

Abwasser Monitoring aktueller Stand und offene Chancen

Folker.Meyer@uk-essen.de

Universitätsmedizin Essen
und
Fakultät für Informatik
Universität Duisburg-Essen

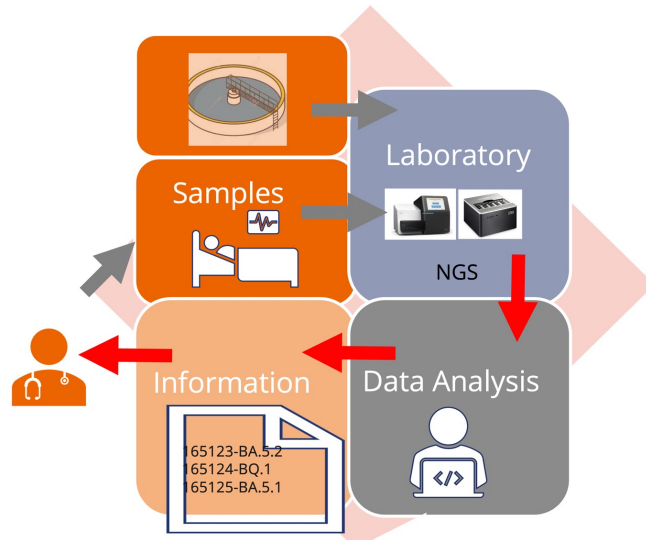


Wastewater Based Epidemiology

Abwasser basierte Epidemiologie

2 Ansätze

- qPCR (oder ddPCR)
- Sequenzierung

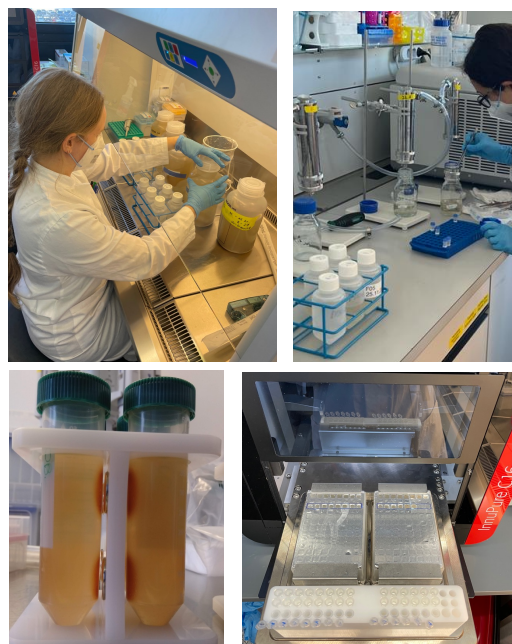


Von Abwasser zu SARS-CoV-2 Varianten

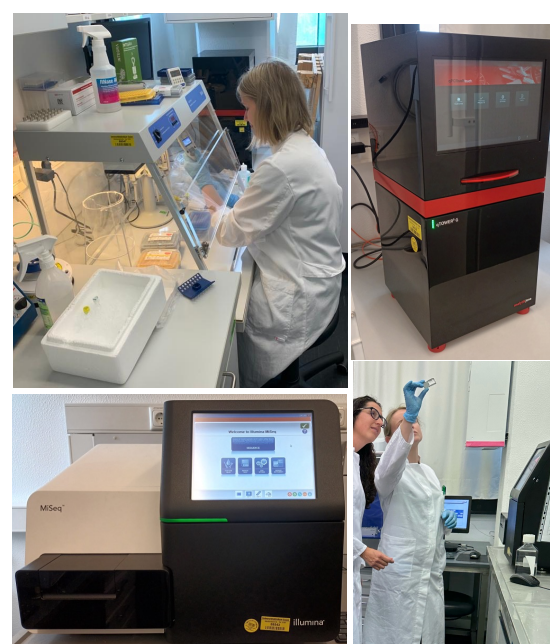
Probennahme / Pre-processing



Extraktion



Sequenzierung/Quantifizierung



Analyse



Kraiselburd et al, STOTEN, 2023



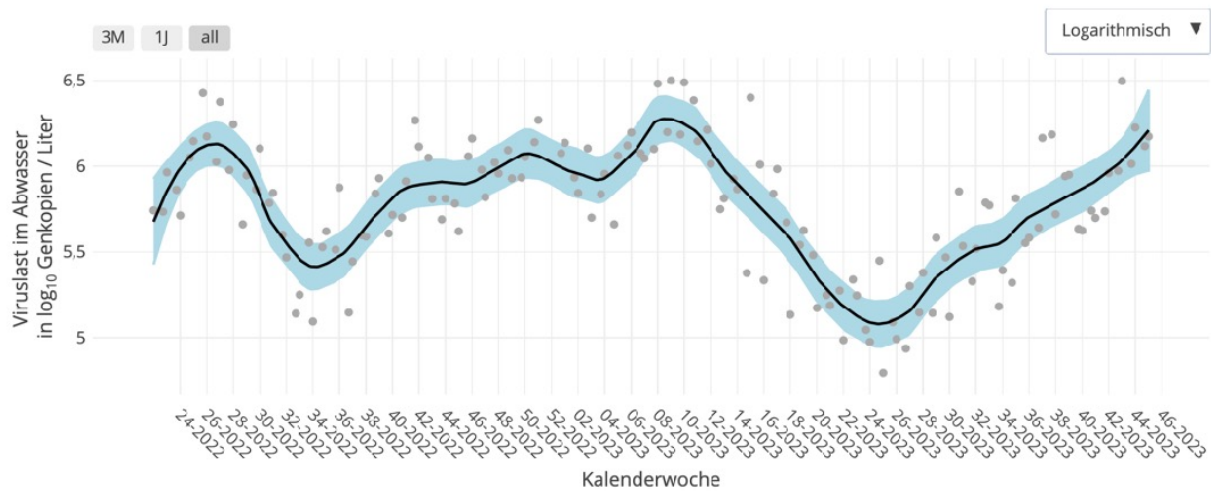
Im Rahmen von AMELAG (Abwassermonitoring für die epidemiologische Lagebewertung) wird unter anderem die Viruslast von SARS-CoV-2 im Abwasser überwacht. Aktuell fließen Daten aus 101 Standorten, d.h. Kläranlagen, in die Analysen ein. Für die Kalenderwoche 46 liegen Daten aus 34 Standorten vor. Daten weiterer Standorte werden nachgeliefert.

Eine Bewertung der COVID-19-Lage erfolgt in Zusammenschau mit anderen Indikatoren im Wochenbericht zu akuten respiratorischen Erkrankungen ([ARE-Wochenbericht](#)).

Der Verlauf der Viruslast im Abwasser wird für die einzelnen Standorte in [Abbildung 1](#) dargestellt. Gezeigt werden die an einem Standort gemessenen, mittels Zehnerlogarithmus transformierten, [normalisierten](#) Viruslasten (graue Punkte), die dazugehörige Ausgleichskurve (schwarze Linie, mittels LOESS-Methode geschätzt) sowie der Unsicherheitsbereich in der Schätzung der Ausgleichskurve, berechnet als punktweise 95%-Konfidenzintervalle (hellblauer Bereich).

