lunge der Fokus. Zudem beinhaltet der Pathomechanismus eine Endothelschädigung, die mit einer Beeinflussung des blutdruckregulierenden Renin-Angiotensin-Systems einhergeht. Dies kann wiederum die Strömungseigenschaften des Blutes beeinflussen und so die Blutgerinnung aktivieren, welche dann zu thrombo-embolischen Ereignissen führen kann (Jin et al. 2020). Wie bereits angedeutet, gibt es weitere Manifestationsformen der Erkrankung, auch an anderen Organsystemen. Beispielhaft seien hier das kardiovaskuläre System (Azevedo et al. 2021) und das neuronale System (Meinhardt et al. 2021; Matschke et al. 2020) genannt.

Die Weltgesundheitsorganisation unterteilt Patienten bezogen auf COVID-19 in fünf Schweregrade. Grob wird von einer nicht infizierten Person, bei der keine Virus RNA nachweisbar war, bis hin zu einem verstorbenen Patienten Punkte von 0-10 vergeben. 0 Punkte würde der nicht Infizierte erhalten und der Verstorbene 10. Dazwischen würde in milde ambulante, moderate hospitalisierte und schwere hospitalisierte Verläufe unterschieden. Ambulante Verläufe werden danach eingeteilt, ob der Patient milde Symptome hat und sich selbstständig versorgen kann oder ob er schon Hilfe benötigt. Moderate hospitalisierte Krankheitsverläufe werden generell danach unterteilt, ob der Patient Sauerstoff benötigt. Diesen erhält er allerdings nur über die Nase oder eine Maske mit einem kontinuierlichen Sauerstofffluss. Es ist also keine Beatmung angezeigt. Sollte sich der Patient unter dieser Therapie nicht bessern oder stabilisieren, also die pulsoxymetrisch gemessene funktionelle Sauerstoffsättigung fällt unter 90%, wird der Krankheitsverlauf

als schwerwiegend hospitalisierter Krankheitsverlauf bezeichnet. Ab dann wird der Patient druckunterstützt beatmet. Sollte der Patient zunehmend ateminsuffizient werden, wird der Patient zusätzlich intubiert und beatmet. Ab Werten unter 150 des Quotienten aus Sauerstoffpartialdruck und inspiratorischer Sauerstofffraktion muss der Patient zusätzlich kreislaufunterstützende Medikamente erhalten, sollten diese nicht schon vorher durch Kreislaufinstabilität oder Schock angezeigt gewesen sein. Solche Zustände, in der Regel ab einem Quotienten aus arteriellem Sauerstoffpartialdruck und inspiratorischer Sauerstofffraktion von unter 300, bezeichnet man als ARDS. Dann sind zusätzlich noch eine Dialyse sowie eine extrakorporale Membranoxygenierung als intensivmedizinische Maximaltherapie in Betracht zu ziehen (Marshall et al. 2020).

Patientenstatus	Beschreibung	Score
Nicht infiziert	Nicht infiziert, keine Virus RNA nachgewiesen	0
Ambulante milde Erkrankung	Asymptomatisch, Virus RNA nachgewiesen	1
	Symptomatisch, unabhängig, selbstversorgend	2
	Symptomatisch, benötigt Hilfe	3
Hospitalisierte moderate Erkrankung	Hospitalisiert, keine O <sub>2</sub> -Therapie	4
	Hospitalisiert; O <sub>2</sub> -Therapie über Maske oder Nase	5
Hospitalisierte schwere Erkrankung	Hospitalisiert, O <sub>2</sub> über NIV oder high flow	6
	Intubation und mechanische Beatmung, $pO_2/FiO_2 \geq 150$ oder $SpO_2/FiO_2 \geq 200$	7
	Mechanische Beatmung, $pO_2/FiO_2 < 150$ ( $SpO_2/FiO_2 < 200$ ) oder Vasopressoren	8
	Mechanische Beatmung, $pO_2/FiO_2 < 150$ und Vasopressoren, Dialyse oder ECMO	9
Tod	Tod	10

*Tabelle 1: Einteilung der Schweregrade einer akuten COVID-19-Erkrankung; Begriffe: NIV- Nicht invasive Ventilation, high flow - Applikation von ca. 60 l Sauerstoff/Minute,  $pO_2/FiO_2$  - Sauerstoffpartialdruck/inspiratorische Sauerstofffraktion,  $SpO_2/FiO_2$  - partielle Sauerstoffsättigung/inspiratorische Sauerstofffraktion, ECMO - extrakorporale Membranoxygenierung (Marshall et al. 2020).*

Die Erkrankung kann nicht nur akut verlaufen, sondern auch in einen chronischen Zustand übergehen, dem so genannten Long-Covid. Als Long-Covid werden Symptome bezeichnet, die vier Wochen nach einer akuten COVID-19-Erkrankung noch bestehen. Diese werden zunächst als fortwährendes symptomatisches COVID-19 bezeichnet. Ab 12 Wochen bestehender Symptomatik spricht man vom Post-COVID Syndrom. Diese beiden Formen werden als Long-Covid zusammengefasst. Die Symptome, welche dieser Krankheit zugeordnet werden, sind sehr heterogen und können auch sehr unspezifisch sein. Zu den Symptomen zählen: Müdigkeit, Erschöpfung, Konzentrationsstörungen, Muskelschwäche, Kopfschmerzen, Husten, Schlafstörungen, Haarausfall, Angst, Depression, Hautausschläge, Belastungsdyspnoe und Engegefühl in der Brustregion sowie Schwindel (Koczulla et al. 2023).

Zur Therapie der akuten COVID-19-Erkrankung seien hier generell supportive Maßnahmen genannt. Bei schweren akuten Verläufen kommen allerdings auch antivirale Medikamente, wie beispielsweise Nirmatrelvir/Ritonavir oder Remdesivir zum Einsatz. Die überschießende Immunreaktion wird mit Glukokortikosteroiden eingedämmt (Kluge et al. 2023). Die Therapie der Long-Covid-Erkrankung erfolgt häufig in Spezialambulanzen und wird dort interdisziplinär begleitet. Dort werden nicht nur die somatischen Leiden behandelt sondern der Patient auch psychosomatisch therapiert und rehabilitiert (Koczulla et al. 2023).

Unter allen Präventionsmaßnahmen ist hier die Impfung hervorzuheben: Gegen SARS-CoV-2 liegt eine Vielzahl von Impfstoffsystemen vor. Zu den wichtigsten zählen: mRNA-Impfstoffe, Vektorimpfstoffe, Subunit-Impfstoffe und Ganzpartikelimpfstoffe (Ständige Impfkommission 2022). Allen Impfstoffen ist gemein, dass entweder nur oder auch, im Fall der Ganzpartikelimpfstoffe, das Spike-Protein von SARS-CoV-2 als Ziel für eine gezielte Immunantwort definiert wird (Heinz et al. 2021). Die rasche Entwicklung von Impfstoffen und das Impfen der Weltbevölkerung hat den Pandemieverlauf in seinem Schweregrad stark mildernd beeinflusst und hat viele Menschenleben retten können (Watson et al. 2022; Harder et al. 2021).

Manifestationen der Erkrankung kommen entweder indirekt durch Beeinflussung geschädigter Organsysteme, wie beispielsweise thrombo-embolische Ereignisse, zustande, (Jin et al. 2020) oder durch direkte Beeinträchtigungen. Direkte Beeinträchtigungen entstehen, wenn die entsprechenden Zellen der unterschiedlichen Gewebe ebenfalls den ACE2-Rezeptor aufweisen. Nicht nur respiratorisches Epithel, Gefäßendothel und Myozyten exprimieren den ACE2-Rezeptor (Varga et al. 2020), sondern auch Lymphknoten, Nierenepithel, Enterozyten (Dünndarm- und Dickdarmepithel), Magenepithel und Ösophagusepithel (Hamming et al. 2004). Besonders der Befall des Gastrointestinalen Systems sei hier noch einmal hervorgehoben, da die Enterozyten nicht nur eine hohe Anzahl an ACE2-Rezeptoren exprimieren sondern auch TMPRSS2 in hohem Maße aufweisen (Ziegler et al. 2020). Gastrointestinale Beschwerden wie Diarrhö gehören ebenfalls zum Krankheitsbild (Cheung et al. 2020). Deshalb scheiden die infizierten Personen SARS-CoV-2 nicht nur über Aerosole und Sputum aus dem Nasopharyngeal- und Bronchialtrakt aus, sondern auch über den Gastrointestinaltrakt durch Fäzes (Xiao et al. 2020; Pan et al. 2020) und die Niere durch Urin (Ling et al. 2020). Dies gilt sowohl für symptomatisch infizierte (Chen et al. 2020) als auch für asymptomatisch infizierte Personen (Park et al. 2021).

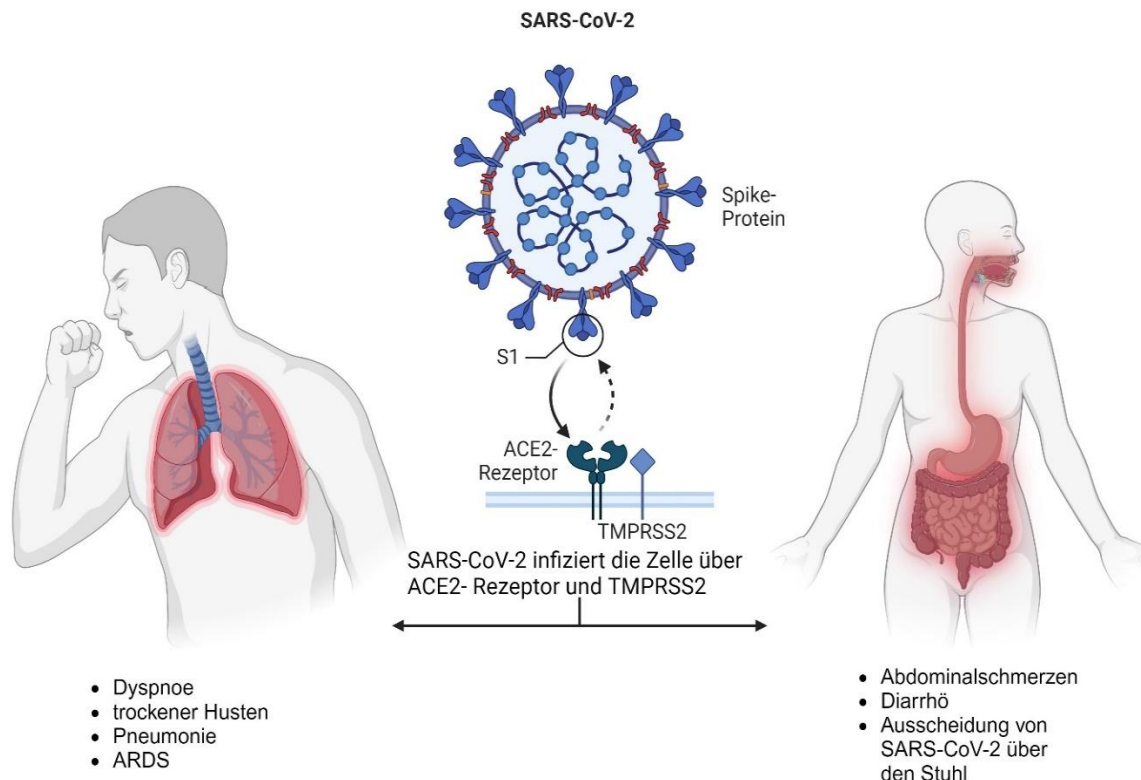


Abbildung 4: SARS-CoV-2 befällt den Respirationstrakt und den Gastrointestinaltrakt. Modifizierte Darstellung (Konturek 2020). Erstellt mit BioRender.com

## 1.7 Abwasserbasierte Surveillance - Baustein zur Eindämmung von Erkrankungen

Die pandemische Entwicklung hat der Weltgemeinschaft unter anderem gezeigt, wie wichtig es ist, verlässliche Informationen über die Infektionstätigkeit in einer Bevölkerung zu generieren. Seit der Pandemie wurde die Forschung an Surveillance Systemen mit verschiedenen Ansätzen forciert: Abwasserbasierte Erhebungen von epidemiologischen Daten stellen hier einen wichtigen Forschungszweig dar. Auch die Politik scheint verstärkt ein Interesse an dieser Forschung sowie Etablierung zu zeigen. Die Europäische Kommission hat bereits am 17. März 2021 die Mitgliedsstaaten dazu aufgerufen abwasserbasierte Surveillance Systeme aufzubauen und in die nationalen Teststrategien systematisch zu integrieren. Nicht nur, um sich den aktuellen Herausforderungen zu stellen, sondern um für die Zukunft besser vorbereitet zu sein (European commission 2021). Ein besonderer Vorteil der abwasserbasierten Surveillance Systeme ist der Umstand, dass symptomatische wie asymptomatische Patienten berücksichtigt werden. Asymptomatische Patienten neigen dazu, sich eher nicht zu testen, da sie keine Symptome verspüren. Die Infektion bleibt damit unbemerkt und wird nicht erfasst. Diese Personen sind aber in der Lage andere Lebewesen zu infizieren (Gao et al. 2021). Der Vorteil lässt sich

darauf herunterbrechen, dass sich nicht jeder testen will oder kann, aber so gut wie jeder früher oder später auf die Toilette muss.

Bei der abwasserbasierten Epidemiologie und Surveillance werden an Abwassersammelstellen, typischerweise Kläranlagen, zunächst Abwasserproben genommen. Anschließend werden diese aufbereitet und schlussendlich molekularbiologisch ausgewertet. Besonders interessant ist, dass der häufig beschriebene Anstieg von Virus RNA im Abwasser dem Anstieg der bestätigten Fälle vorausgeht und somit schon vor den klinischen Tests positive Ergebnisse liefern kann (Agrawal et al. 2021). Die Wichtigkeit kontinuierlicher Testung mag zunächst nur bei dynamischen Infektionszahlen sinnvoll erscheinen, ist allerdings in einer Phase mit verhältnismäßig geringer Infektionstätigkeit in der Bevölkerung trotzdem sinnvoll. Wie oben bereits erwähnt, können in Reservoiren im Tierreich jederzeit neue Varianten entstehen und diese dann wieder auf den Menschen übertragen werden, wie die Pandemie eindrucksvoll gezeigt hat. Ergänzend zur „Point of Care“-Testung (POC), bei der Patienten vor der Aufnahme ins Krankenhaus getestet werden, könnte ein solches Surveillance System auch im Krankenhaus zum Einsatz kommen, um in Zukunft Krankheitserreger nachzuweisen. Das besondere an Abwasser eines Krankenhauses sind größere Mengen an Pathogenen und Detergenzien, welche die Viren beschädigen können. Aus diesem Grund stellt der Nachweis von SARS-CoV-2 eine besondere Aufgabe dar. Auch Temperaturschwankungen, Verdünnungen und pH-Veränderungen können das Virus beschädigen (Kallem et al. 2023). Mit dieser besonderen Zusammensetzung des Abwassers stellt sich die Frage, ob hier trotz dieser Bedingungen ein Nachweis von SARS-CoV-2 über den Pandemieverlauf möglich ist.

Um das Ziel dieser Dissertation zu verdeutlichen, wurde erläutert, warum es wichtig ist kontinuierlich beprobte Surveillance Systeme zu etablieren. Krankenhäuser, oder in unserem Fall Universitätskliniken, sind zentrale Institutionen unseres Gesundheitswesens, in denen mögliche Ausbrüche schnell zu erkennen oder neue Varianten von Krankheitserregern zu identifizieren sind. Wie oben bereits erläutert können diese Erreger in das Abwasser des Krankenhauses gelangen.

Für die Auswertung ist eine digital-PCR verwendet worden. Diese neue PCR-Technologie ist in der Lage sehr niedrige Konzentrationen an Erbmateriale von SARS-CoV-2 nachzuweisen und absolut zu quantifizieren. Dies gelingt dadurch, dass die Probe in beispielsweise 26 000 Partitionen aufgeteilt wird. Dadurch sind die Targets verteilt und pro Partition ist keine, ein oder wenige Targets enthalten. Die hier verwendete digital-PCR weist die Targets über Fluoreszenzfarbstoffe, entweder über in DNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe oder über Primer-TaqMan-Sonden-Systeme, nach. Aus den

Floureszenzintensitäten berechnet dann die digital-PCR über die Poisson- Verteilung, die zur Berechnung von solchen Ereignissen verwendet wird, wie viele Viruskopien sich wahrscheinlich in jeder Partition befunden haben. Dadurch kann das System genaue Konzentrationen im Probenmaterial bestimmen.



Abbildung 5: QIAcuity® One digital-PCR

Zunächst sollte die Methodik etabliert werden. Der Nachweis von SARS-CoV-2 im Abwasser eines Krankenhauses der Maximalversorgung war während der COVID-19-Pandemien wahrscheinlich. Sollte der Nachweis gelingen, könnte eine weitere wissenschaftliche Forschungsarbeit Proben mittels Sequenzierung weitergehend untersuchen. Wegen der Charakteristik der Sequenzierung ist es wichtig, zunächst Vorversuche durchzuführen. In diesen Versuchen sollte man nicht die genaue Konzentration kennen, aber dennoch die Wahrscheinlichkeit hoch sein, den entsprechenden Erreger nachzuweisen. Für den Nachweis des Virus wurden über den Verlauf der Pandemie vom 11.11.2020 bis zum 22.02.2022, etwas über ein Jahr im Pandemieverlauf, 33 Proben gewonnen. Hierfür wurden die Proben zunächst aufkonzentriert und die gesamte RNA extrahiert. Die Viruslast dieser Proben sollte absolut quantifiziert werden. Dazu kommt die oben beschriebene digital-PCR zum Einsatz. Die absolute Quantifizierung wurde angestrebt, um einen ersten Einblick zu erhalten, welche Größenordnungen an Viruskopien zu erwarten sind. Dies soll wiederum Rückschlüsse auf mögliche Verbesserungen im Protokoll geben und einen ersten Einblick in die Prozesse, die für ein solches Surveillance System notwendig sind, ermöglichen.

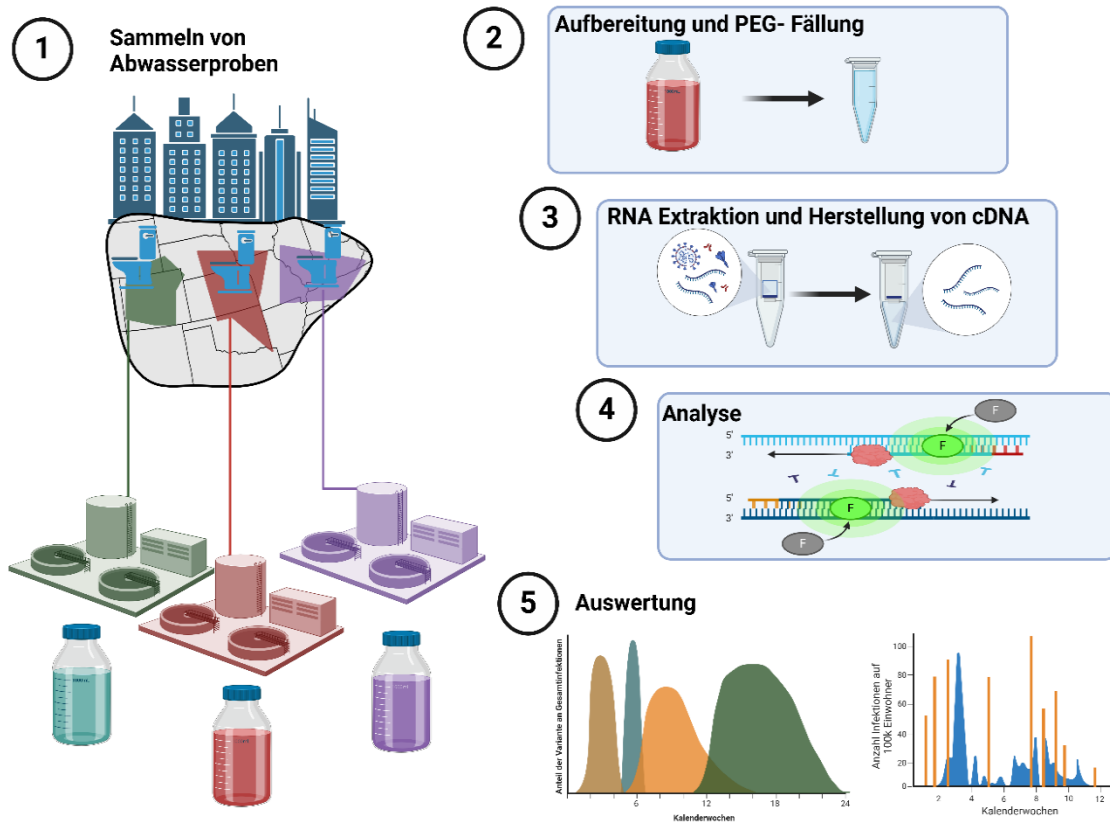


Abbildung 6: Modifizierte Abbildung (Rubio-Acero et al. 2021) mit dem Ablauf der Arbeitsschritte in der Abwasserbasierten Epidemiologie. Erstellt mit BioRender.com

Mit der digital-PCR (dPCR) sollte zunächst ein molekularer Nachweis des Spike-Oberflächen-Proteins etabliert werden. Eine wildtypische Sequenz dieses S-Proteins, welches in ein Plasmid kloniert wurde, sollte für den Nachweis als Target dienen. Zudem wurde auf Basis der wildtypischen Spike-Oberflächenprotein-Sequenz bekannte Mutationen in das S-Protein eingefügt und ein weiteres Plasmid synthetisiert, von der Firma „GenSkript“ (Diehl-Valentin 2023; Hodcroft et al. 2024a). Damit sollte überprüft werden, ob Primer-Systeme etabliert werden können, mit welchen der Nachweis, sowohl der wildtypischen, als auch der mutierten Spike-Proteinsequenz, gelingt (Perchetti et al. 2021; Petrillo et al. 2021). Die entsprechenden Primer wurden bei der Firma „Eurofins Genomics“ in Auftrag gegeben. Dieser Nachweis ist essentiell für die nachfolgenden Versuche. Der molekulare Nachweis des Spike-Oberflächenproteins stellt die Kontrolle für die nachfolgenden Versuche dar. Darauf aufbauend sollte in den Abwasserproben der SARS-CoV-2-Wildtyp und anschließend die Omikron-Variante nachgewiesen werden. Die Nachfolgende Grafik fasst die Vorgehensweise in dieser Arbeit zusammen. Mit diesem Versuchsaufbau sollen die Ziele dieser Arbeit veranschaulicht und in einen logischen Zusammenhang gestellt werden. Der genaue Versuchsablauf wird im „Material und Methoden“-Teil genauer erläutert.

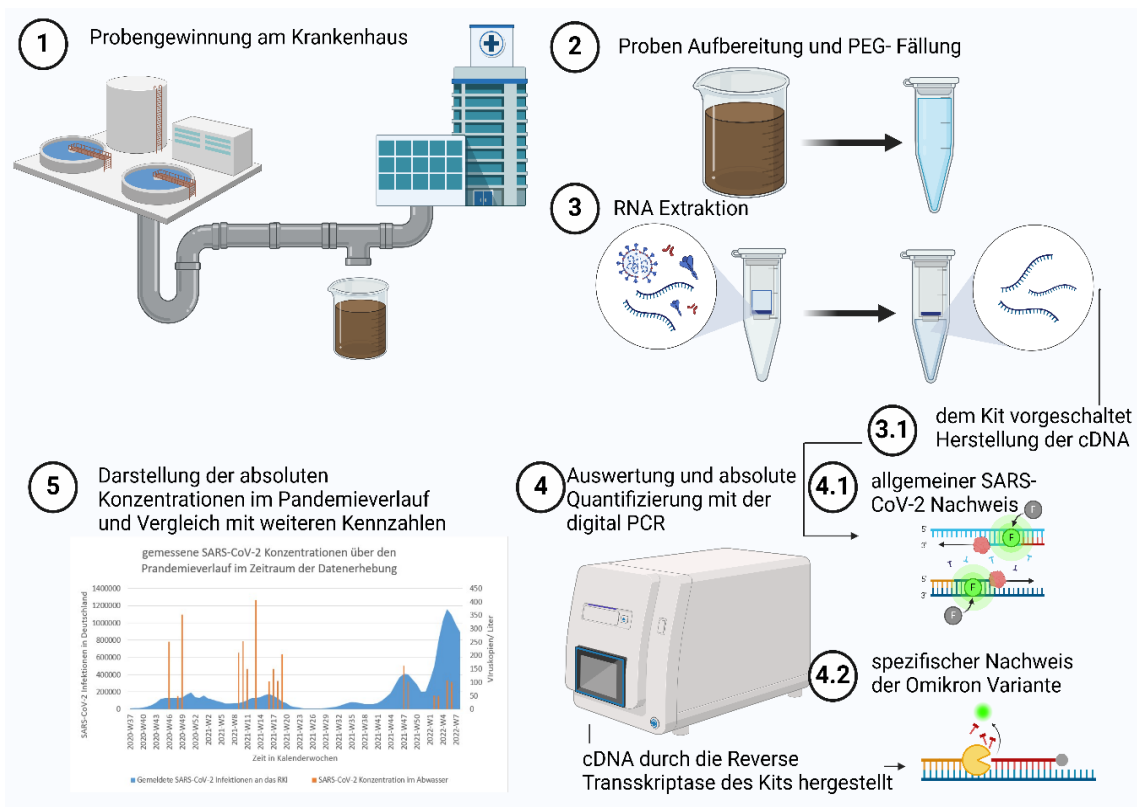


Abbildung 7: Schematischer Ablauf der Vorgehensweise mit der Zielsetzung dieser Arbeit. Erstellt mit Bio-Render.com

### 1.8 Ziele

1. Die Etablierung eines molekularen Nachweises für den SARS-CoV-2-Wildtyp und der Omikron-Variante.
2. Etablierung einer Aufbereitungs- und RNA-Extraktionsmethode aus Klinikabwasser.
3. Varianten-unabhängiger Nachweis von SARS-CoV-2 im Abwasser.
4. Nachweis von SARS-CoV-2 der Omikron-Variante im Abwasser.
5. Quantifizierung des Erregers in den einzelnen Abwasserproben unter Verwendung der digital-PCR.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Sicherheitsmaßnahmen und Sterilitätsbedingungen

Während der Arbeit mit potenziell infektiösem Material wurden ein FFP2-Mund- Nasenschutz, Schutzbrille, Handschuhe sowie Schutzkittel getragen. Gearbeitet wurde bei der initialen Verarbeitung der Proben unter der Sicherheitswerkbank. Im weiteren Verlauf wurde nach Hitzeinaktivierung, Sterilfiltration und PEG-Fällung die RNA-Extraktion unter einem Abzug durchgeführt. Nach jedem Versuchsabschnitt wurde die Sterilbank oder der Abzug desinfiziert. Alle Arbeiten wurden in einem Sicherheitslabor der Stufe 2 nach Biostoffverordnung durchgeführt.

### 2.2 Chemikalien

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Polyethylenglykol BioUltra 8.000	Sigma-Aldrich® (St. Louise, USA)
Natriumchlorid BioUltra ≥ 99,5%	Sigma-Aldrich® (St. Louise, USA)
RNeasy® Mini Kit (50)	QIAGEN GmbH (Hilde, Germany)
QIAcuity® EG PCR Kit	QIAGEN GmbH (Hilde, Germany)
QIAcuity® One-Step Viral RT-PCR Kit	QIAGEN GmbH (Hilde, Germany)
Nuklease freies Wasser	QIAGEN GmbH (Hilde, Germany)
Qubit™ dsDNA HS Assay Kit	Invitrogen™ (USA)
Qubit™ ssDNA HS Assay Kit	Invitrogen™ (USA)
Qubit™ RNA HS Assay Kit	Invitrogen™ (USA)
QIAGEN® Plasmid Mini	QIAGEN GmbH (Hilde, Germany)
Ethanol, puriss. p.a. absolut ≥ 99,8%	Sigma- Aldrich© (St. Louise USA)
Trichlormethan mit 1% Ethanol	Riedel-de Haën AG (Seelze, Germany)
QIAzol™	QIAGEN GmbH (Hilde, Germany)
Primer	Eurofins Genomics(Ebersberg, Germ.)
Plasmide:	
pCI-neo-Spike-SARS-CoV-2-2020	
Spike-Variants in pBluescript II KS (+)	GenScript (Leiden, Netherlands)
High Capacity cDNA Reserve Transcription Kit	Applied Biosystems™ für Thermo Fisher Scientific© (USA)
TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific© (USA)
GeneJET RNA Purification Kit	Thermo Fisher Scientific© (USA)

## 2.3 Verbrauchsmaterialien

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Röhrchen, PP, 50 ml, 30x115 mm, konisch, bodengraduiert, steril, Stehrand, 12 x 25/PAK	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Sterilfilter rapide Filtermax 0,22 µm	Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Schweiz)
Pipetten: 2, 10, 25, 50 ml	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Filterspitzen: 10, 20, 100, 200, 1000 µl	Nerbe plus® GmbH+Co.KG (Karlsruhe)
Entsorgungsbeutel	Carl Roth® GmbH (Winsen/Luhe)
Nitril Handschuhe NITRA-TEX	Ansell Healthcare Europe N.V.
FFP2-Schutzmasken	Zhejiang Dongmeng (China)
Eppendorf Safe-Lock Tubes®	Eppendorf AG (Germany)
High Strength Glass Class B 30 ml Centrifuge-Tube with 20 - 400 Screw Thread 45600-30	Kimble® (Vineland, USA)
Schott-Laborflasche 200 ml	Schott AG (Mainz, Germany)
QIAcuity® Nanoplate 26k 24 Well	QIAGEN GmbH (Hilde, Germany)
Nanoplate Seals	QIAGEN GmbH (Hilde, Germany)
Nanoplate Tray	QIAGEN GmbH (Hilde, Germany)
Gummiadapter für Kimble Gläschen 30 ml	Beranek Laborgeräte (Nußloch, Germany)

## 2.4 Geräte

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Pipetboy 2 Integra	ibs   tecnomara GmbH
Kühlschrank 4 °C CN 3956	LIEBHERR International AG
Gefrierschank -20 °C Bosch GSV30V23	Robert Bosch® GmbH (Stuttgart, Germany)
Gefrierschrank -80 °C HFU600TV63	Thermo Fisher Scientific®
Centrifuge 5424R Eppendorf	Eppendorf AG® (Germany)
Centrifuge Perfect Spin 24	Preqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Germany)
Centrifuge Perfect Spin P	Preqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Germany)
Fisherbrand™ Microplate Shaker	Thermo Fisher Scientific® (USA)
Sorvall RC2 B Automatic Superspeed	Thermo Fisher Scientific® (USA)

## Refrigerated Centrifuge

Sorvall SS-34 Festwinkel Rotor Zentrifuge Fixed Angle	Thermo Fisher Scientific© (USA)
Herasafe 2025 1.8	Thermo Fisher Scientific© (USA)
PCR Workstation Air Clean 600	Thermo Fisher Scientific© (USA)
Millipore Milli-Q Filteranlage	Merk© KGaA (Darmstadt, Germany)
Präzisionswaage 770-12	Kern & Sohn GmbH (Balingen-Frommern, Germany)
QIAcuity® One	QIAGEN GmbH (Hilde, Germany)
GeneAmp® PCR System 9700	Thermo Fisher Scientific© (USA)
Combi-Spin FVL – 2400N	BioSan (Riga, Lettland)
GFL 1083 Schüttelwasserbad	Gemini (Apeldorn, Netherlands)
LABOPORT® N 816.1.2 KT.18 Vakuumpumpe	KNF Neuberger GmbH (Freiburg, Germany)
Notebook HP Z-Book	HP Inc. (USA)
Dell Optiplex 3090	Dell Inc. (USA)
Schreiblaptop	Lenovo (China)
Kamera Fujifilm X20	Fujifilm (Tokyo)
GeneAmp® PCR System 9700	Thermo Fisher Scientific (USA)
Pipetten: 2, 10, 20, 100, 200, 1000 µl	Biohit© by Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Germany)
Thermoblock BioShake iQ	QUANTIFOIL© GmbH (Jena)
Qubit™ 4 Fluorometer GmbH	Invitrogene™ Life Technologies (Darmstadt, Germany)
Vortex- Genie® 2	Carl Roth© GmbH+Co. KG (Karlsruhe, Germany)

## 2.5 Software

Citavi Version 6.14.0.0

Microsoft Excel 2013

Microsoft Word 2013

GoodNotes5 Version 5.9.127

QIAcuity® Software Suite Version 1.2.18, 2.1.7.182; 2.5.0.1

DNASar MegAlign Pro 17

DNASar SeqBuilder Pro 17

Molbiol.ru

BioRender.com

## 2.6 Laborspezifische Begriffe

Amplifikat/Amplicon	Während einer PCR gebildetes DNA Fragment
RNA-Extraktion	Isolierung der Erbinformation aus einer Probe
Kit	Industrielle Chemikalien- und Materialzusammenstellung für den entsprechenden Verwendungszweck
Mastermix	Angesetzte Mischung aus Nukleotiden, Polymerase, Primern, eventuell Sonden und Wasser (Grundlage PCR)
Polymerase	Ein Enzym, welches eine durch Primer markierte DNA-Sequenz durch die Aneinanderreihung der komplementären Nukleotide repliziert
Primer	Oligonukleotide, welche an einen definierten Bereich der einzelsträngigen DNA binden und sie für die Replikation durch die Polymerase markieren
Primermix	Mischung aus Forward- und Reverseprimer
Forwardprimer	Primer der am Leitstrang ansetzt
Reverseprimer	Primer der am Folgestrang ansetzt
Stocklösung	Hochkonzentrierte Lösung zur Herstellung der Arbeitslösung für den anstehenden Versuch
Template	Matrizen-DNA, welche in die PCR eingesetzt wird
Vortex/vortexen	Gerät, bzw. die dazugehörige Handlung, mit der eine Probe von einem Gerät durch schnelle Bewegung vor und zurück durchgemischt wird. Das Probenbehältnis wird dafür am Verschluss festgehalten und an der Spitze des Probengefäßes schnell bewegt
Pellet	Ausgefälltes Substrat nach einer Zentrifugation
Inkubieren	Nach einem Arbeitsschritt wird die Probe während dieser Zeit nicht weiterverarbeitet, oder Enzymen wird Zeit gegeben zu katalysieren
Eluieren	Herauslösen von einem oder mehreren adsorbierten Stoffen aus Adsorbentien mit einem Lösungsmitteln
cDNA	komplementär zur RNA mittels reverser Transkriptase erstellte DNA
NTC dern	Kontrollmastermix, in den keine Probe für die PCR, sondern nur Wasser gegeben wird
Well	Vertiefung in einer Platte in der Reaktionskomponenten gemischt werden können

## 2.7 Probengewinnung

Als Entnahmeort wurde das Abwasserrohr am Entnahmepunkt K12 gewählt. An diesem Punkt laufen gesammelt die Abwässer der Gebäude „Alte Chirurgie“, „Neubau Psychatrie“, „Haupthaus Neubau 2“ entlang. Dort wurden 33 Proben von jeweils 200 ml durch Mitarbeiter des Hygiene- Instituts entnommen. Von dort wurden die Proben in die Hygiene verbracht und in Zentrifugationsröhrchen mit Stehrand umgefüllt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben beschriftet und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

## 2.8 Polyethylenglykol Fällung

Die Abwasserproben wurden nach ihrem Abnahmedatum in 50 ml Zentrifugationsröhrchen mit Schraubverschluss aus Kunststoff umgefüllt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Am Vortag des Experiments wurden die Proben des entsprechenden Abnahmedatums aus dem

$-80^{\circ}\text{C}$ -Gefrierschrank herausgesucht und in einem  $8^{\circ}\text{C}$ -Kühlschrank über Nacht aufgetaut. Weiterhin wurden am Vortag des Versuchs 2 g Polyethylenglykol und 0,9 g Natriumchlorid jeweils in einem gläsernen Zentrifugationsröhrchen mit Schraubverschluss abgewogen. Pro Probe wurden jeweils zwei Glaszentrifugationsröhrchen vorbereitet, um die 50 ml Fassungsvermögen des Kunststoffröhrchens, welches zur Aufbewahrung im  $-80^{\circ}\text{C}$ -Kühlschrank verwendet wurde, zu verteilen. Die gläsernen Zentrifugationsröhrchen mit den eingewogenen Chemikalien wurden über Nacht in einem Vorratsschrank für die oben aufgeführten Chemikalien aufbewahrt. Die gläsernen Zentrifugationsröhrchen wurden dafür mit den dafür vorgesehen Deckeln verschlossen.

Am Tag des Versuchs wurde zunächst ein Wasserbad zur Hitzeinaktivierung der entsprechenden Abwasserproben, welche über Nacht aufgetaut wurden, vorgeheizt. Sobald das Wasserbad  $70^{\circ}\text{C}$  erreichte, wurden die zu verarbeitenden Proben in einem Reagenzglasständer aufrecht in das Wasserbad gestellt. Da das Wasser nicht das komplette Zentrifugationsröhrchen bedeckte, sondern nur etwas über  $3/4$ , wurden die Röhrchen alle 10 Minuten mehrfach über Kopf gewendet und nach 45 min aus dem Wasserbad genommen und abgetrocknet.

Nun wurde die Probe in jeweils eine autoklavierte Laborgewindeflasche steril filtriert. Dazu wurden zunächst zwei Laborgewindeflaschen mit je einem Bottel-top-Filter mit  $0,22\ \mu\text{m}$  Porengröße versehen. Im Anschluss wurden die hitzeinaktivierten Abwasserproben auf die Bottel-top-Filter gegeben und dann mithilfe einer Vakuumpumpe steril filtriert, welche an den Bottel-top-Filter angeschlossen wurde. Danach wurden jeweils 20

ml des steril filtrierten Abwassers in vorher gekennzeichnete gläserne Zentrifugationsröhrchen, mit dem am Vortag abgewogenen Polyethylenglykol und dem Natriumchlorid, pipettiert. Hierzu wurden 25-ml-Pipetten und ein Pipetboy verwendet. Nun wurden die gläsernen Zentrifugationsröhrchen über Kopf gewendet, um das Polyethylenglykol und das Natriumchlorid zu lösen. Dies war durch den Schraubverschluss möglich, da eine solche Probe nicht gevortext werden darf. Um die Polyethylenglykolfällung durchzuführen, wurden die gläsernen Zentrifugationsröhrchen für 30 Minuten im 8°C-Kühlschrank inkubiert.

Nach 30 Minuten wurden die gläsernen Zentrifugationsröhrchen aus dem Kühlschrank entnommen und auf einer Feinwaage austariert. Dazu wurden die Röhrchen in die dafür vorgesehen Adapter für die Zentrifuge gestellt, und das Gewicht der beiden Zentrifugationsröhrchen für die entsprechende Probe austariert. Als weitere Hilfsmittel dienen ein Kolbenhubpipettenhandstück und 10-ml-Pipetten. Im Anschluss wurde die Probe in einer Sorvall-Zentrifuge mit einem SS 34-Festwinkelrotor bei 10.000 rpm für drei Stunden bei 4°C zentrifugiert.

## 2.9 RNA Extraktion und DNase- Verdau

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand der zusammengehörigen gläsernen Zentrifugationsröhrchen in 50-ml-Zentrifugationsröhrchen mit Stehrand aus Kunststoff ausgegossen. Anschließend wurde das Kunststoffröhrchen mit dem hineingegossenen Überstand verworfen. Die gläsernen Zentrifugationsröhrchen wurden zum Abtropfen auf ein Tuch gestellt. Anschließend wurden die gläsernen Zentrifugationsröhrchen mit 700 µl QIAzol durch mehrmaliges hineinpipettieren und wieder aufziehen mit einer 1000-µl-Pipette ausgespült, um das Pellet zu lösen. Dabei wurde so verfahren, dass zunächst 700 µl in das eine Zentrifugationsröhrchen hineingegeben wurde. Nach der Spülung wurden dann die 700 µl von einem Röhrchen in das zweite des jeweiligen Probenbages pipettiert, um dort den Vorgang zu wiederholen und das Pellet in beiden Röhrchen gesammelt zu lösen. Im Anschluss wurden dann die 700 µl in ein Cap pipettiert. Anschließend wiederholte sich der Vorgang mit den beiden gläsernen Zentrifugationsröhrchen der anderen Proben. Weiterhin wurden dann in beide Caps 140 µl Chloroform hinein pipettiert. Anschließend wurden beide Caps für jeweils 15 Sekunden gevortext und dann für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Minuten wurden die beiden Proben bei 4°C und 12.000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert.

In der Zwischenzeit wurde die DNase für den DNase-Verdau auf der Spinsäule angesetzt. Dazu wurden 15 µl DNase-Stocklösung mit 105 µl RDD-Puffer, siehe RNeasy® Mini Kit, angesetzt. Da an den meisten Versuchstagen jeweils zwei Proben zur Verarbeitung kamen, wurde die doppelte Menge angesetzt. Nach dieser Zentrifugation wurden

370 µl der wässrigen Phase von oben hinauspipettiert und in ein separates Cap gegeben. Diese 370 µl Überstand wurden dann mit 525 µl 99,98%igem Ethanol gemischt. Im Anschluss wurde das Gemisch aus absolutem Ethanol und dem Überstand in zwei Schritten, erst 700 µl und danach das Restvolumen, jeweils auf eine Spin-Säule aufpipettiert und dann für 30 Sekunden bei 8.000 x g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde jeweils verworfen. Anschließend wurden pro Säule jeweils 350 µl RWT-Puffer des RNeasy Mini Kits auf die Säulen pipettiert und wiederum bei 8.000 x g für 30 Sekunden zentrifugiert.

Nun konnten 120 µl der angesetzten DNase auf die Spin-Säule pipettiert werden. Anschließend wurden die Proben für 15 Minuten bei 25°C inkubiert. Darauffolgend wurden wieder 350 µl RWT-Puffer auf die Zentrifugationssäule pipettiert und erneut bei 8.000 x g für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Durchlauf wurde wieder verworfen und nun mit 500 µl RPE-Puffer aus dem RNeasy® Kit gewaschen, indem dieser nochmals auf die Säule aufpipettiert wurde. Es folgte abermals eine Zentrifugierung der Säule für 30 Sekunden bei 8.000 x g. Der Durchlauf wurde verworfen und erneut 500 µl des RPE-Puffers aufpipettiert, aber diesmal zwei Minuten lang bei 8.000 x g zentrifugiert. Um die Säule trocken zu zentrifugieren wurde die Probe für den Durchlauf in einem neuen Auffang-Cap gesteckt und für eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Zur Eluierung der Probe aus der Zentrifugationssäule wurde die Säule in das Cap, in dem es aufbewahrt werden soll, hineingesteckt und 40 µl RNase-freies Wasser aus dem RNeasy Kit auf die Zentrifugationssäule pipettiert und dort für zwei bis drei Minuten inkubiert. Abschließend wurde die Probe bei 8.000 x g für eine Minute zentrifugiert und der Durchlauf bei -80°C eingefroren.

Bevor die extrahierte RNA ausgewertet werden konnte war es notwendig die RNA in komplementäre DNA (cDNA) zu transkribieren. Der Reaktionsschritt, in welchem die extrahierte RNA nochmals in cDNA transkribiert wurde, war notwendig, da die Firma Qiagen® kein Kit anbietet (Stand Juni 2022), in dem eine reverse Transkriptase vorhanden ist, und das außerdem mit Fluoreszenzfarbstoffen arbeitet, die in DNA-Amplikate interkalieren. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die ausgewählten Primer Templates nachweisen können, welche sowohl in der original wildtypischen Spike-Oberflächenproteinsequenz zu finden sind, als auch in der für die Mutationen angepasste Sequenz. Es wurde ein Kit benötigt, welches keiner Sonden bedarf, sondern nur Forward- und Reverseprimer für die Amplifikation spezifischer DNA-Templates. Zu diesem Zweck bietet Qiagen® nur das QIAcuity® EG PCR Kit an. Diese Technik war sinnvoll um einen generellen, also Varianten unabhängigen, Nachweis zu etablieren. Somit wurde die Transkription mit einem weiteren Kit vor den Nachweis mit dem QIAcuity® EG PCR Kit vorgeschaltet.

