



333.1	Bestimmung der Totalzellzahl und des quantitativen Verhältnisses der Zellen niedrigen bzw. hohen Nukleinsäuregehaltes in Süsswasser mittels Durchflusszytometrie
--------------	---

Inhaltsverzeichnis

I	Zusammenfassung	3
II	Methodenbeschreibung	4
1	Zweck	4
2	Symbole und Abkürzungen	4
3	Prinzip	4
4	Chemikalien	5
4.1	Fluoreszenzfarbstoff	5
4.2	Verdünnungsmedium für Fluoreszenzfarbstoff	5
4.3	Verdünnungsmedien für Wasserproben	5
4.4	Hüllflüssigkeiten für den Probenstrom (Sheath Fluids)	5
5	Geräte und Hilfsmittel	5
5.1	Durchflusszytometer	5
5.1.1	Geräteanforderungen	5
5.1.2	Autoloader	6
5.2	Filter für DMSO	6
5.3	Filter für Verdünnungsmedium Mineralwasser	6
5.4	Aufbewahrung der Farbstoffaliquote	6
5.5	Behältnisse für die Analyse an Partec-Geräten	6
6	Ausführung	6
6.1	Vorbereitung des Fluoreszenzfarbstoffes	6
6.2	Anfärben (Staining) der Proben	6
6.3	Probenverdünnung und Messbereiche	7
6.4	Probenanalyse	7
6.4.1	Kontrollen	7
6.4.2	Messung	7
7	Auswertung	8
7.1	Bestimmung der TZZ	8
7.2	Bestimmung des LNA/HNA Verhältnisses	8
8	Validierung	9
8.1	Anmerkungen zur Validierung	11
9	Literatur	27
10	Glossar	29
III	Änderungschronik	30

I Zusammenfassung

Titel	Bestimmung der Totalzellzahl und des quantitativen Verhältnisses der Zellen niedrigen bzw. hohen Nukleinsäuregehaltes in Süsswasser mittels Durchflusszytometrie
Messprinzip	Durchflusszytometrie
Methodennummer	333.1
Analyt	Totalzellzahl und mikrobiologische Grundstruktur einer Wasserprobe
Matrix	Süsswasser (z.B. Grundwasser, Quellwasser, Trinkwasser, Mineralwasser, Oberflächengewässer, etc.)
Kurzfassung	<p>Der Wasserprobe wird ein Fluoreszenzfarbstoff zugegeben, der während einer kurzen Inkubationszeit in alle Zellen eindringt und sich an deren DNA und RNA bindet.</p> <p>Die so vorbereitete Wasserprobe wird dem Durchflusszytometer zugeführt. Hier erfolgt die quantitative Erfassung der Totalzellzahl durch Aufnahme der Fluoreszenzsignale und die Analyse der mikrobiologischen Struktur der Probe durch Aufnahme der Fluoreszenzintensität und der Streulichtsignale kleiner (low nucleic acid, LNA) und grosser (high nucleic acid, HNA) mikrobieller Zellen (v. a. Bakterien).</p>
Messbereich	$1.0 \times 10^3 - 2.0 \times 10^5$ Zellen/ml (Proben mit höheren Zellkonzentrationen sind mittels der unter 4.3 erwähnten Medien zu verdünnen)
Nachweisgrenze	1.0×10^2 Zellen/ml [1;2]
Bestimmungsgrenze	1.0×10^3 Zellen/ml [1;2]
Validierungsangaben	Ja
Validierungskommentar	Externer und interner Vergleichstest
Methodenstatus	Empfohlen
Letzte Aktualisierung	2012
Basismethode	–
Bemerkungen	Methode: Eawag, Abt. Umweltmikrobiologie, Dübendorf

II Methodenbeschreibung

1 Zweck

Die Durchflusszytometrie erlaubt die quantitativ präzise und schnelle Detektion der Totalzellzahl einer Wasserprobe nach Anfärbung der Zellen mit einem Nukleinsäure-bindenden Fluoreszenzfarbstoff, sowie die Unterscheidung in kleine, schwach fluoreszierende (low nucleic acid, LNA) und grosse, stark fluoreszierende (high nucleic acid, HNA) Bakterienzellen, die im Bereich der natürlichen Wasser als auch im Bereich der Trinkwässer vorkommen können [5; 6; 7; 8; 9; 10; 11].