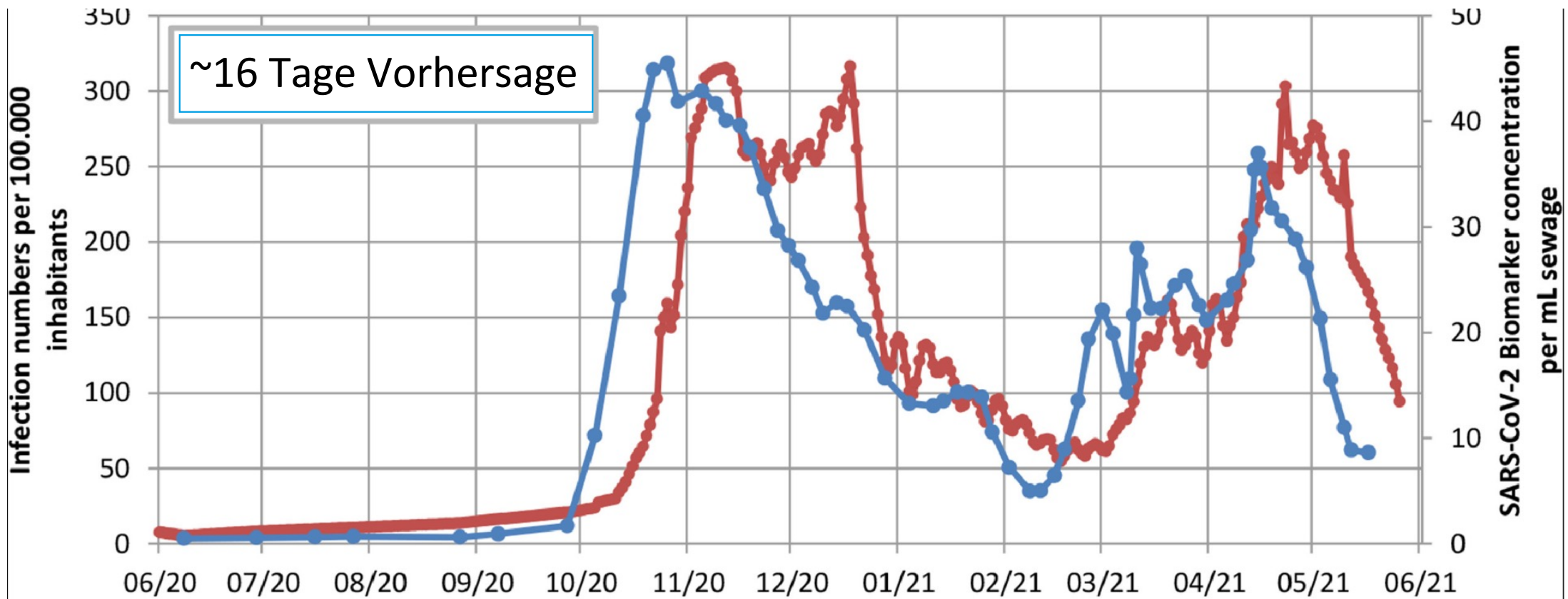
Standort:

Dinslaken



Quelle:
RKI

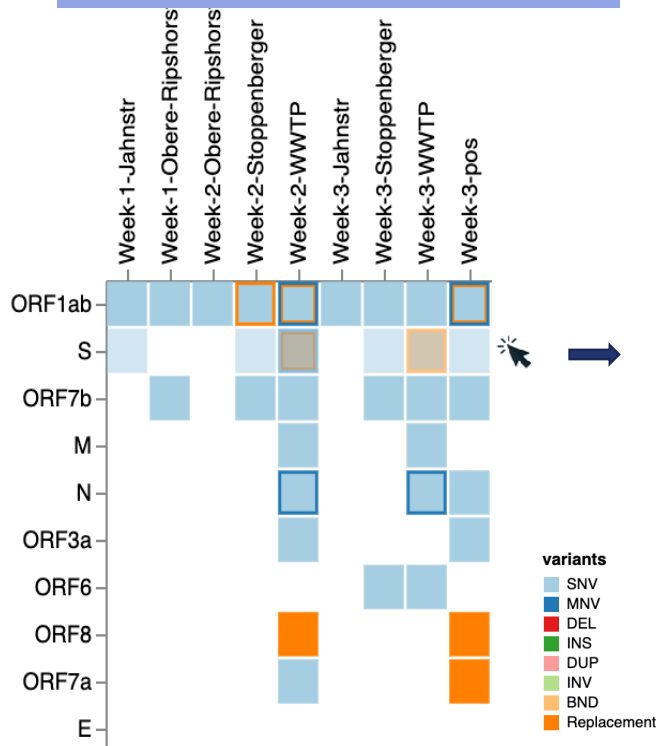
Abwasser sagt Trends vorher



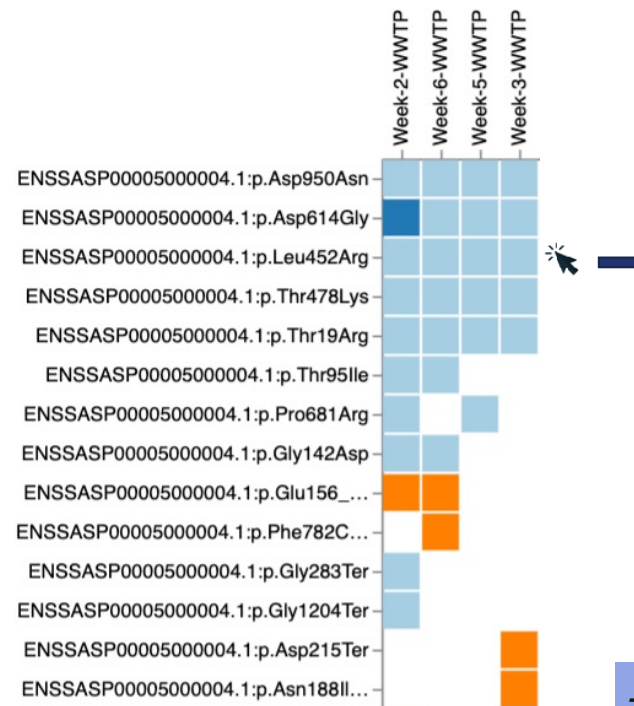
adapted from: Ho, et al Water Research 2022

Sequenzierung erlaubt Variantenerkennung

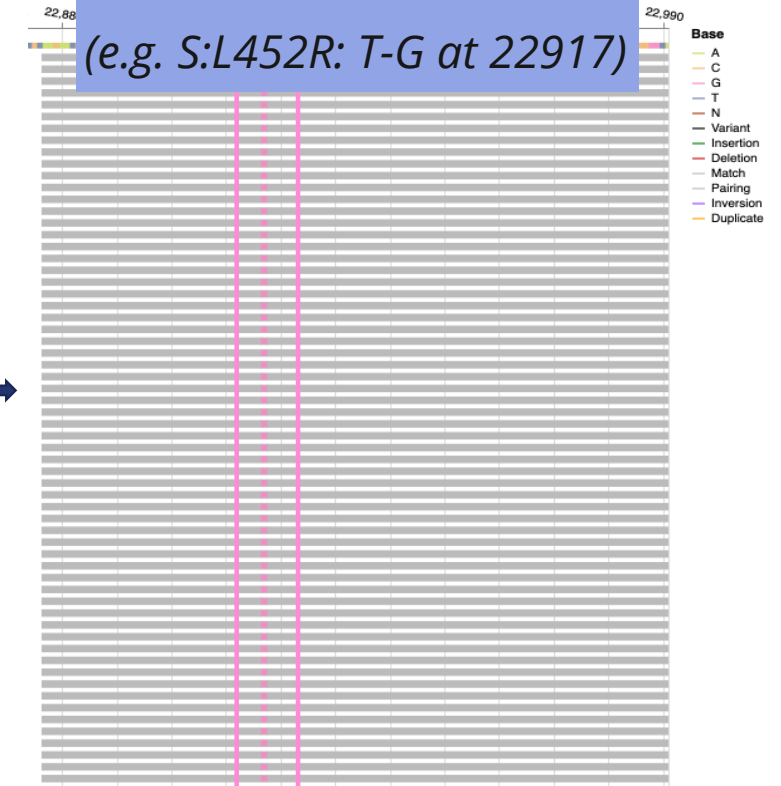
a) Vergleich gefundener Mutationen



b) Mutationen pro Gen



c) Individuelle mutation (e.g. S:L452R: T-G at 22917)



Kraiselburd et al, STOTEN, 2023

Zusammen mit letzter Folie: wir sehen neue Varianten vorab im Abwasser

WBEready – technische Verbesserungen und ÖGD Einbindung

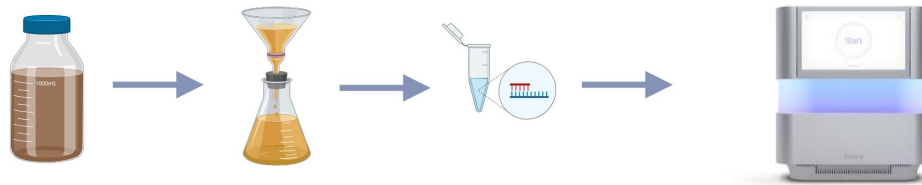
- SARS-CoV-2 Pandemie
- Abwassermonitoring
 - 03/2021 EU Mandat
- ESI-CorA (2022/23)
- AMELAG
- WBEready
 - VirenKit
 - AMRKit
- K.A.R.L (11/2024)