## 2.10 Transkription der RNA in cDNA

Zur Transkription fand das „High Capacity cDNA Reserve Transkription Kit“ von Applied Biosystems™ Verwendung. Dabei wurde der Ansatz ohne DNase-Inhibitoren verfolgt. Um nach Protokoll vorzugehen wurden jeweils für jeden Ansatz 10 µl des Elutionsvolumens aus der RNA-Extraktion eingesetzt und 10 µl aus dem „High Capacity cDNA Reserve Transkription Kit“ verwendet.

Der Anteil des Kits setzte sich wie folgt zusammen:

- 10 x RT Buffer 2 µl
- 25 x dNTP Mix (100 mM) 0,8 µl
- 10 x RT Random Primers 2 µl
- Multiscript Reverse Transkriptase 1 µl
- RNase-freies Wasser 4,2 µl

(Thermo Fisher Scientific Baltics UAB 2018).

Die Proben wurden an einer PCR-Sicherheitswerkbank (PCR workstation) pipettiert und gemischt. Vor dem Mischen wurde die extrahierte RNA auf Eis aufgetaut und herunterzentrifugiert. Die Caps für den Thermocycler wurden dabei ebenfalls schon auf Eis gelagert und dann vor dem Einsetzen in den Thermocycler nochmals herabzentrifugiert. Im Anschluss wurde der Ansatz nach den Protokollangaben im Thermocycler weiterprozessiert. Dieser war wie folgt entsprechend der Protokollangaben programmiert worden:

Set	Zeit (min)	Temperatur (°C)
Aufheizen	10	25
Transkription	120	37
Hitzeinaktivierung	5	85
Kühlen	20	4

Tabelle 2: Thermocycling-Parameter der cDNA Transkription (Thermo Fisher Scientific Baltics UAB 2018).

## 2.11 Qubit™-Konzentrationsbestimmung der cDNA

Nach Komplettierung der Transkription in cDNA wurde mit einem Qubit™ Fluorometer die Konzentration der umgeschriebenen total RNA gemessen, um zu testen, ob die Transkription in cDNA funktioniert hatte. Dies war auch indirekt ein Test dafür, ob die Extraktion der total RNA mit dem oben beschriebenen Protokoll erfolgreich war. Dafür wurden alle Reagenzien des „Qubit™ ssDNA HS Assay-Kits“ 30 Minuten vor dem Versuch aus dem Kühlschrank oder dem Gefrierschrank bei Raumtemperatur belassen, bevor mit dem Versuch begonnen wurde. Das Farbstoff-/Pufferverhältnis (Farbstoff: Qubit™

ssDNA HS Reagent/Puffer: DNA Buffer) wurde mit 1:200 angesetzt, um den Reaktionsmix zu bilden. Danach wurden die Proben 1:10 und 1:100 verdünnt und dann je Probe drei Ansätze vorbereitet. Einmal die im Originalverhältnis, 1:10 und 1:100 für jede Probe. Es wurden 2 µl Probe und 198 µl des Reaktionsmix gemischt. Für die beiden Standards, die Positivkontrolle und Negativkontrolle, wurden 10 µl eingesetzt und mit 190 µl Reaktionsmix vermischt. Im Anschluss wurden alle Ansätze für drei Sekunden gevortext und dann für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Qubit™ Fluorometer ist abschließend noch die Maßeinheit ng/µl angewählt worden, da 2µl Probenvolumen eingesetzt wurden. Insgesamt hatte der Messansatz 200µl Gesamtvolumen. Nun konnten alle Proben gemessen werden, nachdem die Standards eingelesen waren (Thermo Fisher Scientific 2022a).

## 2.12 Allgemeiner SARS-CoV-2 Nachweis mit dem EvaGreen PCR Kit/ Versuche mit cDNA aus der umgeschriebenen RNA

### 2.12.1 Funktionsweise von QIAcuity® One und EvaGreen PCR Kit

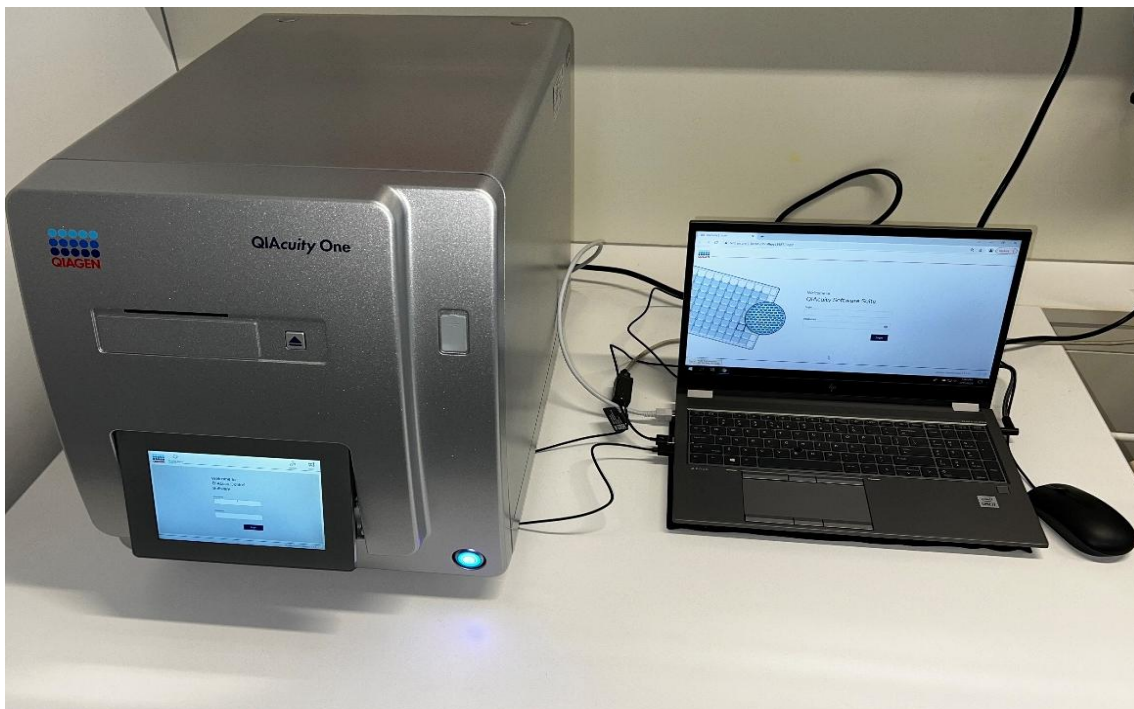


Abbildung 8: QIAcuity® One

Bei der QIAcuity® One handelt es sich um eine digitale PCR. Sie arbeitet nach dem Prinzip, dass ein Hauptmix, bestehend aus der Probe und den PCR-Reagenzien nicht in einem einzigen Reaktionsmix abläuft, sondern dass diese Hauptreaktionsmixturen auf sehr viele kleine Partitionen aufgeteilt werden. In einer Partition läuft jeweils eine PCR-Reaktion mit bedeutend weniger Volumen ab. Dadurch wird erreicht, dass sich nicht zu

viele Signale im Reaktionsmix überlagern, da aufgrund der geringen Menge an Proben-  
volumen sich darin bedeutend weniger mögliche zu detektierende DNA- oder RNA-Frag-  
mente befinden. Jede dieser Reaktionen wird dann von der Maschine einzeln detektiert  
(QIAGEN GmbH 2021b). Dieser Prozess läuft wie folgt ab:

Zunächst werden die Reaktionsreagenzien einzeln in einer 96-Well Mischplatte zusam-  
menpipettiert. Dann wird dieser Reaktionsmix, wie zuvor an der QIAGEN Software Suite  
programmiert, in die Nanoplate hineinpipettiert. Die QIAGEN Software Suite ist die  
Schnittstelle zwischen QIAcuity® und PC. Was das genaue Prozedere sowie die ge-  
nauen Reagenzien waren wird später beschrieben, wenn es um das QIAcuity® EG PCR  
Kit geht, welches im speziellen für die Experimente verwendet wurde. Hier wird vorerst  
die allgemeine Funktionsweise der dPCR beschrieben (QIAGEN GmbH 2021b).

Eine Nanoplate ist der Teil des Versuchsaufbaus, in dem die Reaktion in viele kleine  
Unterreaktionen unterteilt wird. Dazu werden die Wells der Nanoplate durch eine mit der  
Nanoplate mitgelieferten Membran versiegelt. Diese Membran wird dann mit einem Rol-  
linstrument manuell auf der Nanoplate fixiert. Die Nanoplate wird horizontal zur dPCR  
transportiert und in das Gerät eingelegt. In der dPCR wird ein Stempel in jeden Well der  
Nanoplate gedrückt, der über den sich aufbauenden Druck den Reaktionsmix in alle,  
teilweise in Reihe, teilweise parallel geschalteten, Kammern (Partitionen) drückt. In der  
verwendete Nanoplate wurde jeweils pro Well 26.000 Partitionen dahintergeschaltet. Ein  
Reaktionsmix für die PCR wurde auf 26.000 kleine Unterreaktionen aufgeteilt, was eine  
höhere Auflösung erreichte. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich viele Zielsequenzen in  
einer Partition befinden und dadurch übersehen werden, wird dadurch geringer. Nach-  
dem alle, oder zumindest so viele Kammern gefüllt sind, wie der Reaktionsmix befüllen  
kann, kommt ein Rollinstrument von unten und drückt gegen die Nanoplate und ver-  
schließt dadurch die einzelnen Kammern. So entstehen physisch voneinander getrennte  
Kammern in denen einzelne PCR-Reaktionen ablaufen können.

Es gibt verschiedene Nanoplateformate. So werden einmal eine Nanoplate mit 24 Wells  
und 26.000 Partitionen pro Well angeboten, sowie eine Version, in der 24 Wells mit je  
8.500 Partitionen bereitstehen. Eine dritte Option existiert, in der 96 Wells zur Verfügung  
stehen, denen jeweils 8.500 Partitionen zugeordnet sind. Für das Experiment der vorlie-  
genden Forschungsarbeit wurde die 24 Well Platte mit 26.000 Partitionen pro Well ge-  
wählt, da durch die 26.000 Partitionen ermöglicht wird, mehr Probenvolumen und Reak-  
tionsvolumen einzusetzen. Dadurch stehen mehr Partitionen zur Verfügung als bei den  
anderen beiden Varianten. Dies begründet sich aus der wahrscheinlich geringen Menge  
an Viruslast und dem darum verhältnismäßig großen Einsatz an Probenvolumen.



Abbildung 9: QIAcuity® Nanoplate 24 Well 26K Partitionen

### 2.12.2 Thermocycling

Für den Ablauf einer Polymerasen-Kettenreaktion, englisch polymerase chain reaction (PCR), bedarf es eines Thermocyclings, damit die gesuchte Zielsequenz hochamplifiziert wird. Dazu wird die Nanoplate, mit dem darin befindlichen Reaktionsmix, auf einem Thermocycle-Element befestigt. Dabei wird das Thermocycling, entsprechend der vorher auf der QIAcuity® Software Suite festgelegten Temperaturen, durchgeführt.

Der Prozess der Polymerase-Kettenreaktion selbst ist eine durch Enzyme katalysierte Vervielfältigung von Erbinformation. Diese Reaktion erfolgt in Zyklen und wird über die Temperatur (Thermocycling) gesteuert. Dabei wird zunächst über die Erhitzung auf über 90°C die DNA denaturiert, das heißt, die im Zweifel doppelsträngige DNA wird in zwei Einzelstränge getrennt. Daraufhin wird die Temperatur wieder gesenkt. Nun erfolgt die Hybridisierung. Dabei lagern sich Primer (Oligonukleotide) an bestimmte Sequenzen der DNA an. Die Temperatur ist abhängig von der Länge und Zusammensetzung der Primer selbst. In der Regel wird die Temperatur für die Primer-Hybridisierung um 50 - 65°C gehalten. Im Anschluss wird die Temperatur wieder erhöht, denn die Elongation bzw. Extension der DNA-Stränge erfolgt durch das Enzym DNA-Polymerase in einer thermostabilen Form, welche bei ca. 72°C sein Aktivitätsoptimum aufweist. Diese elongiert den neu synthetisierten DNA-Strang durch Nukleotide, die im Reaktionsmix vorliegen, entsprechend der komplementären Basen des Matrizenstrangs DNA. Dadurch kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung des DNA-Abschnitts, zwischen dem die Primer binden (Weier et al. 1988; Kleppe et al. 1971).

Während des Thermocyclings wurde das durch das Primerset aus „sz-CoVS\_For-1A“ und „sz-CoVS\_Rev-1A“ festgelegte Amplikon vervielfältigt und der EvaGreen® Fluoreszenzfarbstoff konnte mit den sich bildenden doppelsträngigen DNA interkalieren. Im nächsten Schritt, dem Imaging, konnte dieser Farbstoff detektiert werden.

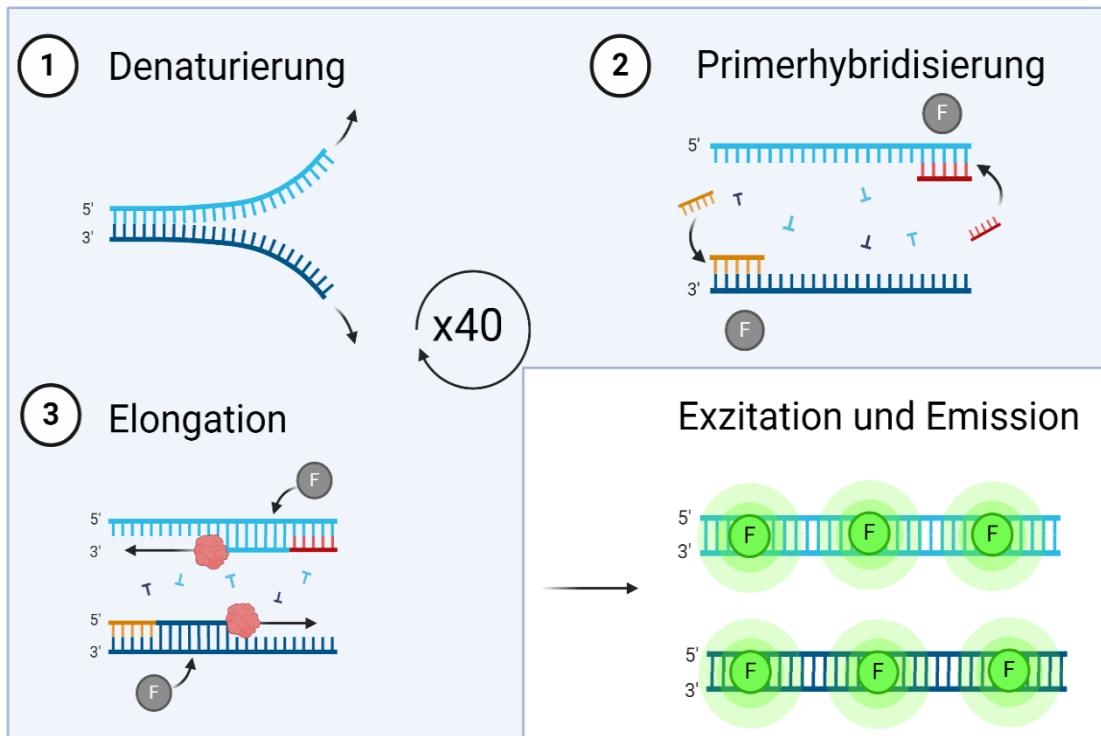


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Nachweises mit dem QIAcuity® EG PCR Kit. Es werden die Replikationsschritte sowie die Interkalierung der Fluoreszenzfarbstoffe und deren abschließende Exzitation und Emission dargestellt. Modifizierte Darstellung (QIAGEN GmbH 2021b). Erstellt mit BioRender.com

Das Thermocycling für alle Versuche mit dem QIAcuity® EG PCR Kit wurde nach dem Handbuch wie folgt programmiert:

Set	Zeit	Temperatur (°C)
PCR initiale Hitzeaktivierung	2 min	95
3-step cycling (40 cycles)		
- Denaturation	15 sec	95
- Annealing	15 sec	60
- Extension	15 sec	72
Kühlung	5 min	40

Tabelle 3: Thermocycling für alle Versuche mit dem QIAcuity® EG PCR Kit (QIAGEN GmbH 2021a).

### 2.12.3 Imaging

Die QIAcuity® unterscheidet positive von negativen Partitionen durch die Fluoreszenzintensität, welche detektiert wird. Dazu wird das Licht einer weißen LED durch einen Anregungsfilter geleitet, um die für den Farbstoff oder die Probe spezifischen Wellenlängen

zu selektieren, um die entsprechenden Kanäle für ein Multiplexing abzubilden. Die QIAcuity® kann fünf Kanäle mit fünf unterschiedlichen Wellenlängen ansteuern. Einen Überblick dazu gibt folgende Tabelle:

Kanal	Anregung (nm)	Emission (nm)	Fluorochrome
Green	463 - 503	518 - 548	FAM, EvaGreen®
Yellow	514 - 535	550 - 564	HEX, VIC, JOE
Orange	543 - 565	580 - 606	TAMRA, ATTO 550
Red	570 - 596	611 - 653	ROX, Texas Red
Crimson	590 - 640	654 - 692	Cy5

Tabelle 4: Übersicht der Kanäle der QIAcuity® mit den dazugehörigen Wellenlängen und Fluorochromen (QIAGEN GmbH 2021b).

Nachdem die entsprechenden Wellenlängen durch den Anregungsfilter selektiert wurden, treffen diese auf die Unterseite der Nanoplate. Diese ist mit einer photodurchlässigen Folie versehen und erlaubt dem emittierten Licht in die einzelnen Partitionen der Nanoplate vorzudringen. Dort regt das Licht, entsprechend seiner Wellenlängen, die Fluoreszenzfarbstoffe oder Reporter der Proben an, um Licht in einer leicht verlängerten Wellenlänge zu emittieren. Dieses Licht wird wieder durch einen Emissionsfilter für Wellenlängen geleitet und dann über ein Objektiv auf den photosensiblen Chip der Kamera geleitet. Über die einzelnen Fluoreszenzstärken aller Partitionen errechnet die Software der QIAcuity®, welche Partitionen als positiv und welche als negativ anzusehen sind.

#### *Imaging Einstellungen spezifisch für das EG PCR Kit:*

In Bezug auf das Imaging existieren zwei Variablen, die man in der QIAcuity® Software Suite verändern kann: Belichtungszeit (ms) und Gain. Mit Gain ist hier die Signalverstärkung der LED gemeint. Dabei wird der interkalierte EvaGreen® Farbstoff mit einer Wellenlänge von 495 nm angeregt und emittiert Licht mit einer Wellenlänge von ca. 530 nm (QIAGEN GmbH 2021b). Für die Auswertung wurde die QIAcuity® Software Suite in der Version 1.2.18. verwendet. Die besten Ergebnisse wurden in den Vorversuchen mit folgenden Einstellungen erzielt: Belichtungszeit 300 ms, Signalverstärkung (Gain) 4.

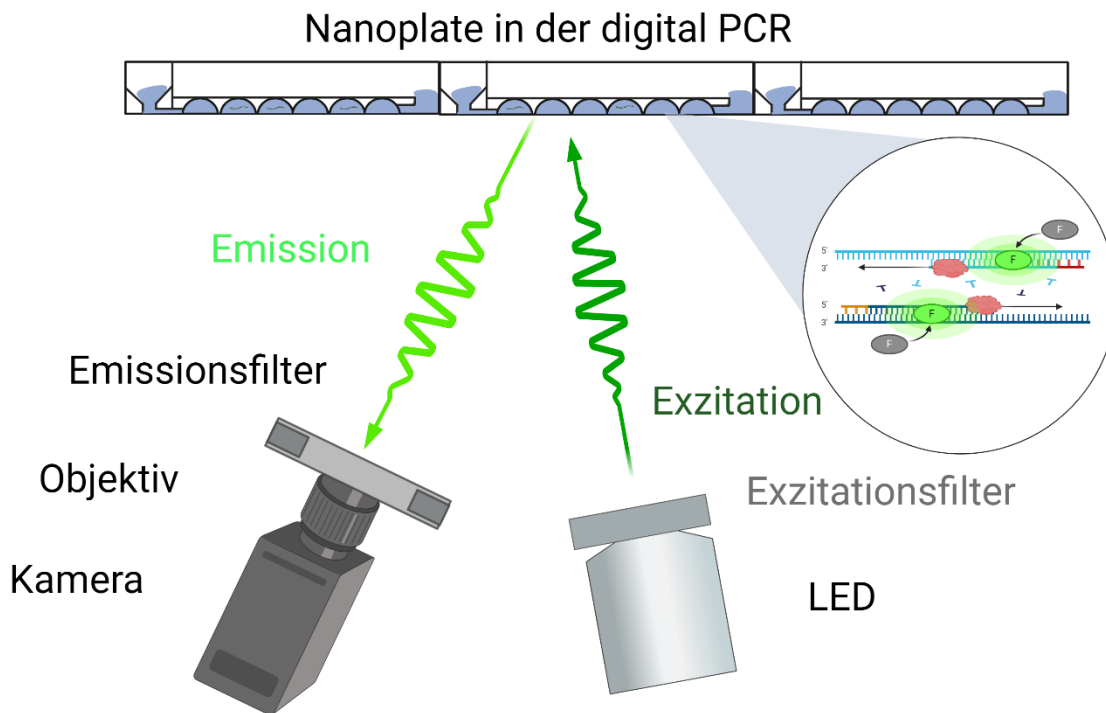


Abbildung 11: Belichtungs- und Imagingprozess der QIAcuity®; Modifizierte Darstellung (QIAGEN GmbH 2021b). Erstellt mit BioRender.com

#### *Berechnung für die absolute Quantifikation:*

Eine weitere Besonderheit der dPCR ist, dass anders als bei der qPCR, hier keine Standardkurven verwendet werden müssen. Da für jede einzelne Partition ein Ergebnis der Fluoreszenzstärke erwartet wird, kann im Verhältnis aus den positiven und den negativen Partitionen und mit der Poisson-Verteilung ein absoluter Wert bestimmt werden (QIAGEN GmbH 2021b).

Die Poisson-Verteilung ist geeigneter für seltene Ereignisse als die Binomialverteilung. So liefert eine Binomialverteilung bei Berechnungen mit einem hohen  $n$  (in unserem Fall eine hohe Anzahl an Partitionen mit 26.000) und einem kleinen  $p$  (eine geringe Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Ereignisses) nicht so genaue Angaben, wie es eine Poisson-Verteilung vermag (Oestreich 2014). Die Formel für die Poisson-Verteilung lautet wie folgt:

$$P(X = k) = \frac{\lambda^k e^{-\lambda}}{k!}$$

e: Eulersche Zahl (2,718281828...)

$\lambda$ : Erwartungswert ( $\lambda = n \cdot p$ )

k!: k Fakultät

k: Kopien pro Partition mit  $k = 0, 1, 2, \dots$

(QIAGEN GmbH 2021b)

#### 2.12.4 Herstellung der Kontrollen

Das Plasmid mit der Sequenz des gesamten original wildtypischen Spike-Oberflächenproteins lag der Arbeitsgruppe bereits vor (Diehl-Valentin 2023). Das entsprechende Plasmid mit der Sequenz des wildtypischen Spike- Oberflächenglykoproteins war mit „pCI-neo-Spike-SARS-CoV-2-2020“ benannt worden (nachfolgend auch Spike genannt). Die Sequenz des wildtypischen Spike- Gens wurde als Matrize verwendet um Primer und Sonden zu entwickeln bzw. herauszusuchen (Perchetti et al. 2021).

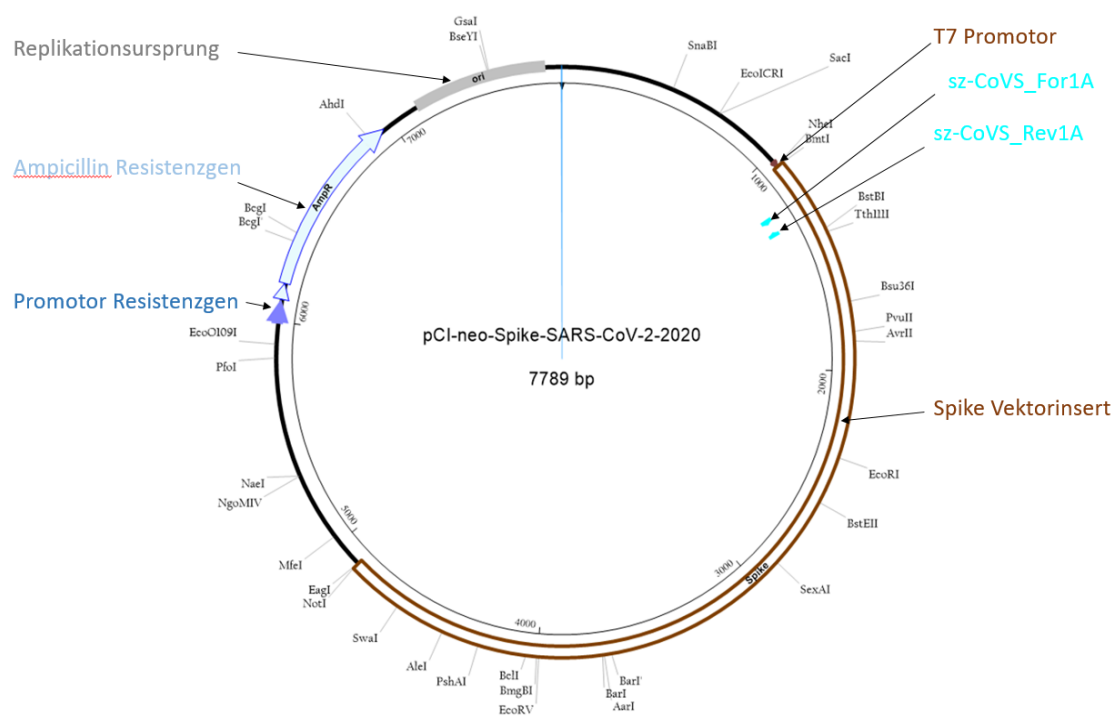


Abbildung 12: pCI-neo-Spike-SARS-CoV-2-2020 Plasmid (Spike) mit der wildtypischen Sequenz des Spike-Proteins mit dem Primerpaar „sz-CoVS\_For1A“ und „sz-CoVS\_Rev1A“; aus DNASTar SeqBuilder Pro 17.

Für den allgemeinen Virusnachweis und späteren Variantennachweis war es nötig, über ein Plasmid zu verfügen, das nur die Sequenz für ein angepasstes Spike-Oberflächenprotein aufwies. Es musste bestimmten Mutationen bzw. Substitutionen in der Sequenz aufweisen wie sie auch in der Omikron- Variante beobachtet wurden (S: S477N; S:

T478K; S: E484A; S: Q493R; S: G496S S: Q498R; S: N501Y; Y505H). Hierfür wurden zunächst diese Mutationen bestimmt und zusammengetragen (Hodcroft 2022). Ein entsprechendes Plasmid wurde über eine Firma bestellt, welche die Sequenz in einen „pBluescript II KS (+)“-Plasmid über die Restriktionsenzymststellen „KpnI“ und „SacI“ synthetisierte. Weiterhin beinhaltet dieser Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen, sowie eine T7 Promotor-Bindungsstelle für die T7 RNA Polymerase. Dieser Vektor, mit der Sequenz des Spike- Proteins mit den eingefügten Mutationen, wurde für diese Arbeit mit „Spike-Variants in pBluescript II KS (+)“ (nachfolgend auch Spike-Variants) genannt. Dieses Plasmid diente als Matrize um die Primer und Sonden für den Variantennachweis auszuwählen. Es wurden in der Literatur schon beschrieben Primer und Sonden für die Versuche ausgewählt (Perchetti et al. 2021). Im allgemeinen Virusnachweis sollte der „Spike-Variants in pBluescript II KS (+)“ Vektor anzeigen, welche Primer sowohl an der wildtypischen Sequenz, hier das „pCI-neo-Spike-SARS-CoV-2-2020“ (Spike) (Abbildung 12), binden, als auch an einer angepassten Sequenz, hier durch das „Spike Variants in pBluescript II KS (+)“-Plasmid (Spike- Variant) (Abbildung 13). Auf die Primer wird jeweils noch in einen gesonderten Kapitel näher eingegangen.

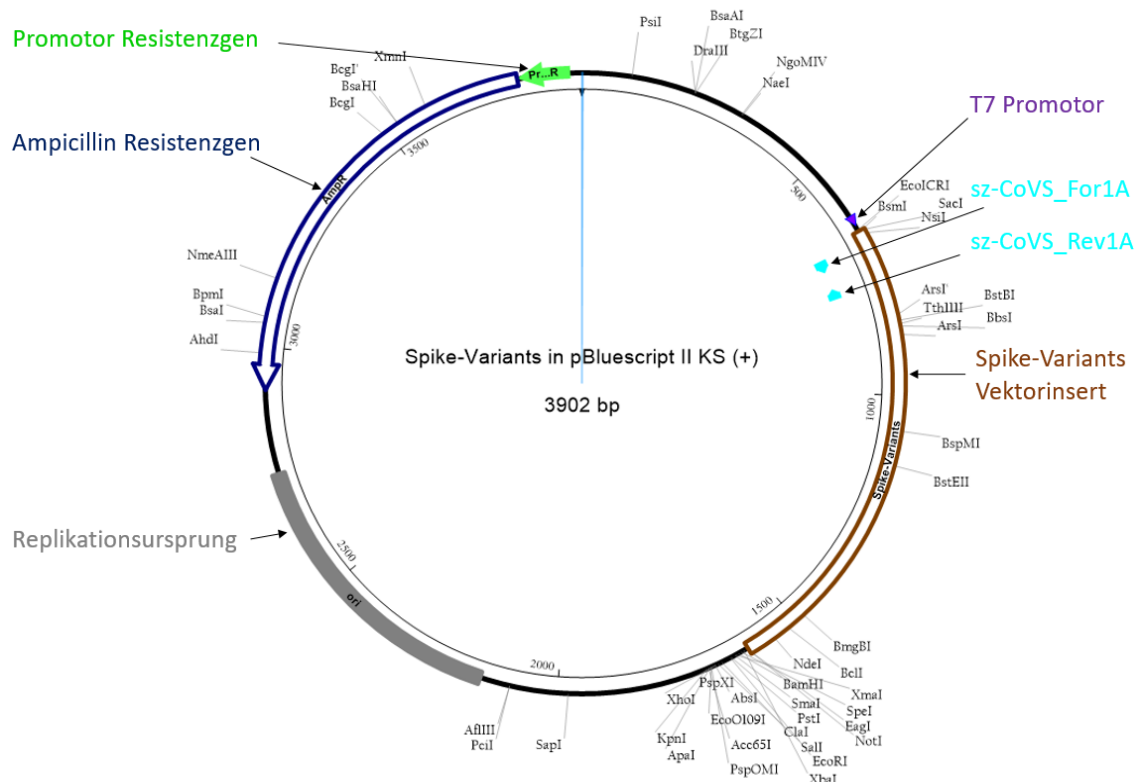


Abbildung 13: Spike- Variants in pBluescript II KS (+) (Spike Variant) mit dem Primerpaar „sz-CoVS\_For1A“ und „sz-CoVS\_Rev1A“; aus DNASTar SeqBuilder Pro 17.

#### 2.12.4.1 Transformieren und Isolieren der Plasmide

Das Spike- Variants in pBluescript II KS (+)-Plasmid (Spike- Variant) mit der Sequenz des Spikeproteins mit den eingefügten Mutationen wurde als Lyophilisat (4 µg DNA) geliefert. Dieses wurde in 20 µl RNase- und DNase-freiem Wasser gelöst und eine 200 ng/µl Konzentration erstellt. Die Transformation erfolgte in kompetente Zellen die der Arbeitsgruppe bereits vorlagen, sogenannte „DH10 Beta“ Zellen. Um das Plasmid zu isolieren wurde das QIAGEN® Plasmid Mini Kit verwendet und so ca. 90 µl Plasmid-DNA erhalten. Im weiteren Verlauf wurde mittels Qubit™ Fluorometer und dem Qubit™ dsDNA HS Assay Kit die Endkonzentration gemessen. Dies erfolgte nach dem Protokoll des Kits für das „Spike-Variants in pBluescript II KS (+)“ (Spike Variant) Plasmid. Es wurde eine Endkonzentration von 246 ng/µl Plasmid-DNA gemessen. Für die Messung wurde das Qubit™ dsDNA HS Assay Kit verwendet und nach Protokollangaben folgendermaßen angesetzt: Zunächst wurde für die Herstellung der Qubit™ worksolution das Qubit™ dsDNA HS reagent in einer Konzentration von 1:200 mit dem Qubit™ dsDNA HS buffer angesetzt. Für die Herstellung der Standards wurden jeweils 190 µl der Qubit™ worksolution und 10 µl des jeweiligen Standards angesetzt. Für die Messung der Plasmid- DNA wurden 198 µl Qubit™ worksolution und 2 µl der jeweiligen Plasmid-DNA eingesetzt. Alle Ansätze wurden dann für 5 Sekunden gevortext und im Anschluss für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Thermo Fisher Scientific 2022b). Die Messungen wurden dann jeweils dreimal erhoben und daraus das arithmetische Mittel erhoben, welches oben bereits aufgeführt wurde.

Für das Plasmid “pCI-neo-Spike-SARS-CoV-2-2020” (Spike) lag eine Lösung mit einer Endkonzentration von 57 ng/µl Plasmid-DNA bereits vor.

#### 2.12.4.2 Linearisierung der Plasmid-DNA

Für die Transkription mussten zunächst die Plasmide linearisiert werden. Dies geschah über die „Not I“-Schnittstelle. Es wurde jeweils 1 µg DNA aus der zuvor durchgeführten Qubit™-Messung eingesetzt. Ein Teil des Ansatzes wurde auf ein 1%-TBE-Gel aufgetragen, um über eine 1kb plus DNA-Leiter den Erfolg des Restriktionsverdau zu kontrollieren. Der Reaktionsmix betrug 50 µl. Für die Aufreinigung wurde die DNA phenolisiert in dem der Reaktionsmix im Verhältnis 1:1 mit 50µl, bestehend aus 25µl Phenol und 25µl Tris gesättigten (ph 7,5) Chlorophorm, gemischt. Aus diesem Gemisch wurde 50µl der wässrigen Phase ab pipettiert und mit 50µl Chloroform gemischt. Aus diesem Gemisch wurden wieder 50µl der wässrigen Phase ab pipettiert und mit 50µl Chloroform

gemischt. Für die Ausfällung der DNA wurde aus dieser Mischung dann 45 µl der wässrigen Phase ab pipettiert und mit 10% 3 M Natriumacetat sowie 2 Volumen (90 µl) Ethanol gemischt. Diese Lösung wurde bei -20°C für 30 Minuten inkubiert und im Anschluss das Pellet über Zentrifugation bei 15 000 Umdrehungen pro Minute bei 4°C für 10 Minuten gesammelt. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol gereinigt. Abschließend wurde die DNA jeweils in 20 µl DEPC-Wasser resuspendiert und die Konzentration mit dem Qubit™ ds DNA HS Assay Kit jeweils gemessen und folgende Werte bestimmt: „pCI-neo-Spike-SARS-CoV-2-2020“ (Spike) mit 147 ng/µl und „Spike- Variants in pBluescript II KS (+)“ (Spike Variant) mit 44,8 ng/µl. Die Messung erfolgte nach dem gleichen Schema wie im Unterkapitel 2.12.4.1 „Transformieren und Isolieren der Plasmide“ (Thermo Fisher Scientific 2022b).

#### 2.12.4.3 Transkription der linearisierten DNA in RNA

Aus den oben gemessenen DNA Resuspensionen wurde jeweils ca. 1 µg in RNA transkribiert. Hierfür wurde das TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit verwendet. Zunächst wurden für jeden Reaktionsmix zunächst alle Komponenten aufgetaut und gevortext sowie kurz zentrifugiert, um die Reagenzien wieder am Boden des Caps zu sammeln. Der „TranscriptAid Enzym Mix“ und die entsprechenden Nukleotide wurden im weiteren Verlauf auf Eis gelagert und der „5X TranscriptAid Reaction Buffer“ wurde bei Raumtemperatur belassen. Durch die verschiedenen Konzentrationen war es nötig mehrere Reaktionsmixe (6 Stück) anzusetzen. Vor dem Ansetzen der Reaktionsmixe wurde noch für alle sieben Reaktionsmixe der „ATP/CTP/ GTP/ UTP mix“ zusammengestellt. 14 µl ATP, 14 µl CTP, 14 µl GTP sowie 14 µl UTP wurden zu 56 µl „ATP/CTP/ GTP/ UTP mix“ kombiniert. Anschließend wurden die Reaktionsmixe wie folgt angesetzt:

Komponenten	2 x Spike/ “pCI-neo-Spike- SARS-CoV-2-2020”	3 x Spike-Variants in „pBluescript II KS (+)“	Kontrolle
DEPC-treated water	2 x 0 µl	3 x 0 µl	4 µl
5x TranscriptAid Reaction Buffer	2 x 4 µl	3 x 4 µl	4 µl
ATP/CTP/ GTP/ UTP mix	2 x 8 µl	3 x 8 µl	8 µl
Template DNA	2 x 6 µl	3 x 6 µl	2 µl
TranscriptAid Enzyme Mix	2 x 2 µl	3 x 2 µl	2 µl
Volumen pro Reaktion	2 x 20 µl	3 x 20 µl	20 µl

*Tabelle 5: Reaktionsmix-Zusammensetzung für das Umschreiben der Plasmid-DNA in RNA (Thermo Fisher Scientific 2014).*

Nun wurden die Reaktionsmixe gemischt und anzentrifugiert. Darauffolgend wurden die Reaktionsmixe bei 37°C für zwei Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurden alle

zusammengehörigen Reaktionsmische (jeweils von Spike und Spike-Variants) gepoolt und bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Vor deren Weiterverarbeitung wurde über den Kontrollmix der Erfolg der Transkription bestimmt. Hierfür wurden  $5\ \mu\text{l}$  dieses Reaktionsmixes mit  $195\ \mu\text{l}$  DEPC-Wasser versetzt und dadurch vierzigfach verdünnt. Darauf aufbauend wurden  $3\ \mu\text{l}$  der Verdünnung mit  $3\ \mu\text{l}$  des „2X RNA Loading Dye Solution Buffer“ aus dem Kit gemischt. Diese Probe wurde dann für 10 Minuten bei  $70^{\circ}\text{C}$  erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Abschließend wurde die wieder abgekühlte Probe mit Ethidiumbromid auf ein 1%iges TBE-Agarose-Gel geben und mit Hilfe der „RiboRuler™ RNA Ladder, high range“ ausgewertet.

#### 2.12.4.4 Template-DNA Entfernung durch DNase-Verdau

Für den DNase-Verdau der restlichen Proben wurden diese zunächst aufgetaut. Dafür wurde das RNeasy® Mini Kit von QIAGEN (Appendix C) verwendet. Zunächst wurde die als Lyophilisat vorliegende DNase über eine RNase-freie Nadel mit RNase-freiem Wasser gelöst und im Anschluss aliquotiert. Für den DNase-Verdau der Proben wurden zwei Reaktionsmische erstellt. Einen für die umgeschriebene Plasmid-DNA von „pCI-neo-Spike-SARS-CoV-2-2020“ (Spike) und einen für „Spike- Variants in pBluescript II KS (+)“ (Spike- Variant). Für den Reaktionsansatz des „pCI-neo-Spike-SARS-CoV-2-2020 (Spike)“ wurden die  $40\ \mu\text{l}$  ( $2 \times 20\ \mu\text{l}$ ) des Transkriptions-Reaktionsmix mit  $10\ \mu\text{l}$  RDD-Puffer aus dem Kit, sowie  $2,5\ \mu\text{l}$  DNase-I-Stocklösung versetzt. Abschließend wurde mit  $47,5\ \mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser auf  $100\ \mu\text{l}$  Gesamtvolumen aufgefüllt. Für den Reaktionsansatz mit „Spike-Variants in pBluescript II KS (+)“ (Spike Variant) wurden die  $60\ \mu\text{l}$  ( $3 \times 20\ \mu\text{l}$ ) des Transkriptions-Reaktionsmix mit  $10\ \mu\text{l}$  RDD-Puffer und  $2,5\ \mu\text{l}$  DNase-I-Stocklösung versetzt. Abschließend wurde dann mit  $27,5\ \mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser auf  $100\ \mu\text{l}$  aufgefüllt. Jeweils wurden die Ansätze dann mit einer neuen Pipettenspitze gemischt. Beide Reaktionsmische wurden dann bei  $25^{\circ}\text{C}$  für 15 Minuten inkubiert.

#### 2.12.4.5 RNA-Aufreinigung nach DNase-Verdau

Zur Aufreinigung der RNA wurde das „GeneJET RNA Purification Kit“ von Thermo Scientific verwendet. Die Aufreinigung erfolgte direkt im Anschluss an den DNase-Verdau. Die  $100\ \mu\text{l}$  Reaktionsmix des DNase-Verdau wurden jeweils mit  $300\ \mu\text{l}$  „Lysis Buffer“ ohne  $\beta$ -Mercapto-ethanol mit einer Pipette gemischt. Anschließend wurden  $180\ \mu\text{l}$  Ethanol absolut hinzu pipettiert. Dieser Mix wurde dann jeweils auf eine „GeneJET RNA Purification Column“ überführt, welche in ein Auffang-Cap gesteckt wurde. Diese Spinsäule mit Cap wurde für eine Minute mit  $\geq 12.000 \times g$  zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Auffang-Cap, in dem die „GeneJET RNA Purification Column“ steckte, verworfen und die Säule in ein frisches  $2\ \text{ml}$ -Cap gesteckt. Auf die Säule wurden  $700\ \mu\text{l}$

„Wash Buffer1“ aufpipettiert und diese wiederum bei 12.000 x g für eine Minute zentrifugiert. Der Durchlauf wurde hiernach verworfen. Anschließend wurden 600 µl des „Wash Buffer2“ auf die Spinsäule aufgetragen, wonach die wieder für eine Minute mit 12.000 x g zentrifugiert wurde. Auch nach diesem Schritt wurde der Durchlauf wieder verworfen. Nun wurden 250 µl „Wash Buffer2“ auf die Säule aufgetragen und für zwei Minuten bei 12.000 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurden die „GeneJET RNA Purification Column“ in ein 1,5 ml steriles und RNase-freies Mikrozentrifugationsröhrchen überführt. Abschließend wurde 50 µl RNase-freies Wasser auf die Säule aufgetragen und dann für eine Minute bei 12.000 x g zentrifugiert um die RNA zu eluieren. Die eluierte RNA wurde aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

Die Konzentration eines Teils der eluierten RNA beider Sequenzen wurde im Anschluss an die Reinigung mit dem Qubit™ RNA HS Assay Kit jeweils gemessen. bestimmt: Für die Messung wurde das Qubit™ RNA HS Assay Kit verwendet und nach Protokollangaben folgendermaßen angesetzt: Zunächst wurde für die Herstellung der Qubit™ work-solution das Qubit™ RNA HS reagent in einer Konzentration von 1:200 mit dem Qubit™ RNA HS buffer angesetzt. Für die Herstellung der Standards wurden jeweils 190 µl der Qubit™ worksolution und 10 µl des jeweiligen Standards angesetzt. Für die Messung der Plasmide wurden 197 µl Qubit™ worksolution und 3µl der jeweiligen RNA-Elutionsvolumina eingesetzt. Die eingesetzten Probenvolumina wurden vor der Messung alle 1:10 in DEPC-Wasser /RNase freiem Wasser verdünnt. Die Messung ergab folgende Werte: „pCI-neo-Spike-SARS-CoV-2-2020“ (Spike) mit 333 ng/µl und „Spike-Variants in pBluescript II KS (+)“ (Spike Variant) mit 301 ng/µl. Alle Ansätze wurden dann für 5 Sekunden gevortext und im Anschluss für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Da für nachfolgende Versuche eine Molekülmenge von ca. 217.000 nicht überschritten werden sollten, wurde mithilfe des Berechnungstools „molbiol“ (Barnett et al. 2022) die Konzentration für beide Sequenzen berechnet. Diese Molekülmenge wurde durch das verwendete QIAcuity® One-Step Viral RT-PCR Kit vorgegeben, welches für den Varianten Nachweis verwendet wurde. Für „pCI-neo-Spike-SARS-CoV-2-2020“ (Spike Vektorinsert 3823 Basenpaare) wurde darum eine 1:1.000.000 Verdünnung erstellt, aus der 1,3 µl die Molekülzahl von ca. 217.000 Moleküle nicht überschritten (berechnet 154.051.813.680 Moleküle in der unverdünnten Lösung). Für „Spike- Variants in pBluescript II KS (+)“ (Spike-Variants Vektorinsert mit 965 Basenpaare länge) musste für die oben genannte Molekülmenge von ca. 200.000 eine Verdünnung von 1:10.000.000 erstellt werden, aus der 3,6 µl entnommen werden konnten (berechnet 551.653.099.298 Moleküle in der unverdünnten Lösung).