- qPCR primer
 - SARS, RSV A/B, Influenza A/B
 - AMR
- Evaluierung von qPCR vs. 16s vs. Shotgun
- ÖGD Anbindung

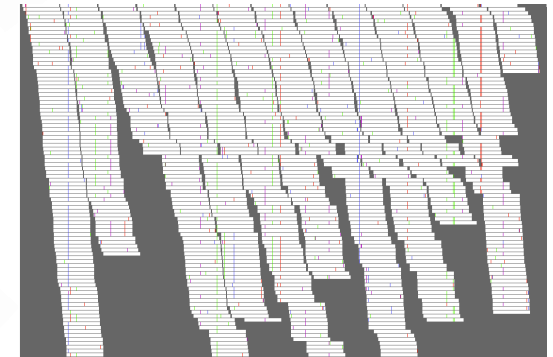


WBEready Besuch beim BMG

WW Surveillance: >150 Metagenome aus Abwasser im nördlichen Ruhrgebiet



	Anzahl	AMR
Basenpaare	2.5×10^{11}	-
Reads	17×10^9	14×10^7
Contigs	88×10^7	0.05 - 0.187%
Bins	25.000	-
MAGs	7000	-

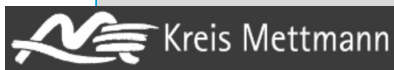


- 50.000 - 183.000 Contigs enthalten Resistenzgene
- Proben enthalten 375 - 880 verschiedene Resistenzgene
- Ohne Bias, keine Vorauswahl der Zielgene oder Organismen ("Discovery")

Beispiel: Monitoring Stadt Monheim, Kreis Mettmann

- Zeitraum: 19. August – 23. September
- ~45,000 Einwohner
- Kleine Mittelstadt
- 2305 Hektar Fläche
- 50/50 Bebauung und Landwirtschaft
- Trennung Regenwasser
- jeweils eine Probe pro Woche (24h Mischprobe)

- Kreis Mettmann:
 - Frau Dr. Susenburger
 - Herr A. Triebs



■ Meldungen im Zeitraum im Kreis

- 23 Covid-19 PatientInnen
- 2 MRE (Enterobacterales) PatientInnen
 - 1 Klebsiella Pneumoniae bestimmt
 - Resistenzen nur für einen Fall bestimmt

Vergleich 4 unterschiedlicher Verfahren

qPCR: 6 Zeitpunkte

- AMR → **WBEready AMR kit**
 - mPOX
 - Masern
 - SARS-CoV-2
 - RSV A/B
 - Influenza A/B
- WBEready Virus**
- 
Virologie
Universitätsklinikum Frankfurt

16S:

- Illumina MiSeq
- 86k-107k Sequenzen

Infektionsschutzgesetz § 7

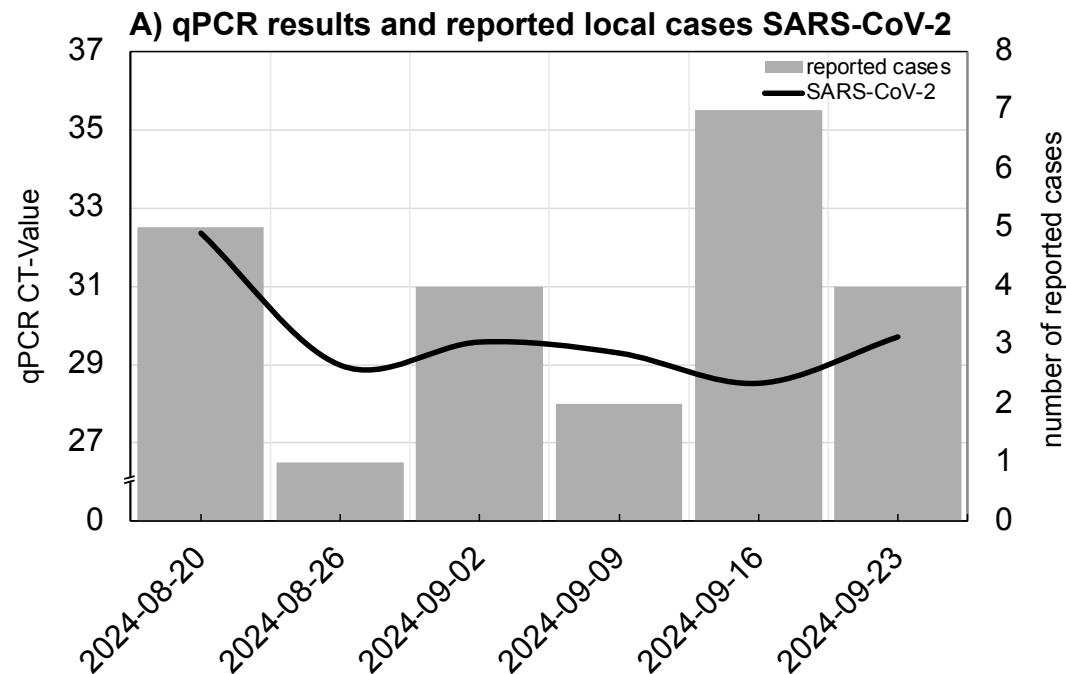
- Meldepflichtige Nachweise von Krankheitserregern

Shotgun Metagenom:

- Illumina NextSeq 2000
- 208 – 225 Millionen Sequenzen
- ~0.1% humane Sequenzen

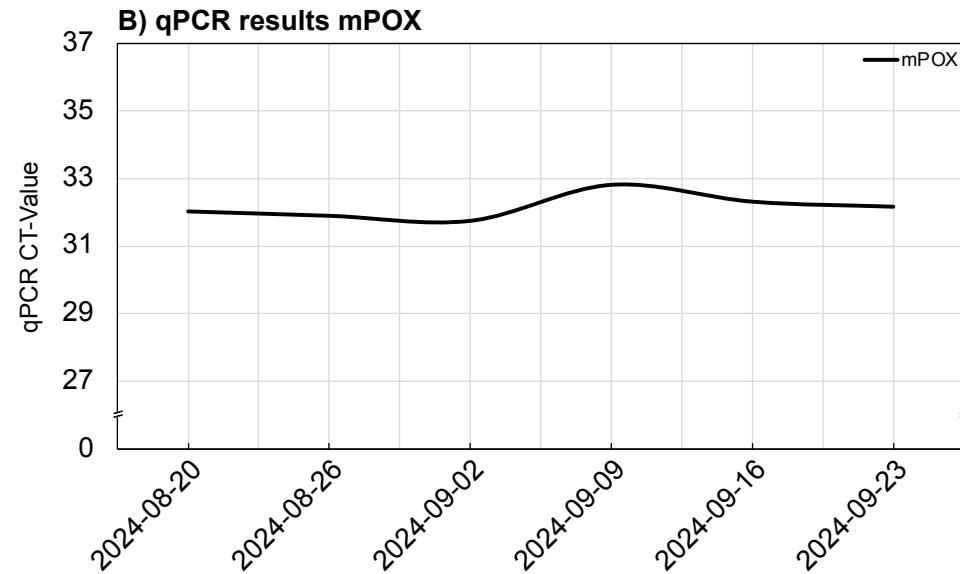
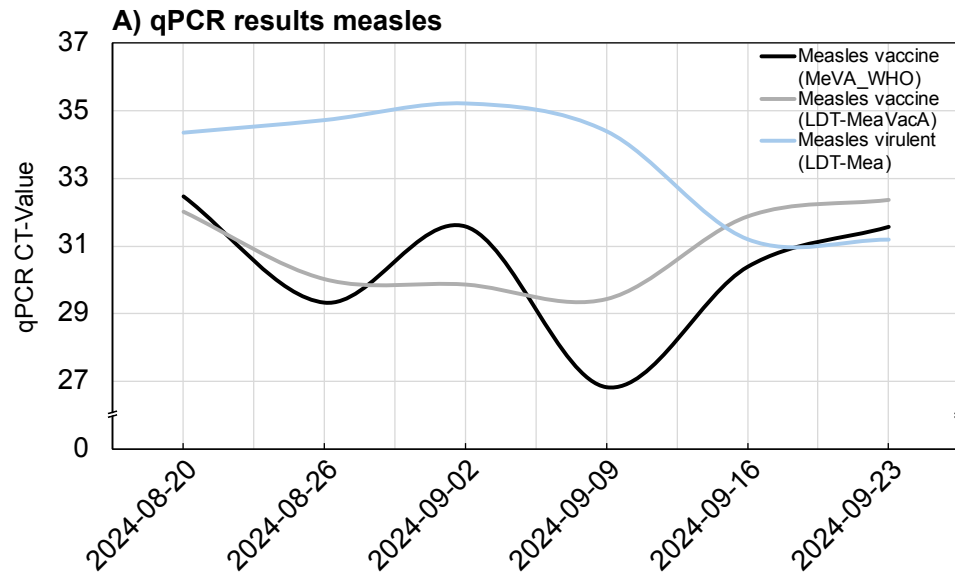
Keine Korrelation für qPCR von SARS-CoV-2 und gemeldeten Fällen