#### 2.12.4.6 Transkription der gereinigten RNA in cDNA für das QIAcuity® EG PCR Kit

Für das QIAcuity® EG PCR Kit wurde keine RNA, sondern deren cDNA (das Kit funktioniert nur mit DNA) als Template benötigt. Dieses Kit beinhaltet keine reverse Transkriptase. Darum musste extern dieser Arbeitsschritt vorgeschaltet werden. Es wurden 10 µl der RNA nach dem gleichen Protokoll wie in Unterkapitel 2.10 „Transkription der RNA in cDNA“ in cDNA transkribiert.

Die cDNA wurde mit dem Qubit™ Fluorometer in einer 1:10-Verdünnung gemessen. Die Messung der cDNA-Konzentration wurde nach dem gleichen Schema durchgeführt wie in Unterkapitel 2.11 „Qubit™-Konzentrationsbestimmung der cDNA“. Die Werte wurden dreifach erhoben und das arithmetische Mittel daraus bestimmt. Für das Spike wurde eine Konzentration in 1:10 von 13,8ng/µl bestimmt. Also in der unverdünnten Lösung 138ng/µl. Für Spike- Variants wurde in der 1:10 Verdünnung 8,37ng/µl bestimmt und also in der unverdünnten Lösung 83,7 ng/µl. Die sich daraus ergebende Konzentrationen wurde dann mit Hilfe des Onlinetools „molbiol“ (Barnett et al. 2022) im Konzentrationsrechner für DNA eingegeben und die Molekülmenge festgehalten Für das Spike wurden 3823 Basenpaare angegeben und für das Spike Variant 965 Basenpaare. Anschließend wurde die Verdünnung für den Versuch mit dem QIAcuity® EG PCR Kit für ca. 65.000 Moleküle bestimmt, welche die QIAcuity® One optimal in diesem Kit detektieren kann. Diese Detektionsgrenze an Molekülen sollte demnach nicht überschritten werden. Für das Spike Variant wurde eine Verdünnung von 1:10.000.000 berechnet und für das Spike 1:50.000.000. Für das Spike mussten für die ca. 65.000 Moleküle ca. 4,62 µl aus der 1:50.000.000 Verdünnung eingesetzt werden da 66.989.090.845 Moleküle mit „molbiol“ bestimmt wurde in der Ausgangslösung (Barnett et al. 2022). Für das Spike Variants mussten aus einer 1:10.000.000 Verdünnung ca. 3,84µl eingesetzt werden, da mit „molbiol“ 163.333.111.849 Moleküle in der Ausgangslösung berechnet wurden (Barnett et al. 2022).

#### 2.12.5 Primer QIAcuity® EG PCR Kit für den allgemeinen SARS-CoV-2 Nachweis

Die Primersequenzen lagen bereits vor und wurden der Veröffentlichung „Specific allelic discrimination of N501Y and other SARS-CoV-2 mutants by ddPCR detects B.1.1.7 lineage in Washington State“ entnommen (Perchetti et al. 2021). Ursprünglich waren diese Primer/TaqMan-PCR-Sonden-Kombinationen dazu konzipiert, Mutationen des Spike-Oberflächenproteins nachzuweisen. In diesem Versuch der Forschungsarbeit war jedoch das Ziel, einen generellen Nachweis von SARS-CoV-2 im Abwasser zu erbringen. Darum wurde nur ein Paar an Forward und Reverse Primern in diesem Teil der Arbeit verwendet, da diese, wie oben in den Plasmidkarten bereits gezeigt, sowohl in der

wildtypischen als auch in der angepassten Sequenz binden konnten; an einer Stelle, in der keine spezielle Mutation sich befindet.

Primer QIAcuity® EG PCR Kit-Versuch:

Forwardprimer: sz-CoVS\_For1A:

5'- TGTT CTTA CCTT TCTT TTCC AATG TTAC TT – 3' (Perchetti et al. 2021)

Reverseprimer: sz-CoVS\_Rev1A

5'- AATG GTAG GACA GGGT TATC AAAC CT – 3' (Perchetti et al. 2021)

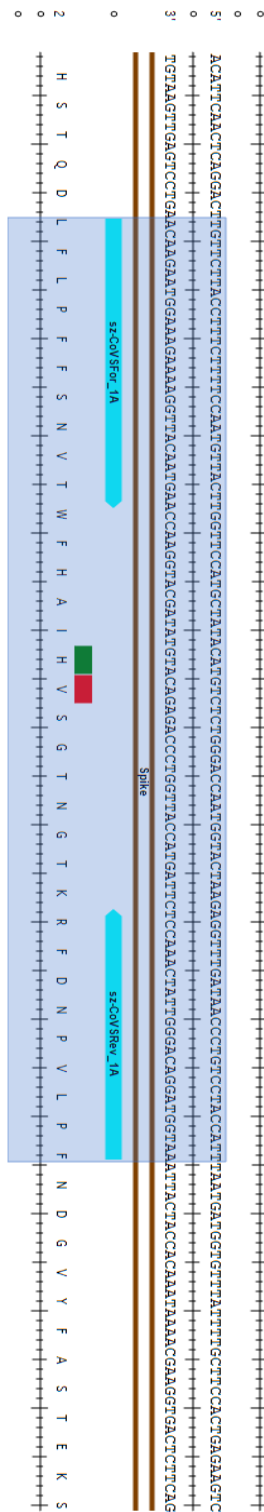


Abbildung 14: Darstellung des Forward- und Reverseprimers sowie deren Amplikon in DNASTar Seqbuilder an der Sequenz des Plasmides „pCI- neo- Spike-SARS-CoV-2-2020“ (Spike) mit der wildtypischen Sequenz des Spike-Proteins, sowie der Aminosäure Histidin (69) in dunkelgrün und Valin (70) in rot.

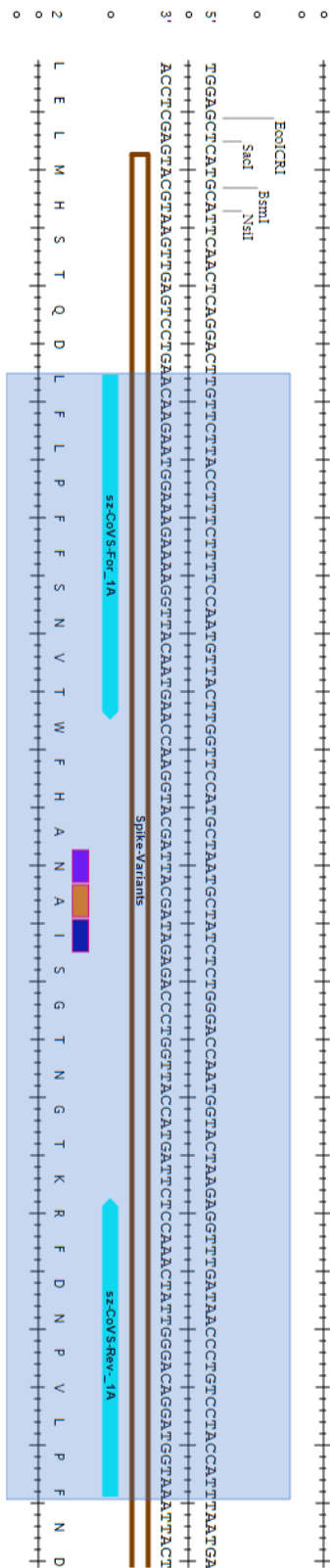


Abbildung 15: Darstellung des Forward- und Reversprimers in DNASTar Seqbuilder an der angepassten Sequenz des „Spike- Variants in pBluescript II KS (+)“ mit den Mutationen S:168N (lila) S:H69A (orange) und S:V70I (dunkelblau)

Initial wurden diese Primer mit der TaqMan-PCR-Sonde „SProbe1A“ zur Detektion der Deletion 69 - 70 (ACATGT) genutzt (Perchetti et al. 2021). Weiterhin war dieses Primer-set besonders geeignet, da das von diesen Primern vervielfältigte Amplikon 97 Basenpaare lang ist. Damit liegt es sehr nah an der optimalen Amplikonlänge für das QIAcuity® EG PCR Kit (QIAGEN GmbH 2021b). Ursprünglich waren die Primer jeweils wie folgt benannt: Forwardprimer: „SForward1A“. Dieser Primer wurde mit „sz-CoVS\_For1A“ benannt und mit der oben bereits genannten Sequenz von einer externen Firma hergestellt. Ähnliches gilt für den Reverseprimer: „SReverse1A“. Dieser Primer wurde ebenfalls extern generiert und mit „sz-CoVS\_Rev1A“ benannt.

Um die Primer in den Konzentrationen, die für den quantitativen Nachweis des Virus mit der QIAcuity dPCR nötig waren, anzusetzen, wurde folgendermaßen vorgegangen:

Das EG PCR Kit benötigte die Primer in einer Endkonzentration der Primer jeweils von 0,4 µM. Darum wurden für 100 µl Primer-Mix 4 µl jeweils der 100µMolaren Forwardprimerstocklösung und 4 µl der 100µM Stocklösung des Reverseprimer mit 92 µl RNase-freiem Wasser versetzt.

#### 2.12.6 Etablierung der Kontrollen des molekularen Nachweises

Zunächst wurden die entsprechenden Caps für die Proben beschriftet. Das 3x EvaGreen PCR Mastermix Cap wurde gevortext und anschließend auf Eis unter der Sicherheitswerkbank aufbewahrt. Währenddessen wurden die anderen Komponenten RNase-freies Wasser, Primermix, cDNA des Spikes sowie Gene für die Positivkontrollen auf Eis aufgetaut. Für den Mastermix wurde dann entsprechend der 3x EvaGreen PCR Master Mix mit dem Primermix aus Forward- und Reverseprimern eingesetzt. Dem Protokoll entsprechend wurden 13,3 µl 3x EvaGreen PCR Mastermix und 4 µl Primermix pro auszuwertendem Well gemischt, zuzüglich jeweils ein bis zwei Sicherheitsproben. Die Mischung von Primer Mix und 3x EvaGreen PCR Mastermix wird im weiteren Verlauf als Mastermix bezeichnet.

Pro Lauf wurden jeweils zwei bis drei Non Template Controls (NTCs) angesetzt (17,3 µl Mastermix und 22,7 µl RNase-freies Wasser) sowie für die Positivkontrollen jeweils drei Ansätze. Für die Positivkontrollen mit dem „pCI-neo-Spike-SARS-CoV-2-2020“ bzw. Spike wurde aus der 1:50.000.000-Verdünnung ein Volumen von 4,62 µl Template (in der gemessenen und unverdünnten Lösung 66.989.090.845 Moleküle) und 18,08 µl RNase-freiem Wasser, mit 2,31 µl Template und 20,39 µl RNase-freiem Wasser sowie eine Probe mit 1,16 µl Template und 21,54 µl RNase-freiem Wasser angesetzt. Für die Positivkontrollen mit dem „Spike-Variants in pBluescript II KS (+)“ bzw. Spike-Variant

wurden aus der 1:10.000.000-Verdünnung 3,84 µl Template (in der gemessenen unverdünnten Lösung 163.333.111.849 Moleküle) und 18,86 µl RNase-freies Wasser, 1,92 µl Template und 20,78 µl RNase-freies Wasser sowie 0,96 µl Template mit 21,74 µl RNase-freiem Wasser eingesetzt. Diese Verdünnungsreihe wurde eingeführt, falls die maximale Anzahl an Molekülen (65.000), welche die QIAcuity® One mit dem EG PCR Kit nachweisen kann, überschritten werden sollte. Um dies zu vermeiden, wurden hier die Verdünnungen im Verhältnis 1:2 und 1:4 zusätzlich eingefügt. Darüber hinaus wurde den Positivkontrollen der entsprechende Mastermix zugesetzt. Diese sechs Ansätze wurden jeweils, um Kontaminationen zu vermeiden, in separaten Caps angesetzt. Das Thermocycling wurde wie oben im dargestellten Schema (siehe Seite 26) programmiert.

Das Imaging wurde mit einer Belichtungszeit von 300 ms und einer Signalverstärkung (Gain) von 4 programmiert. In diesem Versuch wurde ebenfalls die QIAcuity® 26k 24-Well Nanoplate verwendet.

#### 2.12.7 Versuch zum Nachweis von SARS-CoV-2 im Abwasser

Der Versuchsablauf ist zunächst identisch mit dem Präparieren des Versuchs zur Etablierung der Kontrollen des molekularen Nachweises. Der Unterschied besteht darin, dass nur das Plasmid „pCI-neo-Spike-SARS-CoV-2-2020“ mit der wildtypischen Sequenz des Spikeproteins (Spike) als Positivkontrolle verwendet wurde. Für die Positivkontrollen wurden mit 4,62 µl aus cDNA und 18,08 µl RNase-freiem Wasser, eine Probe mit 2,31 µl Template cDNA und 20,39 µl RNase-freiem Wasser sowie eine Probe mit 1,16 µl Template und 21,54 µl RNase-freiem Wasser aus der 1:50.000.000-Verdünnung angesetzt (wie oben bereits beschrieben). Die Proben der Entnahmedaten wurden jeweils in einer 96-Well Mischplatte auf Eis angesetzt und mit den einzelnen Komponenten vermischt. In der Mischplatte wurden 12,7 µl RNase-freies Wasser, 10 µl der aus der RNA transkribierten cDNA und 17,3 µl Mastermix gemischt. Danach wurden die 96-Well Mischplatte sowie die einzelne Caps mit einem 96-Well Plattenschüttler geschüttelt und anschließend herunterzentrifugiert. Im Anschluss wurden alle Proben sowie alle Positivkontrollen und Negativkontrollen auf eine 24 Well 26k Nanoplate pipettiert. Dazu wurden die vorher angesetzten und dann gemischten 40 µl in die vorher festgelegten Wells der Nanoplates pipettiert. Abschließend wurde die Nanoplate versiegelt und in das Gerät, die QIAcuity®, eingeführt. In der QIAcuity® Software Suite sind die oben bereits genannten Einstellungen für das Thermocycling programmiert worden (siehe Seite 26). Das Imaging wurde ebenfalls mit einer Belichtungszeit von 300 ms und einer Signalverstärkung (Gain) von 4 durchgeführt.

## 2.13 Variantennachweis mit dem QIAcuity® One- Step Viral RT- PCR Kit

### 2.13.1 Funktionsweise QIAcuity® One und One-Step Viral RT-PCR Kit mit Primer/ Taqman-Sonden

In diesem Experiment wurde ebenfalls der oben beschriebene QIAcuity® dPCR verwendet. Zunächst wird in dieses Kit keine DNA eingesetzt, sondern RNA, da in diesem Kit eine Reverse Transkriptase vorgeschaltet ist. Zudem wird in diesem Kit nicht mit einem fluoreszierenden Farbstoff gearbeitet, der in die DNA-Stränge des Amplikats interkaliert, sondern einen Primer/TaqMan-PCR-Sonden-Ansatz verfolgt. Diese Methode wurde in dem Experiment angewendet, da hier spezielle Mutationen nachgewiesen werden sollten. Besonders die für die Omikron-Variante spezifischen Kombinationen aus Mutationen sind mit diesem Nachweis präzise zu detektieren. Hierfür wurden, wie oben bereits erwähnt, Primer (jeweils ein Primerpaar aus Forward- und Reverseprimer) und Sonden (eine TaqMan-Sonde) verwendet. Diese Sonde ist wie folgt konstruiert: An der entsprechenden Basensequenz hängt ein Fluorochrom, auch Reporter genannt. Eine weitere Substanz, welche den fluoreszierenden Farbstoff mittels Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) daran hindert zu fluoreszieren, wird auch als Quencher bezeichnet. Solange sich der Farbstoff fix in der räumlichen Nähe zum Quencher befindet, kann das Fluorochrom nicht fluoreszieren. Eine Anregung des Farbstoffes ist nur möglich, wenn eine räumliche Trennung von Farbstoff und Quencher eintritt. Dieser Zustand tritt ein, sobald eine Verlängerung des DNA-Strangs, ausgehend von den Primern durch die TaqMan-Polymerase, stattfindet und so die TaqMan-Polymerase zur Sonde gelangt. Dann wird durch die 5' → 3' exonukleale Aktivität der TaqMan-Polymerase das Fluorochrom von der Sonde ausgelöst und kann abdiffundieren. Der Quencher verbleibt zunächst an der Sonde, bis diese komplett von der TaqMan-Polymerase abgebaut wurde. Nun kann der Quencher ebenfalls abdiffundieren. So ist eine räumliche Trennung von Fluorochrom und Quencher hergestellt (Thiemann et al. 2015). Der Fluoreszenzfarbstoff wird über die LED der QIAcuity® angeregt und fluoresziert entsprechend des Farbstoffs.

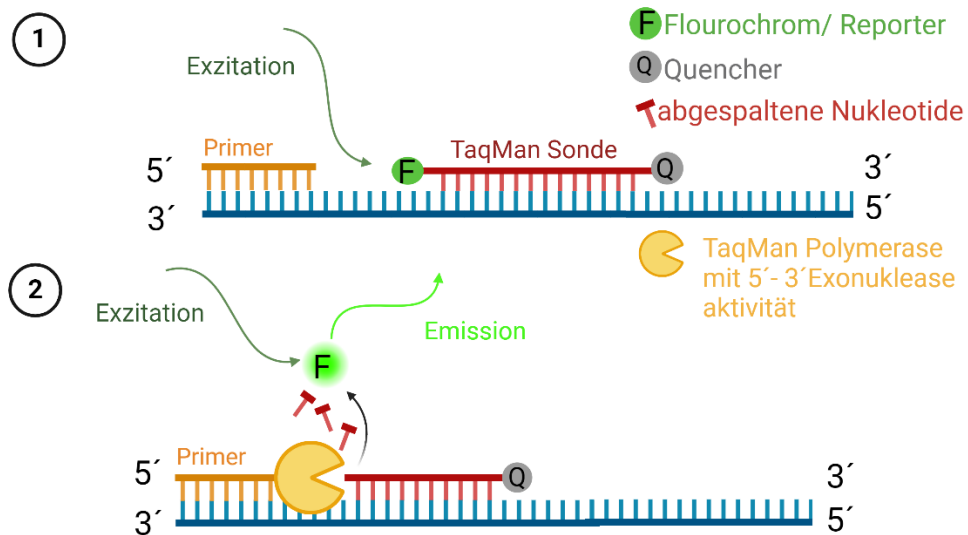


Abbildung 16: Funktionsweise des Nachweises mit dem für das QIAcuity® One-Step Viral RT-PCR Kit verwendeten TaqMan Sonden. Modifizierte Darstellung (QIAGEN GmbH 2021b). Erstellt mit BioRender.com

Es lässt sich zusammenfassen, dass sowohl die Primer als auch die Sonde am Template binden müssen, um ein Signal abgeben zu können. Sollten nur die Primer binden nicht aber die Sonde, deren Basensequenz genau auf die entsprechende Mutation abgestimmt ist, kann kein Signal detektiert werden. Um die entsprechenden Mutationen nachzuweisen, erweist sich dieses Verfahren, aus den oben genannten Gründen, als passend. Für dieses Experiment wurde nicht nur die transkribierte RNA aus der Plasmid-DNA mit der Sequenz des „Spike-Variants in pBluescript II KS (+) als Positivkontrolle mitausgewertet, sondern auch die transkribierte RNA aus der Plasmid-DNA des Spikes (pCI-neo-Spike-SARS-CoV-2-2020) als Negativkontrolle (siehe Unterkapitel 2.11.4.5 „RNA-Aufreinigung nach DNase- Verdau“). Diese Kontrolle stellte, in Abgrenzung zu den Non Template Controls (NTC), eine weitere Negativkontrolle dar.

### 2.13.2 Thermocycling und Imaging

Für das *Cycling* wurden folgende Einstellungen dem Handbuch des Kits entnommen und programmiert:

Set	Time	Temperatur °C
Reverse Transkription	4 min	50
Initiale PCR Hitzeaktivierung	2 min	95
2-step cycling (40 cycles)		
o Denaturation	30 sec	95
o Annealing/Ex-tension	60 sec	60
Hitzedesaktivierung	10 min	98

Tabelle 6: Cycling des QIAcuity® One-Step Viral RT-PCR Kit (QIAGEN GmbH 2024).

### *Imaging*

Für das Imaging wurden für den FAM-Kanal (Grün) folgende Werte festgelegt: Belichtungszeit: 500 ms, Signalverstärkung (Gain): 6.

#### 2.13.3 Etablierung der Positiv- und Negativkontrollen des molekularen Nachweises

Nähere Angaben zu den Plasmiden wurden bereits oben gemacht. Für den QIAcuity® One-Step Viral RT-PCR Kit-Versuch zum Nachweis einer SARS-CoV-2-Variante im Abwasser wurden für die Positivkontrollen, entsprechend der gemessenen Konzentrationen folgende Volumina der in RNA umgeschriebenen Plasmide, eingesetzt (siehe Unterkapitel 2.12.4.5 „RNA-Aufreinigung nach DNase-Verdau“). Für die Positivkontrolle mit „Spike-Variants in pBluescript II KS (+)“ für das Spike-Variants wurden 3,6 µl der 1:10.000.000 -Verdünnung eingesetzt (in der gemessenen und unverdünnten Lösung 551.653.099.298 Moleküle/µl). Für einen Teil der Negativkontrollen wurde ein Volumen von 1,3 µl des Plasmids „pCI-neo-Spike-SARS-CoV-2-2020“ (Spike) aus einer 1:1.000.000-Verdünnung entnommen (in der gemessenen und unverdünnten Lösung 154.051.813.680 Molekülen/µl). Die Entsprechenden Molekülmengen wurden mit „mobiol“ berechnet (Barnett et al. 2022). Für das QIAcuity® One-Step Viral RT-PCR Kit sind in der QIAcuity® One insgesamt 217.000 Moleküle nachweisbar (QIAGEN GmbH 2021b) und die Verdünnungen wurden so angepasst, dass die umgeschriebenen Plasmide diese Grenzen nicht überschreiten. Es wurden beide Plasmide verwendet, um nicht nur mit dem „Spike- Variants in pBluescript II KS (+)“ eine Positivkontrolle zu verwenden, sondern auch „pCI-neo-Spike-SARS-CoV-2-2020“ mit der wildtypischen Spikeprotein-Sequenz (Spike). Dies war nötig, um den spezifischen Nachweis sicherzustellen.

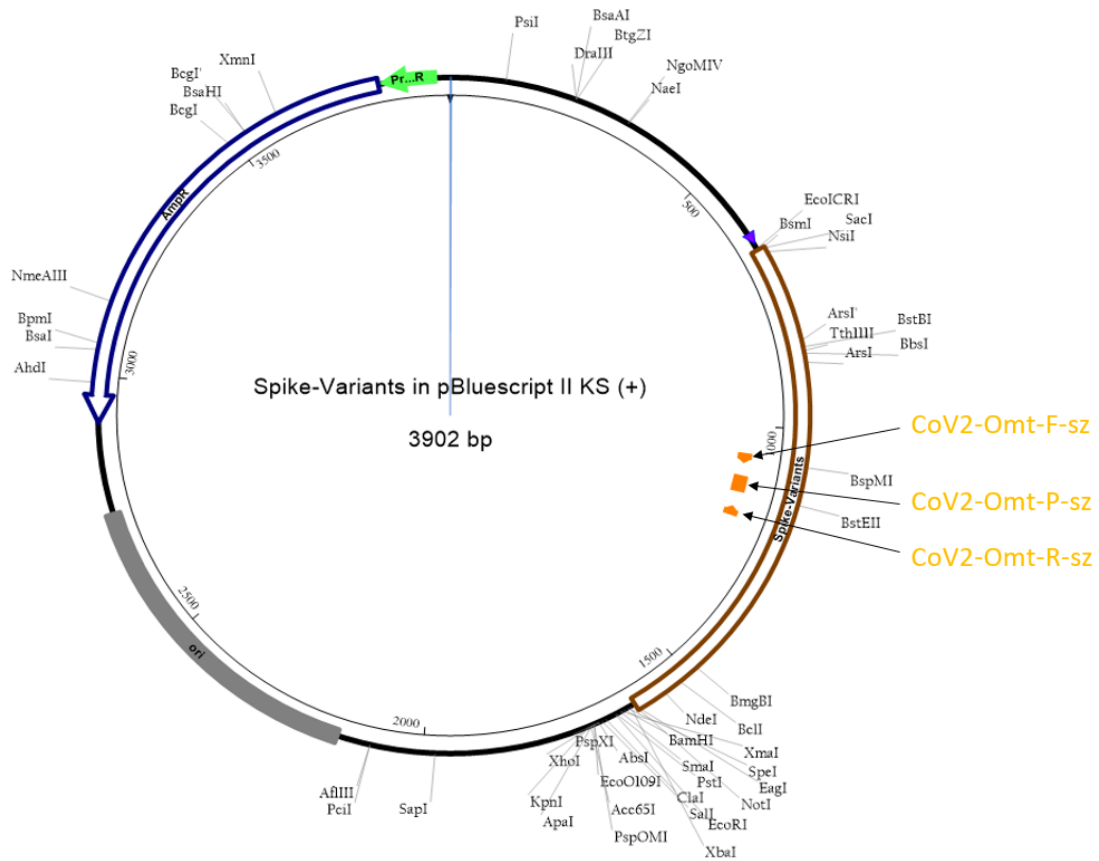


Abbildung 17: „Spike-Variants in pBluescript II KS (+)“ mit der Primer/Sonden-Kombination aus „CoV2-Omt-F-sz“, „CoV2-Omt-R-sz“ / „CoV2-Omt-P-sz“ (Orange); aus DNASTar Seqbuilder.

Der Plasmid „Spike-Variants in pBluescript II KS (+)“ wurde als Positivkontrolle verwendet, da in diesen Vektor eine Kombination von Mutationen eingefügt wurde, die auch in der Omikron-Variante nachgewiesen wurde (Hodcroft et al. 2024a). Dazu zählen folgende Mutationen:

S: S477N (Lila)
S: T478K (Pink)
S: E484A (Dunkelblau)
S: Q493R (Dunkelgrün)
S: G496S (Braun)
S: Q498R (Hellgrün)
S: N501Y (Gelb)
S: Y505H (Orange)

Tabelle 7: Liste der in „Spike-Variants in pBluescript II KS (+)“ eingefügten Mutationen für den Nachweis der Omikron-Variante

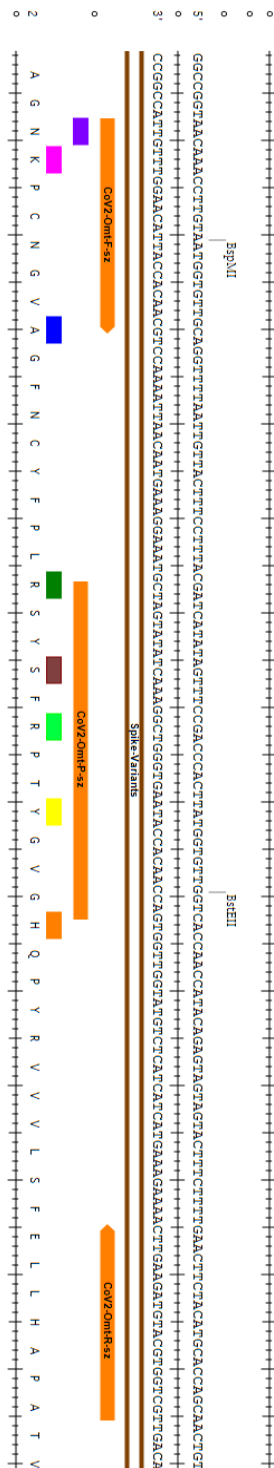


Abbildung 18: Ausschnitt aus „Spike- Variants in pBluescript II KS (+)“ mit den in der Tabelle aufgeführten Mutationen (entsprechend der Farbkodierung aus der Tabelle) sowie der Primer-/Sonden-Kombination aus „CoV2-Omt-F-sz“, „CoV2-Omt-R-sz“ / „CoV2-Omt-P-sz“ (Orange) sowie die Spike -Variant-Sequenz; aus DNASTar Seqbuilder

In der nachfolgenden Abbildung wird das “Spike- Variants in pBluescript II KS (+)“-Plasmid in Gänze aufgeführt ebenfalls mit den verwendeten Primer-/Sondenkombinationen sowie den oben genannten Mutationen, um die Position im Plasmid besser zu veranschaulichen.

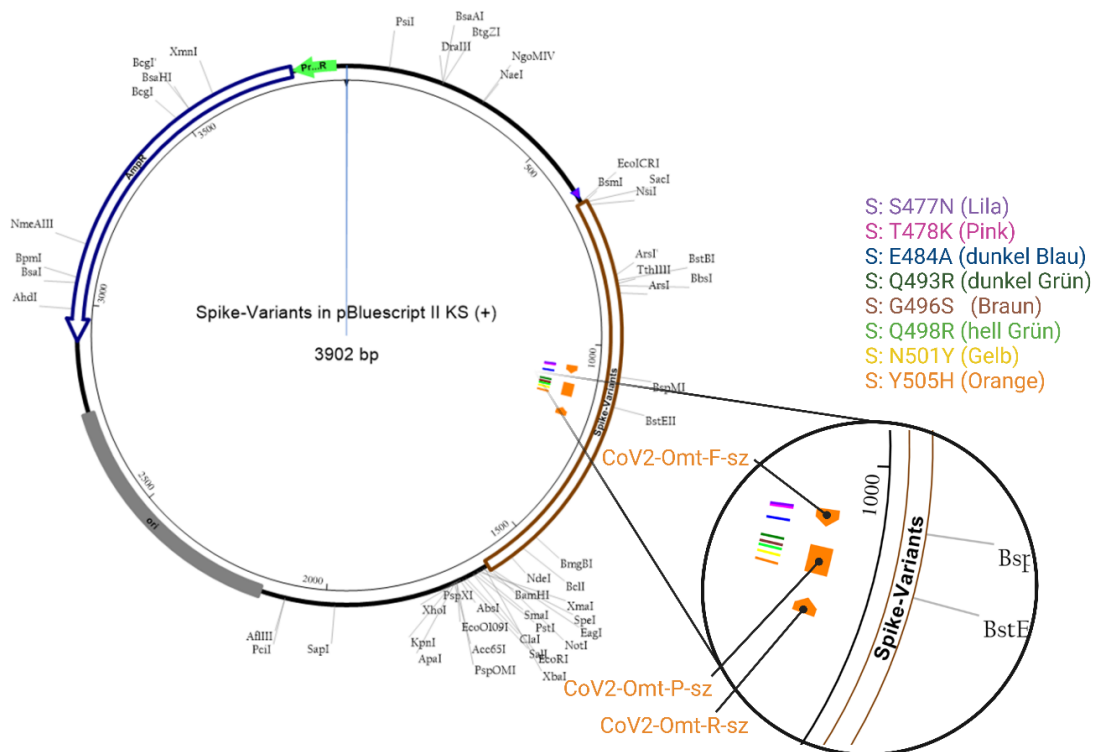


Abbildung 19: „Spike- Variants in pBluescript II KS (+)“ mit Mutationen für den Omikron-Nachweis aus Tabelle 7 (bunte Linien) sowie die Primer-/Sonden-Kombination aus „CoV2-Omt-F-sz“, „CoV2-Omt-R-sz“, „CoV2-Omt-P-sz“ (orangene Pfeile und Quader) mit Vergrößerung. Erstellt mit BioRender.com

#### 2.13.4 Primer

Die Primer und die Sonde für den Omikron-Nachweis sind einer Veröffentlichung der „European Commission, Joint Research Centre“ entnommen (Petrillo et al. 2021). Der Forwardprimer war dort mit dem Code „Omt-F“ beschrieben. Dieser Forwardprimer wurde unter dem Namen „CoV2-Omt-F-sz“ mit folgender Sequenz aus oben genanntem Paper generiert:

5' - AACA AACCC TTGT AATG GTGT TGC – 3' (Petrillo et al. 2021)

Der Reversprimer wurde mit „Omt-R“ bezeichnet. Dessen Herstellung erfolgte unter dem Namen „CoV2-Omt-R-sz“ mit der Sequenz:

5' - TGCT GGTG CATG TAGA AGTT C – 3' (Petrillo et al. 2021)

Die Sonde wurde im oben genannten Paper mit „Omt-P“ bezeichnet. Deren Herstellung erfolgte unter dem Namen „CoV2-Omt-P-sz“ mit der folgenden Sequenz:

5'- FAM-GATC ATAT AGTT TCCG ACCC ACTT ATGG TGTT GGTC – QSY- 3' (Petrillo et al. 2021)

Mit dieser Primer/ Sonden- Kombination kann folgendes Amplikon generiert werden:

5'- AACAAACC TTGT AATG GTGT TGCA GGTT TTAA TTGT TACT TTCC TTTA  
CGAT CATA TAGT TTCC GACC CACT TATG GTGT TGGT CACC AACC ATAC AGAG  
TAGT AGTA CTTT CTTT TGAA CTTC TACA TGCA CCAG CA- 3'

(Petrillo et al. 2021)

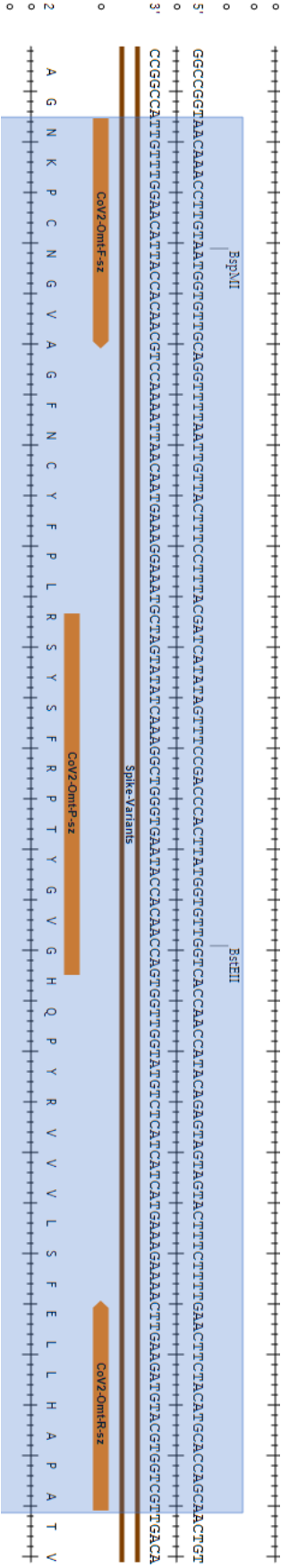


Abbildung 20: Amplikon des Omikron-Nachweis mit der oben aufgeführten Primer/Sonden Kombination aus DNStar Seqbuilder

Die QIAcuity® Software Suite wurde in der Version 2.1.7.182 /2.5.0.1 zur Programmierung der Läufe sowie zur Auswertung der Nanoplates verwendet.

### 2.13.5 Nachweis der Omikron-Variante im Abwasser

In diesem Versuch wurde die QIAcuity® Nanoplate 26k 24-Well Nanoplate verwendet. Für jeden Well der Nanoplate wurde zunächst ein Mastermix angesetzt bestehend aus 10 µl 4x One-Step Viral RT- PCR Mastermix Mix, 0,4 µl 100x Reverse Reverse Transkriptase Mix und 2 µl Primer Mix. Der Primer/ Sonden Mix besteht wiederum aus dem Primer „CoV2-Omt-F-sz“ und „CoV2-Omt-R-sz“, jeweils mit 8 µM und der Sonde „CoV2-Omt-P-sz“ mit 4 µM. So konnte für die Primer eine Endkonzentration von je 0,4µM und die Sonde 0,2µM erreicht werden.

Für die Positivkontrolle mit „Spike-Variants in pBluescript II KS (+)“ wurden 3,6 µl der 1:10.000.000-Verdünnung der aufgereinigten RNA aus dem Versuchsschritt des Unterkapitels 2.12.4.5 „RNA-Aufreinigung nach DNase-Verdau“ eingesetzt. Für einen Teil der Negativkontrollen wurde ein Volumen von 1,3 µl des Plasmids „pCI-neo-Spike-SARS-CoV-2-2020“ (Spike) aus einer 1:1.000.000-RNA-Verdünnung entnommen. Auf eine Verdünnungsreihe wurde hier verzichtet. Die Konzentrationen wurden so angepasst, dass die Plasmide nicht die ca. 217.000 Moleküle überschreiten die bei einem Primer-Sonden-Versuch mit dem QIAcuity® One-Step Viral RT-PCR Kit nicht überschritten werden dürfen.

Die Wells der Proben der Entnahmedaten wurden mit 12 µl der extrahierten Proben-RNA sowie jeweils mit 12,4 µl Mastermix versehen und 15,6 µl RNase-freiem Wasser. Die Wells der Positivkontrollen wurden mit 3,6 µl RNA des „Spike-Variants in pBluescript II KS (+)“-Plasmids (Spike Variant) versehen sowie mit 12,4 µl Mastermix und 24,6 µl RNase-freiem Wasser. Für die Negativkontrollen mit RNA des Spike-Oberflächenproteins wurde 1,3 µl des Plasmids „pCI-neo-Spike-SARS-CoV-2-2020“ (Spike) verwendet sowie 26,6 µl RNase-freies Wasser. Für die reinen NTCs, ohne jegliches Template, wurden der Mastermix und 27,6 µl RNase-freies Wasser verwendet.

Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen und auf Eis pipettiert. Die einzelnen Wells wurden zunächst in einer 96-Well Mischplatte angesetzt und dann in die oben beschriebene Nanoplate überführt. Für das Priming wurden die Werkseinstellungen ausgewählt.

### 3 Ergebnisse

Die vorliegende Forschungsarbeit soll das labortechnische Verfahren zur absoluten Quantifizierung etablieren, auf dessen Basis weiterführende Maßnahmen zur Probengewinnung und Auswertung aufgebaut werden können. Dies soll aktiv zur abwasserbasierten Epidemiologie und Surveillance am UKGM, Standort Gießen beitragen und deren Entwicklung voranbringen. Das Abwasser eines Krankenhauses beinhaltet größere Mengen Pathogene und Detergenzien, welche die Viren beschädigen können. Aus diesem Grund stellt der Nachweis von SARS-CoV-2 eine herausfordernde Aufgabe dar. Wegen der besonderen Zusammensetzung des Abwassers stellt sich die Frage, ob trotz dieser Bedingungen ein Nachweis von SARS-CoV-2 über den Pandemieverlauf möglich war. Da automatisierte Probengewinnungen am Standort Gießen noch nicht existieren, sind die Proben meistens am Vormittag des Probedatums, wie im Material- und Methodenteil beschrieben, entnommen und dann zur Aufbewahrung in die Mikrobiologie verbracht worden.

#### 3.1 Etablierung der Plasmide als Kontrollen

##### 3.1.1 Berechnung der Plasmidkonzentrationen

Wie oben beschrieben, wurden zunächst beide der initial in RNA umgeschriebenen Plasmide wieder in cDNA überführt und mithilfe von Qubit™ 4 Fluorometer und des Online Tools „molbiol“ (Barnett et al. 2022) die Molekülmenge pro  $\mu\text{l}$  bestimmt. Das QIAcuity® digital PCR System darf nicht zu überladen werden, denn diese digital PCR arbeitet optimal mit maximal 65.000 Molekülen für das EvaGreen PCR Kit und mit ca. 217.000 Molekülen für das OSV RT PCR Kit. Darum wurden für die Plasmide verschiedene Verdünnungen berechnet. Für das Plasmid des Spikes eine Verdünnung von 1:500.000 und für das der Spike-Variants eine Konzentration von 1:1.000.000 bestimmt. Eine solche Konzentration bedeutete mit dem verwendeten QIAcuity® EG PCR Kit für das Spike 4,62  $\mu\text{l}$  pro Well. Diese Konzentration wurde dann pro Lauf im Verhältnis 1:1, 1:2 und 1:4 im Rahmen des Vorversuchs ausgewertet.

Für das QIAcuity® One Step Viral RT PCR Kit wurde jeweils die einzusetzende Template- RNA mit der gleichen, oben bereits skizzierten, Methode mit dem Tool „molbiol“ (Barnett et al. 2022) berechnet. Für das wildtypische Spike wurde bei der oben genannten Konzentration ein Volumen von 1,3  $\mu\text{l}$  gelöste RNA errechnet. Für die RNA des angepassten Spikeproteins wurde ein Volumen von 3,6  $\mu\text{l}$  berechnet.

### 3.1.2 Etablierung der Kontrollen für den allgemeinen SARS-CoV-2 Nachweis mit dem QIAcuity® EvaGreen PCR Kit

Die digital PCR detektierte sowohl das Amplikon des Plasmids der wildtypischen Spikesequenz „pCI-neo-Spike-SARS-CoV-2-2020“, wie auch das Plasmid mit der angepassten Spikesequenz „Spike-Variants in pBluescript II KS (+)“. Die nachfolgende Graphik zeigt zunächst den Nachweis des wildtypischen Plasmids. In der Software Suite der QIAcuity® One werden zur visuellen Darstellung sogenannte Streudiagramme verwendet. Dabei werden alle Partitionen hinsichtlich ihrer Fluoreszenzintensität gemessen und in ein Verhältnis zueinander gesetzt. Partitionen die sich von den anderen absetzen, durch eine höhere Fluoreszenz absetzen, werden als positive Nachweise gewertet und für die Berechnung der absoluten Quantifikation als Virusnachweis berücksichtigt. Alle Partitionen, die unter eine von der Software berechnete Schwelle fallen, werden als negativ gewertet. Positive Partitionen werden nachfolgend blau dargestellt und negative Partitionen von der Software Suite als grau dargestellt. Die Fluoreszenzintensität wird auf der y-Achse des Streudiagramms aufgetragen. Aus diesem Grund sind die positiven Partitionen weiter oben als die negativen Partitionen aufgeführt. In A1 ist die 1:1- Verdünnung, in B1 die 1:2-Verdünnung und in C1 die 1:4-Verdünnung des wildtypisches Spike-Plasmids „pCI-neo-Spike-SARS-CoV-2-2020“ aufgeführt.

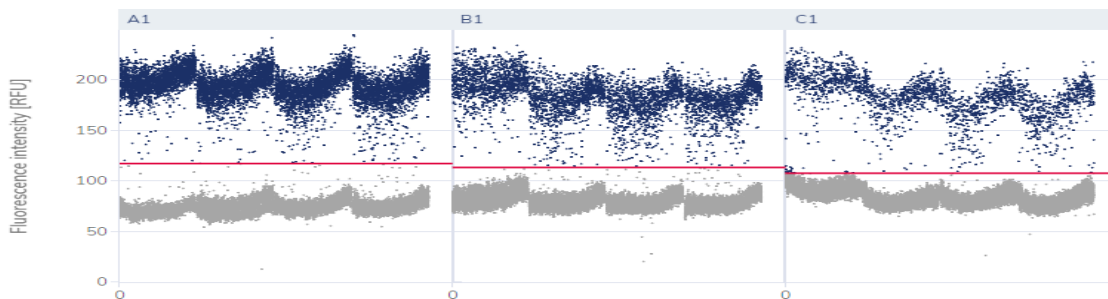


Abbildung 21: Verdünnungsreihe wildtypisches Spike-Plasmid „pCI-neo-Spike-SARS-CoV-2-2020“ (Spike): A1- 1:1-Verdünnung; B1- 1:2-Verdünnung; C1- 1:4-Verdünnung.

Wie hier graphisch in den Streudiagrammen deutlich wird, kann auch die Verdünnungsreihe nachempfunden werden. Die wellenförmige Darstellung kommt zustande durch die Art und Weise, wie die QIAcuity® One die Partitionen ausliest, um die Fluoreszenzintensitäten zu messen. Ähnliche Ergebnisse konnten auch für die angepasste Sequenz des Spike-Proteins mit dem Plasmid „Spike-Variants in pBluescript II KS (+)“ festgestellt werden. Hier wird in A2 die 1:1-Verdünnung, in B2 die 1:2-Verdünnung und in C2 die 1:4-Verdünnung dargestellt.

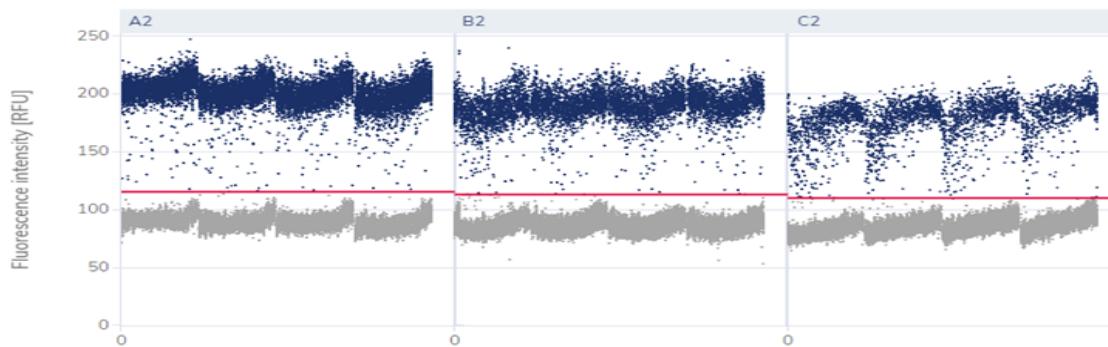


Abbildung 22: Verdünnungsreihe des angepassten Spike „Spike-Variants in pBluescript II KS (+)“ (Spike Variant): A2- 1:1-Verdünnung; B2- 1:2-Verdünnung; C2- 1:4-Verdünnung.

Auch hier ist die Verdünnung an den Streudiagrammen ablesbar. Hier kann festgehalten werden, dass beide Plasmide mit den verwendeten Primern und dem EvaGreen PCR Kit nachweisbar sind. Es können also sowohl die wildtypische Sequenz, wie auch die für Mutationen angepasste Sequenz nachgewiesen werden. Der molekulare Nachweis sollte darüber hinaus absolut quantifiziert werden. Darum zeigt die nachfolgende Tabelle die gemessenen positiven und negativen Partitionen und die daraus mit der Poissonverteilung berechnete Konzentration, als Ausdruck der absoluten Quantifikation, welche in Kopien/ $\mu$ l angegeben wird. Wie aus der Tabelle 8 zu erkennen, sind die beiden Plasmide mit dem oben beschriebenen Primern nachweisbar. Ebenfalls lässt sich die Verdünnung an den sich ungefähr halbierenden positiven Partitionen ablesen:

wildtypisches Spike/ angepasstes Spike Verdünnung	Gewertete Partitionen	Positive Partitionen	Negative Partitionen	Konzentration Kopien/ $\mu$ l
A1 Wildtypisches Spike 1:1	25.446	9.177	16.269	533,8
B1 Wildtypisches Spike 1:2	25.436	4.746	20.723	261,5
C1 Wildtypisches Spike 1:4	25.459	2.441	23.018	128,8
A2 Spike- Variants 1:1	25.436	12.462	12.971	827,2
B2 Spike- Variants 1:2	25.462	6.905	18.557	409,5
C2 Spike- Variants 1:4	25.456	3.535	21.921	199,8

Tabelle 8: Quantifikation des molekularen Nachweises des wildtypischen und des angepassten Spike-Proteins.

Nach diesen Ergebnissen sind die Positivkontrollen für den allgemeinen SARS-CoV-2-Nachweis etabliert.

### 3.1.3 Etablierung der Kontrollen für den Variantennachweis mit dem QIAcuity® One-Step Viral RT-PCR Kit

Im Versuch zum Nachweis der Omikron-Variante mit dem QIAcuity® One-Step Viral RT-PCR Kit wurden wieder die beiden oben beschriebenen Plasmide eingefügt. Das „pCI-neo-Spike-SARS-CoV-2-2020“-Plasmid wurde hier als Negativkontrolle verwendet. Das Plasmid „Spike-Variants in pBluescript II KS (+)“ mit den eingefügten Mutationen, wurde

für die Positivkontrolle verwendet und erkannt. Hier ging es zunächst nicht darum Verdünnungsreihen nachzuweisen, sondern zu erfassen, ob die digital PCR in der Lage ist mit den ausgewählten Primer-/Sonden-Kombinationen wildtypische und angepasste bzw. mutierte Sequenzen zu erkennen. Für das QIAcuity® One-Step Viral RT-PCR Kit ist die Phasentrennung von besonderer Bedeutung, um im Verhältnis zu den Partitionen mit etwas geringerer Fluoreszenz positive und negative Partitionen voneinander zu trennen. Diese beiden Phasen können nah beieinander liegen. Die Software war in der Lage, auch diese geringe Phasentrennung zu registrieren und auszuwerten. E1 sind die Partitionen der wildtypischen Sequenz mit dem Plasmid „pCI-neo-Spike-SARS-CoV-2-2020“ (Spike). Hier wurde keine Phasentrennung erkannt. E2 sind die Partitionen, die das Plasmid mit der angepassten Sequenz „p-blueskript II KS (+)“ enthalten. Eine vergrößerte Ansicht ist in der Lage die Phasentrennung deutlicher darzustellen. Hier zu sehen ist die Phasentrennung von den Partitionen der Positivkontrolle E2 mit der angepassten Spike-Sequenz:

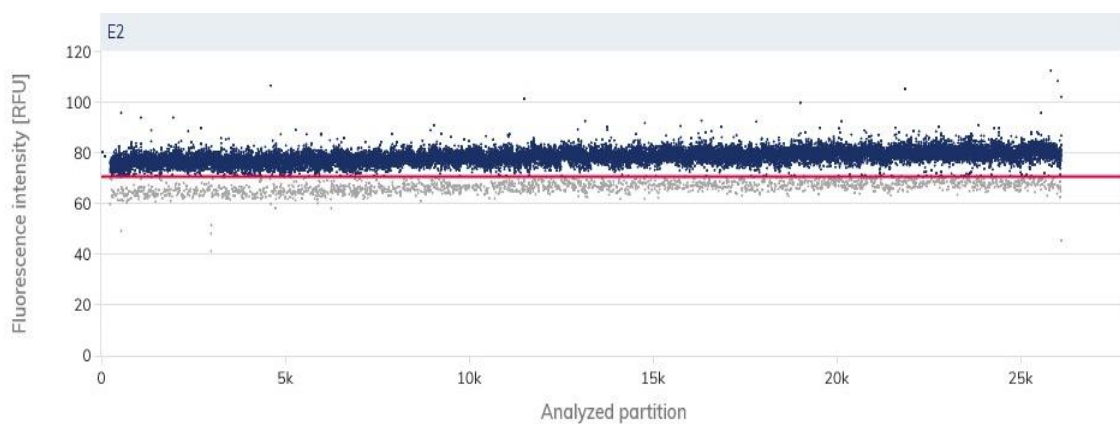


Abbildung 23: Vergrößerte Ansicht der Positivkontrolle E2 mit dem „Spike-Variants in p-Bluescript II KS (+)“. Die Phasentrennung ist hier deutlich zu erkennen. Der Nachweis erfolgte mit der Primer/Sonden-Kombination „CoV2-Omt-F-sz“, „CoV2-Omt-R-sz“ / „CoV2-Omt-P-s und dem QIAcuity® One-Step viral RT-PCR Kit

Die oben erwähnte Phasentrennung ist bei der Negativkontrolle mit der wildtypischen Sequenz (Spike) nicht zu erkennen:

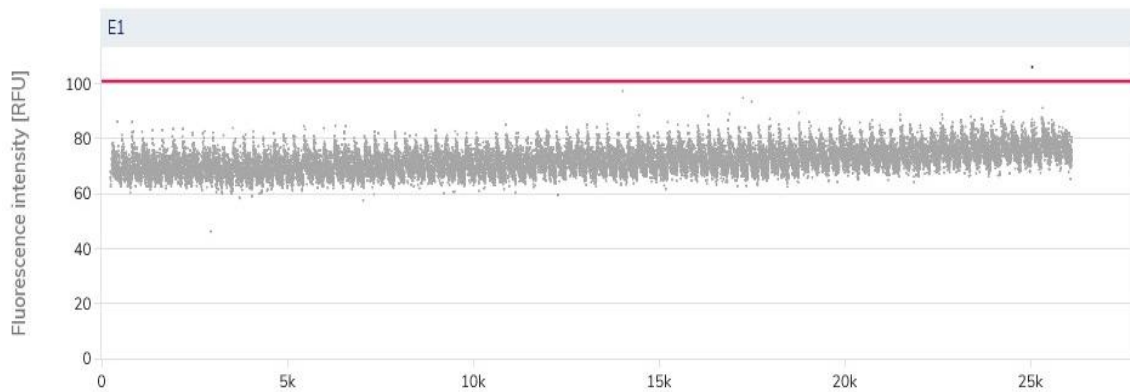


Abbildung 24: Vergrößerte Ansicht der Negativkontrolle E1 mit dem Plasmid der wildtypischen Sequenz „pCI-neo-Spike-SARS-CoV-2-2020“. Die Phasentrennung ist hier nicht zu erkennen. Die Etablierung erfolgte mit der Primer/Sonden-Kombination „CoV2-Omt-F-sz“, „CoV2-Omt“ / „CoV2-Omt-P-s und dem QIAcuity® One-Step viral RT-PCR Kit.

Die Software-Suite hat in absoluten Zahlen folgende Anzahl an Partitionen für die Auswertung erkannt und berücksichtigt:

Kontrolltyp	Erkannte Partitionen	Positive Partitionen	Negative Partitionen
E1 wildtypisches Spike	25.140	1	25.139
E2 Spike-Variants	25.423	23.349	2.074

Tabelle 9: Erkannte Partitionen der verwendeten Primer/Sonden-Kombination „CoV2-Omt-F-sz“, „CoV2-Omt-R-sz“ / „CoV2-Omt-P-sz“ mit der QIAcuity® One und dem QIAcuity® One-Step viral RT-PCR Kit

Die Kontrollen sind damit für den Variantennachweis etabliert.

### 3.2 Konzentrationsbestimmung der cDNA aus der extrahierten und umgeschriebenen total RNA

Aus allen Proben von je 40 ml Probenvolumen wurde mittels Polyethylenglykol-Fällung und Thiazol-Chlorophorm-Extraktion die total RNA extrahiert. Vor der Eluierung wurde in 40 µl RNase-freiem Wasser ein DNase-Verdau vorgeschaltet.

Im Anschluss an die Extraktion der total RNA mussten diese für den weiteren Verlauf in cDNA überführt werden. Dieser Teil des Experiments wurde mittels des „High Capacity cDNA Reserve Transkription Kit“ durchgeführt. Das hier verwendete QIAcuity® EG PCR Kit arbeitet ausschließlich mit DNA, da in diesem Kit intern keine Vorschaltung einer reversen Transkription integriert ist. Aus diesem Grund wurden 10 µl des Elutionsvolumens an total RNA in cDNA transkribiert.

Um den Erfolg der Extraktion sowie der angeschlossenen Transkription zu bewerten, wurde mittels Qubit™ 4 Fluorometer die cDNA-Konzentration gemessen. Bei der Messung mit dem Fluorometer wurden nach dem Einlesen der Standards alle Werte dreifach

erhoben und aus den drei Werten jeweils das arithmetische Mittel berechnet. Die entsprechenden Werte sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Nummer	Entnahmedatum	cDNA-Konzentration im eingesetzten Probenvolumen (ng/ $\mu$ l)
1	11.11.2020	14,7
2	17.11.2020	14,9
3	24.11.2020	15,3
4	30.11.2020	18
5	08.12.2020	17,66
6	14.12.2020	16,86
7	12.01.2021	14,46
8	19.01.2021	18,46
9	26.01.2021	18,83
10	02.02.2021	19,16
11	16.02.2021	16,9
12	23.02.2021	20,23
13	02.03.2021	18,57
14	09.03.2021	21,5
15	16.03.2021	19,6
16	23.03.2021	19,9
17	30.03.2021	18,1
18	13.04.2021	19,6
19	20.04.2021	15,4
20	29.04.2021	19
21	04.05.2021	20,86
22	11.05.2021	16,46
23	17.06.2021	17,93
24	23.11.2021	17,26
25	30.11.2021	17,13
26	07.12.2021	20,26
27	14.12.2021	22,5
28	11.01.2022	23,1
29	18.01.2022	23,43
30	01.02.2022	21,5
31	09.02.2022	20
32	15.02.2022	23,43
33	22.02.2022	21,5

*Tabelle 10: Ergebnisse der in cDNA umgeschriebenen total RNA-Messung in ng/ $\mu$ l.*

In der Konzentrationsbestimmung konnte jeweils gezeigt werden, dass am Ende des Extraktions- und Transkriptionsprozesses cDNA in allen Proben gemessen werden konnte. Das legt nahe, dass auch die Extraktion von total RNA erfolgreich durchgeführt wurde.

### Auswertung der cDNA-Konzentration im zeitlichen Verlauf:

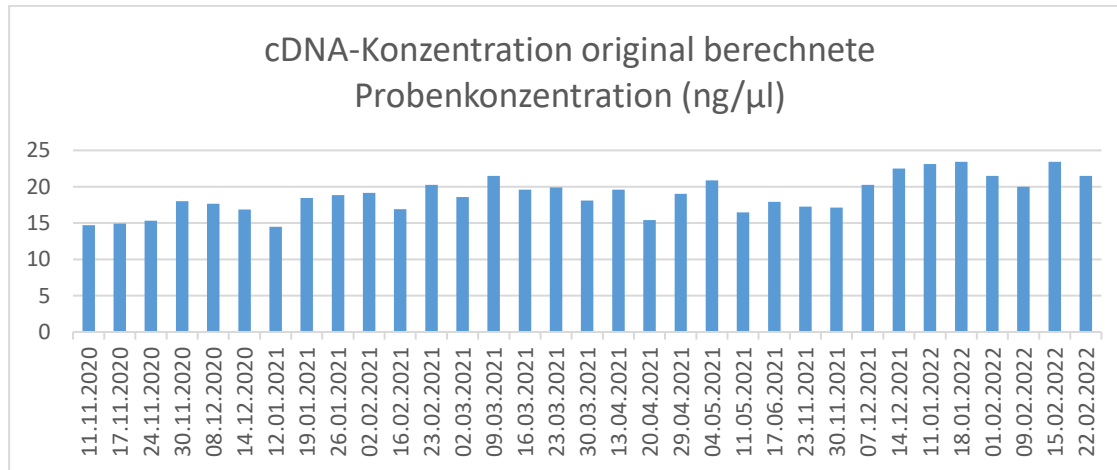


Abbildung 25: Mit dem Qubit™ 4 Fluorometer berechnete cDNA-Konzentration aller Proben in ng/μl in chronologischer Reihenfolge.

Insgesamt ist zu beobachten, dass alle Werte ähnlich hoch sind und kein Wert stark hervorsteht. Ein arithmetisches Mittel von 18,86 ng/μl bei einer Standardabweichung von 2,53 unterstreicht dies statistisch. Ein Median von 18,83 untermauert diese Beobachtung gleichermaßen. Lediglich ist eine tendenzielle Zunahme zu beobachten: Je jünger die Proben werden, desto höher ist die errechnete Konzentration.

### 3.3 Nachweis von SARS-CoV-2

Da es sich bei den extrahierten und umgeschriebenen Nukleinsäuren um total RNA handelt, ist nun im nächsten Schritt relevant, ob in der in cDNA umgeschriebenen RNA auch SARS-CoV-2 nachweisbar ist. In diesem Kontext lag der Fokus darauf mit der digital PCR absolute Konzentrationen des Virus in den Proben zu bestimmen. Die Auswertung der Proben wurde mit einer 300 ms Belichtungszeit bei einer Signalverstärkung von 4 durchgeführt. Weiterhin wurden automatisch von der Software Suite errechnete Schwellenwerte der Fluoreszenzintensitäten übernommen. In der Auswertung ergaben sich folgende Ergebnisse:

Nummer	Entnahmedatum	Viruskopien/ $\mu$ l Elutionsvolumen	Viruskopien/Liter
1	11.11.2020	0,251	251
2	17.11.2020	0	0
3	24.11.2020	0,05	50
4	30.11.2020	0,353	353
5	08.12.2020	0	0
6	14.12.2020	0	0
7	12.01.2021	0	0
8	19.01.2021	0	0
9	26.01.2021	0	0
10	02.02.2021	0	0
11	16.02.2021	0	0
12	23.02.2021	0	0
13	02.03.2021	0,21	210
14	09.03.2021	0,253	253
15	16.03.2021	0,151	151
16	23.03.2021	0	0
17	30.03.2021	0,407	407
18	13.04.2021	0	0
19	20.04.2021	0,107	107
20	29.04.2021	0,151	151
21	04.05.2021	0,105	105
22	11.05.2021	0,205	205
23	17.06.2021	0	0
24	23.11.2021	0,161	161
25	30.11.2021	0,101	101
26	07.12.2021	0	0
27	14.12.2021	0	0
28	11.01.2022	0,051	51
29	18.01.2022	0,05	50
30	01.02.2022	0,107	107
31	09.02.2022	0,102	102
32	15.02.2022	4445,7	4445700
33	22.02.2022	6471	6471000

*Tabelle 11: Messergebnisse der absoluten Quantifikation des Elutionsvolumens (Kopien/ $\mu$ l) und hochgerechnet auf einen Liter Abwasser (Kopien/Liter).*

Von 33 ausgewerteten Proben erfolgte in 19 Proben ein Nachweis von SARS-CoV-2. Die Proben vom 15.02.22 und 22.02.22 sind von ihren gemessenen Kopien/Liter sehr hoch und deutlich stärker konzentriert, als jede andere gemessene Probe. Daher wurden diese Proben zunächst nicht bei der weiteren Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt. Die absolute Quantifizierung wurde bei den auswertbaren Proben in Kopien pro Liter umgerechnet, um die Realität besser abzubilden. Es handelt sich bei den Proben um

Abwasser, welches in der Regel in anderen Größenordnungen verarbeitet wird als beispielsweise das Sputum eines infizierten Patienten. Die Verarbeitung von Abwasser erfolgt mindestens im Liter-, eher im Kubikmeterbereich.

#### *Auswertung der absolut quantifizierten Virus Konzentrationen im zeitlichen Verlauf*

In dieser Arbeit wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der Pandemie Abwasserproben entnommen. Aus diesem Grund stellt sich die Frage, ob man anhand der erhobenen Ergebnisse auch den Pandemieverlauf darstellen kann. Um sich dieser Frage zu nähern werden im Folgenden die Proben chronologisch mit den Fallzahlen in Deutschland verglichen und in einem Zeitstrahl übereinander aufgetragen:

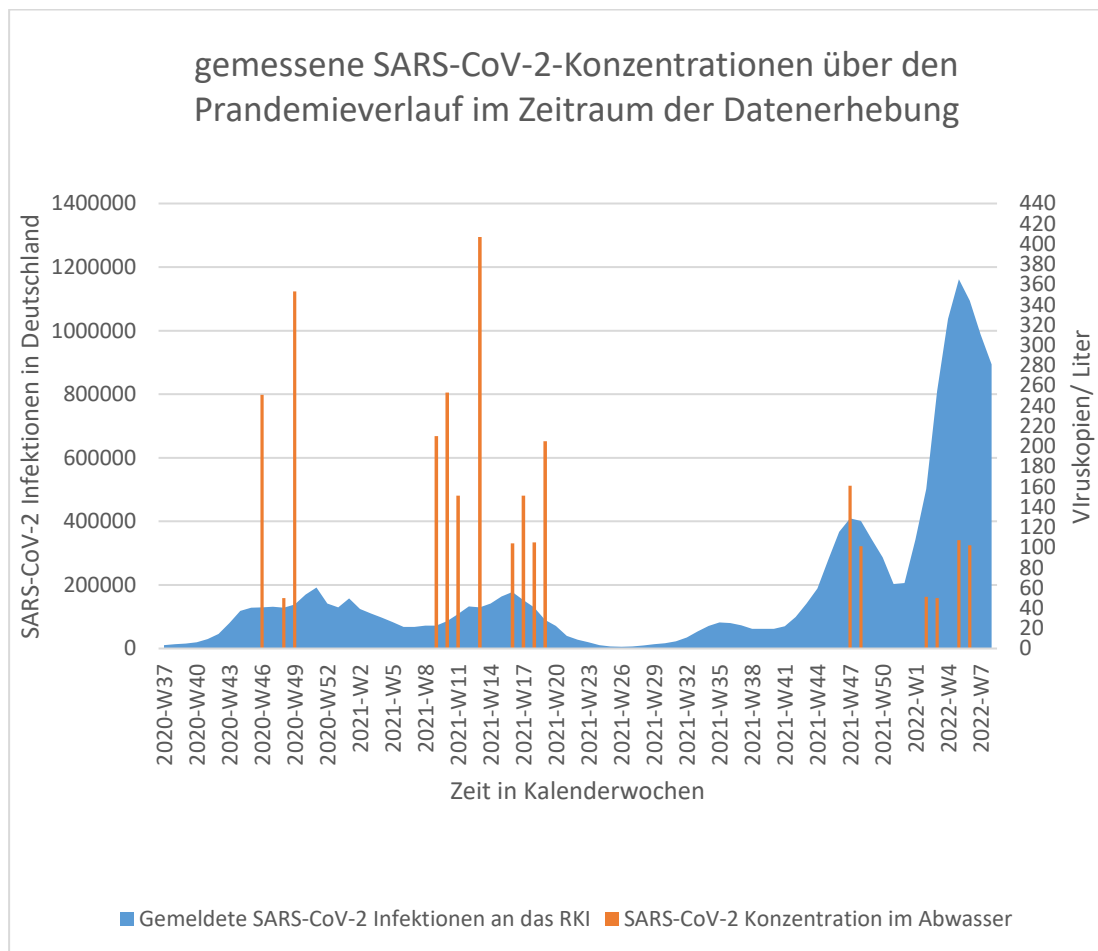


Abbildung 26: gemessene SARS-CoV-2-Konzentration im Krankenhausabwasser im UKGM Gießen über den Pandemieverlauf im Zeitraum der Datenerhebung mit den an das Robert Koch-Institut gemeldeten COVID-19-Infektionen in Deutschland (RKI Open Data 2023).

Im Verlauf fällt auf, dass in der ersten Hälfte des Erhebungszeitraums höhere Viruskonzentrationen gemessen wurden. Zwar sind in der ersten Hälfte auch mehr Datenpunkte erhoben, allerdings dadurch auch mehr Proben berücksichtigt worden, in denen keine Viruskonzentrationen gemessen wurden. Vom 11.11.20 - 17.06.21 ergibt sich ein Mittel-

wert von 97,5 Viruskopien pro Liter, während vom 23.11.21 - 09.02.22 nur ein arithmetisches Mittel von 71,5 bestimmt wurde. Dies erklärt sich dadurch, dass die höchsten Konzentrationen an Virus, die höchsten 6 Werte, sich alle in der ersten Hälfte des Erhebungszeitraums befinden. Was allerdings auffällt ist, dass die Fallzahlen in Deutschland sich diametral zu dieser Beobachtung verhalten. Dort sind die höchsten Werte an beobachteten Fällen im zweiten Beobachtungszeitraum angesiedelt. Dies relativiert sich, wenn man die Messwerte vom 15.02.2022 und 22.02.2022 mitberücksichtigt. Denn diese beiden Werte würden die beiden höchsten Messwerte darstellen. Der Vollständigkeit halber werden hier noch einmal die eben gezeigten Daten aufgeführt, aber diesmal mit den Messwerten vom 15.02.2022 und 22.02.2022. Es wurde zur besseren Übersicht eine logarithmische Skala gewählt zur Basis 10 für die gemessenen Viruskopien/Liter. Es zeigt sich, dass die restlichen Werte nun nicht mehr den Verlauf darstellen können. Zudem wird durch diese beiden Werte auch die Aussagekraft der übrigen Messwerte stark verzerrt. Deswegen wurde initial auf diese Werte verzichtet. Die folgende Graphik soll nur den Unterschied zwischen den beiden Messwerten vom 15.02.2022, 22.02.2022 und den restlichen Messwerten darlegen. Auf die Ursache für die Unterschiede wird in der Diskussion weiter eingegangen.

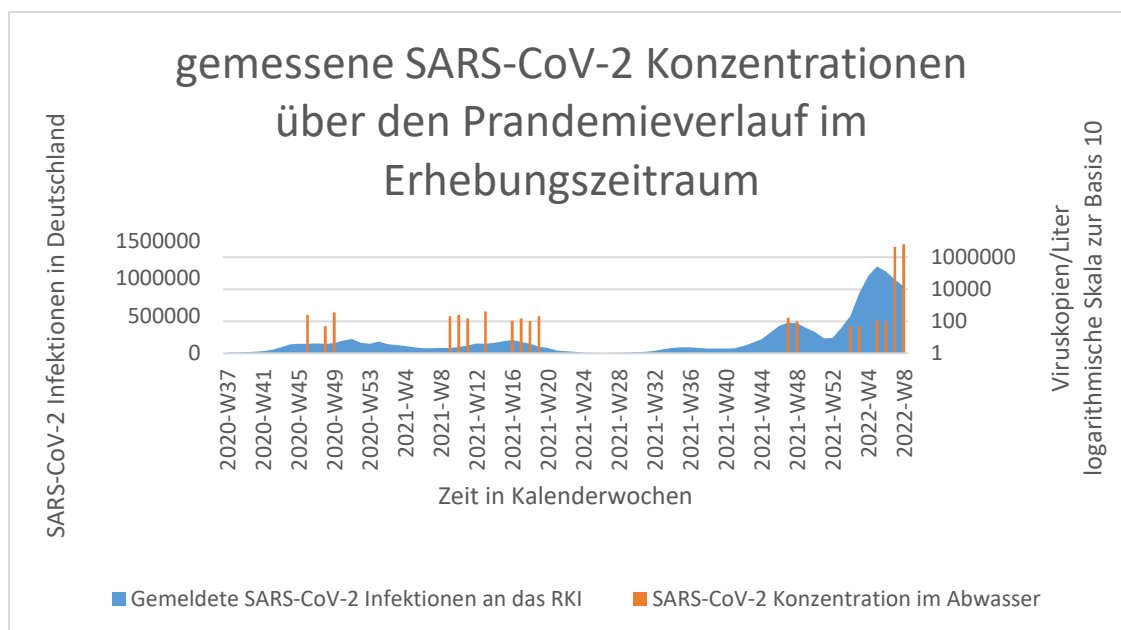


Abbildung 27: gemessene SARS-CoV-2-Konzentration im Krankenhausabwasser im UKGM Gießen über den Pandemieverlauf im Zeitraum der Datenerhebung dargestellt in einer logarithmischen Skala zur Basis 10 mit den an das Robert Koch-Institut gemeldeten COVID-19-Infektionen in Deutschland (RKI Open Data 2023)

Zudem wurden die Werte für das Bundesland Hessen gegen die von der „Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin e.V. (DIVI)“ gemeldete Intensivbettenbelegung mit an Covid19 erkrankten Patienten verglichen:

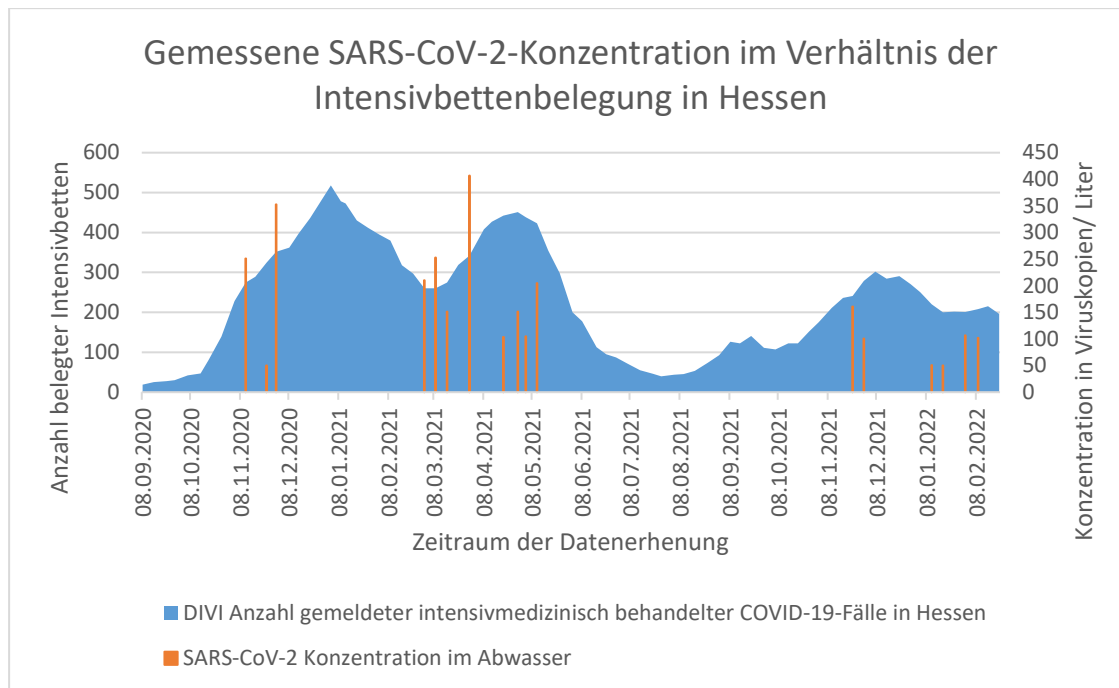


Abbildung 28: Gemessene SARS-CoV-2-Konzentration im Verhältnis der Intensivbettenbelegung (DIVI) in Hessen im Pandemieverlauf (Robert Koch-Institut, DIVI e.V. 2023)

Die vom DIVI gemeldete Bettenbelegung im Bundesland Hessen lässt sich eher durch unsere Messwerte nachvollziehen, als das generelle Infektionsgeschehen durch das Virus in der Allgemeinbevölkerung. Dort wurden ebenfalls die beiden höchsten Werte während unseres ersten Beobachtungszeitraums gemeldet. Dies ist allerdings auch über unsere Entnahmestelle der Proben nachvollziehbar. Die K12-Entnahmestelle ist vor allem mit dem UKGM und krankenhausassoziierten Gebäuden verbunden.

Zur Statistik lässt sich folgendes festhalten: Da es sich um punktuelle Stichproben handelt, beschränkt sich diese Arbeit zunächst auf die deskriptive Statistik, welche die Zahlen anschaulich darstellt. Weiterführende statistische Auswertungen sind bei der geringen Anzahl an Proben nicht belastbar aussagefähig. Eine wesentlich höhere Stichprobenquantität wäre für vergleichende Ansätze statistischer Berechnungen vonnöten. Für den generellen Nachweis von SARS-CoV-2 in diesem besonderen Abwasser, welches das Abwasser eines Universitätsklinikums darstellt, sind sie allerdings auch nicht nötig.

### 3.4 Variantennachweis der „Variant of Concern“ Omikron

Nachdem die absolute Viruskonzentration bestimmt wurde, unabhängig von der Mutation des Virus, wurde nun im finalen Schritt ein Variantennachweis durchgeführt. Für diesen Nachweis waren von besonderem Interesse die beiden hoch positiven Proben vom 15.02.22 und dem 22.02.22. Alle anderen Proben wurden ebenfalls auf Omikron getestet, sofern sie positive Ergebnisse im generellen Virusnachweis erbracht hatten. Untersucht wurde hier auf die Omikron-Variante. Für den Variantennachweis wurde das

„QIAcuity® One-Step Viral RT-PCR Kit“ verwendet. Dieses Kit wurde ausgewählt, da nun mit einem Primer-Sonden- Mix gearbeitet werden sollte, um die Mutationen nachzuweisen. Ausgewertet wurden die Ergebnisse folgender Proben:

Entnahmedatum	Viruskopien / Liter
11.11.20	0
24.11.20	0
30.11.20	0
02.03.21	0
09.03.21	0
16.03.21	56
30.03.21	0
20.04.21	0
29.04.21	55
04.05.21	0
14.12.20	0
19.01.21	0
16.02.21	0
11.05.21	53
23.11.21	0
30.11.21	0
11.01.22	0
18.01.22	0
01.02.22	54
09.02.22	0
15.02.22	416 600
22.02.22	0

*Tabelle 12: Messwerte der absoluten Quantifikation für die Omikron-Variante in Kopien/Liter.*

## 4 Diskussion

### 4.1 Etablierung der Kontrollen

#### 4.1.1 Interpretation

Diese Arbeit liefert erste Erkenntnisse für den Aufbau eines abwasserbasierten Surveillance Systems am Universitätsklinikum Gießen. Als erstes Ziel wurde die Etablierung der Positivkontrollen beschrieben und erfolgreich durchgeführt. Der Nachweis der verwendeten Plasmide gelang und auch die Quantifizierung konnte über die Darstellung von Verdünnungsreihen abgeleitet werden. Dieser Sachverhalt stellt die Basis der nachfolgenden Versuche dar und lässt sich anhand der hier beschriebenen Ergebnisse als etabliert betrachten. Auch konnte mit den verwendeten Primern und Sonden für den Variantennachweis der Omikron-Variante zwischen dem „pCI-neo-Spike-SARS-CoV-2-2020“ (wildtypischen Spike) und dem „Spike-Variants in pBluescript II KS (+)“ (Spike Variants) unterschieden werden. In dem ein Nachweis von „Spike-Variants in pBluescript II KS (+)“ möglich war, nicht aber von „pCI-neo-Spike-SARS-CoV-2-2020“ (wildtypischen Spike).

#### 4.1.2 Vergleich

Die Matrizen der Targets waren entweder die wildtypische Sequenz oder eine an Mutationen angepasste Sequenz des Spike-Oberflächenglykoproteins. In der Literatur dienen allerdings häufig nicht das S-Gen, sondern das Gen des Nukleokapsids oder andere Bestandteile des Virus als Target. Die Wahl des Targets hatte zunächst einmal praktische Gründe. Im letzten Teil dieser Arbeit sollte die Omikron-Variante nachgewiesen werden. Hierfür bedurfte es nicht nur Positivkontrollen mit Plasmiden der veränderten Sequenz, sondern auch eines Plasmids, welches die originale Sequenz des Spikeproteins enthielt. Die originale Sequenz war nötig, um die spezifische Bindung der Primer/TaqMan-Sonden-Kombination im Test sicherzustellen. Wenn Primer verwendet werden, die beide Plasmide nachweisen können, erhält man einen generellen Nachweis, der unabhängig von den Virusvarianten ist. Durch die Verwendung des S-Gens als Matrix für die Primer, mussten nur zwei Plasmide für beide Versuche als Kontrollen etabliert werden, sowohl für den generellen Virusnachweis, als auch für den Nachweis der Omikron-Variante. Diesem Umstand ist geschuldet, dass die Untersuchung ein Target verwendet, welches in der Literatur eher seltener erwähnt wird. Dennoch konnte gezeigt werden, dass mit Primern ein Nachweis des ausgewählten Gens erfolgte. So wurden sieben deutsche Labore und deren Testkits, Targets und PCR-Hardware verglichen. Als Referenz wurde RNA aus dem Stuhl eines fünfjährigen Kindes extrahiert und quantifiziert. Den Laboren wurden dann Proben mit bekannter Anzahl Viruskopien zugesendet. Diese Proben enthielten auf ein Probenvolumen von 5 µl je 5.000, 500, 50, 5, 0,5, 0.005

Viruskopien. Ausgewertet wurden 34 mögliche Labor-Reaktions-Kombinationen. In zwei dieser möglichen 34 Kombinationen wurde das S-Gen als Target verwendet. Weitaus häufiger wurde das Target „RNA-abhängige RNA-Polymerase“ (RdRP) mit 8 aus 34 Kombinationen beobachtet. Auch das Nukleokapsid war bedeutend häufiger als Target gewählt worden, und zwar in 10 von 34 Fällen. Das Spike-Gen ist von der Häufigkeit, in der es als Target verwendet wurde, eher selten (Muenchhoff et al. 2020). Dieser Umstand wurde durch weitere Literaturrecherche erneut bestätigt (Li et al. 2023). Der Nachweis von SARS-CoV-2 war mit dem S-Gen als Target ebenfalls möglich. Auch in den Verdünnungsreihen konnte in beiden Fällen, in denen das S-Gen als Target fungierte, ein Nachweis von 0,5 Kopien/5 µl erbringen. Ein Nachweis von 0,05 Kopien war nicht mehr möglich (Muenchhoff et al. 2020). Der Nachweis von 0,5 Viruskopien/5 µl, bzw. 0,1 Viruskopien/µl, ist die Viruskonzentration, die in den meisten Proben nachgewiesen wurde. 16 Proben lagen über einer Konzentration von 0,1 Kopien/µl oder darüber und in drei Proben darunter. Der Nachweis der meisten Proben lag also im Konzentrationsbereich, in dem auch das S-Gen in weiteren Fällen Nachweise erbringen konnte. Im Variatennachweis war es eine Probe. Drei Proben sind positiv auf Omikron getestet worden. Zwar handelt es sich bei der verglichenen Hardware größtenteils um qPCR und nicht um digitale PCR-Systeme, allerdings ist die hier verwendete digitale PCR noch selten in Verwendung. Darum liegen aktuell (Stand August 2023) keine größeren Vergleichsstudien vor, in denen das S-Gen als Target in dieser Technologie untersucht wird. In der Literatur wurde allerdings darauf verwiesen, dass auch Primer-Systeme, die ursprünglich in der qPCR eine Verwendung fanden, auch in dPCR-Systemen genutzt werden können. So konnte in einer Studie, in der Abwasserproben aus vier Krankenhäusern ausgewertet wurden mittels der qPCR zunächst kein SARS-CoV-2-Nachweis erfolgen. Da 200 µl Probenvolumen aus 2 Litern Gesamtprobe keine Ergebnisse hatten erbringen können, wurde das zu untersuchende Probenvolumen angepasst. Das Probenvolumen wurde auf 500 ml erhöht und dann im Verhältnis 250:1 hochkonzentriert. Dies wurde einmal für einen weiteren qPCR-Ansatz, sowie auch für einen digital PCR-Ansatz verfolgt, mit demselben Primer/Sonden-Kit. Das „ORF1ab“ fungierte als Target. In der Auswertung konnte nun in mehr Proben, zwei von vier Abwasserproben, SARS-CoV-2 nachgewiesen werden. Die Probe des Wuchang Hospital wies allerdings höhere Konzentrationen an Chlorrückständen auf (>10mg/L), sodass auch aus diesen Gründen keine Viruskopien nachweisbar waren (Zhou et al. 2021). So zeigt die Studie zwei Dinge für diese Arbeit auf: Zunächst ist es sinnvoll, auch funktionierende Primer-Sets oder Primer/Sonden-Sets aus der qPCR auch mit der digital PCR zu verwenden. Dieser Umstand war relevant, da auch in der Methodik dieser hier vorliegenden Arbeit eine digitale PCR zum Einsatz kam und die verwendeten Primer sich an einer Veröffentlichung orientierten,

welche die qPCR als technische Auswertung verwendete (Perchetti et al. 2021). Die Verwendung einer digital PCR erschien sinnvoll, da so nicht nur eine absolute Quantifizierung möglich ist, sondern in der Literatur auch die höhere Sensitivität bei geringen Konzentrationen an Virus beschrieben wird. So wurde festgestellt, dass initial durch die RT-qPCR als negativ erkannte Proben mithilfe von dPCR als falsch negativ identifiziert werden konnten. Die Patienten zeigten Covid-typische Symptome, wurden jedoch mit der RT-qPCR nicht als infiziert erkannt (Sun et al. 2021). Vor allem wird die dPCR-Technologie mit ihrer hohen Sensitivität für die Verwendung in Umwelt-Surveillance-Systemen hervorgehoben (Nyaruaba et al. 2022). Zudem wird unterstrichen, wie wichtig es sein kann, das Probenvolumen zu erhöhen und die auszuwertende Probe zu konzentrieren, um mehr genetisches Material im einzusetzenden Probenvolumen zu finden. Die hier verwendeten Proben wurden ebenfalls konzentriert, allerdings war das initiale Probenvolumen dieser Forschungsarbeit mit 40 ml deutlich geringer, als das oben beschriebene Volumen von 500 ml. Für die Anzahl der Viruskopien der weiteren Targets des N-Gens (42 Kopien/Reaktion Central Hospital of Wuhan; 26 Kopien/Reaktion im Jiangxia Cabin Hospital) und des E-Gens (10,2 Kopien/Reaktion Central Hospital of Wuhan; 36 Kopien/Reaktion im Jiangxia Cabin Hospital) liegen eher niedrigere Konzentrationen vor, wie die gemessenen Viruskonzentrationen dieser Forschungsarbeit. Eine Reaktion in der oben beschriebenen Studie fasst das Probenvolumen von 500 ml zusammen. Rechnet man die Zahl der Kopien pro Liter hoch, erhält man Werte zwischen 20 - 82 Kopien/Liter (Zhou et al. 2021). Hochgerechnet auf den Liter wurden in den Versuchen der vorliegenden Forschungsarbeit 50 - 407 Kopien/Liter bestimmt, wenn man die beiden hoch positiven Proben mit mehreren Millionen Viruskopien/Liter zunächst nicht mit auswertet. Vergleichbarkeit der Ergebnisse lässt sich allerdings über verschiedene Herangehensweisen an die Studie herstellen. Im Konzentrationsverfahren wurde zunächst steril filtriert und dann ebenfalls eine Polyethylenglykolfällung vorgenommen, sehr ähnlich dem hier angewendeten Konzentrationsverfahren. Zur Detektion wurde dort eine digital-droplet-RT-PCR verwendet. Für den Versuchsaufbau dieser Arbeit kam eine dPCR zum Einsatz, die keine Tropfen nutzte, um den Reaktionsmix in viele kleinere Partitionen aufzuteilen, sondern fertige Platten, die oben beschriebenen Nanoplates. Wie im Abschnitt „Material und Methode“ bereits dargestellt, sind die Partitionen in diesen Platten bereits angelegt und wurden durch ein Rollinstrument in der QIAcuity® One verschlossen und so räumlich getrennt. So konnte sichergestellt werden, dass alle Partitionen exakt gleich groß sind und die gleiche Menge des Reaktionsmix enthalten. Bei der digital-droplet-PCR kann dies variieren, da die Größe, der durch das Gerät generierten Tropfen, voneinander abweichen kann. So können sich leichter unterschiedlich viele Zielsequenzen in den

Tropfen, also den Partitionen, befinden, was die Berechnung der absoluten Quantifikation erschwert (Košir et al. 2017).

#### 4.1.3 Limitationen

Die Wahl des Targets zur Etablierung der Kontrolle fiel auf die Sequenz des Spike-Oberflächenglykoproteins. Nachteil dieser Sequenz ist die bereits hohe Anzahl bekannter Mutationen. Aus diesem Grund haben viele Labore den Nachweis anderer Sequenzen häufiger gewählt, um falsch negative Proben zu minimieren. Sequenzen, wie die der Hülle oder des Nukleokapsids, weisen weniger Mutationen auf (Nyaruba et al. 2022). Diesem Problem wurde entgegengewirkt, indem der Vergleich zu einem Plasmid gezogen wurde, welches einige Mutationen des Spike-Oberflächenglykoproteins enthielt. Es ist nachvollziehbar, dass nicht alle möglichen Mutationen, die auftreten können, bei diesem Ansatz berücksichtigt werden können.