(WBEready Viren Kit)



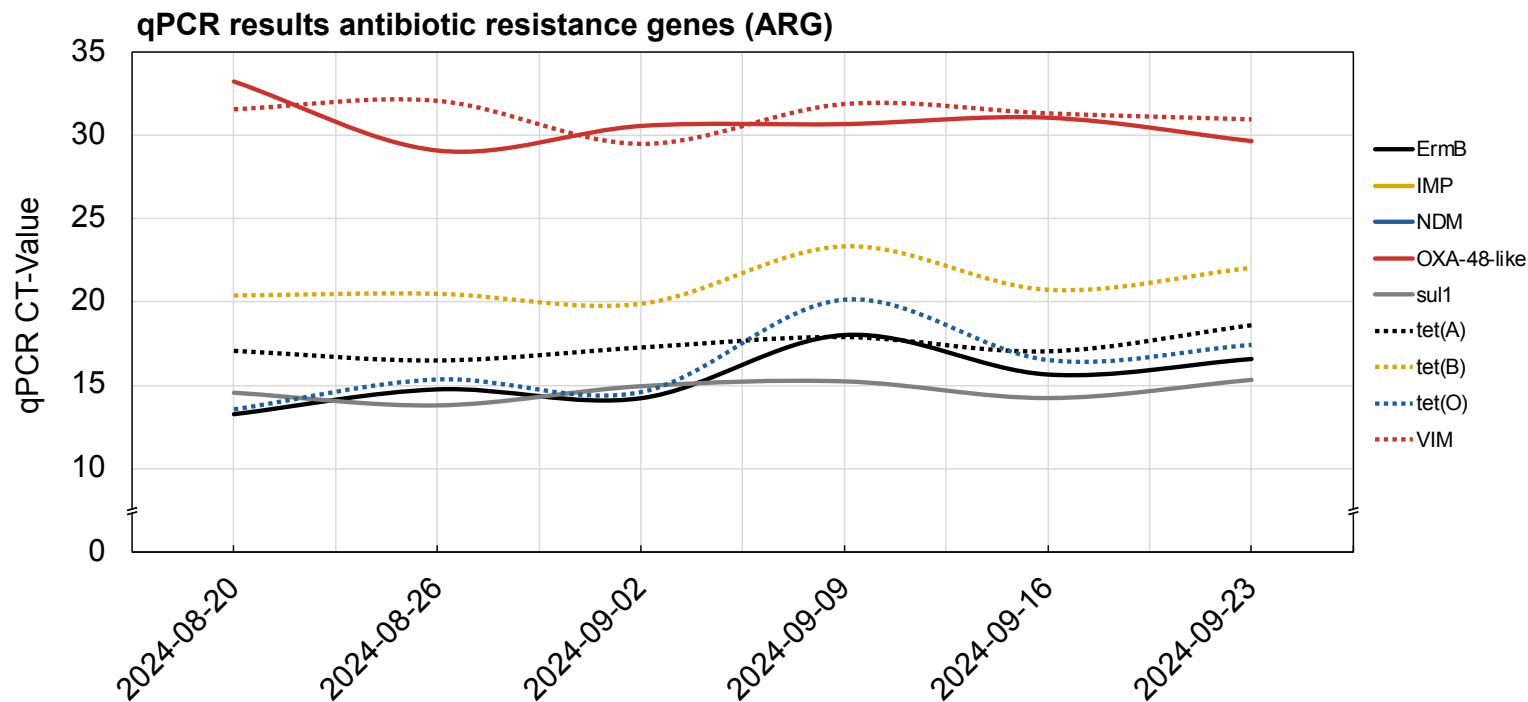
- SARS-CoV-2 gefunden
- keine Korrelation mit Meldungen
- nicht normalisiert

qPCR für Viren liefert Überraschungen



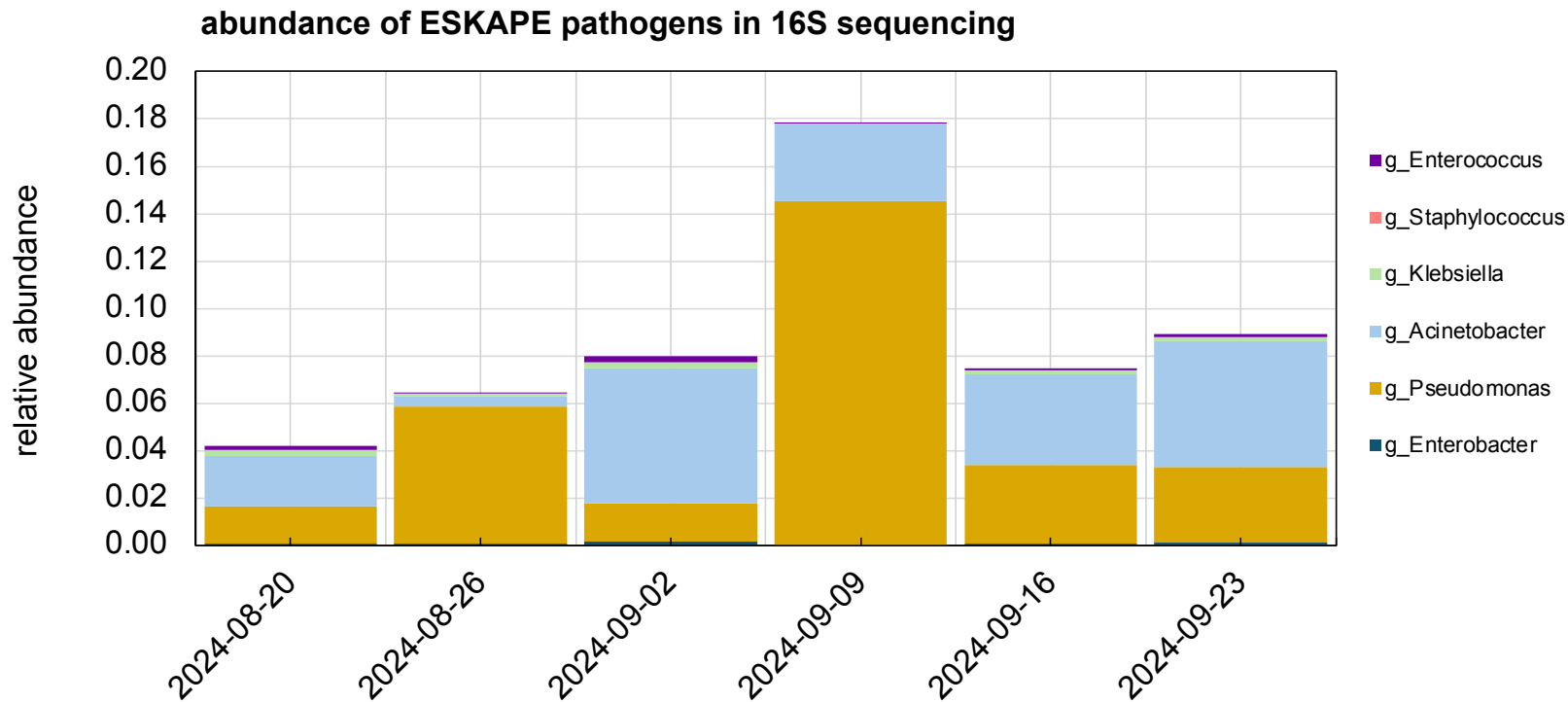
- **Gefunden:**
 - Masern
 - mPOX
 - HPV und EBV
- **Nicht Gefunden:**
 - Influenza A/B
 - RSV A/B

qPCR für Antibiotikaresistenzgene



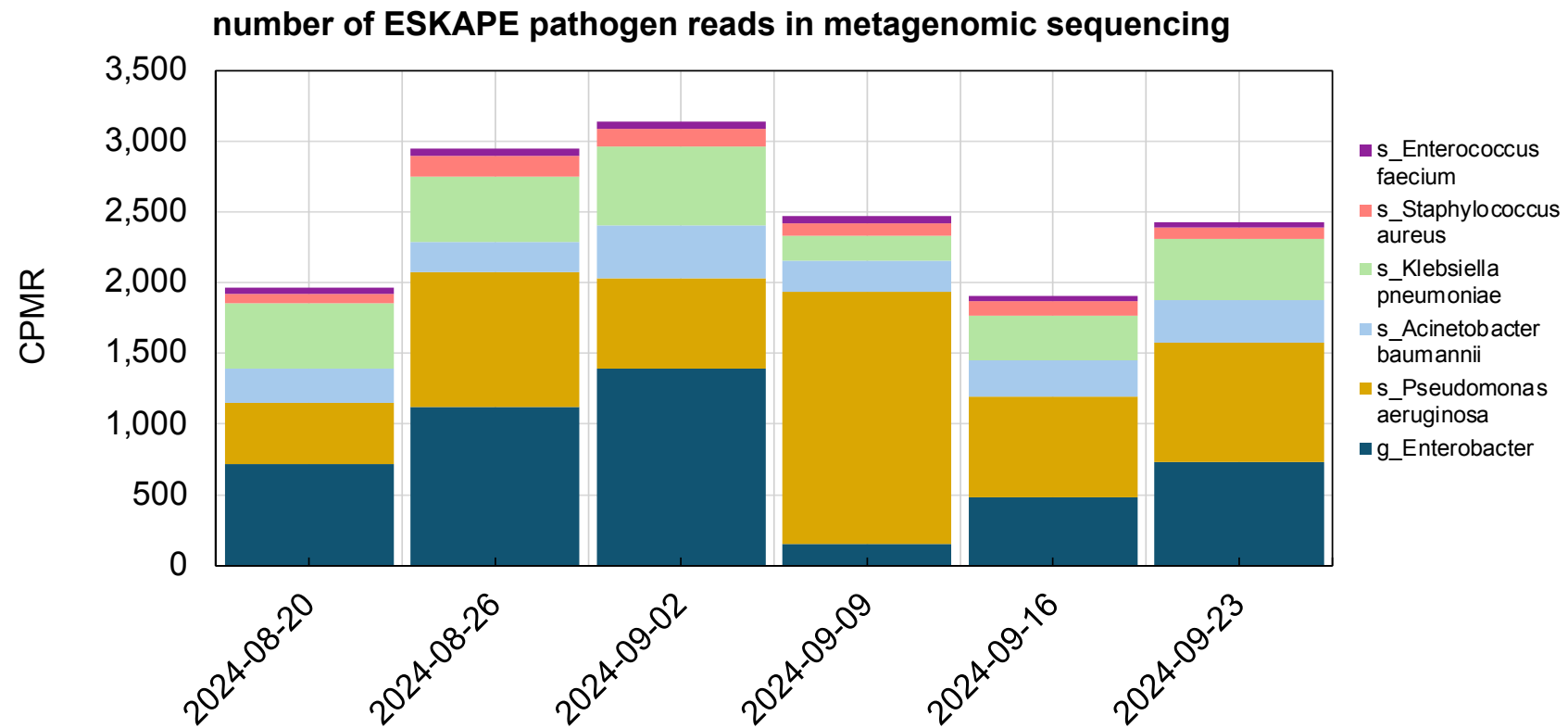
- OXA-48 ist relativ überraschend, eher KH
- keine Information über Spezies
- keine Information für Behandlung (neue Resistenz in Organismus X)

16S Sequenzierung für ESKAPE Pathogene



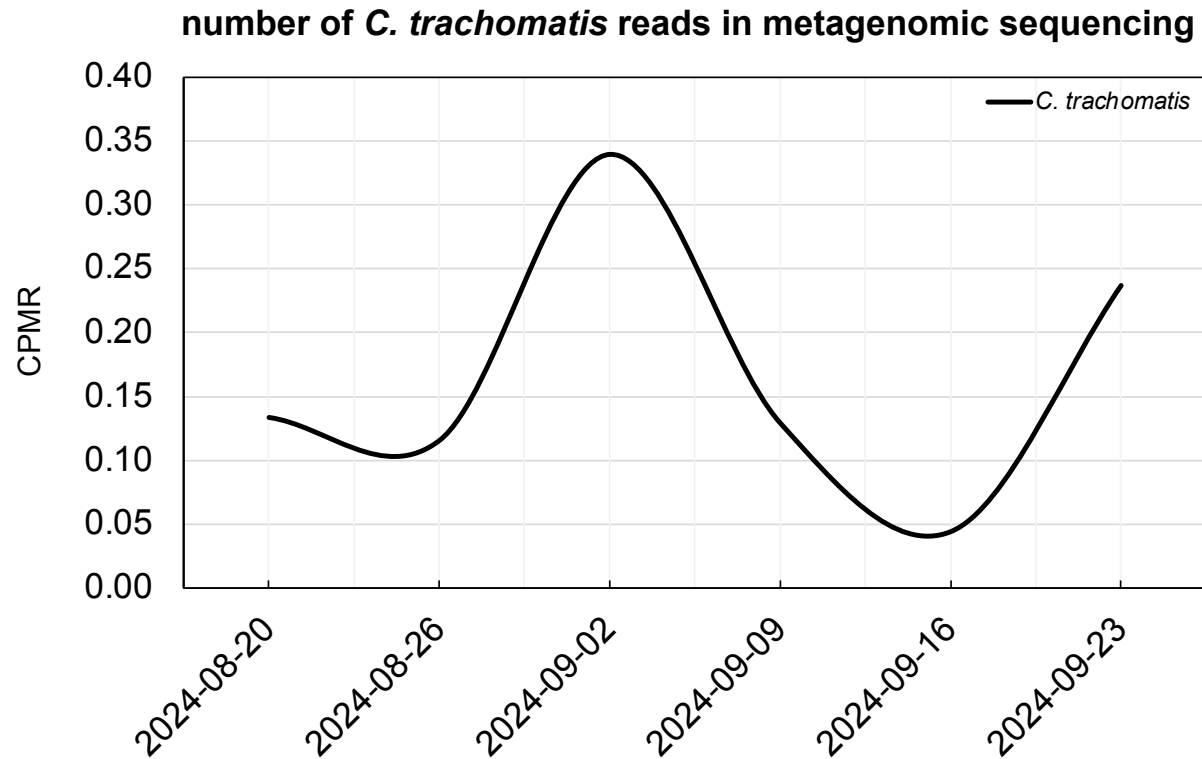
- zeigt gemeldete Klebsiellen
- Daten auf Genus Ebene
- keine Staphylokokken?