#### 4.1.4 Schlussfolgerungen

Allgemein wird festgehalten, dass die Wahl des Targets für diesen speziellen Versuchsaufbau und für den Zeitpunkt, zu dem er entworfen wurde, effizient war. Generell kann für zukünftige Versuche, in denen dann im Zweifel eine Sequenzierung angeschlossen wird, zusätzlich zu einem RT-dPCR-Nachweis bereits etablierte Testkits mit dem Target Nukleokapsid- oder Envelope-Gen verwendet werden. Es handelt sich dabei um Testkits, die auf Primer-TaqMan-Sonden beruhen. Die Verwendung der dPCR zur Probenauswertung dieser Versuche erscheint in der Literaturrecherche anderer Technik überlegen.

### 4.2 Genereller Virusnachweis

#### 4.2.1 Interpretation

Es konnte gezeigt werden, dass in den Abwasserproben SARS-CoV-2 nachweisbar war. Der Nachweis konnte auch über den Pandemieverlauf dargestellt und Quantifizierungen durchgeführt werden, um erste Erkenntnisse über die Konzentrationen von Pathogenen im Klinikabwasser zu erhalten.

#### 4.2.2 Vergleich

Die Proben wurden am Morgen bis Vormittag des Probedatums entnommen. Der Vormittag wurde gewählt, da die Viruskonzentration mit der Wassernutzung über den Tag hin assoziiert ist. Morgens 8:00 – 11:30 Uhr existierten die höchsten Wasserverbräuche, die mit Ausscheidungen assoziiert sind (Li et al. 2023). Aus diesem Grund wurden für diese Arbeit größtenteils morgens bis vormittags die Proben direkt aus der Hauptabwas-

serleitung (K12) des Krankenhauses entnommen. Die Autoren, der oben genannten Studie, hielten ebenfalls fest, dass die Art und Weise, wie die Probe entnommen wird, entweder einmalige Stichprobe, die die Momentsituation abbildet oder eine Kompositprobe, nur einen geringen Effekt hat, wenn es darum geht Fallzahlen mit RNA-Konzentrationen im Abwasser zu korrelieren. Aber die Zeit, welche der Probeninhalt im Abwassersystem verbringt, hat eine höhere Bedeutung. In dieser Zeit im Abwassersystem findet ein Zerfall erster Ordnung statt, weil das Virus im Abwasser verschiedenen Einflüssen ausgesetzt ist. Die Autoren leiten zudem einen positiven Effekt für die oben beschriebene Korrelation ab, wenn die Frequenz, mit der die Proben entnommen wurden, erhöht wird. Von dieser Beobachtung leiteten die Autoren dieser Forschungsarbeit ab, dass es für den Versuchsaufbau sinnvoll sei, die Proben direkt aus dem Abwassersystem in der Nähe des Krankenhauses zu entnehmen, damit nicht das Virus auf dem Weg zur Kläranlage weiteren Einflüssen ausgesetzt ist und nicht schon in der Kanalisation weiter zerfallen konnte (Li et al. 2023; Kallem et al. 2023). Die Beobachtung, dass es keinen großen Effekt habe, ob die Proben über einen kurzen oder einen längeren Zeitraum entnommen wurden wird dadurch relativiert, dass in einer 24-Stunden-Probe die Beprobungsfrequenz durch die Methodik allein erhöht ist. Andere Autoren beobachteten deutliche Unterschiede bei den extrahierbaren RNA-Mengen von SARS-CoV-2 und der Art und Weise, wie die Probe entnommen wurde. So kommen sie zu dem Schluss, dass eine 24-Stunden-Sammelprobe zu einer Verzehnfachung der Virus-RNA führt (Gerrity et al. 2021). Die Erkenntnis, dass Kompositproben überlegen sind, wird durch die Arbeit anderer Autoren gestützt. Diese beschreiben, dass obwohl der Spülvorgang einer Toilette nur wenige Sekunden dauert, das Abwasser dieser Spülung in zeitversetzten Pulsen an entfernteren Orten der Kanalisation ankommt (Ort et al. 2010b). Aus dieser Beobachtung leiten die Autoren in einer weiteren Studie ab, dass eine Probe alle 5 Minuten oder weniger entnommen werden sollte. Dies wird damit begründet, dass das MRT-Kontrastmittel Gadolinium, hier Surrogat für eine spezifische Stuhlprobe, über einen Zeitraum von 4 - 8 Minuten bis zu 15 - 20 Minuten in der Kanalisation am Beprobungsort nachweisbar war. Hieraus leiten die Autoren eine optimale Beprobungsfrequenz von <5 Minuten ab (Ort et al. 2010a). Die Infrastruktur der Probengewinnung am UKGM ist allerdings nicht so ausgebaut, dass beide Ansätze, sowohl einmalige Probengewinnung am Probenstag oder 24-Stunden-Kompositproben, zu verfolgen und zu vergleichen möglich wäre. Wie bereits erwähnt, wurde die Probengewinnung zeitlich an den statistisch hoch frequentierten Zeitraum der Toilettennutzung angepasst und direkt aus der Abwasser- abführenden Leitung entnommen. Den Weg, den das Abwasser bis zur Entnahmestelle zurücklegen muss, wurde so eher kurzgehalten.

Einige Autoren messen andere, kontinuierlich im Stuhl vorkommende Viren, wie das „Petter Mild Mottle Virus“ (PMMoV), um Verdünnungen durch größere Wassereinspeisungen nachzuempfinden (Gerrity et al. 2021). In der Literatur wird dieses Virus immer wieder herangezogen, wenn es um die Verunreinigung von Wasser mit Stuhl geht, da dieses Virus durch den Menschen in verhältnismäßig gleichen Dosen ausgeschieden wird (Dhakar et al. 2022). So kann der Abfall von Viruskonzentrationen von SARS-CoV-2 im Verhältnis zur PMMoV-Konzentration betrachtet werden und nachlassende Infektionsfähigkeit von starken Verdünnungen des Abwassers, wie beispielweise durch eingespeistes Regenwasser, getrennt werden. Allerdings ist dieser Ansatz aufwendiger und würde den Aufgabenrahmen dieser Arbeit übersteigen. Diese Forschungsarbeit strebt zunächst generell einen Nachweis an und nicht schon detaillierte Angaben zu möglichen Verdünnungen.

Alle Proben wurden vor der Auswertung hitzeinaktiviert. Dieser Prozess war nicht nur als Sicherheitsvorkehrung intendiert. Autoren wie Trujillo, Cheung et al. konnten zeigen, dass die Viruskopienanzahl nach der Applikation von Hitze, hier pasteurisieren der Proben, höher war als in Abwasserproben die vorher nicht hitzebehandelt worden waren. Die Autoren nehmen an, dass das Virus aus im Abwasser gelösten Feststoffen freigesetzt wird und so den Nachweis verbessert (Trujillo et al. 2021).

Entscheidende Punkte sind die Konzentration der Probe und die Extraktion der RNA. In dieser Arbeit wurde sich für eine Fällung mit Polyethylenglykol (PEG) entschieden. Ahmed, et al. 2020 untersuchten zu Beginn der Pandemie, welche Methoden sich am besten eignen, um vorher in die unbehandelten Abwasserproben hinzugegebenes Virus nachzuweisen. Die Ergebnisse zeigten, dass die beste Nachweisrate bei der Extraktion durch eine elektronegative Membran (MgCl<sub>2</sub>) erzielt wurde. Die Nachweisrate des initial beimpften Virus lag bei dieser Methode im Mittel bei 65 %, mit allerdings einer sehr hohen Standardabweichung von 23 %. Die elektronegative Membran, welche pH-neutral war, schnitt am zweitbesten ab (60 % Mittelwert) gefolgt von der Ultrafiltration (56 % Mittelwert), allerdings beide mit hohen Standardabweichungen. Als viertbeste Methode stellte sich mit 44 % die PEG-Fällung dar. Diese initiale Studie wurde mit einem Surrogat-Virus, „Murines Hepatitis Virus“, durchgeführt, und ist darum nicht direkt vergleichbar (Ahmed et al. 2020). Das Murine Hepatitis Virus wird als mögliche Prozesskontrolle diskutiert. Die Arbeit von Zheng, Deng et al. 2022 versuchte dieser Schwachstelle entgegenzutreten und untersuchte Extraktionsmethoden anhand von inaktiviertem SARS-CoV-2. In diesem Experiment wurde Ultrazentrifugation (150.000 x g für 1 Stunde) als effektivste Methode bewertet mit 25 % Nachweisrate im Mittel. Diese Methode lag bei Ahmed, Bertsch et al. 2020 noch hinter der Nachweisrate von PEG. Die PEG-Fällung

(11,8 %) schnitt in diesem Versuchsaufbau als drittbeste ab. Insgesamt stellte sich der Versuchsaufbau, nun mit SARS-CoV-2 anstelle des Surrogats, eher als ineffektiv heraus, aufgrund der generell eher geringen Nachweisraten (Zheng et al. 2022). Es ist aus der Studie nicht zu entnehmen, wie viele Viruskopien pro Ansatz den Abwasserproben beigemischt wurden. Wenn generell eine geringe Viruskopienanzahl beigemischt wurde und die nachweisbaren Kopien eher nahe der Nachweisgrenze der PCR liegen, würde dies die geringe Nachweisrate erklären. Eine andere Studie konnte ebenfalls die hohen Nachweisraten von Ahmed, Bertsch et al. 2020 generieren. Dies war von hoher Relevanz, da es sich um eine unbekannte Viruskopienanzahl im Abwasser handelte. Niedrige Konzentrationen des Virus sollten so hoch wie nur möglich nachweisbar sein. So war es mit dem Versuchsaufbau von Dumke, La Cruz Barron et al. 2021 für das inaktivierte Coronavirus möglich, Nachweisraten von 59,4 - 63,7 % zu erzielen. Dies gelang mit der PEG-Fällung (Dumke et al. 2021). Die von Ahmed, Bertsch et al. 2020 beschriebene Extraktion mittels Ultrafiltrations-Membran erreicht Nachweisraten von 33.0 % - 42.6 % (Dumke et al. 2021). Auch andere Autoren kommen zu dem Schluss, dass die PEG-Fällung eine robustere Extraktionsmethode darstellt, wie beispielsweise Sapula, Whittall et al. 2021 feststellten. So konnten die Autoren zeigen, dass auch hier anhand der PEG-Fällung zur Probenkonzentration mit inaktiviertem SARS-CoV-2 versetztem Abwasser ein Nachweis von 46.6 % – 56.7 % möglich war. Damit stellte sich diese Methode als effektiver heraus, auch im Vergleich zur elektronegativen Membran, welche Nachweisraten von 0 % – 21.7 % ermöglichte (Sapula et al. 2021). Geringe Streuung sowie hohe Nachweisraten führten dazu, dass sich in dieser hier vorliegenden Forschungsarbeit am Versuchsaufbau von Dumke, La Cruz Barron et al. 2021 orientiert wurde. So verwendeten die Autoren für den weiteren Verlauf das RNeasy Mini Kit der Firma QIAgen®. Dieses Kit arbeitet mit Silicat-Spinnsäulen. Die zuvor mit Ethanol behandelte RNA bindet an die silicat-basierte Membran in der Säule und kann dort weiter aufgereinigt werden. Diesem Arbeitsschritt wird die Trizol-(Qiazol)-Chloroform-Extraktion vorgeschaltet. In der Literatur wird häufig die Überlegenheit der Trizol-Chloroform-Extraktion hervorgehoben. So kann der unselektiven Extraktion der PEG-Fällung entgegengewirkt werden, in dem RNA stabilisiert und RNasen durch Guanidinium Isothiocyanat gehemmt werden (Shieh et al. 1995). Diese Substanzen sind in Trizol in Kombination mit Phenol enthalten. Zudem kann der Übertrag von sowohl DNA als auch inhibitorischen Proteinen verringert werden. Die RNA wird mit der wässrigen Phase abpipettiert, während Proteine sowie DNA in der organischen und der Interphase verbleiben (Rio et al. 2010). In einigen Studien, darunter Torii, Furumai et al. 2021, konnten die höchsten Nachweisraten erzielt werden, wenn die PEG-Fällung mit der Triazol-Chloroform-Extraktion kombiniert wurde. So lag die Nach-

weisrate von beimpften Abwasserproben bei ca. 50 %. Kombinationen aus anderen Konzentrationsmethoden und RNA-Extraktionsmethoden konnten Nachweisraten von ca. 30 % erreichen (Torii et al. 2021). Hieraus wurde geschlussfolgert, dass eine alleinige Extraktion mit der Trizol-(Qiazol)-Chlorophorm-Extraktion hohe Nachweisraten generieren kann, aber die Nachweisrate noch verbessert werden kann, wenn dieser Extraktionsschritt mit den silicatbasierten Membranen der Spinnsäulen kombiniert wird. Es lässt sich festhalten, dass es kaum Studien gibt, die tatsächlich die Extraktionsmethoden oder Extraktionskits untereinander in Bezug auf SARS-CoV-2 vergleichen (Stand Oktober 2023). Dies gilt vor allem für die Extraktion von SARS-CoV-2-RNA aus Abwasserproben. Für Proben, die aus dem Oropharyngialtrakt gewonnen wurden, gilt dies weniger. Hier wird weitere Forschung nötig sein, um einen allgemein gültigen Versuchsaufbau zu etablieren. Aus diesem Grund wurde der Versuchsaufbau stark an dem von Dumke, La Cruz Barron et al. 2021 orientiert.

Im Folgenden werden die Messwerte eingeordnet: Generell lässt sich festhalten, dass diese sich zwischen 50 Kopien/Liter und 407 Kopien/Liter bewegen. Zwei Messwerte lagen deutlich darüber mit Werten von ca.  $4,4 \times 10^6$  und  $6,5 \times 10^6$  Kopien/Liter. Alle diese Messwerte haben somit eine große Spannweite. Solche schwankenden Messwerte finden sich auch in der Literatur. Da es so gut wie keine deutschen Studien gibt, in denen Konzentrationen von SARS-CoV-2 aus dem Abwasser von Krankenhäusern bestimmt wurde, muss aus diesem Grund zunächst auf Literatur aus dem Ausland zurückgegriffen werden (Stand Oktober 2023). Aber auch diese Studien bedienen sich häufig anderer Konzentrationsmethoden, RNA-Extraktionsmethoden und anderer Targets. Eine direkte Vergleichbarkeit ist aus diesem Grund schwieriger. Es werden zunächst Studien berücksichtigt, die auf ähnliche Art und Weisen die Proben gewannen. Darunter fallen Studien, die „Grab Sampling“ als Probengewinnung durch Stichproben verwenden, inklusive Proben, die innerhalb eines Zeitraums von 15 Minuten entnommen wurden. Im Kontrast dazu stehen Kompositproben, bei denen Probenvolumina in Zeitintervallen, beispielsweise jede Stunde, entnommen werden (Bill Simpson 2013).

Wie oben bereits erwähnt, konnten Zhou, Kong et al. 2021 in Krankenhausabwässern SARS-CoV-2 in Konzentrationen von 20 - 82 Kopien/Liter für das E-Gen und das N-Gen als Target nachweisen (Zhou et al. 2021). Diese Messwerte liegen unter den Viruskonzentrationen, die im vorliegenden Experiment nachgewiesen wurden, bei einem Probenvolumen, welches mit 500 ml mehr als 12 mal so hoch war wie das Probenvolumen von 40 ml, aus dem hier die RNA extrahiert wurde. Als Extraktionsmethode wurde in diesem Experiment die elektronegative Membran verwendet (Zhou et al. 2021). Eine weitere Studie konnte ebenfalls Werte nachweisen, die in diesem Bereich liegen, allerdings auch

solche Konzentrationen, welche deutlich darüberliegen. So zeigte die Arbeit von Hong, Rachmadi et al. 2021, dass die SARS-CoV-2-Konzentrationen in Krankenhausabwässern nicht nur Werte von unter 100 Kopien/Liter, sondern auch Werte deutlich darüber aufwiesen. Die Studie konnte Konzentrationen von ca.  $19 - 1,4 \times 10^4$  Kopien/Liter nachweisen. Die Proben wurden als Stichprobe aus dem Abwassersammelsystem der Einrichtung unter dem Krankenhaus entnommen, und zwar ein Probenvolumen von 250 – 500 ml, welches hochkonzentriert wurde. Die RNA wurde auf einem Silicatmembranbasierten Spinnssäulensystem extrahiert. Allerdings wurden die Proben nicht mittels RT-dPCR, sondern mit einer RT-qPCR ausgewertet. Das N1-, N2- und N3-Gen stellten die Targets dar (Hong et al. 2021). Die Arbeit zeigt, dass auch Abwasser aus einem Krankenhaus eine hohe Varianz in der Viruskonzentration aufweisen kann. Allerdings stellen sich die gemessenen Werte zwischen dem Minimum und dem Maximum eher gleichmäßiger verteilt dar. Die Studie wertete fast doppelt so viele Proben aus mit  $n = 57$ , während in dieser hier vorliegenden Arbeit 33 Proben ausgewertet wurden. In der Studie dieser Forschungsarbeit konzentrieren sich die Werte eher um ca. 150 Kopien/Liter (Median). 17 Proben, also ein Großteil der Messwerte der positiven Proben, sind um diesen Wert herum angesiedelt, wie das 1. und 3. Quartil zeigen (1. Quartil 103 Viruskopien/Liter; 3. Quartil 252 Viruskopien/Liter). Bei zwei der Proben liegen die Werte bei ca.  $4,4 \times 10^6$  und  $6,5 \times 10^6$  Viruskopien/Liter. Für die positiven Proben des Targets N1, neben anderen Targets das mit der höchsten Nachweisrate, zeigte sich bei Hong, Rachmadi et al. 2021 ein Median von ca. 200 Kopien/Liter. Auch das 1. Quartil (ca. 118 Kopien/Liter) und das 3. Quartil (ca. 374 Kopien/Liter) bewegen sich in der gleichen Größenordnung und zeigen, dass sich auch hier die Messwerte stark um den Median herum konzentrieren. Dass die Quartile sich um einen deutlich geringeren Messwert herum anordnen sticht hervor, wenn man das generell gemessene Maximum dieser Studie mit ca.  $1,4 \times 10^4$  Kopien/Liter betrachtet. Diese Daten wurden dem „Supplementary Materials“ der oben genannten Studie auf „PubMed Central®“ entnommen (Hong et al. 2021). Wie oben beschrieben, stellen sich die Messwerte im Versuch dieser Arbeit ähnlich dar, nur mit dem Unterschied, dass Hong, Rachmadi et al. mehrere unterschiedliche Targets untersuchten.

Auch wenn Werte von anderen deutschen Krankenhäusern zur Diskussion nicht zur Verfügung standen bleibt festzuhalten, dass Laborwerte um den Median herum von 150 Kopien/Liter SARS-CoV-2 durchaus in der Literatur beschrieben wurden, und dies in Arbeiten, die ähnliche Beprobungsstrategien verfolgten. Einige Autoren legen allerdings nahe, dass für „low-flow“-Abwassersysteme stichprobenartige Beprobung von Abwasser sehr ungenau ist und starke Unterschiede in der SARS-CoV-2-Konzentration festgestellt

werden. Erst mit höherem Abwasseraufkommen wird es zunehmend irrelevant, ob stichprobenartig oder in Kompositproben Abwasser gewonnen wird (George et al. 2022). Da wir uns trotz eines Universitätskrankenhauses in einer „low-flow“- bis „medium-flow“-Situation befinden (ganze Nachbarschaften und Häuserblöcke), sind eher Beprobungsfrequenzen von ca. 5 Minuten relevant um die Konzentration besser abzubilden. „High-flow“-Situationen meinen hier das Abwasseraufkommen ganzer Kläranlagen (George et al. 2022). Im Setting dieser Forschungsarbeit sollten sich starke Unterschiede zwischen Stichproben und Kompositproben darstellen. Dies kann darin begründet liegen, dass die Proben kontinuierlich, nicht nur einmal täglich und zwar nur tageszeitoptimiert, entnommen wurden. Weitere Studien, wie beispielsweise Kagami, et al. 2023 verwenden zwar Abwasser aus Krankenhäusern, allerdings sind diese Proben an Kläranlagen entnommen worden und nicht direkt am Krankenhaus, wie in den oben benannten Studien und wie es auch für diese Arbeit gegeben war (Kagami et al. 2023). Solche Proben sind damit auch durch weiteres Abwasser aus dem Einzugsgebiet der Kläranlage, an der eine solche Probe gewonnen wurde, versetzt. Weiterhin können Viruskonzentrationen stark davon beeinflusst sein, wie lange diese im Abwassernetz verbleiben, bis sie entnommen werden (Li et al. 2023). Allerdings variieren die Werte der Arbeit von Kagami, et al. 2023 ebenfalls von ca.  $10^2$  - ca.  $7,25 \times 10^4$  Viruskopien/Liter. Dies zeigt noch einmal, dass die Spannweite nicht zwangsläufig gleichmäßiger ausfallen muss, nur weil eine Kompositprobe verwendet wurde. Es ist allerdings festzuhalten, dass auch zwischen den Extremen sich eine gleichmäßigere Verteilung der Messwerte zeigt. Es wurden allerdings auch mehrere hundert Abwasserproben in dieser Studie ausgewertet (Kagami et al. 2023). Dies unterstützt die Überlegung, eher Kompositproben zu generieren, da möglicherweise hohe Messwerte durch einmalige kurze Beprobungszeiträume durch weitere Messungen relativiert werden können. Proben, in denen initial durch Zufall keine Viruskopien vorlagen, können so durch weitere Probenzyklen mit Probenmaterial versetzt werden, welches Viruskopien enthalten kann.

So hohe Konzentrationen von SARS-CoV-2 im Abwasser, wie die beiden höchsten Messwerte dieser Arbeit, wurden bis dato seltener in Studien beschrieben, die ausschließlich Krankenhausabwässer ausgewertet haben und auch direkt am Krankenhaus oder in unmittelbarer Nähe beprobt wurden. Allerdings lassen sich solche Werte durchaus in der Literatur finden, auch wenn es dabei meist um Proben geht, die an Kläranlagen entnommen wurden. Wurtzer, et al. 2020 konnten in ihrer Auswertung über SARS-CoV-2-RNA im Abwasser der Metropole Paris über  $10^6$  Kopien/Liter detektieren. Allerdings wurden in dieser Arbeit die 24-Stunden-Sammelproben aus drei Kläranlagen ausgewertet bei Probenvolumina von 8,7 bis 14 Litern pro Tag. Die Kläranlagen bezogen

das Abwasser von 3 Millionen Einwohnern und sammelten 600.000 m<sup>3</sup> Abwasser pro Tag (Wurtzer et al. 2020). Prinzipiell sind noch höhere Konzentrationen in Abwasserproben möglich. So konnten Wilhelm, Schoth et al. 2022 mittels 24-Stunden-Proben an einer Kläranlage an der Emscher-Mündung, die das Wasser weiter Teile des nördlichen Ruhrgebiets aufnimmt, Proben gewinnen. Die Kläranlage ist mit über 700.000 Haushalten verbunden und kann das Abwasser von ca. 1.700.000 Einwohnern aufnehmen. Mittels elektronegativer Membran und RT-qPCR ermittelten die Autoren, ursprünglich 100 ml am Tag als Probe ausgewertet, ca.  $4 \times 10^{14}$  Kopien/Tag (Wilhelm et al. 2022). Wenn die Autoren von 348.703.426 m<sup>3</sup> pro Jahr ausgehen und die 100 ml-Probe als Referenz mit einbeziehen, kommt man am Tag auf ca.  $4,1 \times 10^6$  Kopien/Liter.

Aus diesem Grund muss auch an mögliche Verunreinigungen gedacht werden. Die Proben wurden durch den Autor der Studie noch während der Pandemie ausgewertet und eine Infektion mit SARS-CoV-2 wäre zu jedem Zeitpunkt möglich gewesen. Zwar wurde bei der Auswertung der Proben eine FFP-2-Maske getragen und es lag keine bestätigte SARS-CoV-2-Infektion vor, allerdings muss die Möglichkeit einer Kontamination der Proben zumindest in Erwägung gezogen werden.

In der Darstellung der Werte über den Pandemieverlauf in Relation zu der gemeldeten Infektionstätigkeit (RKI Open Data 2023) in Deutschland und der Intensivbettenbelegung (Robert Koch-Institut, DIVI e.V. 2023) lässt sich folgendes festhalten: Die beiden Grafiken lassen sich dahingehend mit unseren Ergebnissen vereinbaren, dass die Infektionstätigkeit zwar zu Beginn der Pandemie geringer war, allerdings sind die Hospitalisierungen pro Fall höher gewesen als im späteren Verlauf des untersuchten Zeitraums der Pandemie (Federal Ministry of Health, Robert Koch Institute 2025). Da die Messwerte dieser Arbeit an einem Krankenhaus generiert wurden, erscheint dies kohärent.

#### 4.2.3 Limitationen

Da es für den Transport in das Labor kein konkretes Protokoll gab, könnten durch die Einführung eines solchen Vorgehens erhöhte Transport- und Liegezeiten vermieden werden. Ebenfalls der Zeitabstand, der bis zur Auswertung bestand, stellt sich problematisch dar. So wurden die ersten Proben am 11.11.2020 abgenommen und ab 18.03.2022 ausgewertet. Die Proben waren während der gesamten Zeit bei -80°C eingefroren. Über einen möglichen Zerfall von SARS-CoV-2 und deren weiteren Zerfall in Abwasserproben bei -80°C wurde zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht publiziert (August 2023). Es sei allerdings an dieser Stelle auf den zeitlichen Abstand hingewiesen.

Die Polyethylenglykol-Fällung ist ein unselektives Verfahren, welches unterschiedlich gelösten Substanzen mittels Aussalzung die Hydrathülle entziehen kann. So lagern sich

diese Substanzen mit ihren freien Ladungen aneinander an und können nun mittels Zentrifugation ausgefällt werden. Neben der RNA werden so auch manchmal Proteine ausgefällt. Diese Proteine können im weiteren Verlauf des Versuchs die PCR inhibieren. Möglicherweise spielt dieses Phänomen eine Rolle bei den teilweise negativen Proben ohne Virusnachweis (Shieh et al. 1995). Es ist darum sinnvoll, weiter im Verlauf der Experimente PCR-Kits, die PCR-Inhibitoren abfangen können, zu verwenden. Dies wäre eine Option, um diesem Phänomen der unselektiven Extraktion mittels PEG-Fällung entgegen zu wirken.

Der DNA-Verdau wird ebenfalls als mögliche Schwachstelle identifiziert, da möglicherweise in diesem Arbeitsschritt über die Erwärmung der Probe die extrahierte RNA zerfallen kann (Li et al. 2019). Auch sollte erwähnt werden, dass der methodisch nicht anders umsetzbare Schritt des Umschreibens der RNA in cDNA, Gelegenheit für mögliche Fehler und Verunreinigungen darstellte. Dies ist dem Umstand geschuldet, dass die Proben für diesen Schritt extra aufgetaut und geöffnet sowie verarbeitet werden mussten.

#### 4.2.4 Schlussfolgerungen

Es konnte SARS-CoV-2 im Abwasser des UKGMs am Standort Gießen nachgewiesen werden und das über einen längeren Zeitraum. Allerdings ist die Mehrheit der nachgewiesenen Viruskonzentrationen eher im unteren Drittel, im Vergleich zu anderen Studien, angesiedelt. Da die Probengewinnung und Planung der Experimente zu Beginn der Pandemie erfolgten, und damals erst begonnen wurde das Thema abwasserbasierte Surveillance in Bezug auf SARS-CoV-2 zu beforschen, fanden sich in der Literatur nur wenige Vergleichsstudien. Um die Virusmenge zu erhöhen und so genauere Ergebnisse zu erzielen, sollten einige, der seit Beginn des Experiments gewonnenen Erkenntnisse in weiterführenden Experimenten berücksichtigt werden. Darunter fällt vor allem die Erhöhung des Probenvolumens. Dabei sollte mindestens ein Liter Abwasserprobe ausgewertet werden, wenn nicht sogar mehr. Auch die Beprobungsfrequenz sollte in weiteren Versuchen erhöht werden. So sollte nicht, wie im bisherigen Versuchsaufbau, die Probe einmal täglich gewonnen werden, sondern in unter 5 bis maximal 15-minütigen Abständen. Da dies personell schwer umzusetzen ist, sollte ein Beprobungsautomat (Autosampler) etabliert werden. Dabei stellt die Konzentration der Probe eine entsprechende Limitation dar. Es sollten pro 15-Minuten-Intervall mindestens 10ml gewonnen werden, um über 24 Stunden mindestens auf ca. einen Liter Probenvolumen zu kommen. Auch scheint die Einführung weiterer Targets sinnvoll. Dies kann selber entschieden oder über schon bestehende Testkits ausgewählt werden. Andere Targets scheinen in der Literatur

häufiger ausgewählt worden zu sein als das S-Gen und darum sind diese bereits etabliert. Weiterhin sollte ein konkretes Abnahme- und Transport- Protokoll für die Entnahme der Proben eingeführt werden.

Weitere Schritte zur Prozessqualitätssicherung: Wenn die Polyethylenglykol-Fällung beibehalten wird, sollte die Abwasserprobe mit einem zusätzlichen Virus beimpft werden, von dem die genaue Kopienanzahl bekannt ist. So kann der gesamte Prozess beurteilt werden. Von der Virus-Recovery in der Konzentration und Extraktion bis zur Prüfung der PCR-Qualität, also ob PCR-Inhibitoren anwesend waren oder nicht. Der von Boxus, Letellier et al. 2005 beschriebene Nachweis des Bovinen-respiratorischen-Synzytialvirus mittels Primer und TaqMan-Sonden würde sich für weitere Ansätze anbieten (Boxus et al. 2005).

Ebenfalls sollte in zukünftige Proben Konzentrationen bestimmter weitere Viren, wie beispielsweise das „Petter Mild Mottle Virus“ (PMMoV), mitbestimmt werden, um die Verdünnung der Probe als zusätzlichen Messwert zu bestimmen.

Dies sind die Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen dieser Arbeit und den Studien anderer Autoren, die mittlerweile publiziert wurden und darum hier auch berücksichtigt werden und in zukünftige Versuche integriert werden sollten.

## 4.3 Variantennachweis Omikron

### 4.3.1 Interpretation

In der Zusammenschau der Ergebnisse konnte SARS-CoV-2 der Omikron Variante mithilfe der verwendeten Primer und Sonden in einigen Proben nachgewiesen werden. Es wurde eine Auswahl von Proben ausgewertet, welche im allgemeinen SARS-CoV-2 Nachweis positive Ergebnisse erbringen konnten. Die höchste gemessene Viruskonzentration lag in einem Zeitintervall, in dem auch die Omikron-Variante in Deutschland per Sequenzierung nachgewiesen wurde. Der Nachweis der Omikron Variante BA.1 und BA.2 am 15.02.22 deckt sich mit der generell hohen Sequenzierungsfrequenz dieser Varianten in Deutschland von ca. 52% für BA.1 und 48% für BA.2. Von den weiteren Nachweisen der Omikron-Variante, die in ihrer Konzentration deutlich weniger Kopien aufwiesen, lag ein Nachweis in einem Zeitintervall, in dem noch keine Omikron-Variante in Deutschland per Sequenzierung identifiziert werden konnte. Der Nachweis vom 15.02.2022 stimmte wieder mit den Sequenzierungsdaten überein (Hodcroft et al. 2024b). Die geringe Menge an Viruskopien, in Kombination mit den noch nicht beobachteten Sequenzierungsnachweisen der Omikron-Variante, macht einen Messfehler oder eine falsch-positive Probe wahrscheinlich für den Nachweis vom 16.03.21, 29.04.21 und 11.05.21. Die Nachweise vom 01.02.22 und vom 15.02.22 erscheinen wahrscheinlicher.

Die Messwerte für den 01.02.22 sind zwar nur minimal höher als die Messung am 11.05.21, aber im zeitlichen Zusammenhang ist die Messung vom 01.02.22 glaubhafter. Für diesen Zeitraum lag die Sequenzierungsfrequenz BA.1 bei ca. 76% und für BA.2 bei ca. 23%. Dies wird noch einmal unterstrichen durch den Umstand, dass die meisten anderen Proben, die außerhalb des Sequenzierungsintervalls der Omikron-Varianten in Deutschland lagen, keine Probe einen positiven Nachweis erbringen konnte. Die Ergebnisse der Probe vom 15.02.22 sind allerdings deutlich höher und liegen in einem Zeitintervall währenddessen die Omikron Variante in Deutschland fast ausschließlich sequenziert wurde (Hodcroft et al. 2024b). Der Nachweis ist darum plausibel. Allerdings bleibt die Frage, ob die Primer und Sonden optimal gewählt wurden, da in drei Proben ein Nachweis erfolgte, in denen das Vorliegen der Omikron-Variante an sich nicht zu erwarten war. Ein möglicher Erklärungsansatz ist, dass in diesen Proben zwar gewisse Mutationen nachgewiesen wurden, nicht aber Viruskopien der Omikron-Variante.

Die Probe vom 22.02.22 liegt in einem Zeitraum, in dem die Omikron-Variante BA.2 zunehmend sequenziert wurde, zum Entnahmedatum der Probe etwa mit einer Frequenz von ca. 48% tendenziell steigend. Die Variante BA.1 war zu diesem Zeitpunkt mit einer Sequenzierungsfrequenz von ca. 52% fallend (Hodcroft et al. 2024b). Allerdings konnten keine Viruskopien der Omikron-Clade in dieser Probe mit dem verwendeten System nachgewiesen werden. Dies kann an dem Fehlen der nachgewiesenen Mutationen in dieser Virusvariante gelegen haben, falls es sich um eine Variante der Omikron-Clade gehandelt haben sollte. Oder eine komplett andere Virusvariante hat initial im generellen Virusnachweis zu einem positiven Virusnachweis geführt. Dieses Ergebnis relativiert allerdings die Annahme, dass die Proben vom 15.02.22 und 22.02.22 kontaminiert wurden, da sie am selben Tag verarbeitet wurden. Beide Proben zeigten zwar hohe Viruskonzentrationen im allgemeinen SARS-CoV-2-Nachweis, hier allerdings unterschiedliche Konzentrationen im Variantennachweis.

#### 4.3.2 Vergleich

Für den spezifischen Nachweis der Omikron-Varianten aus Klinikabwasser gibt es keine vergleichbaren Studien (Stand September 2023). Aus diesem Grund wird hier auf Studien zurückgegriffen, welche die Omikron-Variante und deren Untervarianten nachgewiesen haben. So konnten Chassalevris, Chaintoutis et al. 2022 im Abwasser der Stadt Thessaloniki in Griechenland 675 RNA-Kopien/ $\mu$ l nachweisen, die BA.1 zugeordnet werden (Chassalevris et al. 2022). Eine exakte Vergleichbarkeit ist daher aus folgenden, weiteren Gründen nicht gegeben: Für diese Arbeit wurden 24-Stunden-Sammelproben verwendet, für die jede Stunde 100 ml Probenvolumen gesammelt wurden. Aus dieser Sammelprobe wurden dann drei aliquotierte Proben à 40 ml abgefüllt und aufbereitet.

Die Proben wurden mittels elektronegativer Membran konzentriert und die RNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion extrahiert. Zur Detektion wurde ein Nachweis mittels RT-qPCR gewählt und Sequenzen des E-Hüllproteins und N-Proteins als Targets nachgewiesen. In den Primärdaten finden sich auch die umgerechneten Konzentrationen pro Liter. So wurden Konzentrationen BA.1 von  $6,5 \times 10^4$  Kopien/Liter bis  $10^7$  BA.1 Viruskopien/Liter gemessen (Chassalevris et al. 2022). Diese Konzentrationen liegen in ähnlicher Höhe vor wie die Viruskonzentration von ca.  $4,16 \times 10^5$  Kopien/Liter, die in dieser hier vorliegenden Forschungsarbeit nachgewiesen wurden und sogar noch etwas darüber. Diese Beobachtung legt also nahe, dass die hier gemessenen Konzentrationen durchaus nachweisbar sind und in größeren Städten noch deutlich darüber liegen können.

Wurtzer, Levert et al. 2022 kamen in ihrem Versuchsdesign deutlich näher an den Versuchsaufbau dieser Arbeit heran, zumindest was die Auswertung der Proben betraf. So wurden dort 24-Stunden-Sammelproben aus Abwasserleitungen und Kläranlagen im Großraum Paris entnommen. Aufkonzentriert wurden diese Proben mittels Ultrazentrifugation. Die RNA wurde, wie in dieser Arbeit auch, mit einem Kit entnommen, welches auf silicatmembran-basierten Spinnsäulen beruht. Für den Test auf die Omikron-Variante BA.1 wurde unter anderem auf die Deletion im Spike-Protein an der 69. und 70. Stelle getestet (S: del69-70), was hier größere Ähnlichkeit auch im Target aufweist. Für die Auswertung wurde ebenfalls ein QIAcuity® One von QIAGEN® verwendet, also eine Nanoplate basierte RT-digital PCR. Es handelt sich um das gleiche Gerät, was auch in dieser Arbeit verwendet wurde. Es wurde der gleiche Mastermix mit dem One Step Viral RT-PCR Kit getestet. Die gemessenen BA.1-Konzentrationen lagen für S:del69-70 bei ca.  $3 \times 10^5$  Kopien/Liter (Wurtzer et al. 2022). Damit wurden ähnliche Konzentrationen gemessen wie in dieser Forschungsarbeit am 15.02.22 mit ca.  $4 \times 10^5$  Kopien/Liter. Allerdings konnte in den weiteren Proben der Arbeit dieses Manuskripts keine weitere Probe solche Konzentrationen erreichen. Dies kann in der oben bereits erwähnten Schwierigkeit begründet sein, dass Stichproben nur einen sehr kurzen Ausschnitt wiedergeben können und 24-Stunden-Sammelproben einen weiten Zeitraum abdecken können. So kann die Probe, die als Stichprobe gewonnen wird, wenig Virusmaterial enthalten, wenn zu diesem Zeitpunkt nur wenig vorbeigeflossen ist. Dennoch weisen andere Studien mit vergleichbarem Beprobungsintervall höhere Mengen nach, wie oben bereits anhand der Ergebnisse von Hong, et al. 2021 erläutert wurde (Hong et al. 2021).

Andere Autoren versuchen für den Nachweis mehrere Techniken miteinander zu verbinden und ineinander zu verschachteln, um mehr Daten generieren zu können und damit die Ergebnisse, die jede Nachweismethode für sich liefert, überprüfen zu können. So

verglichen Peng, Sun et al. 2022 für die Auswertung von Abwasserproben die RT-qPCR mit einer nested PCR (nPCR). Dies ist ein PCR-Verfahren, bei dem zwei Primer sich im Reaktionsmix befinden, um die Möglichkeit von zufällig generierten Amplikons zu senken. Das PCR-Produkt wurde zusätzlich mittels Flüssigchromatographie (LC) und Massenspektrometrie (MS) ausgewertet. Die Kopplung dieser Verfahren soll Schwachstellen von herkömmlichen Verfahren ausbessern. Im Abgleich mit der qPCR konnte diese Kopplung mehrerer Verfahren (nPCR-LC-MS) in einer Regressionsanalyse mit  $R^2 = 0,8361$  Ähnlichkeiten der Ergebnisse feststellen (Peng et al. 2022). Allerdings müssen diese Techniken auch etabliert sein, um sie mit in einen solchen Versuch zu integrieren. Auch ist in dieser Konstellation eine absolute Quantifikation nicht möglich, wie sie in dieser Arbeit angestrebt wurde. Aus diesen Gründen wird hier weiterhin der Ansatz mittels RT-digital PCR als zielführend angesehen.

#### 4.3.3 Limitationen

Da die RNA für diesen Versuch aus den gleichen Proben entnommen wurde, sind generell alle bereits oben genannten Schwachstellen des Versuchs des generellen SARS-CoV-2-Nachweises auch auf diesen Versuch übertragbar. Dies gilt allerdings nicht für den Prozess des Umschreibens der RNA in cDNA, da dies durch das hier verwendete Kit direkt in der QIAcuity® One erfolgte. Allerdings ist bei diesem Experiment generell zu bemängeln, dass auch hier mangels Erfahrung keine weiteren Kontrollviren getestet wurden, um die Extraktionsrecovery zu beurteilen. Dies ist allerdings dem Umstand geschuldet, dass zum Zeitpunkt der Planung noch zu wenige vergleichbare Studien vorlagen, an denen man sich hätte orientieren können. Das auf eine Variante des Virus getestet wurde, stellt eine weitere Limitation dieser Arbeit dar. Da über einen längeren Zeitraum getestet wurde, wäre es möglich gewesen, andere Varianten in die Auswertung mit aufzunehmen. Es wurde davon Abstand genommen, da die einzelnen Virusvarianten einen sehr dynamischen Verlauf zeigten und es in dieser Forschungsarbeit um die Etablierung einer Methode ging. Weiterhin ist auffällig, dass eine Probe stark positiv war, während die anderen positiven Proben bedeutend weniger positive Partitionen aufwiesen. Von 22 getesteten Proben wurden also fünf als positiv bestätigt. Auch ist eine Schwachstelle die geringe Anzahl an ausgewerteten Proben. Nicht nur hätten noch an mehr Tagen Proben genommen werden können, auch wäre ein größeres Probenvolumen sinnvoll gewesen. Dieses größere Probenvolumen hätte noch aliquotiert werden können, um ein Mittel aus den einzelnen Aliquots zu bilden. Die eher geringe Menge an Proben, die in einem Zeitintervall lag, während dessen auch die Omikron-Variante wahrscheinlich bereits vorlag, erschwerte es, Proben untereinander zu vergleichen. Die späte Auswertung ist durch den generellen Zerfall des Virus ein Problem. Da der allgemeine

SARS-CoV-2-Nachweis schon zeigte, dass die hier generierten Werte sich eher im unteren Drittel im Vergleich zu anderen Studien befinden, ist es bei einem sehr spezifischen Test, wie einem Variantennachweis, noch unwahrscheinlicher höhere Werte zu erwarten. Allerdings ist der Umstand, dass in den Proben eher geringere Werte für die Omikron-Varianten nachgewiesen wurden, als im generellen SARS-COV-2-Nachweis, als ein Zeichen der Nachvollziehbarkeit der Werte anzusehen.

#### 4.3.4 Schlussfolgerungen

Es lässt sich festhalten, dass diese Arbeit eine der ersten Ansätze beinhaltet, Krankenhausabwässer auf Varianten des SARS-CoV-2-Virus zu untersuchen und auch mittels digital PCR absolut zu quantifizieren. Darum fehlte es an konkreten vergleichbaren Studien. Es wurde darum auf generelle Auswertungen von Abwässern, in denen auf die Omikron-Variante oder andere Varianten getestet wurde, ausgewichen. Es zeigt sich hier ein „buntes Bild“ der Ansätze, da dieses Forschungsfeld recht jung ist und darum verschiedenste Ansätze erprobt werden. Es lässt sich bereits festhalten, dass es möglich war, SARS-CoV-2 der Omikron-Variante nachzuweisen in einem Zeitraum, in dem generell in Deutschland Sequenzierungsdaten für die Omikron-Variante vorlagen. Die meisten Proben lagen in Zeiträumen, in denen dies nicht der Fall war, und darum sind in den meisten Proben keine SARS-CoV-2-Viren der Omikron-Variante nachweisbar (Hodcroft et al. 2024b). Auch lagen drei Proben, die vom 16.03.2021, 29.04.2021 und 11.05.2021, außerhalb dieses Bereiches. Diese Proben waren zwar positiv, aber die Werte der absoluten Quantifizierung, im Verhältnis zur absoluten Quantifizierung der Probe vom 15.02.2022, sind eher gering. Darum könnte es sich hier um eine falsch positive Probe handeln. Es wurden zwar gewisse Mutationen nachgewiesen, es handelte sich aber wahrscheinlich nicht um die Omikron-Variante. Auch hat das Fehlen des Nachweises der Omikron-Variante in der Probe vom 22.02.2022 die Möglichkeit einer Kontamination der Proben relativiert, da ein Nachweis sehr wohl am 15.02.2022 erfolgte. Das Verfahren hat sich zum Nachweis von SARS-CoV-2 der Omikron-Variante im Krankenhausabwasser als vielversprechend herausgestellt. In Zeiträumen, in denen man mit der Variante gerechnet hätte, ist der Nachweis gelungen. In Zeiträumen, zu denen nicht mit einem Nachweis gerechnet wurde, ist dieser auch in allen Fällen, außer in drei Proben, nicht erfolgt. Generell finden die im allgemeinen Virusnachweis besprochenen Verbesserungen auch hier wieder Anwendung.