Shotgun Metagenomik für ESKAPE Pathogene



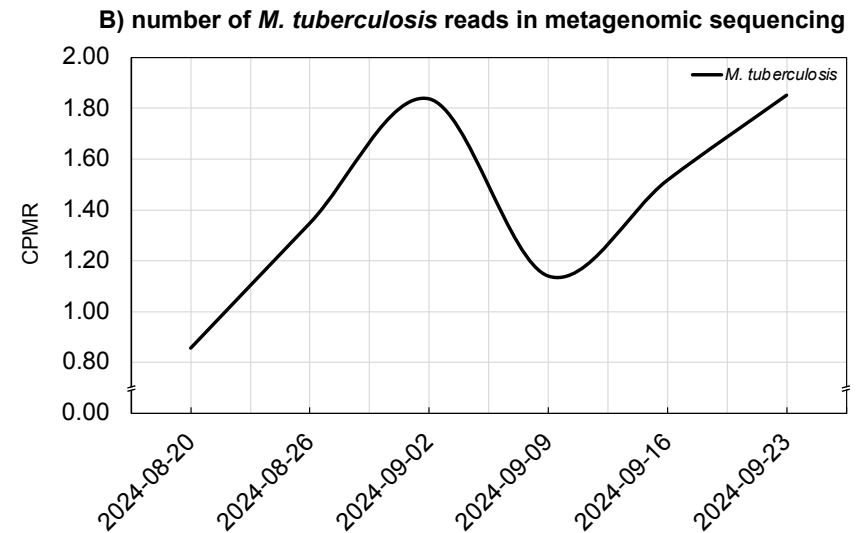
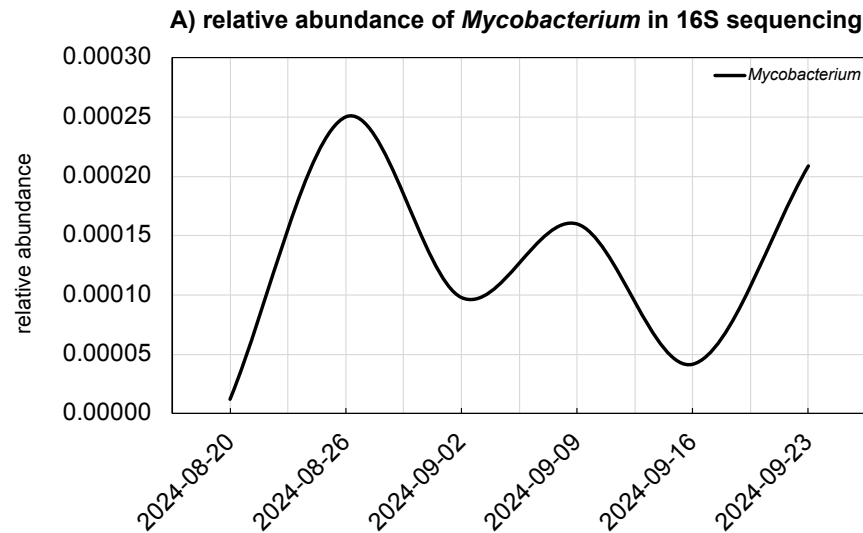
- Trend ist ähnlich
- auf Spezies Ebene
- Staphylokokken sind präsent

Beifang: *Clamychia trachomatis*



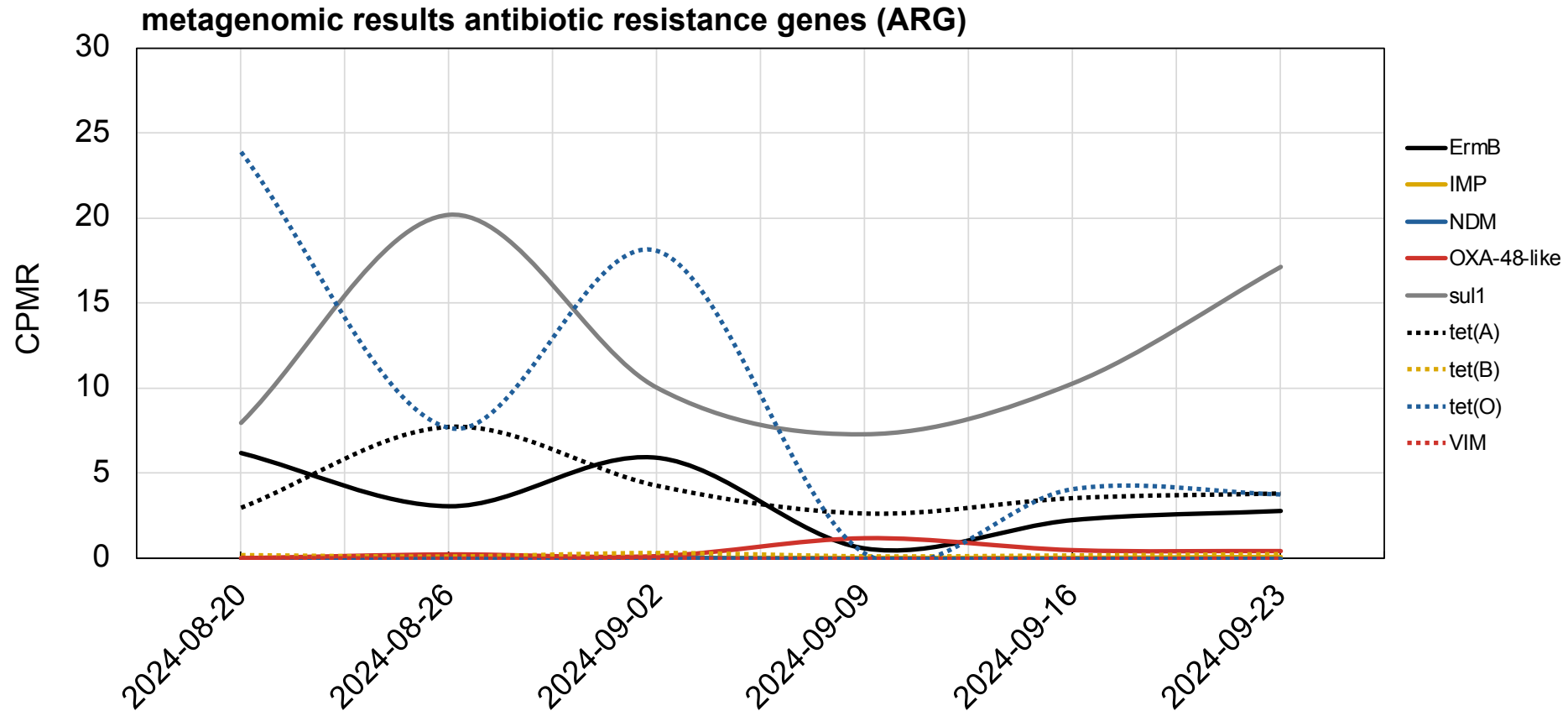
- STI gefunden
- obligat pathogen
- niedrige Abundanz aber eindeutig

Beifang: *Mycobacterium tuberculosis*



- *Mycobacterium tuberculosis* gefunden
- obligat pathogen
- meldepflichtig und beunruhigend

Resistenzgene mittels Shotgun Metagenomik



- NDM + IMP fehlen wieder
- ErmB + sul1 sind relativ häufig
- Trends bestätigt

Viele Spezies mit Resistenzen gefunden

reads mapped on ARGs	%reads mapped on ARGs	#ARGs	#different ARGs
220,952	0.10%	221	163
267,675	0.13%	229	165
236,029	0.11%	243	175
153,196	0.09%	84	69
109,615	0.08%	182	149
150,358	0.10%	203	153

- weniger ARGs als Durchschnitt
- ~0.1% aller Sequenzen sind ARGs
- aufwändige Analyse

Zu viele Spezies + AMR um es anzuzeigen

contigs_classification_with_WHO_drugs

sampleID	Contig	contig_len	level	classification	ARG_count	carbapenem	cephalosporin	fluoroquinolone	glycopeptide	vancomycin	macrolide	penicillin beta-lactam	ampicillin	methicillin	penicillin	rifamycin	rifa
WMMM2401	k141_1637302	28584	genus	Klebsiella	1	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
WMMM2401	k141_874246	6596	genus	Bifidobacterium	1	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	yes	yes
WMMM2401	k141_700326	10196	genus	Klebsiella	1	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
WMMM2401	k141_8687	10937	genus	Klebsiella	1	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
WMMM2401	k141_1579235	513	genus	Enterobacter	1	no	yes	yes	no	no	no	yes	yes	no	no	yes	yes
WMMM2401	k141_1984705	7176	genus	Klebsiella	2	yes	yes	yes	no	no	no	yes	yes	no	no	yes	yes
WMMM2401	k141_39342	592	species	Acidovorax sp. HMMF029	1	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
WMMM2401	k141_1057004	1513	species	Rheinheimera sp. MM224	1	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
WMMM2401	k141_1017155	1155	genus	Enterobacter	1	no	yes	yes	no	no	no	yes	yes	no	no	yes	yes
WMMM2401	k141_743897	2030	species	Roseburia sp. AM16-25	1	no	no	no	yes	yes	no	no	no	no	no	no	no
WMMM2401	k141_281559	3707	species	Rheinheimera faecalis	1	no	no	yes	no	no	no	no	no	no	no	no	no
WMMM2401	k141_560945	8869	species	Phocaeicola plebeius	1	no	no	no	no	no	yes	no	no	no	no	no	no
WMMM2401	k141_599296	1768	genus	Citrobacter	1	no	yes	yes	no	no	no	yes	yes	no	no	yes	yes
WMMM2401	k141_117028	1089	species	Bacteroides fragilis	1	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
WMMM2401	k141_1713921	793	genus	Klebsiella	1	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
WMMM2401	k141_1676844	5124	genus	Klebsiella	3	yes	yes	yes	no	no	yes	yes	no	no	no	no	no
WMMM2401	k141_497016	13867	species	Pseudomonas fluvialis	1	no	no	yes	no	no	no	no	no	no	no	no	no
WMMM2401	k141_359940	4344	genus	Geobacter	2	yes	yes	no	no	no	no	yes	yes	no	no	no	no
WMMM2401	k141_779770	801	species	Lachnospira sp. CLA-JM-H23	1	no	no	no	yes	yes	no	no	no	no	no	no	no
WMMM2401	k141_348436	11337	genus	Blautia	1	no	no	no	yes	yes	no	no	no	no	no	no	no
WMMM2401	k141_1291374	5972	genus	Klebsiella	1	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
WMMM2401	k141_1849154	5420	genus	Klebsiella	1	yes	no	no	no	no	no	no	no	no	no	yes	yes
WMMM2401	k141_2196910	1455	species	Escherichia coli	1	no	no	yes	no	no	no	no	no	no	no	no	no
WMMM2401	k141_74627	9197	genus	Klebsiella	1	no	yes	no	no	no	no	yes	yes	no	no	no	no
WMMM2401	k141_499397	1398	species	uncultured Tolomonas sp.	1	no	no	yes	no	no	no	no	no	no	no	no	no
WMMM2401	k141_1079532	919	species	Escherichia coli	1	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
WMMM2401	k141_1185173	9857	genus	Bacteroides	1	no	yes	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
WMMM2401	k141_1534541	5009	species	Escherichia coli	2	no	yes	yes	no	no	no	yes	yes	no	no	yes	yes
WMMM2401	k141_1884028	21222	species	Vescimonas coprocola	1	no	no	no	yes	yes	no	no	no	no	no	no	no
WMMM2401	k141_1397038	2014	genus	Bifidobacterium	1	no	no	no	yes	yes	no	no	no	no	no	no	no
WMMM2401	k141_1577572	1616	genus	Citrobacter	1	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
WMMM2401	k141_1324279	2381	species	Streptococcus suis	1	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
WMMM2401	k141_208971	3561	species	Pseudomonas alcaligenes	1	no	no	yes	no	no	no	no	no	no	no	no	no
WMMM2401	k141_557726	2231	species	Aliarcobacter cryaerophilus	1	no	no	no	no	no	yes	no	no	no	no	no	no
WMMM2401	k141_2093858	1777	genus	Citrobacter	1	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
WMMM2401	k141_779475	981	species	Bittarella massiliensis (ex Durand et al. 2017)	1	no	no	no	yes	yes	no	no	no	no	no	no	no
WMMM2401	k141_1615804	889	species	Thalassotalea crassostreae	1	no	no	yes	no	no	no	no	no	no	no	no	no
WMMM2401	k141_835644	738	species	uncultured Acetatifactor sp.	1	no	no	no	yes	yes	no	no	no	no	no	no	no
WMMM2401	k141_1648521	2789	genus	Klebsiella	1	yes	yes	no	no	no	no	yes	no	no	no	no	no

- Ausschnitt dargestellt
- viele ARGs in vielen Spezies

MAGs mit Resistenzen aus der WHO Liste

WHO group	taxonomy	resistance	20.08.2024	26.08.2024	02.09.2024	09.09.2024	16.09.2024	23.09.2024
critical								
	o_Enterobacterales	cephalosporin	3	5	4	0	2	1
	o_Enterobacterales	carbapenem	3	3	4	0	1	1
high	g_Salmonella	fluoroquinolone	2	3	3	0	0	0
	g_Shigella	fluoroquinolone	3	3	3	0	0	0
	s_Pseudomonas aeruginosa	carbapenem	0	0	0	0	0	1
	s_Neisseria gonorrhoeae	fluoroquinolone	0	0	0	0	0	0



Technisches Problem

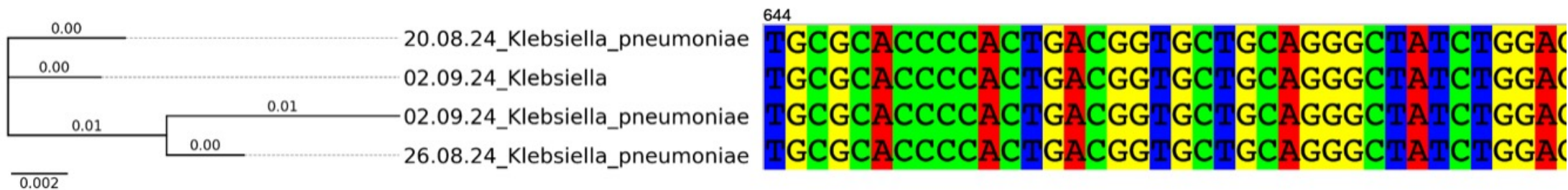
- MAG = *metagenome assembled genome*; pseudo-klonales Genom
- Erlaubt bessere Betrachtung
- Nur abundante Spezies in MAGs

- Reduktion der Komplexität
- 45 MAGs mit ARGs gefunden
- 2 von 4 WHO “critical” Erregern
- 4 von 7 WHO “high” Erregern

Klebsiella pneumoniae mit Carbapenemase gefunden

- *Klebsiella Pneumoniae* mit Carbapenem Resistenz gefunden
- Jeweils 1 Stamm aus den 6 Wochen ist sehr ähnlich
- Fund früher als Meldung nach IfSG

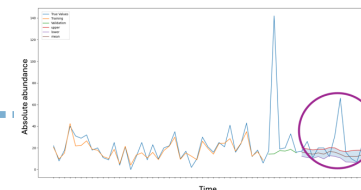
- Genotypen aus MAG rekonstruierbar
- Phylogenetische Analyse möglich
- "Aufblühen" erkennbar
- dienen als Referenzen



Daten der ersten drei Wochen

Zusammenfassung

- **alle** gemeldeten Viren und Bakterien gefunden und mehr
- **qPCR**
 - sehr informativ für Viren
 - weniger informativ für Resistenz
- **16S** zeigt Trends
- **Metagenom** zeigt
 - Resistenzen und Spezies
 - “Neue” Spezies
 - Genotypen, ermöglicht Vergleich
- Funde sind **deutlich früher** als Meldungen
- Nur qPCR kommt ohne Informatik aus
- **Offene Fragen**
 - Welche “Signalstärke” ist relevant?
 - Vergleich zu kulturbasierten Ansätzen
 - Wie soll der ÖGD damit umgehen?
 - Datenfluß zu KH Hygiene
 - KI-Modelle als Frühwarnsystem?
 - Vorhersagehorizont



The Partners



INUPH
INSTITUT FÜR
URBAN PUBLIC HEALTH

- Susanne Moebus
- Dennis Schmiede



- Jan Buer
- Jan Kehrmann
- Evelyn Heintschel von Heinegg

- Volker Linnemann

- Frank-Andreas Weber



- Christin Seifert
- Jörg Schlötterer



- Marek Widera
- Alexander Wilhelm

- Robert Heyer



- Ulf Dittmer
- Mirko Trilling
- Khanh Le-Trilling



- Ryan Aydelott
- Miriam Balzer
- Katharina Block
- Leah Consten
- Adrian Dörr
- Ann-Kathrin Dörr
- Jule Gosch
- Ivana Kraiselburd
- Simon Magin
- Shivohum Nishad
- Ricarda Schmithausen
- Alexander Thomas
- Julian Welling
- Josefa Welling

The Team



- Torsten Schmidt
- Alex Probst



- Jens Schoth
- Tina Schmidt



- Dag Harmsen



- Alexander Mellmann
- Frieder Schaumburg



- Ricarda Schmithausen
- Richard Egelkamp



aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages



Die Landesregierung
Nordrhein-Westfalen



Stiftung Zukunft NRW

.....