Die unter „1.8 Ziele“ formulierten Zielsetzungen konnten in dieser Arbeit erreicht werden. Abschließend kann festgehalten werden, dass erfolgreich ein molekularer Nachweis sowohl für den SARS-CoV-2 Wildtyp als auch die Omikron-Variante etabliert werden konnte. Ebenfalls wurde erfolgreich eine Aufbereitungs- und RNA-Extraktionsmethode

---

aus Klinikabwasser etabliert. Mit den oben genannten Arbeitsschritten ist der Nachweis von SARS-CoV-2 allgemein sowie der Omikron-Variante im Krankenhausabwasser der Uniklinik Gießen möglich. Der Nachweis konnte in beiden Fällen erfolgreich absolut quantifiziert werden. Der Grundstein für ein Abwasser basiertes Surveillance System an der Universitätsklinik Gießen ist damit gelegt.

## 5 Zusammenfassung

Die hier vorliegende Forschungsarbeit hat erste Erkenntnisse zum Aufbau eines abwasserbasierten Surveillance Systems am Universitätsklinikum Gießen geliefert. Zur Generierung erster Daten wurden während der COVID-19-Pandemie 33 Stichproben aus dem Abwasser des Universitätsklinikums gewonnen und ausgewertet. Hierfür wurde ein Protokoll zur Verarbeitung von Abwasser und von RNA-Extraktion etabliert. In allen Proben konnte im Pandemieverlauf in cDNA überführte total-RNA gemessen werden. Weiterhin wurde ein molekularer Nachweis für SARS-CoV-2 erfolgreich eingeführt. Dieser ist die Basis für einen generellen Virusnachweis von SARS-CoV-2 und ist in der Lage auch Virusvarianten zu detektieren. Durch die Verwendung einer digital-PCR wurde die absolute Quantifizierung von SARS-CoV-2 erreicht.

Die Wahl des Targets, mit Sequenzen des Spike-Glyko-Oberflächenproteins, war für diesen speziellen Versuchsaufbau sinnvoll. Zukünftig kann auf mittlerweile konventionell erhältliche Kits zum Nachweis zurückgegriffen werden. Auch sollten noch weitere Sequenzen ausgewertet werden, um umfangreichere Datensätze zu generieren. In dem angestrebten generellen und Varianten-unabhängigen Nachweis von SARS-CoV-2 konnten über den beobachteten Pandemieverlauf absolut quantifizierte Daten erhoben werden. Die gemessenen Konzentrationen divergierten zum Teil stark, obwohl sich die meisten Proben um den Median von 150 Viruskopien/Liter Abwasser verorten ließen. Möglicherweise lässt sich dies mit der stichpunktartigen Entnahmestrategie in einem niedrig bis mittleren Durchfluss-Abwassersystem erklären.

Im spezifischen Nachweis der Omikron-Variante konnte diese Studie Ergebnisse liefern, die mit den Sequenzierungsdaten in Deutschland über das mögliche Vorliegen der Omikron-Variante übereinstimmten. Auch hier wurde eine große Spannweite zwischen den Konzentrationen festgestellt. Generell lieferte die absolute Quantifizierung im Varianten-Nachweis geringere Viruskonzentrationen als im Varianten-unabhängigen Nachweis. Dies kann ein Zeichen dafür sein, dass die Konzentrationen spezifisch für die Variante, als Teilmenge des gesamten Virusnachweises, getestet wurden. Hier war ebenso eine absolute Quantifizierung möglich. Es konnten keine Verlaufsdaten erhoben werden, da dafür zu wenig Proben im Zeitraum des Auftritts der Variante gewonnen wurden. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass potenzielle Krankheitserreger im Abwasser des Universitätsklinikums am Standort Gießen nachweisbar und quantifizierbar sind.

Aus der Diskussion ergeben sich folgende Ansätze für weiterführende Versuche: Zunächst sollte die Abwasserprobengewinnung angepasst werden. Es sollten die Bepro-

bungsfrequenz und das Probenvolumen erhöht werden. Es sollte eine 24-Stunden-Sammelprobe, mit Abnahmeintervallen von 5 - 15 Minuten, mit den Ergebnissen einer einfachen Stichprobe verglichen werden. Auch sind die oben erwähnten Prozesskontrollmechanismen zu überprüfen und zu etablieren. Die dann gewonnenen Ergebnisse sollten in ein Surveillance System integriert werden, das nicht nur eine digital-PCR verwendet, sondern auch Sequenzierungsdaten erhebt. Damit können abschließend nicht nur Pathogene nachgewiesen werden, für die explizite Primer oder Primer/Sonden-Paare vorliegen, wie in dieser Arbeit, sondern noch viele weitere Pathogene. So könnten auch solche nachgewiesen werden, die initial am Patienten übersehen worden sind. Der Grundstein für ein Abwasser basiertes Surveillance System an der Universitätsklinik Gießen ist damit gelegt.

## 6 Summary

The scientific experiments have provided first insights for establishing a wastewater-based surveillance system for the university hospital in Gießen. To generate this data 33 grab samples were taken from the hospital's wastewater during the COVID-19 pandemic. In the further process the samples were collected, processed and analyzed all together. Therefor a protocol to process the wastewater samples was successfully introduced. After the concentration, extraction and transcription process in all samples in cDNA transferred total RNA was measured Furthermore a molecular detection method was successfully established. This was the foundation for a general SARS-CoV-2 detection and the Omicron variant detection protocol. By using the digital PCR an absolute quantification of the virus was conducted.

The chosen targets, sequences of the spike protein, were suitable for the protocol. For preceding experiments commercially available test kits with other or additional targets, with fewer mutations, can be used to create more complex datasets. The experiment for a variant unspecific detection of SARS-CoV-2 was able to detect and quantify the virus during the monitored time period. All samples together indicate a wide range of virus concentrations, although most concentration are close to the median of about 150 copies/liter untreated wastewater. The wide range of concentrations could be caused by the sampling method by grab sampling in a low to medium flow wastewater system

The experiment of the variant specific detection of the Omicron variant was able to provide data that suited the sequencing data for Germany. This experiment also showed a very high range of measured virus concentration. Throughout all samples the virus concentration measured in the variant specific experiment was lower than in the variant unspecific experiment. This could indicate that the measured virus concentration was a subset of the initial measured general SARS-CoV-2 concentration. It was difficult to review the data of the variant specific concentration over the course of the pandemic, because only a short period of time was captured, in which the Omicron variant was sequenced in Germany. The results have shown that potential pathogens can be detected and quantified in the wastewater of the university hospital in Gießen.

The following adjustments and enhancements can be introduced to the protocol in future experiments: First and foremost the sampling process must be reevaluated. Not only the sampling frequency, with which the sample itself is acquired, but also the sample volume must be increased. A 24-hour composite sampling strategy, with a sampling frequency of under 5 to 15 minutes, should be evaluated and compared to a grab sampling strategy that was used in these experiments. Furthermore process control mechanisms should

be evaluated. In a final step the acquired knowledge should be integrated in a wastewater surveillance system that uses not only a digital PCR, but also sequencing as a surveillance tool. This will provide the capability to not only detect pathogens that were covered by the used primer or primer/probe sets, but it will potentially detect all pathogens. This could include pathogens that were not detected and diagnosed in the clinical setting.

This is the foundation for wastewater-based surveillance at the university hospital in Gießen.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

ACE2	-	Angiotensin-konvertierendes Enzym 2
BZgA	-	Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung
cDNA	-	complementary DNA (komplementäre DNS)
COVID-19	-	coronavirus disease 2019
CSG	-	Coronaviridae Study Group
DIVI	-	Deutsche interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin e.V.
DNA (DNS)	-	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	-	Desoxyribonuklease
EG	-	EvaGreen
E-Protein	-	Envelope-Protein
et al.	-	et alii (Maskulinum), et aliae (Femininum) - und andere
FAM	-	ein Fluoreszenzfarbstoff
FFP2	-	filtering face piece (filtrierendes Gesichtsteil)
m	-	Meter
ml	-	Milliliter
ms	-	Millisekunde
M-Protein	-	Membrane-Protein
µl	-	Mikroliter
nm	-	Nanometer
N-Protein	-	Nukleokapsid-Protein
PCR	-	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RNA	-	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
SARS-CoV-2	-	Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2
S-Protein	-	Spike-Protein
S1/S2	-	Untereinheiten des Spikeproteins
VOC	-	Variants of Concern
VOI	-	Variants of Interest
WHO	-	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
x g	-	mal Gravitation

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der Schweregrade einer akuten COVID-19-Erkrankung; Begriffe: NIV- Nicht invasive Ventilation, high flow - Applikation von ca. 60 l Sauerstoff/Minute, $pO_2/FiO_2$ - Sauerstoffpartialdruck/inspiratorische Sauerstofffraktion, $SpO_2/FiO_2$ - partielle Sauerstoffsättigung/inspiratorische Sauerstofffraktion, ECMO - extrakorporale Membranoxygenierung (Marshall et al. 2020). .....	8
Tabelle 2: Thermocycling-Parameter der cDNA Transkription (Thermo Fisher Scientific Baltics UAB 2018).....	22
Tabelle 3: Thermocycling für alle Versuche mit dem QIAcuity® EG PCR Kit (QIAGEN GmbH 2021a).....	26
Tabelle 4: Übersicht der Kanäle der QIAcuity® mit den dazugehörigen Wellenlängen und Fluorochromen (QIAGEN GmbH 2021b). .....	27
Tabelle 5: Reaktionsmix-Zusammensetzung für das Umschreiben der Plasmid-DNA in RNA (Thermo Fisher Scientific 2014).....	32
Tabelle 6: Cycling des QIAcuity® One-Step Viral RT-PCR Kit (QIAGEN GmbH 2024).....	42
Tabelle 7: Liste der in „Spike- Variants in pBluescript II KS (+)“ eingefügten Mutationen für den Nachweis der Omikron-Variante.....	44
Tabelle 8: Quantifikation des molekularen Nachweises des wildtypischen und des angepassten Spike-Proteins. ....	52
Tabelle 9: Erkannte Partitionen der verwendeten Primer/Sonden-Kombination „CoV2-Omt-F-sz“, „CoV2-Omt-R-sz“ / „CoV2-Omt-P-sz“ mit der QIAcuity® One und dem QIAcuity® One-Step viral RT-PCR Kit .....	54
Tabelle 10: Ergebnisse der in cDNA umgeschriebenen total RNA-Messung in ng/µl...	55
Tabelle 11: Messergebnisse der absoluten Quantifikation des Elutionsvolumens (Kopien/µl) und hochgerechnet auf einen Liter Abwasser (Kopien/Liter). .....	57
Tabelle 12: Messwerte der absoluten Quantifikation für die Omikron-Variante in Kopien/Liter. ....	61

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modifizierte Vorlage von Jerry Gu des schematischen Aufbaus SARS-CoV-2 mit den wichtigsten Strukturen. (Bergmann et al. 2020). Gegenüberstellung von SARS-CoV-2 in einer dreidimensionalen und zweidimensionalen Form. Erstellt mit BioRender.com. ....	2
Abbildung 2: Modifizierte Abbildung der Übertragungswege von Atemwegsinfektionen. (Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung (BZgA) 2021) Erstellt mit BioRender.com. ....	5
Abbildung 3: Replikationszyklus von SARS-CoV-2. Modifizierte Vorlage von Benjamin Goldman-Israelow (Harrison et al. 2020) und V'kovski et al. (V'kovski et al. 2021). Erstellt mit BioRender.com.....	6
Abbildung 4: SARS-CoV-2 befällt den Respirationstrakt und den Gastrointestinaltrakt. Modifizierte Darstellung (Konturek 2020). Erstellt mit BioRender.com .....	10
Abbildung 5: QIAcuity® One digital-PCR.....	12
Abbildung 6: Modifizierte Abbildung (Rubio-Acero et al. 2021) mit dem Ablauf der Arbeitsschritte in der Abwasserbasierten Epidemiologie. Erstellt mit BioRender.com ..	13
Abbildung 7: Schematischer Ablauf der Vorgehensweise mit der Zielsetzung dieser Arbeit. Erstellt mit BioRender.com .....	14
Abbildung 8: QIAcuity® One .....	23
Abbildung 9: QIAcuity® Nanoplate 24 Well 26K Partitionen.....	25
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Funktionsweise des-Nachweises mit dem QIAcuity® EG PCR Kit. Es werden die Replikationsschritten.sowie die Interkalierung der Flouochrome sowie deren abschließende Exzitation und Emission dargestellt. Modifizierte Darstellung (QIAGEN GmbH 2021b). Erstellt mit BioRender .com.....	26
Abbildung 11: Belichtungs- und Imagingprozess der QIAcuity®; Modifizierte Darstellung (QIAGEN GmbH 2021b). Erstellt mit BioRender.com .....	28
Abbildung 12: pCI-neo-Spike-SARS-CoV-2-2020 Plasmid (Spike) mit der wildtypischen Sequenz des Spike-Proteins mit dem Primerpaar „sz-CoVS_For1A“ und „sz-CoVS_Rev1A“; aus DNASTar SeqBuilder Pro 17. ....	29
Abbildung 13: Spike- Variants in pBluescript II KS (+) (Spike Variant) mit dem Primerpaar „sz-CoVS_For1A“ und „sz-CoVS_Rev1A“; aus DNASTar SeqBuilder Pro 17. ....	30
Abbildung 14: Darstellung des Forward- und Reverseprimers sowie deren Amplikon in DNASTar Seqbuilder an der Sequenz des Plasmides „pCI- neo- Spike-SARS-CoV-2-2020“ (Spike) mit der wildtypischen Sequenz des Spike-Proteins, sowie der Aminosäure Histidin (69) in dunkelgrün und Valin (70) in rot. ....	37
Abbildung 15: Darstellung des Forward- und Reversprimers in DNASTar Seqbuilder an der angepassten Sequenz des „Spike- Variants in pBluescript II KS (+)“ mit den Mutationen S:I68N (lila) S:H69A (orange) und S:V70I (dunkelblau) .....	38
Abbildung 16: Funktionsweise des Nachweises mit dem für das QIAcuity® One-Step Viral RT-PCR Kit verwendeten TaqMan Sonden. Modifizierte Darstellung (QIAGEN GmbH 2021b). Erstellt mit BioRender.com .....	42
Abbildung 17: „ Spike- Variants in pBluescript II KS (+)“ mit der Primer/Sonden-Kombination aus „CoV2-Omt-F-sz“, „CoV2-Omt-R-sz“ / „CoV2-Omt-P-sz“ (Orange); aus DNASTar Seqbuilder. ....	44
Abbildung 18: Ausschnitt aus „Spike- Variants in pBluescript II KS (+)“ mit den in der Tabelle aufgeführten Mutationen (entsprechend der Farbkodierung aus der Tabelle) sowie der Primer-/Sonden-Kombination aus „CoV2-Omt-F-sz“, „CoV2-Omt-R-sz“ / „CoV2-Omt-P-sz“ (Orange) sowie die Spike -Variant-Sequenz; aus DNASTar Seqbuilder .....	45
Abbildung 19: „Spike- Variants in pBluescript II KS (+)“ mit Mutationen für den Omikron-Nachweis aus Tabelle 7 (bunte Linien) sowie die Primer-/Sonden-	

Kombination aus „CoV2-Omt-F-sz“, „CoV2-Omt-R-sz“, „CoV2-Omt-P-sz“ (orangene Pfeile und Quader) mit Vergrößerung. Erstellt mit BioRender.com.....	46
Abbildung 20: Amplikon des Omikron-Nachweis mit der oben aufgeführten Primer/Sonden Kombination aus DNASTar Seqbuilder .....	48
Abbildung 21: Verdünnungsreihe wildtypisches Spike-Plasmid „pCI-neo-Spike-SARS-CoV-2-2020“ (Spike): A1- 1:1-Verdünnung; B1- 1:2-Verdünnung; C1- 1:4-Verdünnung. ....	51
Abbildung 22: Verdünnungsreihe des angepassten Spike „Spike-Variants in pBluescript II KS (+)“ (Spike Variant): A2- 1:1-Verdünnung; B2- 1:2-Verdünnung; C2- 1:4-Verdünnung. ....	52
Abbildung 23: Vergrößerte Ansicht der Positivkontrolle E2 mit dem „Spike-Variants in p-Bluescript II KS (+)“. Die Phasentrennung ist hier deutlich zu erkennen. Der Nachweis erfolge mit der Primer/Sonden-Kombination „CoV2-Omt-F-sz“, „CoV2-Omt-R-sz“ / „CoV2-Omt-P-s und dem QIAcuity® One-Step viral RT-PCR Kit .....	53
Abbildung 24: Vergrößerte Ansicht der Negativkontrolle E1 mit dem Plasmid der wildtypischen Sequenz „pCI-neo-Spike-SARS-CoV-2-2020“. Die Phasentrennung ist hier nicht zu erkennen. Die Etablierung erfolgte mit der Primer/Sonden-Kombination „CoV2-Omt-F-sz“, „CoV2-Omt“ / „CoV2-Omt-P-s und dem QIAcuity® One-Step viral RT-PCR Kit. ....	54
Abbildung 25: Mit dem Qubit™ 4 Fluorometer berechnete cDNA-Konzentration aller Proben in ng/µl in chronologischer Reihenfolge. ....	56
Abbildung 26: gemessene SARS-CoV-2-Konzentration im Krankenhausabwasser im UKGM Gießen über den Pandemieverlauf im Zeitraum der Datenerhebung mit den an das Robert Koch-Institut gemeldeten COVID-19-Infektionen in Deutschland (RKI Open Data 2023). ....	58
Abbildung 27: gemessene SARS-CoV-2-Konzentration im Krankenhausabwasser im UKGM Gießen über den Pandemieverlauf im Zeitraum der Datenerhebung dargestellt in einer logarithmischen Skala zur Basis 10 mit den an das Robert Koch-Institut gemeldeten COVID-19-Infektionen in Deutschland (RKI Open Data 2023) .....	59
Abbildung 28: Gemessene SARS-CoV-2-Konzentration im Verhältnis der Intensivbettenbelegung (DIVI) in Hessen im Pandemieverlauf (Robert Koch-Institut, DIVI e.V. 2023).....	60

## 10 Literaturverzeichnis

Agrawal, Shelesh; Orschler, Laura; Lackner, Susanne (2021): Long-term monitoring of SARS-CoV-2 RNA in wastewater of the Frankfurt metropolitan area in Southern Germany. In: *Scientific Reports* 11. DOI: 10.1038/s41598-021-84914-2.

Ahmed, Warish; Bertsch, Paul M.; Bivins, Aaron; Bibby, Kyle; Farkas, Kata; Gathercole, Amy; Haramoto, Eiji; Gyawali, Pradip et al. (2020): Comparison of virus concentration methods for the RT-qPCR-based recovery of murine hepatitis virus, a surrogate for SARS-CoV-2 from untreated wastewater. In: *The Science of the Total Environment* 739, S. 139960. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.139960.

Ather, Amber; Patel, Biraj; Ruparel, Nikita B.; Diogenes, Anibal; Hargreaves, Kenneth M. (2020): Coronavirus Disease 19 (COVID-19): Implications for Clinical Dental Care. In: *Journal of endodontics* 46 (5), S. 584–595. DOI: 10.1016/j.joen.2020.03.008.

Azevedo, Rafael Bellotti; Botelho, Bruna Gopp; Hollanda, João Victor Gonçalves de; Ferreira, Leonardo Villa Leão; Junqueira de Andrade, Letícia Zarur; Oei, Stephanie Si Min Lilienwald; Mello, Tomás de Souza; Muxfeldt, Elizabeth Silaid (2021): Covid-19 and the cardiovascular system: a comprehensive review. In: *Journal of human hypertension* 35 (1), S. 4–11. DOI: 10.1038/s41371-020-0387-4.

Baric, R. S.; Sullivan, E.; Hensley, L.; Yount, B.; Chen, W. (1999): Persistent infection promotes cross-species transmissibility of mouse hepatitis virus. In: *Journal of virology* 73 (1), S. 638–649. DOI: 10.1128/JVI.73.1.638-649.1999.

Barnett, J. Lynn; Mozzherin, Dmitry; Keshvari, Nima (2022): Umrechnung: Gewicht – Mol (für Nukleinsäuren) | Praktische Molekularbiologie. Unter Mitarbeit von Nima Keshvari. Online verfügbar unter [http://www.molbiol.ru/ger/scripts/01\\_07.html](http://www.molbiol.ru/ger/scripts/01_07.html), zuletzt aktualisiert am 06.09.2022, zuletzt geprüft am 06.09.2022.

Bedford, Trevor; Hodcroft Emma B; Neher Richard A (2021): Updated Nextstrain SARS-CoV-2 clade naming strategy. Hg. v. Trevor Bedford und Neher Richard. Online verfügbar unter <https://nextstrain.org/blog/2021-01-06-updated-SARS-CoV-2-clade-naming>, zuletzt aktualisiert am 18.12.2023, zuletzt geprüft am 22.12.2023.

Bergmann, Cornelia C.; Silverman, Robert H. (2020): COVID-19: Coronavirus replication, pathogenesis, and therapeutic strategies. In: *Cleveland Clinic journal of medicine* 87 (6), S. 321–327. DOI: 10.3949/ccjm.87a.20047.

Bill Simpson (2013): Wastewater-Sampling. U.S. Environmental Protection Agency. Online verfügbar unter <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-06/documents/Wastewater-Sampling.pdf>, zuletzt geprüft am 28.08.2023.

Bobay, Louis-Marie; O'Donnell, Angela C.; Ochman, Howard (2020): Recombination events are concentrated in the spike protein region of Betacoronaviruses. In: *PLoS genetics* 16 (12), e1009272. DOI: 10.1371/journal.pgen.1009272.

Bolze, Alexandre; Basler, Tracy; White, Simon; Dei Rossi, Andrew; Wyman, Dana; Dai, Hang; Roychoudhury, Pavitra; Greninger, Alexander L. et al. (2022): Evidence for SARS-CoV-2 Delta and Omicron co-infections and recombination. In: *Med (New York, N.Y.)* 3 (12), 848-859.e4. DOI: 10.1016/j.medj.2022.10.002.

Boxus, M.; Letellier, C.; Kerkhofs, P. (2005): Real Time RT-PCR for the detection and quantitation of bovine respiratory syncytial virus. In: *Journal of Virological Methods* 125 (2), S. 125–130. DOI: 10.1016/j.jviromet.2005.01.008.

Bundesministerium für Gesundheit: Entwurf eines Gesetzes zum Schutz der Bevölkerung bei einer epidemischen Lage von nationaler Tragweite, S. 1–33. Online verfügbar unter [https://www.bundesgesundheitsministerium.de/fileadmin/Dateien/3\\_Down-](https://www.bundesgesundheitsministerium.de/fileadmin/Dateien/3_Down-)

loads/Gesetze\_und\_Verordnungen/GuV/S/Entwurf\_Gesetz\_zum\_Schutz\_der\_Bevoelkerung\_bei\_einer\_epidemischen\_Lage\_von\_nationaler\_Trugweite.pdf, zuletzt geprüft am 07.08.2023.

Bundesministerium für Gesundheit (2023): Chronik zum Coronavirus SARS-CoV-2. Hg. v. Bundesministerium für Gesundheit. Online verfügbar unter <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/coronavirus/chronik-coronavirus.html>, zuletzt aktualisiert am 07.08.2023, zuletzt geprüft am 07.08.2023.

Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung (BZgA) (2021): Atemwegsinfektionen. Hg. v. Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung (BZgA). Online verfügbar unter <https://www.infektionsschutz.de/infektionskrankheiten/krankheitsbilder/atemwegsinfektionen/>, zuletzt aktualisiert am 17.12.2023, zuletzt geprüft am 17.12.2023.

Carlos, W. Graham; Dela Cruz, Charles S.; Cao, Bin; Pansnick, Susan; Jamil, Shazia (2020): Novel Wuhan (2019-nCoV) Coronavirus. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 201 (4), P7-P8. DOI: 10.1164/rccm.2014P7.

Centers for Disease Control and Prevention (2022): COVID-19 and Your Health. Hg. v. Centers for Disease Control and Prevention. Online verfügbar unter [https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/prevent-getting-sick/how-covid-spreads.html?CDC\\_AA\\_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fcoronavirus%2F2019-ncov%2Fabout%2Findex.html](https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/prevent-getting-sick/how-covid-spreads.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fcoronavirus%2F2019-ncov%2Fabout%2Findex.html), zuletzt aktualisiert am 10.08.2023, zuletzt geprüft am 10.08.2023.

Chassalevris, Taxiarchis; Chaintoutis, Serafeim C.; Koureas, Michalis; Petala, Maria; Moutou, Evangelia; Beta, Christina; Kyritsi, Maria; Hadjichristodoulou, Christos et al. (2022): SARS-CoV-2 wastewater monitoring using a novel PCR-based method rapidly captured the Delta-to-Omicron BA.1 transition patterns in the absence of conventional surveillance evidence. In: *The Science of the Total Environment* 844, S. 156932. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.156932.

Chen, Yifei; Chen, Liangjun; Deng, Qiaoling; Zhang, Guqin; Wu, Kaisong; Ni, Lan; Yang, Yibin; Liu, Bing et al. (2020): The presence of SARS-CoV-2 RNA in the feces of COVID-19 patients. In: *Journal of medical virology* 92 (7), S. 833–840. DOI: 10.1002/jmv.25825.

Cheung, Ka Shing; Hung, Ivan F.N.; Chan, Pierre P.Y.; Lung, K. C.; Tso, Eugene; Liu, Raymond; Ng, Y. Y.; Chu, Man Y. et al. (2020): Gastrointestinal Manifestations of SARS-CoV-2 Infection and Virus Load in Fecal Samples From a Hong Kong Cohort: Systematic Review and Meta-analysis. In: *Gastroenterology* 159 (1), S. 81–95. DOI: 10.1053/j.gastro.2020.03.065.

Choi, Jun Yong; Smith, Davey M. (2021): SARS-CoV-2 Variants of Concern. In: *Yonsei medical journal* 62 (11), S. 961–968. DOI: 10.3349/ymj.2021.62.11.961.

Dhakar, Vaishali; Geetanjali, A. Swapna (2022): Role of pepper mild mottle virus as a tracking tool for fecal pollution in aquatic environments. In: *Archives of microbiology* 204 (8), S. 513. DOI: 10.1007/s00203-022-03121-3.

Diehl-Valentin, Theresa (2023): Molekularbiologische Strategien zur Erhöhung der Produktion von bakteriellen Membranvesikeln sowie die Produktion von SARS-CoV-2 Spike S1-Protein haltigen bakteriellen Membranvesikeln. Dissertation (Edition Scientifique).

Dumke, Roger; La Cruz Barron, Magali de; Oertel, Reinhard; Helm, Björn; Kallies, Rene; Berendonk, Thomas U.; Dalpke, Alexander (2021): Evaluation of Two Methods to Concentrate SARS-CoV-2 from Untreated Wastewater. In: *Pathogens* 10 (2), S. 195. DOI: 10.3390/pathogens10020195.

- European commission (2021): RECOMMENDATIONS COMMISSION RECOMMENDATION (EU) 2021/472 of 17 March 2021. on a common approach to establish a systematic surveillance of SARS-CoV-2 and its variants in wastewater in the EU, 3-8. Online verfügbar unter <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32021H0472&from=EN>, zuletzt geprüft am 30.08.2022.
- Federal Ministry of Health, Robert Koch Institute (2025): Infektionsradar. Hg. v. Federal Ministry of Health, Robert Koch Institute. Federal Ministry of Health, Robert Koch Institute. Online verfügbar unter <https://infektionsradar.gesund.bund.de/en/covid/hospitalizations>, zuletzt aktualisiert am 07.01.2025, zuletzt geprüft am 02.02.2025.
- Fehr, Anthony R.; Perlman, Stanley (2015): Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1282, S. 1–23. DOI: 10.1007/978-1-4939-2438-7\_1.
- Gao, Zhiru; Xu, Yinghui; Sun, Chao; Wang, Xu; Guo, Ye; Qiu, Shi; Ma, Kewei (2021): A systematic review of asymptomatic infections with COVID-19. In: *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection* 54 (1), S. 12–16. DOI: 10.1016/j.jmii.2020.05.001.
- George, Andrea D.; Kaya, Devrim; Layton, Blythe A.; Bailey, Kestrel; Mansell, Scott; Kelly, Christine; Williamson, Kenneth J.; Radniecki, Tyler S. (2022): Impact of Sampling Type, Frequency, and Scale of the Collection System on SARS-CoV-2 Quantification Fidelity. In: *Environ. Sci. Technol. Lett.* 9 (2), S. 160–165. DOI: 10.1021/acs.estlett.1c00882.
- Gerrity, Daniel; Papp, Katerina; Stoker, Mitchell; Sims, Alan; Frehner, Wilbur (2021): Early-pandemic wastewater surveillance of SARS-CoV-2 in Southern Nevada: Methodology, occurrence, and incidence/prevalence considerations. In: *Water Research X* 10, S. 100086. DOI: 10.1016/j.wroa.2020.100086.
- Gorbalenya, Alexander E.; Baker, Susan C.; Baric, Ralph S. et al. (2020): The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. In: *Nature microbiology* 5 (4), S. 536–544. DOI: 10.1038/s41564-020-0695-z.
- Graham, Rachel L.; Baric, Ralph S. (2010): Recombination, reservoirs, and the modular spike: mechanisms of coronavirus cross-species transmission. In: *Journal of virology* 84 (7), S. 3134–3146. DOI: 10.1128/JVI.01394-09.
- Hamming, I.; Timens, W.; Bulthuis, M. L. C.; Lely, A. T.; Navis, G. J.; van Goor, H. (2004): Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. In: *The Journal of Pathology* 203 (2), S. 631–637. DOI: 10.1002/path.1570.
- Harder, Thomas; Koch, Judith; Vygen-Bonnet, Sabine; Külper-Schiek, Wiebe; Pilic, Antonia; Reda, Sarah; Scholz, Stefan; Wichmann, Ole (2021): Efficacy and effectiveness of COVID-19 vaccines against SARS-CoV-2 infection: interim results of a living systematic review, 1 January to 14 May 2021. In: *Eurosurveillance* 26 (28). DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.28.2100563.
- Harrison, Andrew G.; Lin, Tao; Wang, Penghua (2020): Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. In: *Trends in immunology* 41 (12), S. 1100–1115. DOI: 10.1016/j.it.2020.10.004.
- Heinz, Franz X.; Stiasny, Karin (2021): Distinguishing features of current COVID-19 vaccines: knowns and unknowns of antigen presentation and modes of action. In: *NPJ vaccines* 6 (1), S. 104. DOI: 10.1038/s41541-021-00369-6.
- Hodcroft, Emma (2022): CoVariants: Shared Mutations. Unter Mitarbeit von Ivan Aksamentov, Richard Neher, Trevor Bedford, James Hadfield, Moria Zuber, James Scott-

Brown et al. Hg. v. Emma Hodcroft. Institute of Social and Preventive Medicine University of Bern, Switzerland & SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Switzerland. Online verfügbar unter <https://covariants.org/shared-mutations>, zuletzt aktualisiert am 05.09.2022, zuletzt geprüft am 06.09.2022.

Hodcroft, Emma; Aksamentov, Ivan; Neher, Richard; Bedford, Trevor; Hadfield, James; Zuber, Moria; Scott-Brown, James; Sanderson, Theo (2024a): CoVariants: Shared Mutations. Hg. v. Emma Hodcroft. Online verfügbar unter <https://covariants.org/shared-mutations>, zuletzt aktualisiert am 20.02.2024, zuletzt geprüft am 27.02.2024.

Hodcroft, Emma; Aksamentov, Ivan; Neher, Richard; Bedford, Trevor; Hedfield, James (2024b): CoVariants. Übersicht der Varianten in den Ländern. Hg. v. Emma Hodcroft. Online verfügbar unter <https://covariants.org/per-country?country=Germany&variant=21K+%28Omicron%29&variant=21L+%28Omicron%29&variant=22A+%28Omicron%29&variant=22B+%28Omicron%29&variant=22C+%28Omicron%29&variant=22D+%28Omicron%29&variant=22E+%28Omicron%29&variant=22F+%28Omicron%29&variant=23A+%28Omicron%29&variant=23B+%28Omicron%29&variant=23C+%28Omicron%29&variant=23D+%28Omicron%29&variant=23E+%28Omicron%29&variant=23F+%28Omicron%29&variant=23G+%28Omicron%29&variant=23H+%28Omicron%29&variant=23I+%28Omicron%29>, zuletzt aktualisiert am 12.01.2024, zuletzt geprüft am 20.01.2024.

Holmes, Edward C.; Goldstein, Stephen A.; Rasmussen, Angela L.; Robertson, David L.; Crits-Christoph, Alexander; Wertheim, Joel O.; Anthony, Simon J.; Barclay, Wendy S. et al. (2021): The origins of SARS-CoV-2: A critical review. In: *Cell* 184 (19), S. 4848–4856. DOI: 10.1016/j.cell.2021.08.017.

Hong, Pei-Ying; Rachmadi, Andri Taruna; Mantilla-Calderon, David; Alkahtani, Mohsen; Bashawri, Yasir M.; Al Qarni, Hamed; O'Reilly, Kathleen M.; Zhou, Jianqiang (2021): Estimating the minimum number of SARS-CoV-2 infected cases needed to detect viral RNA in wastewater: To what extent of the outbreak can surveillance of wastewater tell us? In: *Environmental Research* 195, S. 110748. DOI: 10.1016/j.envres.2021.110748.

Jin, Yuefei; Ji, Wangquan; Yang, Haiyan; Chen, Shuaiyin; Zhang, Weiguo; Duan, Guangcai (2020): Endothelial activation and dysfunction in COVID-19: from basic mechanisms to potential therapeutic approaches. In: *Signal transduction and targeted therapy* 5 (1), S. 293. DOI: 10.1038/s41392-020-00454-7.

Kagami, Keisuke; Kitajima, Masaaki; Takahashi, Hisashi; Teshima, Takanori; Ishiguro, Nobuhisa (2023): Association of wastewater SARS-CoV-2 load with confirmed COVID-19 cases at a university hospital in Sapporo, Japan during the period from February 2021 to February 2023. In: *The Science of the Total Environment* 899, S. 165457. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.165457.

Kallem, Parashuram; Hegab, Hanaa; Alsafar, Habiba; Hasan, Shadi W.; Banat, Fawzi (2023): SARS-CoV-2 detection and inactivation in water and wastewater: review on analytical methods, limitations and future research recommendations. In: *Emerging microbes & infections* 12 (2), S. 2222850. DOI: 10.1080/22221751.2023.2222850.

Kampf, G.; Todt, D.; Pfaender, S.; Steinmann, E. (2020): Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. In: *The Journal of hospital infection* 104 (3), S. 246–251. DOI: 10.1016/j.jhin.2020.01.022.

Khare, Shruti; Gurry, Céline; Freitas, Lucas; Schultz, Mark B.; Bach, Gunter; Diallo, Amadou; Akite, Nancy; Ho, Joses et al. (2021): GISAID's Role in Pandemic Response. In: *China CDC weekly* 3 (49), S. 1049–1051. DOI: 10.46234/ccdcw2021.255.

- Kleppe, K.; Ohtsuka, E.; Kleppe, R.; Molineux, I.; Khorana, H. G. (1971): Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. In: *Journal of molecular biology* 56 (2), S. 341–361. DOI: 10.1016/0022-2836(71)90469-4.
- Kluge, Stefan; Janssens, Uwe; Welte, Tobias; Weber-Carstens, Steffen; Schälte, Ge-reon; Spinner, Christoph D.; Malin, Jakob J.; Gastmeier, Petra (2023): S3-Leitlinie - Empfehlungen zur Therapie von Patienten mit COVID-19. Hg. v. AWMF-Leitlinienregis-ter. Online verfügbar unter <https://register.awmf.org/de/leitlinien/detail/113-001LG>, zu-letzt aktualisiert am 31.07.2023, zuletzt geprüft am 11.08.2023.
- Koczulla, A. R.; Ankermann, T.; Behrends, U.; Berlit, P.; Brinkmann, F.; Frank, U. (2023): AWMF Leitlinienregister. Online verfügbar unter <https://regis-ter.awmf.org/de/leitlinien/detail/020-027>, zuletzt aktualisiert am 28.09.2023, zuletzt ge-prüft am 29.12.2023.
- Konings, Frank; Perkins, Mark D.; Kuhn, Jens H.; Pallen, Mark J.; Alm, Erik J.; Archer, Brett N.; Barakat, Amal; Bedford, Trevor et al. (2021): SARS-CoV-2 Variants of Interest and Concern naming scheme conducive for global discourse. In: *Nature microbiology* 6 (7), S. 821–823. DOI: 10.1038/s41564-021-00932-w.
- Konturek, Peter C. (2020): Wie das Coronavirus den Magen-Darm-Trakt angreift : Se-minar / Gastromodul. In: *MMW Fortschritte der Medizin* 162 (8), S. 59–60. DOI: 10.1007/s15006-020-0431-x.
- Korber, Bette; Fischer, Will M.; Gnanakaran, Sandrasegaram; Yoon, Hyejin; Theiler, James; Abfalterer, Werner; Hengartner, Nick; Giorgi, Elena E. et al. (2020): Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. In: *Cell* 182 (4), 812-827.e19. DOI: 10.1016/j.cell.2020.06.043.
- Košir, Alexandra Bogožalec; Divieto, Carla; Pavšič, Jernej; Pavarelli, Stefano; Dobnik, David; Dreo, Tanja; Bellotti, Roberto; Sassi, Maria Paola et al. (2017): Droplet volume variability as a critical factor for accuracy of absolute quantification using droplet digital PCR. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 409 (28), S. 6689–6697. DOI: 10.1007/s00216-017-0625-y.
- Laue, Michael; Kauter, Anne; Hoffmann, Tobias; Möller, Lars; Michel, Janine; Nitsche, Andreas (2021): Morphometry of SARS-CoV and SARS-CoV-2 particles in ultrathin plastic sections of infected Vero cell cultures. In: *Scientific Reports* 11 (1), S. 3515. DOI: 10.1038/s41598-021-82852-7.
- Li, Fang (2016): Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. In: *Annual review of virology* 3 (1), S. 237–261. DOI: 10.1146/annurev-virology-110615-042301.
- Li, Xi; Qiu, Donghua; Chen, Sheng; Li, Jinmei; Luo, Chao; Hu, Dong; Li, Jingjing; Zhu, Jianwen et al. (2019): Evaluation of RNA degradation in pure culture and field Micro-cystis samples preserved with various treatments. In: *Journal of microbiological meth-ods* 164, S. 105684. DOI: 10.1016/j.mimet.2019.105684.
- Li, Xuan; Zhang, Shuxin; Sherchan, Samendrdra; Orive, Gorka; Lertxundi, Unax; Haramoto, Eiji; Honda, Ryo; Kumar, Manish et al. (2023): Correlation between SARS-CoV-2 RNA concentration in wastewater and COVID-19 cases in community: A sys-tematic review and meta-analysis. In: *Journal of Hazardous Materials* 441, S. 129848. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2022.129848.
- Ling, Yun; Xu, Shui-Bao; Lin, Yi-Xiao; Di Tian; Zhu, Zhao-Qin; Dai, Fa-Hui; Wu, Fan; Song, Zhi-Gang et al. (2020): Persistence and clearance of viral RNA in 2019 novel coronavirus disease rehabilitation patients. In: *Chinese medical journal* 133 (9), S. 1039–1043. DOI: 10.1097/CM9.0000000000000774.

- Mallapaty, Smriti (2020): Animal source of the coronavirus continues to elude scientists. In: *Nature*. DOI: 10.1038/d41586-020-01449-8.
- Marshall, J. C.; Murthy, S. (2020): A minimal common outcome measure set for COVID-19 clinical research. In: *The Lancet. Infectious diseases* 20 (8), e192-e197. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30483-7.
- Matschke, Jakob; Lütgehetmann, Marc; Hagel, Christian; Sperhake, Jan P.; Schröder, Ann Sophie; Edler, Carolin; Mushumba, Herbert; Fitzek, Antonia et al. (2020): Neuro-pathology of patients with COVID-19 in Germany: a post-mortem case series. In: *The Lancet. Neurology* 19 (11), S. 919–929. DOI: 10.1016/S1474-4422(20)30308-2.
- Meinhardt, Jenny; Radke, Josefine; Dittmayer, Carsten; Franz, Jonas; Thomas, Carolina; Mothes, Ronja; Laue, Michael; Schneider, Julia et al. (2021): Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. In: *Nature neuroscience* 24 (2), S. 168–175. DOI: 10.1038/s41593-020-00758-5.
- Muenchhoff, Maximilian; Mairhofer, Helga; Nitschko, Hans; Grzimek-Koschewa, Natascha; Hoffmann, Dieter; Berger, Annemarie; Rabenau, Holger; Widera, Marek et al. (2020): Multicentre comparison of quantitative PCR-based assays to detect SARS-CoV-2, Germany, March 2020. In: *Eurosurveillance* 25 (24). DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.24.2001057.
- Nyaruaba, Raphael; Mwaliko, Caroline; Dobnik, David; Neužil, Pavel; Amoth, Patrick; Mwau, Matilu; Yu, Junping; Yang, Hang et al. (2022): Digital PCR Applications in the SARS-CoV-2/COVID-19 Era: a Roadmap for Future Outbreaks. In: *Clinical Microbiology Reviews* 35 (3), e0016821. DOI: 10.1128/cmr.00168-21.
- Oestreich, Markus (2014): Keine Panik vor Statistik! Erfolg und Spaß im Horrorfach nichttechnischer Studiengänge. 5., aktualisierte Aufl. 2014. Wiesbaden: Springer Spektrum (Springer eBook Collection).
- Ort, Christoph; Lawrence, Michael G.; Reungoat, Julien; Mueller, Jochen F. (2010a): Sampling for PPCPs in wastewater systems: comparison of different sampling modes and optimization strategies. In: *Environmental Science & Technology* 44 (16), S. 6289–6296. DOI: 10.1021/es100778d.
- Ort, Christoph; Lawrence, Michael G.; Rieckermann, Jörg; Joss, Adriano (2010b): Sampling for pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and illicit drugs in wastewater systems: are your conclusions valid? A critical review. In: *Environmental Science & Technology* 44 (16), S. 6024–6035. DOI: 10.1021/es100779n.
- Pan, Yang; Zhang, Daitao; Yang, Peng; Poon, Leo L. M.; Wang, Quanyi (2020): Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. In: *The Lancet. Infectious diseases* 20 (4), S. 411–412. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30113-4.
- Park, Soo-Kyung; Lee, Chil-Woo; Park, Dong-Il; Woo, Hee-Yeon; Cheong, Hae Suk; Shin, Ho Cheol; Ahn, Kwangsung; Kwon, Min-Jung et al. (2021): Detection of SARS-CoV-2 in Fecal Samples From Patients With Asymptomatic and Mild COVID-19 in Korea. In: *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 19 (7), 1387-1394.e2. DOI: 10.1016/j.cgh.2020.06.005.
- Peng, Jiayi; Sun, Jianxian; Yang, Minqing Ivy; Gibson, Richard M.; Arts, Eric J.; Olabode, Abayomi S.; Poon, Art F. Y.; Wang, Xian Yao et al. (2022): Early Warning Measurement of SARS-CoV-2 Variants of Concern in Wastewaters by Mass Spectrometry. In: *Environ. Sci. Technol. Lett.* 9 (7), S. 638–644. DOI: 10.1021/acs.estlett.2c00280.