.....

AMR- Surveillance in Abwasser: verfügbare Technologien

Technology	phenotype	genotype	taxonomy	established	cost	sensitivity	discovery
Kultur	+	-	+/-	+++	\$	+	+/-
q/dPCR	-	-	-	+	\$	++	-
epicPCR	-	+	+	+/-	\$	++	-
Metagenomik	-	++	++	+	\$\$\$	-	++

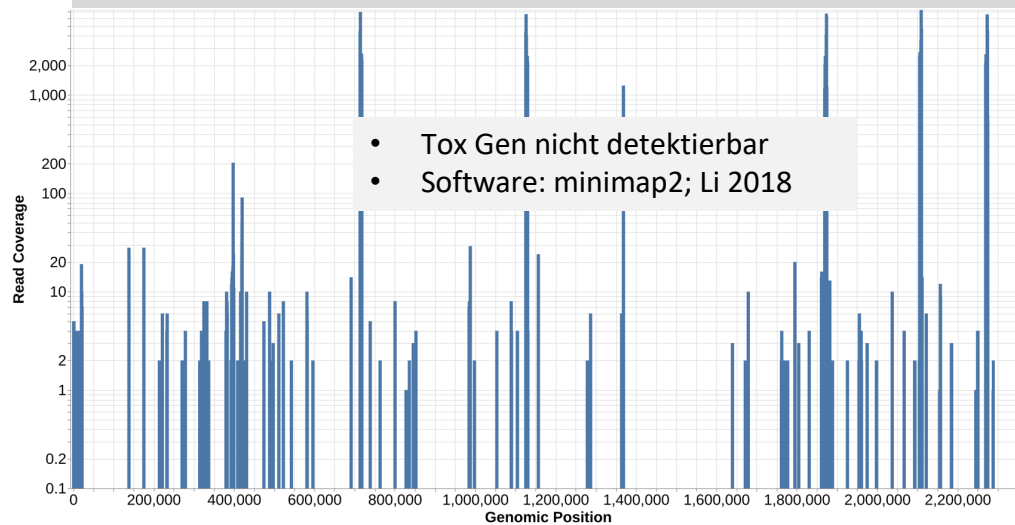
➤ Präsenz von AMR-Genen **in spezifischen Organismen** => klinisch/ÖGD relevante Information

- epicPCR kombiniert Sensitivität, taxonomische Informationen und Genotyp und ermöglicht die Entdeckung neuer AMR-Pathogen-Kombinationen
- Metagenomik ermöglicht die Entdeckung neuer AMR Genotype (Mutationen/Varianten), aber nur bei (relativ) abundanten Organismen

Unerwartete Funde: *Corynebacterium diphtheriae* in ALLEN Metagenomen gefunden

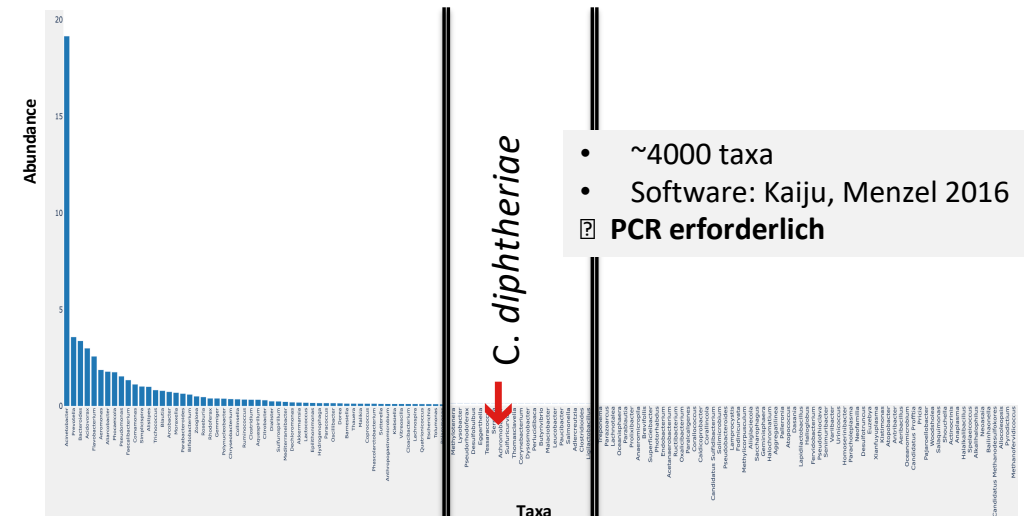
- Nach Frage aus GA: Suche nach *C. diphtheriae* in >150 Shotgun-Metagenomen aus KA im Nord-NRW
- alle Metagenome** sind positiv für Diphtherie (geringe Abundanz) => wichtig für ÖGD und Krankenhäuser
- Diphtherie aufgrund sehr niedriger Inzidenz in der Routine oft übersehen (Zitat Kliniker)
- Deutschlandweit 2021-> 2022/3 Anstieg um 750%

Genomabdeckung in einem Metagenom



Block ... Kraiselburd, in preparation

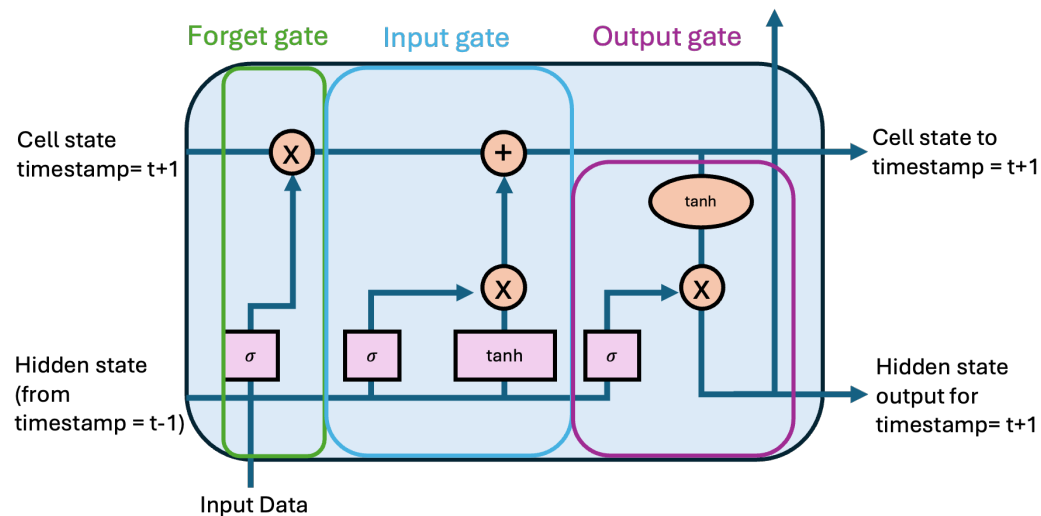
Diphtherie in geringer Abundanz



KI: Modell ermöglicht Frühwarnsystem

Erkennung von ungewöhnlichen Variationen bei der Routine-Surveillance von Bakterien im Abwasser durch LSTM-Modell

- Modelltraining mit Zeitseriendaten
 - Längere Serien verbessern Vorhersage
- Frühwarnsystem für den ÖGD?
- verstärkte Surveillance bei Abweichungen
- Fokus auf Pathogene



Vorhersageintervall für ein Pathogen