Perchetti, Garrett A.; Zhu, Haiying; Mills, Margaret G.; Shrestha, Lasata; Wagner, Cassia; Bakhash, Shah Mohamed; Lin, Michelle J.; Xie, Hong et al. (2021): Specific allelic discrimination of N501Y and other SARS-CoV-2 mutations by ddPCR detects B.1.1.7 lineage in Washington State. In: *Journal of medical virology* 93 (10), S. 5931–5941. DOI: 10.1002/jmv.27155.

Petrillo, Mauro; Querci, Maddalena; Corbisier, Philippe; Marchini, Antonio; Buttinger, Gerhard; van den Eede, Guy (2021): In Silico Design of Specific Primer Sets for the Detection of B.1.1.529 SARS-CoV-2 Variant of Concern (Omicron).

Puhach, Olha; Meyer, Benjamin; Eckerle, Isabella (2023): SARS-CoV-2 viral load and shedding kinetics. In: *Nature Reviews. Microbiology* 21 (3), S. 147–161. DOI: 10.1038/s41579-022-00822-w.

QIAGEN GmbH (2021a): QIAcuity® EG PCR Kit. Online verfügbar unter <https://www.qiagen.com/de-de/products/instruments-and-automation/accessories/qiacuity-eg-pcr-kit>, zuletzt geprüft am 31.03.2024.

QIAGEN GmbH (2021b): QIAcuity® User Manual Extension, 1-84. Online verfügbar unter <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=5d19083d-fa10-4ed2-88a0-2953d9947e0c&lang=en>, zuletzt geprüft am 30.12.2023.

QIAGEN GmbH (2024): Recoures. Hg. v. QIAGEN GmbH. Online verfügbar unter <https://www.qiagen.com/de-us/knowledge-and-support/knowledge-hub/search/resources?categories=RESOURCES&page=0&query=QIAcuity%C2%AEOne-Step%20Viral%20RT-PCR%20Kit>, zuletzt aktualisiert am 02.03.2024, zuletzt geprüft am 02.03.2024.

Rambaut, Andrew; Holmes, Edward C.; O'Toole, Áine; Hill, Verity; McCrone, John T.; Ruis, Christopher; Du Plessis, Louis; Pybus, Oliver G. (2020): A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. In: *Nature microbiology* 5 (11), S. 1403–1407. DOI: 10.1038/s41564-020-0770-5.

Rio, Donald C.; Ares, Manuel; Hannon, Gregory J.; Nilsen, Timothy W. (2010): Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). In: *Cold Spring Harbor protocols* 2010 (6), pdb.prot5439. DOI: 10.1101/pdb.prot5439.

RKI Open Data (2023): SARS-CoV-2-PCR-Testungen\_in\_Deutschland/SARS-CoV-2-PCR-Testungen\_in\_Deutschland.csv at main · robert-koch-institut/SARS-CoV-2-PCR-Testungen\_in\_Deutschland · GitHub. Unter Mitarbeit von Hannes Wuensche. Robert Koch Institut. Online verfügbar unter [https://github.com/robert-koch-institut/SARS-CoV-2-PCR-Testungen\\_in\\_Deutschland/blob/main/SARS-CoV-2-PCR-Testungen\\_in\\_Deutschland.csv](https://github.com/robert-koch-institut/SARS-CoV-2-PCR-Testungen_in_Deutschland/blob/main/SARS-CoV-2-PCR-Testungen_in_Deutschland.csv), zuletzt aktualisiert am 05.01.2024, zuletzt geprüft am 05.01.2024.

Robert Koch-Institut, DIVI e.V. (2023): DIVI Intensivregister. Robert Koch-Institut, DIVI e.V. Online verfügbar unter <https://www.intensivregister.de/#/aktuelle-lage/zeitreihen>, zuletzt aktualisiert am 14.06.2023, zuletzt geprüft am 19.06.2023.

Rubio-Acero, Raquel; Beyerl, Jessica; Muenchhoff, Maximilian; Roth, Marc Sancho; Castelletti, Noemi; Paunovic, Ivana; Radon, Katja; Springer, Bernd et al. (2021): Spatially resolved qualified sewage spot sampling to track SARS-CoV-2 dynamics in Munich - One year of experience. In: *The Science of the Total Environment* 797, S. 149031. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.149031.

Sapula, Sylvia A.; Whittall, Jonathan J.; Pandopulos, Aaron J.; Gerber, Cobus; Venter, Henrietta (2021): An optimized and robust PEG precipitation method for detection of SARS-CoV-2 in wastewater. In: *The Science of the Total Environment* 785, S. 147270. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.147270.

- Schroeder, Simon; Mache, Christin; Kleine-Weber, Hannah; Corman, Victor M.; Muth, Doreen; Richter, Anja; Fatykhova, Diana; Memish, Ziad A. et al. (2021): Functional comparison of MERS-coronavirus lineages reveals increased replicative fitness of the recombinant lineage 5. In: *Nature Communications* 12 (1), S. 5324. DOI: 10.1038/s41467-021-25519-1.
- Schulte-Schrepping, Jonas; Reusch, Nico; Paclik, Daniela; Baßler, Kevin; Schlickeiser, Stephan; Zhang, Bowen; Krämer, Benjamin; Krammer, Tobias et al. (2020): Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment. In: *Cell* 182 (6), 1419-1440.e23. DOI: 10.1016/j.cell.2020.08.001.
- Sharma, Anshika; Ahmad Farouk, Isra; Lal, Sunil Kumar (2021): COVID-19: A Review on the Novel Coronavirus Disease Evolution, Transmission, Detection, Control and Prevention. In: *Viruses* 13 (2). DOI: 10.3390/v13020202.
- Sharun, Khan; Dhama, Kuldeep; Pawde, Abhijit M.; Gortázar, Christian; Tiwari, Ruchi; Bonilla-Aldana, D. Katterine; Rodriguez-Morales, Alfonso J.; La Fuente, José de et al. (2021): SARS-CoV-2 in animals: potential for unknown reservoir hosts and public health implications. In: *The veterinary quarterly* 41 (1), S. 181–201. DOI: 10.1080/01652176.2021.1921311.
- Shieh, Y. S.; Wait, D.; Tai, L.; Sobsey, M. D. (1995): Methods to remove inhibitors in sewage and other fecal wastes for enterovirus detection by the polymerase chain reaction. In: *Journal of Virological Methods* 54 (1), S. 51–66. DOI: 10.1016/0166-0934(95)00025-p.
- Ständige Impfkommision (2022): Beschluss der STIKO zur 21. Aktualisierung der COVID-19-Impfempfehlung. DOI: 10.25646/10412.
- Sun, Yong; Ding, Chengchao; Chen, Qingqing; Xie, Jiajia; Yu, Junling; Shi, Yonglin; Jiang, Chengcheng; Zhang, Zhuhui et al. (2021): Digital PCR assay for the effective detection of COVID-19 patients with SARS-CoV-2 low viral load. In: *Journal of Virological Methods* 295, S. 114185. DOI: 10.1016/j.jviromet.2021.114185.
- Sungnak, Waradon; Huang, Ni; Bécavin, Christophe; Berg, Marijn; Queen, Rachel; Litvinukova, Monika; Talavera-López, Carlos; Maatz, Henrike et al. (2020): SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. In: *Nature medicine* 26 (5), S. 681–687. DOI: 10.1038/s41591-020-0868-6.
- Swenson, Kai Erik; Swenson, Erik Richard (2021): Pathophysiology of Acute Respiratory Distress Syndrome and COVID-19 Lung Injury. In: *Critical Care Clinics* 37 (4), S. 749–776. DOI: 10.1016/j.ccc.2021.05.003.
- Thakur, Vikram; Ratho, Radha Kanta (2022):OMICRON (B.1.1.529): A new SARS-CoV-2 variant of concern mounting worldwide fear. In: *Journal of medical virology* 94 (5), S. 1821–1824. DOI: 10.1002/jmv.27541.
- Thermo Fisher Scientific (2014): Thermo Scientific TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit. Online verfügbar unter [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0012652\\_TranscriptAid\\_T7\\_High\\_Yield\\_Transcription\\_UG.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0012652_TranscriptAid_T7_High_Yield_Transcription_UG.pdf), zuletzt geprüft am 03.03.2024.
- Thermo Fisher Scientific (2022a): Qubit™ RNA High Sensitivity (HS), Broad Range (BR), and Extended Range (XR) Assay Kits. Online verfügbar unter <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/de/en/Q32852>, zuletzt aktualisiert am 06.03.2024, zuletzt geprüft am 06.03.2024.

Thermo Fisher Scientific (2022b): Qubit™ ssDNA Assay Kit. Online verfügbar unter <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/de/en/Q10212>, zuletzt aktualisiert am 06.03.2024, zuletzt geprüft am 06.03.2024.

Thermo Fisher Scientific Baltics UAB (2018): High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. USER GUIDE. Online verfügbar unter [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FSLG%2Fmanuals%2FMAN0017977\\_highcap\\_cDNA\\_RT\\_UG.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FSLG%2Fmanuals%2FMAN0017977_highcap_cDNA_RT_UG.pdf), zuletzt geprüft am 04.01.2024.

Thiemann, Frank; Cullen, Paul M.; Klein, Hanns-Georg (Hg.) (2015): Molekulare Diagnostik. Grundlagen der Molekularbiologie, Genetik und Analytik. 2. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH. Online verfügbar unter <http://gbv.ebib.com/patron/FullRecord.aspx?p=1847934>.

Torii, Shotaro; Furumai, Hiroaki; Katayama, Hiroyuki (2021): Applicability of polyethylene glycol precipitation followed by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction for the detection of SARS-CoV-2 RNA from municipal wastewater. In: *The Science of the Total Environment* 756, S. 143067. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.143067.

Trémeaux, Pauline; Latour, Justine; Ranger, Noémie; Ferrer, Vénicia; Harter, Agnès; Carcenac, Romain; Boyer, Pauline; Demmou, Sofia et al. (2023): SARS-CoV-2 Co-Infections and Recombinations Identified by Long-Read Single-Molecule Real-Time Sequencing. In: *Microbiology spectrum*, e0049323. DOI: 10.1128/spectrum.00493-23.

Trujillo, Monica; Cheung, Kristen; Gao, Anna; Hoxie, Irene; Kannoly, Sherin; Kubota, Nanami; San, Kaung Myat; Smyth, Davida S. et al. (2021): Protocol for safe, affordable, and reproducible isolation and quantitation of SARS-CoV-2 RNA from wastewater. In: *PLoS one* 16 (9), e0257454. DOI: 10.1371/journal.pone.0257454.

van Doremalen, Neeltje; Bushmaker, Trenton; Morris, Dylan H.; Holbrook, Myndi G.; Gamble, Amandine; Williamson, Brandi N.; Tamin, Azaibi; Harcourt, Jennifer L. et al. (2020): Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. In: *New England Journal of Medicine* 382 (16), S. 1564–1567. DOI: 10.1056/NEJMc2004973.

Varga, Zsuzsanna; Flammer, Andreas J.; Steiger, Peter; Haberecker, Martina; Andermatt, Rea; Zinkernagel, Annelies S.; Mehra, Mandeep R.; Schuepbach, Reto A. et al. (2020): Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. In: *Lancet (London, England)* 395 (10234), S. 1417–1418. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30937-5.

V'kovski, Philip; Kratzel, Annika; Steiner, Silvio; Stalder, Hanspeter; Thiel, Volker (2021): Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. In: *Nature Reviews. Microbiology* 19 (3), S. 155–170. DOI: 10.1038/s41579-020-00468-6.

Watanabe, Shumpei; Masangkay, Joseph S.; Nagata, Noriyo; Morikawa, Shigeru; Mizutani, Tetsuya; Fukushi, Shuetsu; Alviola, Phillip; Omatsu, Tsutomu et al. (2010): Bat coronaviruses and experimental infection of bats, the Philippines. In: *Emerging Infectious Diseases* 16 (8), S. 1217–1223. DOI: 10.3201/eid1608.100208.

Watson, Oliver J.; Barnsley, Gregory; Toor, Jaspreet; Hogan, Alexandra B.; Winskill, Peter; Ghani, Azra C. (2022): Global impact of the first year of COVID-19 vaccination: a mathematical modelling study. In: *The Lancet. Infectious diseases* 22 (9), S. 1293–1302. DOI: 10.1016/S1473-3099(22)00320-6.

Weier, H. U.; Gray, J. W. (1988): A programmable system to perform the polymerase chain reaction. In: *DNA (Mary Ann Liebert, Inc.)* 7 (6), S. 441–447. DOI: 10.1089/dna.1.1988.7.441.

Wells, Heather L.; Bonavita, Cassandra M.; Navarrete-Macias, Isamara; Vilchez, Blake; Rasmussen, Angela L.; Anthony, Simon J. (2023): The coronavirus recombination pathway. In: *Cell host & microbe* 31 (6), S. 874–889. DOI: 10.1016/j.chom.2023.05.003.

Weltgesundheitsorganisation (2023a): Coronavirus disease (COVID-19) pandemic. Hg. v. Weltgesundheitsorganisation. Online verfügbar unter <https://www.who.int/europe/emergencies/situations/covid-19>, zuletzt aktualisiert am 07.08.2023, zuletzt geprüft am 07.08.2023.

Weltgesundheitsorganisation (2023b): Germany: WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data. Online verfügbar unter <https://covid19.who.int/region/euro/country/de>, zuletzt aktualisiert am 08.08.2023, zuletzt geprüft am 08.08.2023.

Weltgesundheitsorganisation (2023c): Updated working definitions and primary actions for SARSCoV2 variants. Hg. v. Weltgesundheitsorganisation. Online verfügbar unter <https://www.who.int/publications/m/item/updated-working-definitions-and-primary-actions-for--sars-cov-2-variants>, zuletzt aktualisiert am 09.08.2023, zuletzt geprüft am 09.08.2023.

Weltgesundheitsorganisation (2023d): WHO announces simple, easy-to-say labels for SARS-CoV-2 Variants of Interest and Concern. Online verfügbar unter <https://www.who.int/news/item/31-05-2021-who-announces-simple-easy-to-say-labels-for-sars-cov-2-variants-of-interest-and-concern>, zuletzt aktualisiert am 21.12.2023, zuletzt geprüft am 22.12.2023.

Wilhelm, Alexander; Schoth, Jens; Meinert-Berning, Christina; Agrawal, Shelesh; Bastian, Daniel; Orschler, Laura; Ciesek, Sandra; Teichgräber, Burkhard et al. (2022): Wastewater surveillance allows early detection of SARS-CoV-2 omicron in North Rhine-Westphalia, Germany. In: *The Science of the Total Environment* 846, S. 157375. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.157375.

Wurtzer, S.; Marechal, V.; Mouchel, J. M.; Maday, Y.; Teyssou, R.; Richard, E.; Almayrac, J. L.; Moulin, L. (2020): Evaluation of lockdown effect on SARS-CoV-2 dynamics through viral genome quantification in waste water, Greater Paris, France, 5 March to 23 April 2020. In: *Eurosurveillance* 25 (50). DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.50.2000776.

Wurtzer, Sebastien; Levert, Morgane; Dhenain, Eloïse; Accrombessi, Heberte; Manco, Sandra; Fagour, Nathalie; Goulet, Marion; Boudaud, Nicolas et al. (2022): From Alpha to Omicron BA.2: New digital RT-PCR approach and challenges for SARS-CoV-2 VOC monitoring and normalization of variant dynamics in wastewater. In: *The Science of the Total Environment* 848, S. 157740. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.157740.

Xiao, Fei; Sun, Jing; Xu, Yonghao; Li, Fang; Huang, Xiaofang; Li, Heying; Zhao, Jingxian; Huang, Jicheng et al. (2020): Infectious SARS-CoV-2 in Feces of Patient with Severe COVID-19. In: *Emerging Infectious Diseases* 26 (8), S. 1920–1922. DOI: 10.3201/eid2608.200681.

Yurkovetskiy, Leonid; Wang, Xue; Pascal, Kristen E.; Tomkins-Tinch, Christopher; Nyalile, Thomas P.; Wang, Yetao; Baum, Alina; Diehl, William E. et al. (2020): Structural and Functional Analysis of the D614G SARS-CoV-2 Spike Protein Variant. In: *Cell* 183 (3), 739-751.e8. DOI: 10.1016/j.cell.2020.09.032.

Zanza, Christian; Romenskaya, Tatsiana; Manetti, Alice Chiara; Franceschi, Francesco; La Russa, Raffaele; Bertozzi, Giuseppe; Maiese, Aniello; Savioli, Gabriele et al. (2022): Cytokine Storm in COVID-19: Immunopathogenesis and Therapy. In: *Medicina (Kaunas, Lithuania)* 58 (2). DOI: 10.3390/medicina58020144.

Zhang, Ze; Zhang, Lichao; Wang, Yanqiao (2020): COVID-19 indirect contact transmission through the oral mucosa must not be ignored. In: *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 49 (5), S. 450–451. DOI: 10.1111/jop.13019.

Zheng, Xiawan; Deng, Yu; Xu, Xiaoqing; Li, Shuxian; Zhang, Yulin; Ding, Jiahui; On, Hei Yin; Lai, Jimmy C. C. et al. (2022): Comparison of virus concentration methods and RNA extraction methods for SARS-CoV-2 wastewater surveillance. In: *The Science of the Total Environment* 824, S. 153687. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.153687.

Zhou, Jun-Bo; Kong, Wen-Hua; Wang, Sheng; Long, Yi-Bing; Dong, Lian-Hua; He, Zhen-Yu; Liu, Man-Qing (2021): Detection of SARS-CoV-2 RNA in Medical Wastewater in Wuhan During the COVID-19 Outbreak. In: *Virologica Sinica* 36 (5), S. 1077–1079. DOI: 10.1007/s12250-021-00373-z.

Ziegler, Carly G. K.; Allon, Samuel J.; Nyquist, Sarah K.; Mbanjo, Ian M.; Miao, Vincent N.; Tzouanas, Constantine N.; Cao, Yuming; Yousif, Ashraf S. et al. (2020): SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues. In: *Cell* 181 (5), 1016-1035.e19. DOI: 10.1016/j.cell.2020.04.035.

## 11 Anhang



49 Spadina Ave. Suite 200  
Toronto ON M5V 2J1 Canada  
www.biorender.com

## Confirmation of Publication and Licensing Rights

March 29th, 2024  
Science Suite Inc.

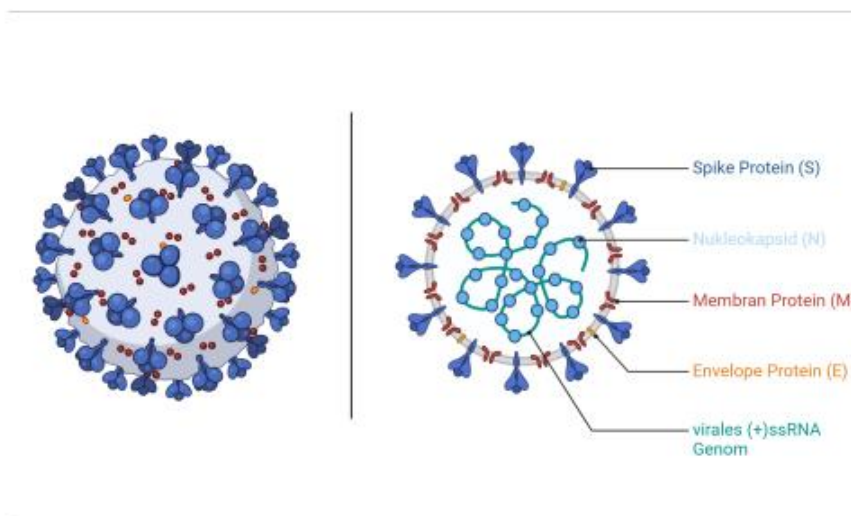
**Subscription:** Student Plan  
**Agreement number:** WA26MVJS0T  
**Journal name:** N/A

To whom this may concern,

This document is to confirm that Peter Basten has been granted a license to use the BioRender content, including icons, templates and other original artwork, appearing in the attached completed graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender content to be sublicensed for use in journal publications.

All rights and ownership of BioRender content are reserved by BioRender. All completed graphics must be accompanied by the following citation: "Created with BioRender.com".

BioRender content included in the completed graphic is not licensed for any commercial uses beyond publication in a journal. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



For any questions regarding this document, or other questions about publishing with BioRender refer to our [BioRender Publication Guide](#), or contact BioRender Support at [support@biorender.com](mailto:support@biorender.com).



49 Spadina Ave. Suite 200  
Toronto ON M5V 2J1 Canada  
www.biorender.com

## Confirmation of Publication and Licensing Rights

March 29th, 2024  
Science Suite Inc.

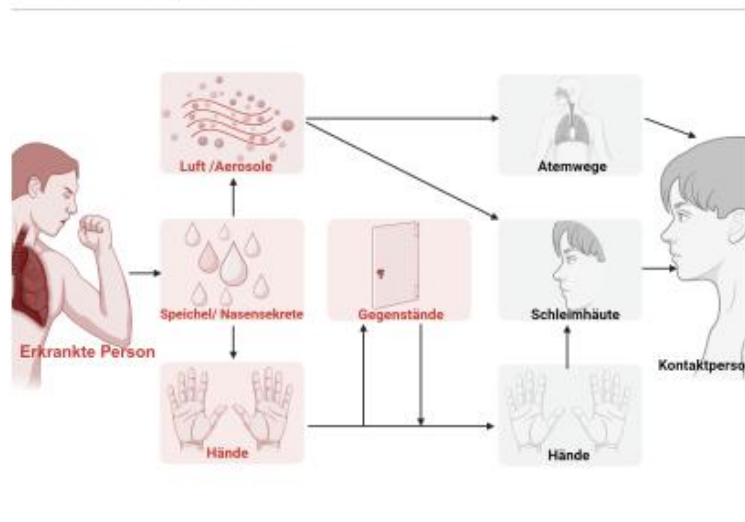
**Subscription:** Student Plan  
**Agreement number:** TV26MVL5UN  
**Journal name:** N/A

To whom this may concern,

This document is to confirm that Peter Basten has been granted a license to use the BioRender content, including icons, templates and other original artwork, appearing in the attached completed graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender content to be sublicensed for use in journal publications.

All rights and ownership of BioRender content are reserved by BioRender. All completed graphics must be accompanied by the following citation: "Created with BioRender.com".

BioRender content included in the completed graphic is not licensed for any commercial uses beyond publication in a journal. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



For any questions regarding this document, or other questions about publishing with BioRender refer to our [BioRender Publication Guide](#), or contact BioRender Support at [support@biorender.com](mailto:support@biorender.com).



49 Spadina Ave. Suite 200  
Toronto ON M5V 2J1 Canada  
www.biorender.com

## Confirmation of Publication and Licensing Rights

March 29th, 2024  
Science Suite Inc.

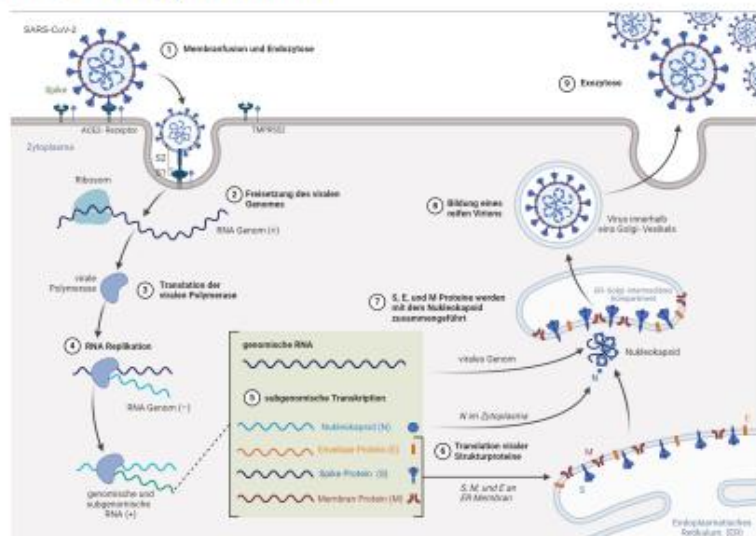
**Subscription:** Student Plan  
**Agreement number:** GU26MVUQ84  
**Journal name:** N/A

To whom this may concern,

This document is to confirm that Peter Basten has been granted a license to use the BioRender content, including icons, templates and other original artwork, appearing in the attached completed graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender content to be sublicensed for use in journal publications.

All rights and ownership of BioRender content are reserved by BioRender. All completed graphics must be accompanied by the following citation: "Created with BioRender.com".

BioRender content included in the completed graphic is not licensed for any commercial uses beyond publication in a journal. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



For any questions regarding this document, or other questions about publishing with BioRender refer to our [BioRender Publication Guide](#), or contact BioRender Support at [support@biorender.com](mailto:support@biorender.com).



49 Spadina Ave. Suite 200  
Toronto ON M5V 2J1 Canada  
www.biorender.com

## Confirmation of Publication and Licensing Rights

March 29th, 2024  
Science Suite Inc.

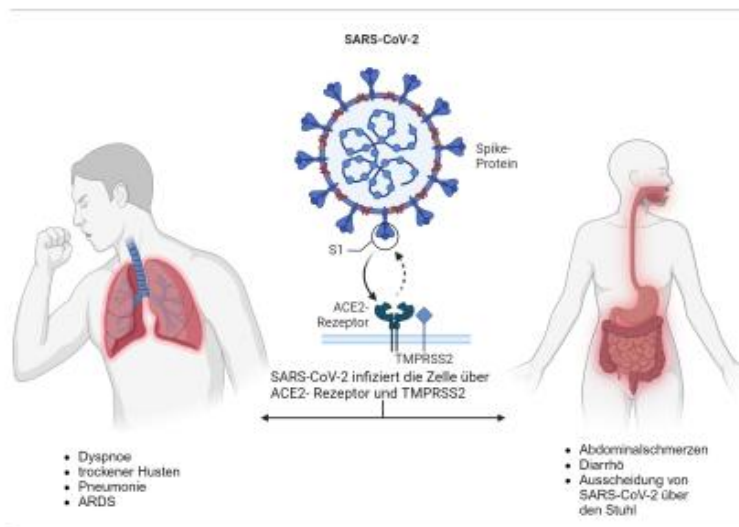
**Subscription:** Student Plan  
**Agreement number:** JD26MVXQC6  
**Journal name:** N/A

To whom this may concern,

This document is to confirm that Peter Basten has been granted a license to use the BioRender content, including icons, templates and other original artwork, appearing in the attached completed graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender content to be sublicensed for use in journal publications.

All rights and ownership of BioRender content are reserved by BioRender. All completed graphics must be accompanied by the following citation: "Created with BioRender.com".

BioRender content included in the completed graphic is not licensed for any commercial uses beyond publication in a journal. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



For any questions regarding this document, or other questions about publishing with BioRender refer to our [BioRender Publication Guide](#), or contact BioRender Support at [support@biorender.com](mailto:support@biorender.com).



49 Spadina Ave. Suite 200  
Toronto ON M5V 2J1 Canada  
www.biorender.com

## Confirmation of Publication and Licensing Rights

January 29th, 2025

**Subscription Type:** Student Plan - Academic  
**Agreement number:** VR27UL0517  
**Publisher Name:** N/A

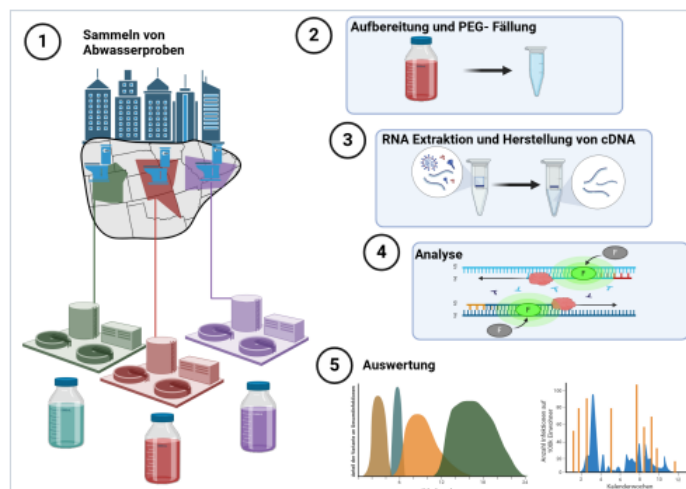
**Citation to Use:** Created in BioRender. Basten, P. (2025) <https://BioRender.com/a47p778>

To whom this may concern,

This document is to confirm that Peter Basten has been granted a license to use the BioRender Content, including icons, templates, and other original artwork, appearing in the attached Completed Graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender Content to be sublicensed for use in publications (journals, textbooks, websites, etc.).

All rights and ownership of BioRender Content are reserved by BioRender. All Completed Graphics must be accompanied by the following citation: "Created in BioRender. Basten, P. (2025) <https://BioRender.com/a47p778>".

BioRender Content included in the Completed Graphic is not licensed for any commercial uses beyond use in a publication. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



For any questions regarding this document, or other questions about publishing with BioRender, please refer to our [BioRender Publication Guide](#), or contact BioRender Support at [support@biorender.com](mailto:support@biorender.com).



49 Spadina Ave. Suite 200  
Toronto ON M5V 2J1 Canada  
www.biorender.com

## Confirmation of Publication and Licensing Rights

January 29th, 2025

**Subscription Type:** Student Plan - Academic  
**Agreement number:** SH27UKUNJW  
**Publisher Name:** N/A

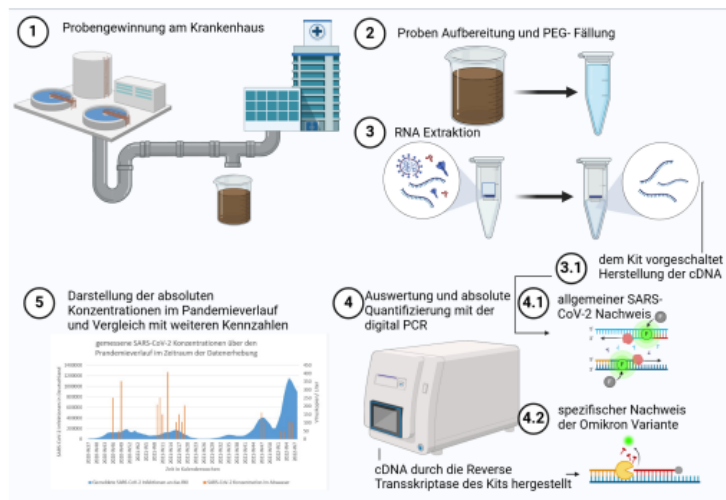
**Citation to Use:** Created in BioRender. Basten, P. (2025) <https://BioRender.com/m25n951>

To whom this may concern,

This document is to confirm that [Peter Basten](#) has been granted a license to use the BioRender Content, including icons, templates, and other original artwork, appearing in the attached Completed Graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender Content to be sublicensed for use in publications (journals, textbooks, websites, etc.).

All rights and ownership of BioRender Content are reserved by BioRender. All Completed Graphics must be accompanied by the following citation: "Created in BioRender. Basten, P. (2025) <https://BioRender.com/m25n951>".

BioRender Content included in the Completed Graphic is not licensed for any commercial uses beyond use in a publication. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



For any questions regarding this document, or other questions about publishing with BioRender, please refer to our [BioRender Publication Guide](#), or contact BioRender Support at [support@biorender.com](mailto:support@biorender.com).



49 Spadina Ave. Suite 200  
Toronto ON M5V 2J1 Canada  
www.biorender.com

## Confirmation of Publication and Licensing Rights

March 30th, 2024  
Science Suite Inc.

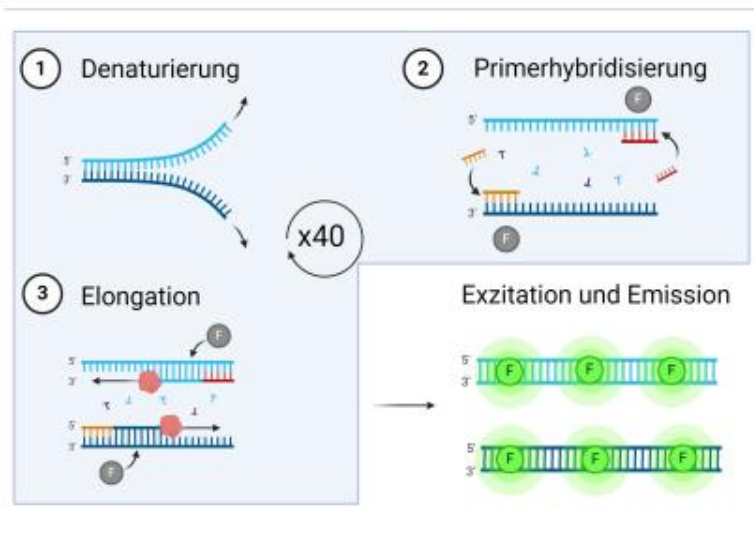
**Subscription:** Student Plan  
**Agreement number:** YC26MZATMA  
**Journal name:** N/A

To whom this may concern,

This document is to confirm that Peter Basten has been granted a license to use the BioRender content, including icons, templates and other original artwork, appearing in the attached completed graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender content to be sublicensed for use in journal publications.

All rights and ownership of BioRender content are reserved by BioRender. All completed graphics must be accompanied by the following citation: "Created with BioRender.com".

BioRender content included in the completed graphic is not licensed for any commercial uses beyond publication in a journal. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



For any questions regarding this document, or other questions about publishing with BioRender refer to our [BioRender Publication Guide](#), or contact BioRender Support at [support@biorender.com](mailto:support@biorender.com).



49 Spadina Ave. Suite 200  
Toronto ON M5V 2J1 Canada  
www.biorender.com

## Confirmation of Publication and Licensing Rights

March 30th, 2024  
Science Suite Inc.

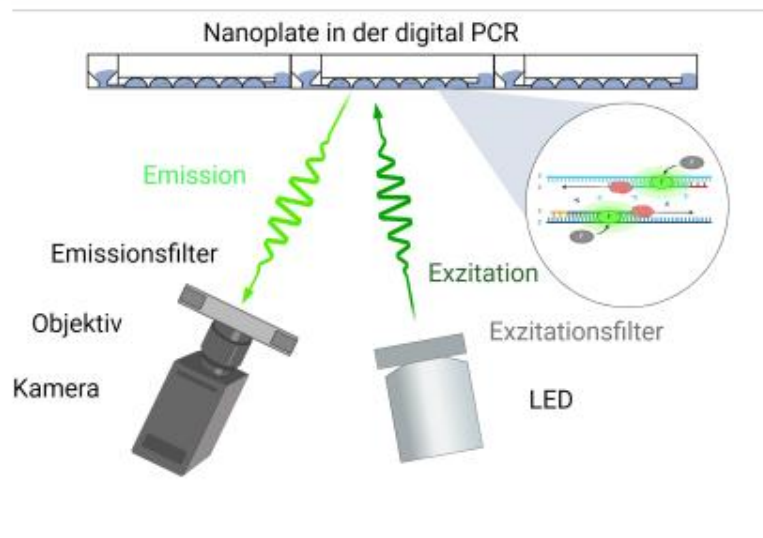
**Subscription:** Student Plan  
**Agreement number:** JH26MZD4CN  
**Journal name:** N/A

To whom this may concern,

This document is to confirm that Peter Basten has been granted a license to use the BioRender content, including icons, templates and other original artwork, appearing in the attached completed graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender content to be sublicensed for use in journal publications.

All rights and ownership of BioRender content are reserved by BioRender. All completed graphics must be accompanied by the following citation: "Created with BioRender.com".

BioRender content included in the completed graphic is not licensed for any commercial uses beyond publication in a journal. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



For any questions regarding this document, or other questions about publishing with BioRender refer to our [BioRender Publication Guide](#), or contact BioRender Support at [support@biorender.com](mailto:support@biorender.com).



49 Spadina Ave. Suite 200  
Toronto ON M5V 2J1 Canada  
www.biorender.com

## Confirmation of Publication and Licensing Rights

March 30th, 2024  
Science Suite Inc.

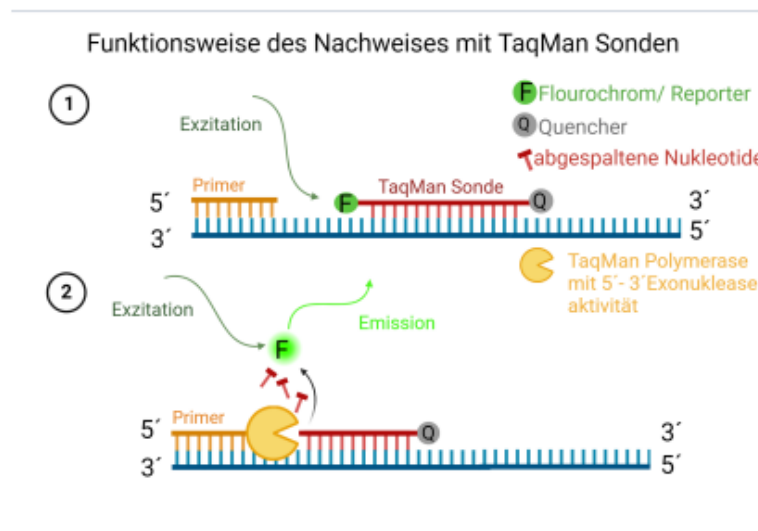
**Subscription:** Student Plan  
**Agreement number:** NH26MZXMGP  
**Journal name:** N/A

To whom this may concern,

This document is to confirm that Peter Basten has been granted a license to use the BioRender content, including icons, templates and other original artwork, appearing in the attached completed graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender content to be sublicensed for use in journal publications.

All rights and ownership of BioRender content are reserved by BioRender. All completed graphics must be accompanied by the following citation: "Created with BioRender.com".

BioRender content included in the completed graphic is not licensed for any commercial uses beyond publication in a journal. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



For any questions regarding this document, or other questions about publishing with BioRender refer to our [BioRender Publication Guide](#), or contact BioRender Support at [support@biorender.com](mailto:support@biorender.com).



49 Spadina Ave. Suite 200  
Toronto ON M5V 2J1 Canada  
www.biorender.com

## Confirmation of Publication and Licensing Rights

January 29th, 2025

**Subscription Type:** Student Plan - Academic  
**Agreement number:** KB27ULHJCH  
**Publisher Name:** N/A

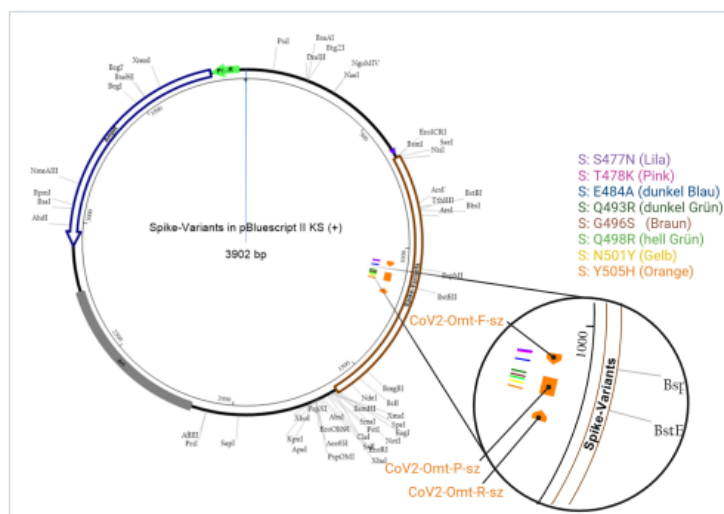
**Citation to Use:** Created in BioRender. Basten, P. (2025) <https://BioRender.com/s47t012>

To whom this may concern,

This document is to confirm that Peter Basten has been granted a license to use the BioRender Content, including icons, templates, and other original artwork, appearing in the attached Completed Graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender Content to be sublicensed for use in publications (journals, textbooks, websites, etc.).

All rights and ownership of BioRender Content are reserved by BioRender. All Completed Graphics must be accompanied by the following citation: "Created in BioRender. Basten, P. (2025) <https://BioRender.com/s47t012>".

BioRender Content included in the Completed Graphic is not licensed for any commercial uses beyond use in a publication. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



For any questions regarding this document, or other questions about publishing with BioRender, please refer to our [BioRender Publication Guide](#), or contact BioRender Support at [support@biorender.com](mailto:support@biorender.com).

---

Der Inhalt dieser Seite wurde entfernt, da er Unterschriften Dritter beinhaltet.

Der Inhalt dieser Seite wurde entfernt, da er Unterschriften Dritter beinhaltet.

Der Inhalt dieser Seite wurde entfernt, da er Unterschriften Dritter beinhaltet.

Der Inhalt dieser Seite wurde entfernt, da er Unterschriften Dritter beinhaltet.

Der Inhalt dieser Seite wurde entfernt, da er Unterschriften Dritter beinhaltet.

Der Inhalt dieser Seite wurde entfernt, da er Unterschriften Dritter beinhaltet.

Der Inhalt dieser Seite wurde entfernt, da er Unterschriften Dritter beinhaltet.

Der Inhalt dieser Seite wurde entfernt, da er Unterschriften Dritter beinhaltet.

Der Inhalt dieser Seite wurde entfernt, da er Unterschriften Dritter beinhaltet.

Der Inhalt dieser Seite wurde entfernt, da er Unterschriften Dritter beinhaltet.

Der Inhalt dieser Seite wurde entfernt, da er Unterschriften Dritter beinhaltet.

Der Inhalt dieser Seite wurde entfernt, da er Unterschriften Dritter beinhaltet.

Der Inhalt dieser Seite wurde entfernt, da er Unterschriften Dritter beinhaltet.

Der Inhalt dieser Seite wurde entfernt, da er Unterschriften Dritter beinhaltet.

Der Inhalt dieser Seite wurde entfernt, da er Unterschriften Dritter beinhaltet.

Der Inhalt dieser Seite wurde entfernt, da er Unterschriften Dritter beinhaltet.

Der Inhalt dieser Seite wurde entfernt, da er Unterschriften Dritter beinhaltet.

Der Inhalt dieser Seite wurde entfernt, da er Unterschriften Dritter beinhaltet.

Der Inhalt dieser Seite wurde entfernt, da er Unterschriften Dritter beinhaltet.

Der Inhalt dieser Seite wurde entfernt, da er Unterschriften Dritter beinhaltet.

---

Der Inhalt dieser Seite wurde entfernt, da er Unterschriften Dritter beinhaltet.

Der Inhalt dieser Seite wurde entfernt, da er Unterschriften Dritter beinhaltet.

---

Der Inhalt dieser Seite wurde entfernt, da er Unterschriften Dritter beinhaltet.

Der Inhalt dieser Seite wurde entfernt, da er Unterschriften Dritter beinhaltet.

Der Inhalt dieser Seite wurde entfernt, da er Unterschriften Dritter beinhaltet.

Der Inhalt dieser Seite wurde entfernt, da er Unterschriften Dritter beinhaltet.

---

Der Inhalt dieser Seite wurde entfernt, da er Unterschriften Dritter beinhaltet.

Der Inhalt dieser Seite wurde entfernt, da er Unterschriften Dritter beinhaltet.

---

Der Inhalt dieser Seite wurde entfernt, da er Unterschriften Dritter beinhaltet.

Der Inhalt dieser Seite wurde entfernt, da er Unterschriften Dritter beinhaltet.

Der Inhalt dieser Seite wurde entfernt, da er Unterschriften Dritter beinhaltet.

Der Inhalt dieser Seite wurde entfernt, da er Unterschriften Dritter beinhaltet.

2022.08.17EvaGreenPCRRerun11.11.20-08.12.20



Reaction Mixes

Reaction Mix Name	Target Name	Dye	Channel	IC	Reference
EvaGreen	Spike	EvaGreen	● Green	-	-

Absolute Quantification (Imaging step 1)

\*Presented results do not include the Volume Precision Factor

Reaction Mix	Target	Sample/NTC/Control	Concentration copies/μL *	CI (95%)	Partitions valid	positive	negative	Threshold
A1	EvaGreen	Spike NTC	0.0	-	25390	0	25390	-
A2	EvaGreen	Spike NTC	0.048	274.4%	25431	1	25430	-
A3	EvaGreen	Spike NTC	0.0	-	24593	0	24593	-
C1	EvaGreen	11.11.20 cDNA rerun	0.251	95.7%	25464	5	25459	-
C2	EvaGreen	17.11.20 cDNA rerun	0.0	-	25473	0	25473	-
C3	EvaGreen	24.11.20 cDNA rerun	0.050	274.4%	25447	1	25446	-
D1	EvaGreen	30.11.20 cDNA rerun	0.353	79%	25454	7	25447	-
D2	EvaGreen	08.12.20 cDNA rerun	0.0	-	25461	0	25461	-
F1	EvaGreen	Spike 1.1	293.4	3.1%	18063	3650	14413	-
F2	EvaGreen	Spike 1.2	279.4	2.7%	25402	4695	20707	-
F3	EvaGreen	Spike 1.4	156.8	3.6%	24298	2780	21518	-

Sample To Insight

20220713EGPCRKit23.02.21-23.11.21



**Absolute Quantification (Imaging step 1)**

\*Presented results do not include the Volume Precision Factor

Reaction Mix	Target	Sample/MTC/Control	Concentration copies/ $\mu$ L *	CI (95%)	Partitions valid	Partitions		Threshold
						positive	negative	
A1	Spike	Spike NTC	0.0	-	25258	0	25258	-
A3	Spike	Spike NTC	0.142	130%	25263	3	25260	-
C1	Spike	23.02.21 cDNA	0.0	-	25468	0	25468	-
C2	Spike	02.03.21 cDNA	0.210	109.1%	25411	4	25407	-
C3	Spike	09.03.21 cDNA	0.253	95.7%	25418	5	25413	-
D1	Spike	16.03.21 cDNA	0.151	130%	25459	3	25456	-
D2	Spike	23.03.21 cDNA	0.0	-	25453	0	25453	-
D3	Spike	30.03.21 cDNA	0.407	73.3%	25443	8	25435	-
E1	Spike	13.04.21 cDNA	0.0	-	25485	0	25485	-
E2	Spike	20.04.21 cDNA	0.107	168.6%	25457	2	25455	-
E3	Spike	11.05.21 cDNA	0.205	109.2%	25382	4	25378	-
F1	Spike	17.06.21 cDNA	0.0	-	25458	0	25458	-
F2	Spike	23.11.21 cDNA	0.161	130%	25412	3	25409	-
F3	Spike	Spike 1.1	225.9	3.3%	19966	3207	16759	-
G1	Spike	Spike 1.2	143.9	3.7%	24795	2598	22197	-
G2	Spike	Spike 1.4	97.2	4.5%	25456	1813	23643	-

Sample To Insight

6 / 9

Generated by (admin) on 12.02.2024 22:01  
via QIAcuity Software Suite 1.2.18

20220714EGPCRKit30.11.21-22.02.22+29.04.21+04.05.21



**Absolute Quantification (Imaging step 1)**

\*Presented results do not include the Volume Precision Factor

Reaction Mix	Target	Sample/NTC/Control	Concentration copies/ $\mu$ L *	CI (95%)	Partitions valid	positive	negative	Threshold
A1	Spike	Spike NTC	0.0	-	25370	0	25370	39.78
A2	Spike	Spike NTC	0.0	-	25422	0	25422	38.51
A3	Spike	Spike NTC	0.0	-	25001	0	25001	37.23
C1	Spike	29.04.21 cDNA	0.151	130%	25460	3	25457	74.2
C2	Spike	04.05.21 cDNA	0.105	168.6%	25447	2	25445	84.41
C3	Spike	30.11.21 cDNA	0.101	168.6%	25442	2	25440	97.79
D1	Spike	07.12.21 cDNA	0.0	-	25457	0	25457	79.31
D2	Spike	14.12.21 cDNA	0.0	-	25448	0	25448	88.23
D3	Spike	11.01.22 cDNA	0.051	274.4%	25453	1	25452	92.06
E1	Spike	18.01.22 cDNA	0.050	274.5%	25448	1	25447	94.92
E2	Spike	01.02.22 cDNA	0.107	168.6%	25470	2	25468	103.53
E3	Spike	09.02.22 cDNA	0.102	168.6%	25415	2	25413	100.66
F1	Spike	15.02.22 cDNA	4445.7	0.7%	20462	19793	669	11985
F2	Spike	22.02.22 cDNA	6471.0	0.6%	25468	25244	224	112.2
H1	Spike	Spike 1.1	53.1	5.9%	25281	1078	24203	103.28
H2	Spike	Spike 1.2	104.3	4.2%	25338	2080	23258	90.53

Sample To Insight

6 / 10

20221124OSVRTPCRKit1.11.20-04.05.21



**Absolute Quantification (Imaging step 1)**

Sample/NTC/Control	Reaction Mix	Target	IC		Control Type	Concentration copies/µL	CI (95%)	Partitions		Threshold	
			-	-				valid	negative		
A1 Spike	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	NEG	0.052	147.5%	25260	1	25259	104.81
A3 SpikeVariant	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	POS	1735.8	1.7%	20235	14718	5517	61.19
B1 Spike	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	NEG	0.054	147.5%	24665	1	24664	92.06
B3 SpikeVariant	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	POS	1700.8	1.7%	21557	15422	6135	66.03
C2 30.11.20	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	-	0.000	-	25374	0	25374	94.61
D1 11.11.20	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	-	0.000	-	25442	0	25442	89.51
D2 24.11.20	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	-	0.000	-	25250	0	25250	85.68
D3 02.03.21	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	-	0.000	-	24052	0	24052	102.26
E1 09.03.21	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	-	0.000	-	25449	0	25449	93.33
E2 16.03.21	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	-	0.056	147.5%	25161	1	25160	89.51
E3 30.03.21	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	-	0.000	-	25174	0	25174	93.33
F1 20.04.21	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	-	0.000	-	24712	0	24712	92.06
F2 29.04.21	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	-	0.055	147.5%	25325	1	25324	88.23
F3 04.05.21	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	-	0.000	-	25201	0	25201	94.61
H1 NTC	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	-	0.000	-	25450	0	25450	78.03
H2 NTC	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	-	0.000	-	25309	0	25309	83.13
H3 NTC	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	-	0.053	147.5%	25353	1	25352	90.78

Sample To Insight

9 / 12



2022.08.18EvaGreenPCRrun14.12.20-16.02.21 - Upgraded

Sample/NTC/Control	Reaction Mix	Target Name	IC	Control Type	Conc. [cpμL] <sup>3)</sup>	Undiluted sample	CI (95%)	Partitions	Threshold
F3 Spike1.4	EvaGreen	Spike	-	POS	26.77	1	8.6%	25169 517 24652	138.34

1) Presented results do not include the Volume Precision Factor

2022.08.18EvaGreenPCRRerun14.1.2.20-16.02.21



Reaction Mixes

Reaction Mix Name	Target Name	Dye	Channel	IC	Reference
EvaGreen	Spike	EvaGreen	● Green	-	-

Absolute Quantification (Imaging step 1)

\*Presented results do not include the Volume Precision Factor

Reaction Mix	Target	Sample/NTC/Control	Concentration copies/ $\mu$ L *	CI (95%)	Partitions valid	positive	negative	Threshold
A1	EvaGreen	Spike NTC	0.094	168.6%	25439	2	25437	-
A2	EvaGreen	Spike NTC	3.5	23.2%	25343	72	25271	-
A3	EvaGreen	Spike NTC	Infinity	n.a.	19674	19674	0	-
C1	EvaGreen	14.12.20 cDNA rerun	0.151	130%	25461	3	25458	-
C2	EvaGreen	12.01.21 cDNA rerun	0.0	-	25467	0	25467	-
C3	EvaGreen	19.01.21 cDNA rerun	0.202	109.1%	25422	4	25418	-
D1	EvaGreen	26.01.21 cDNA rerun	0.0	-	25474	0	25474	-
D2	EvaGreen	02.02.21 cDNA rerun	0.0	-	25462	0	25462	-
D3	EvaGreen	16.02.21 cDNA rerun	0.102	168.6%	25473	2	25471	-
F1	EvaGreen	Spike 1.1	0.0	-	25458	0	25458	-
F2	EvaGreen	Spike 1.2	0.0	-	25382	0	25382	-
F3	EvaGreen	Spike 1.4	54.4	6%	25306	1045	24261	-

Sample To Insight

5 / 5



2022112505VRTPCRKit 14.12.20-16.02.21 u 11.05.21-22.02.22 - Upgraded

**Absolute Quantification (Imaging step 1)**

Sample/NTC/Control	Reaction Mix	Target Name	IC	Control Type	Conc. [cp/mL] <sup>1)</sup>	Undiluted sample	CI (95%) dPCR reaction	Partitions Valid Positive Negative	Threshold
A1	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	NEG	0	-	-	25422 0 25422	100.98
A3	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	POS	0	-	-	25206 0 25206	88.23
B1	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	NEG	0.052	-	147.5%	25453 1 25452	93.33
B3	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	POS	2071.5	-	1.6%	21866 17134 4732	68.21
C1	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	0	-	-	25466 0 25466	98.43
C2	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	0	-	-	25443 0 25443	94.61
C3	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	0	-	-	25359 0 25359	94.61
D1	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	0.053	-	147.5%	25475 1 25474	89.51
D2	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	0	-	-	25455 0 25455	95.88
D3	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	0	-	-	25332 0 25332	93.33
E1	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	0	-	-	25479 0 25479	95.88

1) Presented results do not include the Volume Precision Factor

Sample To Insight



20221125OSVRTPCRKit 14.12.20-16.02.21 u 11.05.21-22.02.22 - Upgraded

	Sample/NTC/Control	Reaction Mix	Target Name	IC	Control Type	Conc. [cp/μL] <sup>1)</sup>		CI (95%) dPCR reaction	Partitions Valid Positive Negative	Threshold
						dPCR reaction	Undiluted sample			
E2	18.01.22	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	0	-	-	25426 0 25426	88.23
E3	01.02.22	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	0.054	-	147.5%	25311 1 25310	100.98
F1	09.02.22	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	0	-	-	25471 0 25471	94.61
F2	15.02.22	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	416.6	-	2.4%	25305 6500 18805	72.04
F3	22.02.22	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	0	-	-	25386 0 25386	104.81
H1	NTC	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	0	-	-	25461 0 25461	84.41
H2	NTC	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	0.110	-	119.0%	24552 2 24550	85.68
H3	NTC	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	0.053	-	147.5%	25286 1 25285	90.78

1) Presented results do not include the Volume Precision Factor



20220711EGPCRKitPositivkontrollen300ms4G-S+SV

### Reaction Mixes

Reaction Mix Name	Target Name	Dye	Channel	IC	Reference
EvaGreenSpikeVariants	SpikeVariants	EvaGreen	Green	-	-
EvaGreenSpike	Spike	EvaGreen	Green	-	-

### Absolute Quantification (Imaging step 1)

\*Presented results do not include the Volume Precision Factor

Reaction Mix	Target	Sample/NTC/Control	Concentration copies/μL *	CI (95%)	Partitions valid	positive	negative	Threshold
A1	EvaGreenSpike	Spike 1.1	533.8	1.8%	25446	9177	16269	117.3
A2	EvaGreenSpikeVariants	SpikeVariant 1.1	827.2	1.5%	25436	12465	12971	126.22
B1	EvaGreenSpike	Spike 1.2	261.5	2.7%	25469	4746	20723	113.47
B2	EvaGreenSpikeVariants	SpikeVariant 1.2	409.5	2.2%	25462	6905	18557	124.95
C1	EvaGreenSpike	Spike 1.4	128.8	3.9%	25459	2441	23018	107.74
C2	EvaGreenSpikeVariants	SpikeVariant 1.4	199.8	3.2%	25456	3535	21921	123.67
E1	EvaGreenSpike	ReactionMix + Wasser S	0.202	109.1%	25464	4	25460	112.45
E2	EvaGreenSpikeVariants	ReactionMix + Wasser SV	0.374	79%	25448	7	25441	110.86

— Sample To Insight



### Absolute Quantification (Imaging step 1)

	Sample/NTC/Control	Reaction Mix	Target		IC	Control type	Conc. [copies/ $\mu$ L]	CI (95%)	Partitions valid		Threshold	
			Spike Omi...	Spike Omi...					positive	negative		
E1	p-neo-Spike RNA	Step One Viral Set Omikron	Spike Omi...	Spike Omi...	-	-	0.054	147.5%	25140	1	25139	102.26
E2	p-Bluescript KS SpikeVAriants	Step One Viral Set Omikron	Spike Omi...	Spike Omi...	-	-	3524.3	1.6%	25423	23349	2074	72.04
E3	Negativkontrolle Reaktionsmix	Step One Viral Set Omikron	Spike Omi...	Spike Omi...	-	-	0.109	119.0%	25142	2	25140	89.51

2022112405VRTPCRKit11.11.20-04.05.21



**Absolute Quantification (Imaging step 1)**

Sample/NTC/Control	Reaction Mix	Target Name	IC	Control Type	Conc. [pp[L] <sup>1)</sup>		CI (95%) dPCR reaction	Partitions Valid Positive Negative	Threshold
					dPCR reaction	Undiluted sample			
A1	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	NEG	0.052	-	147.5%	25260 1 25259	104.81
A3	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	POS	1735.8	-	1.7%	20235 14718 5517	61.19
B1	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	NEG	0.054	-	147.5%	24665 1 24664	92.06
B3	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	POS	1700.8	-	1.7%	21557 15422 6135	66.03
C2	30.11.20	Spike Variant Omikron	-	-	0	-	-	25374 0 25374	94.61
D1	11.11.20	Spike Variant Omikron	-	-	0	-	-	25442 0 25442	89.51
D2	24.11.20	Spike Variant Omikron	-	-	0	-	-	25250 0 25250	85.68
D3	02.03.21	Spike Variant Omikron	-	-	0	-	-	24052 0 24052	102.26
E1	09.03.21	Spike Variant Omikron	-	-	0	-	-	25449 0 25449	93.33
E2	16.03.21	Spike Variant Omikron	-	-	0.056	-	147.5%	25161 1 25160	89.51
E3	30.03.21	Spike Variant Omikron	-	-	0	-	-	25174 0 25174	93.33

1) Presented results do not include the Volume Precision Factor

Sample To Insight

8 / 12

20221124OSVRTPCRKit1.1.1.20-04.05.21



	Sample/NTC/Control	Reaction Mix	Target Name	IC	Control Type	Conc. [cp/mL] <sup>1)</sup>		CI (95%) dPCR reaction	Partitions Valid Positive Negative	Threshold
						dPCR reaction	Undiluted sample			
F1	20.04.21	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	0	-	-	24712 0 24712	92.06
F2	29.04.21	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	0.055	-	147.5%	25325 1 25324	88.23
F3	04.05.21	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	0	-	-	25201 0 25201	94.61
H1	NTC	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	0	-	-	25450 0 25450	78.03
H2	NTC	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	0	-	-	25309 0 25309	83.13
H3	NTC	Spike Variant Omikron	Spike Omikron-F	-	-	0.053	-	147.5%	25353 1 25352	90.78

1) Presented results do not include the Volume Precision Factor

## Sequenz pCI-neo-Spike-SARS-CoV-2-2020

5'- TCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATAAATCAA-  
TATTGGC-  
TATTGGCCATTGCATACGTTGTATCTATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCA  
TGCCAATATGACCGCCATGTTGGCATTGATTATTGACTAGTTATTA-  
TAGTAATCAATTAC-  
GGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAA  
ATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTGACGTCAA-  
TAATGAC-  
GTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAG  
TATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCAT-  
ATGCCAAGTCCGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATT  
ATGCCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTAC-  
GTATTAG-  
TCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTGGATA  
GCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAG-  
TTTGTTTT-  
GGCACCAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTGAC  
GCAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAA-  
GCAGAGCTCGTTTAGTGAAC-  
CGTCAGATCACTAGAAGCTTTATTGCGGTAGTTTATCACAGTTAAATTGCTAACGC  
AGTCAGTGCTTCTGACACAACAGTCTCGAACTTAAGCTGCAGAAGTT-  
GGTCGTGAGGCAC-  
TGGGCAGGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAACTG  
GGCTTGTGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTTCTGATAGGCAC-  
CTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAG  
TTCAATTACAGCTCTTAAGGCTAGAGTACTTAATACGACTCACTATAGGCTAG-  
CATGTTT-  
GTTTTTCTTGTTTTATTGCCACTAGTCTCTAGTCAGTGTGTTAATCTTACAACCAGA  
ACTCAATTACCCCTGCATACACTAATTCTTTCACAC-  
GTGGTGTATTACCCTGACAAAGTTTTAGATCCTCAGTTTTACATTCAACTCAGG  
ACTTGTCTTACCTTTCTTTCCAATGTTACTTGGTTCCATGCTATA-  
CATGTCTCTGGGAC-  
CAATGGTACTAAGAGGTTTGATAACCCTGTCTACCATTTAATGATGGTGTGTTATTT  
TGCTTCCACTGAGAAGTCTAACATAATAAGAGGCTGGATTTTTGGTACTACTTTA-  
GAT-  
TCGAAGACCCAGTCCCTACTTATTGTTAATAACGCTACTAATGTTGTTATTAAGTC  
TGTGAATTTCAATTTTGTAAATGATCCATTTTTGGGTGTTTATTAC-  
CACAAAACAACAAAAGTTGGATGGAAAGTGAGTTCAGAGTTTATTCTAGTGCGAA  
TAATTGCACTTTTGAATATGTCTCTCAGCCTTTTCTTATGGACCTT-  
GAAGGAAAACAGGG-  
TAATTTCAAAAATCTTAGGGAATTTGTGTTTAAGAATATTGATGGTATTTTAAAATA  
TATTCTAAGCACACGCCTATTAATTTAG-  
TGCGTGATCTCCCTCAGGGTTTTTCGGCTTTA-  
GAACCATTGGTAGATTTGCCAATAGGTATTAACATCACTAGGTTTTCAAACCTTACTT  
GCTTTACATAGAAGTTATTTGACTCCTGGTGATTCTTCTTCAGGTT-  
GGACAGCTGGTGCTG-  
CAGCTTATTATGTGGGTTATCTTCAACCTAGGACTTTTCTATTAAAATATAATGAAA  
ATGGAACCATTACAGATGCTGTAGACTGTGCACTT-

GACCCTCTCTCAGAAACAAAGTGTAC-  
GTTGAAATCCTTCACTGTAGAAAAAGGAATCTATCAAACCTTCTAACTTTAGAGTCCA  
ACCAACAGAATCTATTGTTAGATTTTCTAATATTACAAACTTGTGCCCTTTT-  
GGTGAAGTTTTTAAACGCCACCAGATTTGCATCTGTTTATGCTTGGAACAGGAAGAG  
AATCAGCAACTGTGTTGCTGATTATTCTGTCCTATATAATTCCG-  
CATCATTTTCCAC-  
TTTTAAGTGTTATGGAGTGTCTCCTACTAAATTAATGATCTCTGCTTTACTAATGT  
CTATGCAGATTCATTTGTAATTAGAGGTGATGAAGTCAGACAAATCGCTCCAGGG-  
CAAACCTG-  
GAAAGATTGCTGATTATAATTATAAATTACCAGATGATTTTACAGGCTGCGTTATAG  
CTTGGAAATTCTAACAATCTTGATTCTAAGGTTGGTGGTAATTATAATTACCTGTATA-  
GATTGTTTAGGAAGTCTAATCTCAAACCTTTTGGAGAGAGATATTTCAACTGAAATCT  
ATCAGGCCGGTAGCACACCTTGTAAATGGTGTGTTGAAGTTTTAATT-  
GTTACTTTCCCTTACAATCATATGGTTTCCAACCCACTAATGGTGTGTTACCAAC  
CATACAGAGTAGTAGTACTTTCTTTTGAACCTTCTACATGCACCAGCAACTGTTT-  
GTGGAC-  
CTAAAAGTCTACTAATTTGGTTAAAACAAATGTGTCAATTTCAACTTCAATGGTT  
TAACAGGCACAGGTGTTCTTACTGAG-  
TCTAACAAAAAGTTTCTGCCTTTCCAACAATTTGG-  
CAGAGACATTGCTGACACTACTGATGCTGTCCGTGATCCACAGACACTTGAGATT  
CTTGACATTACACCATGTTCTTTTGGTGGTGTGAGTGTATAACACCAGGAACAAA-  
TACTTCTAACCAGGTTGCTGTTCTTTATCAGGGTGTAACTGCACAGAAGTCCCTG  
TTGCTATTCATGCAGATCAACTTACTCCTACTTGGCGTGTTTATTC-  
TACAGGTTCTAATGTTTTTCAAACACGTGCAGGCTGTTAATAGGGGCTGAACATG  
TCAACAACCTCATATGAGTGTGACATACCCATTGGTGCAGGTATATGCGCTAG-  
TTATCAGACTCAGACTAATTCTCCTCGGCGGGCACGTAGTGTAGCTAGTCAATCC  
ATCATTGCCTACACTATGTCACTTGGTGCAGAAAATTCAGTTGCTTACTCTAA-  
TAACTC-  
TATTGCCATACCCACAAATTTTACTATTAGTGTACCACAGAAATCTACCAGTGTG  
TATGACCAAGACATCAGTAGATTGTACAATGTACATTTGTGGTGAT-  
TCAACTGAATGCAG-  
CAATCTTTTGTGCAATATGGCAGTTTTTGTACACAATTAACCGTGCTTTAACTGG  
AATAGCTGTTGAACAAGACAAAAACACCCAAGAAGTTTTT-  
GCACAAGTCAAACAAATTTACAAAACACCACCAATTAAGATTTTTGGTGGTTTTAAT  
TTTTCACAAATATTACCAGATCCATCAAACCAAGCAAGAGGTCATTTATTGAA-  
GATCTACTTTTCAAACAAAGTGACACTTGCAGATGCTGGCTTCATCAAACAATATGG  
TGATTGCCTTGGTGATATTGCTGCTAGAGACCTCATTGTGCACAAAAGTTTAAAC-  
GGCCTTACTGTTTTGCCACCTTTGCTCACAGATGAAATGATTGCTCAATACACTTC  
TGCCTGTTAGCGGGTACAATCACTTCTGGTTGGACCTTTGGTGCAGGTGCTG-  
CATTACAAA-  
TACCATTTGCTATGCAAATGGCTTATAGGTTTAAATGGTATTGGAGTTACACAGAAT  
GTTCTCTATGAGAACCAAAAATTGATTGCCAACCAATTTAATAGTGTATTGG-  
CAAAATTCAAGACTCACTTTCTTCCACAGCAAGTGCCTTGGAAAACCTTCAAGATG  
TGGTCAACCAAAATGCACAAGCTTTAAACACGCTT-  
GTTAAACAACCTTAGCTCCAATTTT-  
GGTGAATTTCAAGTGTTTTTAAATGATATCCTTTACAGTCTTGACAAAAGTTGAGGC  
TGAAGTGCAAATTGATAGGTTGATCACAGGCAGACTTCAAAGTTTGCAGACAT-  
ATGTGACTCAACAATTAATTAGAGCTGCAGAAATCAGAGCTTCTGCTAATCTTGCT  
GCTACTAAAATGTCAGAGTGTGTACTTGGACAATCAAAAAGAGTTGATTTTTGTG-  
GAAAGGGCTATCATCTTATGTCCTTCCCTCAGTCAGCACCTCATGGTGTAGTCTTC  
TTGCATGTGACTTATGTCCCTGCACAAGAAAA-

GAACTTCACAACCTGCTCCTGCCATTT-  
GTCATGATGGAAAAGCACACTTTCCTCGTGAAGGTGTCTTTGTTTCAAATGGCACA  
CACTGGTTTGTAAACACAAAGGAATTTTTATGAACCACAAATCATTACTACAGA-  
CAACACATTTGTGTCTGGTAACTGTGATGTTGTAATAGGAATTGTCAACAACACAG  
TTTATGATCCTTTGCAACCTGAATTAGACTCATTCAAGGAGGAGTTAGATAAA-  
TATTTTAA-  
GAATCATACATCACCAGATGTTGATTTAGGTGACATCTCTGGCATTAAATGCTTCAG  
TTGTAAACATTCAAAAAGAAATTGACCGCCTCAATGAGGTTGCCAA-  
GAATTTAAATGAATCTCTCATCGATCTCCAAGAACTTGGAAAGTATGAGCAGTATA  
TAAAATGGCCATGGTACATTTGGCTAGGTTTTATAGCTGGCTTGATTGCCA-  
TAGTAATGGTGACAATTATGCTTTGCTGTATGACCAGTTGCTGTAGTTGTCTCAAG  
GGCTGTTGTTCTTGTGGATCCTGCTGCAAATTTGATGAAGACGACTCTGAGCCAG-  
TGCTCAAAGGAGTCAAATTACATTACACATAAGCGGCCGCTTCGAGCAGACATGA  
TAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACACTAGAATGCAG-  
TGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTA  
TAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATT-  
GCATTCATTTTATGTTTCAGGTTCCAGGGG-  
GAGATGTGGGAGGTTTTTAAAGCAAGTAAACCTCTACAAATGTGGTAAAATCGA  
TAAGGATCCGGGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCAC-  
CGATCGCCCTTCCCAACAGTT-  
GCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGC  
GGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTT-  
GCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTGCTTTCTCCCTTCCTTTCTCGCCACGT  
TCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGAT-  
TTAG-  
TGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACCTTGATTAGGGTGTGTTTACGTTAGT  
GGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCAC-  
GTTCTTTAA-  
TAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTT  
TTGATTTATAAGGGATTTTGGCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGAT-  
TTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAAACAAAATATTAACGCTTACAATTTCTGATG  
CGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATGGTGCAC-  
TCTCAG-  
TACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCC  
GCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAA-  
GCTGTGAC-  
CGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGGTTTTACCGTTCATCACCGAAACGCGC  
GAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAA-  
TAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCC  
TATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAA-  
TAACCCTGA-  
TAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTC  
GCCCTTATTCCCTTTTTTTCGGCATTTTTGCCTTCTGTTTTTGTCTACCCAGAAAC-  
GCTGGTCAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATC  
GAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAAC-  
GTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGT  
ATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGCATACAC-  
TATTCTCAGAATGACTTGGTT-  
GAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAAT  
TATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACAC-  
TGCGGCCAACTTACTTCTGACAAC-  
GATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTA

ACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGAC-  
GAGCGTGACAC-  
CACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTA  
CTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTT-  
GCAGGAC-  
CACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGC  
CGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAA-  
GCCCTCCCG-  
TATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGA  
CAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGAC-  
CAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGA  
TCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAG-  
TTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGA  
TCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCCACCGCTAC-  
CAGCGGTGGTTTGTTCGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAC  
TGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAG-  
TTAGGCCAC-  
CACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACC  
AGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGAC-  
GATAGTTAC-  
CGGATAAGGCGCAGCGGTCTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGC  
TTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGA-  
GAAAGCGCCAC-  
GTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGAA  
CAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGG-  
TATCTTTATAGTCTGTCTGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTGCATTTTTGTG  
ATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAAC-  
GCGGCCTTTTTAC-  
GTTTCTGGCCTTTTTGCTGGCCTTTTTGCTCACATGGCTCGACAGATCT – 3`

Sequenz wildtypisches Spike:

5'- TTATGTGTAATGTAATTTGACTCCTTTGAGCACTGGCTCAGAG-  
TCGTCTTCATCAAATTT-  
GCAGCAGGATCCACAAGAACAACAGCCCTTGAGACAACTACAGCAACTGGTCATA  
CAGCAAAGCATAATTGTCACCATACTATGGCAATCAAGCCAGCTATAAAAC-  
CTAGCCAAATGTACCATGGCCATTTTATATACTGCTCATACTTTCCAAGTTCTTGA  
GATCGATGAGAGATTCATTTAAATTCTTGGCAACCTCATT-  
GAGGCGGTCAATTTCTTTTT-  
GAATGTTTACAACCTGAAGCATTAAATGCCAGAGATGTCACCTAAATCAACATCTGGT  
GATGTATGATTCTTAAAATATTTATCTAACTCCTCCTTGAATGAG-  
TCTAATTCAGGTT-  
GCAAAGGATCATAAACTGTGTTGTTGACAATTCCTATTACAACATCACAGTTACCA  
GACACAAATGTGTTGTCTGTAGTAATGATTTGTGGTTCATAAAAATTCCTTT-  
GTGTTACAAACCAGTGTGTGCCATTTGAAACAAAGACACCTTCACGAGGAAAGTG  
TGCTTTTCCATCATGACAAATGGCAGGAGCAGTTGTGAAGTTCTTTTCTTGTG-  
CAGGGACATAAGTCACATGCAAGAAGACTACACCATGAGGTGCTGACTGAGGGAA  
GGACATAAGATGATAGCCCTTTCCACAAAAATCAACTCTTTTT-

GATTGTCCAAGTACACAC-  
TCTGACATTTTAGTAGCAGCAAGATTAGCAGAAGCTCTGATTTCTGCAGCTCTAAT  
TAATTGTTGAGTCACATATGTCTGCAAACCTTTGAAGTCTGCCTGTGATCAAC-  
CTATCAATTT-  
GCACTTCAGCCTCAACTTTGTCAAGACGTGAAAGGATATCATTAAAACACTTGAA  
ATTGCACCAAATTGGAGCTAAGTTGTTTAAACAAGCGTGTTTAAAGCTTGTG-  
CATTTTGGTT-  
GACCACATCTTGAAGTTTTCCAAGTGCACCTTGCTGTGGAAGAAAGTGAGTCTTGAA  
TTTTGCCAATAGCACTATTAATTGGTTGGCAATCAATTTTTGGTTCTCATAGA-  
GAACATTCTGTGTAACCTCAATACCATTAAACCTATAAGCCATTTGCATAGCAAATG  
GTATTTGTAATGCAGCACCTGCACCAAAGGTCCAAC-  
CAGAAGTGATTGTACCCGCTAACAG-  
TGCAGAAGTGTATTGAGCAATCATTTTCATCTGTGAGCAAAGGTGGCAAACAGTAA  
GGCCGTTAAACTTTTTGTGCACAAATGAGGTCTCTAGCAGCAATATCAC-  
CAAGGCAATCAC-  
CATATTGTTTGTGATGAAGCCAGCATCTGCAAGTGTCACTTTGTTGAAAAGTAGATCT  
TCAATAAATGACCTCTTGCTTGGTTTTGATGGATCTGGTAATATTT-  
GTGAAAATTA AAC-  
CACCAAATCTTTAATTGGTGGTGTGTTTTGTAAATTTGTTTGACTTGTGCAAAACTT  
CTTGGGTGTTTTGTCTTGTCAACAGCTATTCCAGTTAAAGCACGGTTTAATT-  
GTG-  
TACAAAACTGCCATATTGCAACAAAAGATTGCTGCATTGAGTTGAATCACCACAA  
ATGTACATTGTACAATCTACTGATGTCTTGGTCATAGACACTGG-  
TAGAATTTCTGTGG-  
TAACACTAATAGTAAAATTTGTGGGTATGGCAATAGAGTTATTAGAGTAAGCAACT  
GAATTTTCTGCACCAAGTGACATAGTGTAGGCAATGATGGATTGACTAGCTACAC-  
TAC-  
GTGCCCGCCGAGGAGAATTAGTCTGAGTCTGATAACTAGCGCATATACCTGCACC  
AATGGGTATGTCACACTCATATGAGTTGTT-  
GACATGTTGAGCCCTATTAACAGCCTGCAC-  
GTGTTTAAAAACATTAGAACCTGTAGAATAAACACGCCAAGTAGGAGTAAGTTGA  
TCTGCATGAATAGCAACAGGGACTTCTGTGCAGTTAACACCCTGATAAAGAACAG-  
CAAC-  
CTGGTTAGAAGTATTTGTTCCCTGGTGTATAACACTGACACCACCAAAGAACATG  
GTGTAATGTCAAGAATCTCAAGTGTCTGTGGATCACGGACAGCATCAGTAG-  
TGTCAG-  
CAATGTCTCTGCCAAATTGTTGGAAAGGCAGAACTTTTTGTTAGACTCAGTAAGA  
ACACCTGTGCCTGTTAAACCATTGAAGTTGAAATTGACACATTTGTTTTTAAC-  
CAAATTAG-  
TAGACTTTTTAGGTCCACAAACAGTTGCTGGTGCATGTAGAAGTTCAAAGAAAGT  
ACTACTACTCTGTATGGTTGGTAACCAACACCATTAGTGGGTTGGAAAC-  
CATATGATTGTAAAGGAAAGTAACAATTA AACCTTCAACACCATTACAAGGTGTG  
CTACCGGCCTGATAGATTTGAGTTGAAATATCTCTCTCAAAGGTTTGA-  
GATTAGACTTCCTAAACAATCTATACAGGTAATTATAATTACCACCAACCTTAGAAT  
CAAGATTGTTAGAATCCAAGCTATAACGCAGCCTGTAAAATCATCTGG-  
TAATTTATAATTATAATCAGCAATCTTTCCAGTTTGCCTGGAGCGATTTGTCTGAC  
TTCATCACCTCTAATTACAAATGAATCTGCATAGACATTAGTAAAGCAGA-  
GATCATTTAATTTAGTAGGAGACACTCCATAACACTTAAAAGTGGAAAATGATGCG  
GAATTATATAGGACAGAATAATCAGCAACACAGTTGCTGAT-  
TCTCTTCCCTGTTCCAA-  
GCATAAACAGATGCAAATCTGGTGGCGTTAAAACTTCACCAAAGGGCACAAGT

TTGTAATATTAGGAAATCTAACAATAGATTCTGTTGGTTGGACTCTAAAGTTA-  
GAAGTTTGA-  
TAGATTCCTTTTTCTACAGTGAAGGATTTCAACGTACACTTTGTTTCTGAGAGAGG  
GTCAAGTGCACAGTCTACAGCATCTGTAATGGTTCCATTTTCATTATATTTTAA-  
TAGAAAAGTCCTAGGTTGAAGATAACCCACATAATAAGCTGCAGCACCAGCTGTC  
CAACCTGAAGAAGAATCACCAGGAGTCAAATAACTTCTATGTAAA-  
GCAAGTAAAGTTT-  
GAAACCTAGTGATGTTAATACCTATTGGCAAATCTACCAATGGTTCTAAAGCCGAA  
AAACCCTGAGGGAGATCACGCACTAAATTAATAGGCGTGTGCTTA-  
GAATATATTTTAAAA-  
TAACCATCAATATTCTTAAACACAAATTCCTAAGATTTTTGAAATTACCCTGTTTTTC  
CTTCAAGGTCCATAAGAAAAGGCTGAGAGACATATTCAAAGTGCAATTATTCG-  
CACTAGAA-  
TAAACTCTGAACTCACTTTCCATCCAACTTTTGTTGTTTTTGTGGTAATAAACACCC  
AAAAATGGATCATTACAAAATTGAAATTCACAGACTTTAATAACAACATTAG-  
TAGCGTTATTAACAATAAGTAGGGACTGGGTCTTGAATCTAAAGTAGTACCAAAA  
ATCCAGCCTCTTATTATGTTAGACTTCTCAGTGGAAAGCAAATAAACAC-  
CATCATTAATGG-  
TAGGACAGGGTTATCAAACCTCTTAGTACCATTGGTCCCAGAGACATGTATAGCAT  
GGAACCAAGTAACATTGGAAAAGAAAGGTAAGAACAAGTCCTGAGTT-  
GAATGTAAAAGTGG-  
GATCTGAAAAGTTTGTGAGGGTAATAAACACCACGTGTGAAAGAATTAGTGTATGC  
AGGGGGTAATTGAGTTCTGGTTGTAAGATTAACACACTGACTAGAGACTAGTGG-  
CAATAAAACAAGAAAAACAACAT - 3'

Sequenz Spike-Variants in pBluescript II KS (+):

5'- CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAATTCGCGTTAAATTTTT-  
GTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAATCCCTTATAAAT  
CAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGAACAAGAG-  
TCCAC-  
TATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGA  
TGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCG-  
TAAAGCAC-  
TAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGG  
CGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAA-  
GCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGG-  
CAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGC  
CGCTACAGGGCGCGTCCATTCCGCAATTCAGGCTGCGCAACTGTTGG-  
GAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGG  
ATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC-  
GTT-  
GTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGG  
AGCTCATGCATTCAACTCAGGACTTGTCTTACCTTTCTTTTCCAATGTTACTT-  
GGTTCCATGCTAATGCTATCTCTGGGACCAATGGTACTAAGAGGTTTGATAACCCT  
GTCCTACCATTTAATGATGGTGTATTTTGTCTTCCACTGAGAAGTCTAACATAA-  
TAA-  
GAGGCTGGATTTTTGGTACTACTTTAGATTCTGAAGACCCAGTCCCTACTTATTGTT  
AATAACGCTACTAATGTTGTTATTAAGTCTGTGAATTTCAATTTT-

GTAATGATCCATTTTT-  
GGGTGTTTACCACAACAAAAACAACAAAAGTTGGATGGAAAGTGAGTTCAGAGTTT  
ATTCTAGTGCGAATAATTGCACTTTTGAA-  
TATGTCATTTCAACTGAAATCTATCAGGCCGG-  
TAACAAACCTTGTAAATGGTGTTCAGGTTTTAATTGTTACTTTTCTTTACGATCATA  
TAGTTTCCGACCCACTTATGGTGTTCAGCAACCATACAGAGTAGTAG-  
TACTTTCTTT-  
GAACTTCTACATGCACCAGCAACTGTTTGTGGACCTAAAAAGTCTACTAATTTGGT  
TGCTATGCAAATGGCTTATAGGTTAATGGTATTGGAGTTACACAGAATGTTCTC-  
TATGA-  
GAACCAAAAATTGATTGCCAACCAATTTAATAGTGCTATTGGCAAATTCAAGACT  
CACTTTCTTCCACAGCAAGTGCACTTGGAAAACCTTCAAGATGTGGTCAAC-  
CAAAATGCACAA-  
GCTTTAAACACGCTTGTAAACAACCTTAGCTCCAATTTTGGTGCAATTTCAAGTGTT  
TTAAATGATATCCTTGACAGTCTTGACAAAGTTGAGGCTGAAGTGCAAATTGA-  
TAGGTT-  
GATCACAGGCAGACTTCAAAGTTTGCAGACATATGTGACTCAACAATTACCAGTGC  
TCAAAGGAGTCAAATTACATTACACATAAGCGGCCGCTCTAGAAGTAGTG-  
GATCCCCCGGGCTGCAGGAATTGATATCAAGCTTATCGATACCGTTCGACCTCGA  
GGGGGGGCCCGGTACCCAGCTTTTGTCCCTTTAGTGAGGGTTAATT-  
GCGCGCTTGGCG-  
TAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACA  
CAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAG-  
TGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAA  
CCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTT-  
GCG-  
TATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGTTCCG  
CTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATAC-  
GGTTATCCACAGAATCAGGGGA-  
TAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAA  
AAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAG-  
CATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAA  
GATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAA-  
GCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGC  
CTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTG-  
TAGGTATCTCAG-  
TTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTCA  
GCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGG-  
TAAGACAC-  
GACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTAT  
GTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTA-  
GAAGGACAG-  
TATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAG  
CTCTTGATCCGGCAAACAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAA-  
GCAG-  
CAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGG  
GTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGAT-  
TATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAAT  
CTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAG-  
TGAGGCAC-  
CTATCTCAGCGATCTGTCTATTTGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTG

TAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGA-  
TACCGCGA-  
GACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGG  
GCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATT-  
GTT-  
GCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGC  
CATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGG-  
TATGGCTTCATTACAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCC  
ATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTT-  
GTCAGAAGTAAGTT-  
GGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTCA  
TGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAAC-  
CAAGTCATTCTGAGAA-  
TAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCG  
CGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAAC-  
GTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGAT  
GTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTAC-  
CAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATA  
AGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAA-  
GCATTTATCAGGGTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAA  
ATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC – 3'

Sequenz Spike-Variants:

5'-TTATGTGTAATGTAATTTGACTCCTTTGAGCACTGGTAATTGTTGAGTCACAT-  
ATGTCTG-  
CAAACCTTTGAAGTCTGCCTGTGATCAACCTATCAATTTGCACTTCAGCCTCAACTTT  
GTCAAGACGTGCAAGGATATCATTTAAAACACTTGAAATTGCACCAAATTT-  
GGAGCTAAGTT-  
GTTTAAACAAGCGTGTTTAAAGCTTGTGCATTTTGGTTGACCACATCTTGAAGTTTTC  
CAAGTGCCTTGTGTGGAAGAAAGTGAGTCTTGAATTTTGCCAATAGCAC-  
TATTAAATT-  
GGTTGGCAATCAATTTTTGGTTCTCATAGAGAACATTCTGTGTAACTCCAATACCAT  
TAAACCTATAAGCCATTTGCATAGCAACCAAATTAG-  
TAGACTTTTTAGGTCCACAAACAGTT-  
GCTGGTGCATGTAGAAGTTCAAAGAAAGTACTACTACTCTGTATGGTTGGTGACC  
AACACCATAAGTGGGTCGGAACTATATGATCG-  
TAAAGGAAAGTAACAATTTAAACCTG-  
CAACACCATTACAAGGTTTGTACCGGCCTGATAGATTTTCAAGTTGAAATGACATAT  
TCAAAGTGCAATTATTCGCACTAGAATAAACTCTGAACTCAC-  
TTTTCCATCCAACTTTTGTT-  
GTTTTTGTGTGGTAAACACCCAAAATGGATCATTACAAAATTGAAATTCACAGAC  
TTTAATAACAACATTAGTAGCGTTATTAACAA-  
TAAGTAGGGACTGGGTCTTCGAATCTAAAGTAGTACCAAAAATCCAGCCTCTTATT  
ATGTTAGACTTCTCAGTGGAAGCAAAATAAACACCATCATTAAATGGTAG-  
GACAGGGTTATCAAACCTCTTAGTACCATTGGTCCCAGAGATAGCATTAGCATGG  
AACCAAGTAACATTGGAAAAGAAAGGTAAGAACAAGTCCTGAGTTGAATGCAT – 3'

## 12 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort/ Datum

---

Unterschrift

## 13 Danksagung

Zum Abschluss dieser Forschungsarbeit möchte ich einigen Menschen aufrichtig danken. Zunächst gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. rer. nat. Eugen Domann und Frau Silke Zechel-Gran für die fortwährende Unterstützung bei der Erstellung dieser Dissertation. Das Aufzeigen von fachlichen Zusammenhängen, speziellen Details sowie Prof. Domanns ruhige und bedachte Art ließen mich in schwierigen Zeiten neuen Mut schöpfen, und brachten mit den entscheidenden Hinweisen dieses Projekt zu einem guten Abschluss.

Frau Zechel-Gran danke ich besonders für ihre warmherzige, tatkräftige Unterstützung während der Forschungsphase im Labor. Erst durch ihre unermüdliche fachliche Begleitung und ausgiebige Hilfe bei allen Problemen der labortechnischen Umsetzung wurde diese Forschungsarbeit möglich.

Genauso danke ich Herrn PD Dr. Mobarak Abu Mraheil. Er und seine Arbeitsgruppe haben mit dem „pCI-neo-Spike-SARS-CoV-2-2020“-Plasmid einen essentiellen Bestandteil des Versuchsaufbaus zur Verfügung gestellt. Ohne diesen hätten die Versuche, wie in dieser Arbeit beschrieben, nicht durchgeführt werden können.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Freundin, meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Neben der Tatsache, dass mir ein Studium der Humanmedizin ermöglicht wurde, konnte ich mich immer auf ihre emotionale und tatkräftige Unterstützung verlassen. Freude und Frust durfte ich während der Entstehung dieser Promotionsarbeit mit ihnen teilen. Herzlichen Dank dafür!