Der Haupteinsatzbereich der Methode erstreckt sich von der Trinkwasseraufbereitung, über Hauptverteilssysteme, bis hin zu Hausinstallationen [8; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18].

Die Methode dient der Erlangung mikrobiologischer Summenparameter und liefert detaillierte Informationen über den allgemeinen mikrobiologischen Zustand und zu eventuell vorliegenden Störungen, die durch weiterführende Untersuchungen genauer verifiziert werden können.

2 Symbole und Abkürzungen

DZ	Durchflusszytometrie, Durchflusszytometer
DMSO	Dimethylsulfoxid
G-FL	Grünfluoreszenz
R-FL	Rotfluoreszenz
SSC	Sidescatter (Seitwärtsstreulicht)
TZZ	Totalzellzahl
LNA	Low Nucleic Acid
HNA	High Nucleic Acid
{G1}	Gate 1
{G2}	Gate 2
{G3}	Gate 3

3 Prinzip

Die für die Anfärbung der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoffaliquot SYBR Green I versetzte, bei 37°C (± 2 °C) für mindestens 13 Minuten in Dunkelheit inkubierte Probe wird dem DZ zugeführt. Die Zellen werden während der Messung mittels hydrodynamischer Fokussierung vereinzelt durch eine von einem Laser (488 nm) durchstrahlte Glaskapillare geschleust. Jede den Laserstrahl passierende Zelle führt zu einer Lichtstreuung und zu einer Fluoreszenzlichtemission abhängig vom eingesetzten Fluoreszenzfarbstoff. Das entstehende Streulicht- bzw. Fluoreszenzlichtsignal wird über Filter zu Detektoren geleitet und dort erfasst. Durch die an das DZ gekoppelte Analysesoftware kann so jedem einzelnen Partikel, respektive jeder einzelnen Zelle, ein spezifisches Streulicht- und Fluoreszenzsignal zugeordnet werden. Dabei können kleinere, wenig Nukleinsäuren enthaltende (LNA) Zellen, bedingt durch die geringere Menge des in den Zellen an deren DNA/RNA bindenden Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green I, hinsichtlich der Intensität ihrer Grünfluoreszenz-Signale deutlich von grösseren (HNA) Zellen unterschieden werden. [19; 20]. Die durchflusszytometrische Analyse erlaubt die Detektion mehrerer Hundert Partikel bzw. Zellen pro Sekunde. Für die Analyse wird in der Regel ein sehr niedriges Probenvolumen benötigt, oftmals im Rahmen von weniger als einem Milliliter.

- Emissionsfilter: 520 – 530 nm (Grünfluoreszenz); 610 – 670 nm (Rotfluoreszenz)
- Minimum Partikelgrösse für SSC: 0,2 µm – 0,5 µm

5.1.2 Autoloader

Anmerkung: Die Nutzung von automatischen Probegebern für die jeweiligen Durchflusszytometer ist für diese Methode möglich.

- Robby (PAS III) Partec GmbH, Münster (D)
- Robby Well (Cyflow-Serie) Partec GmbH, Münster (D)
- CSampler BD Biosciences, 2350 Qume Drive, San Jose, California, USA, 95131

5.2 Filter für DMSO

- IC Millex – IG 0,2 µm Millipore, Kat.-Nr.: SLLGC25NS

5.3 Filter für Verdünnungsmedium Mineralwasser

- Millex GV 0,22 µm (niedriger Durchsatz) Millipore, Kat.-Nr.: SLGV033RB
- Millex GP 0,22 µm (hoher Durchsatz) Millipore, Kat.-Nr.: SLGP033RB

5.4 Aufbewahrung der Farbstoffaliquote

- Glasfläschchen 2 ml Supelco, Kat.-Nr.: 27267-U
- Septum 10mm, PTFE/Silicon Supelco, Kat.-Nr.: 27277
- Polypropylen-Schraubverschluss Supelco, Kat.-Nr.: 27271

5.5 Behältnisse für die Analyse an Partec-Geräten

- Röhrchen, 3,5 ml Sarstedt, Ref.-Nr.: 55.484

6 Ausführung

6.1 Vorbereitung des Fluoreszenzfarbstoffes

- Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I (10.000x) wird im Verhältnis 1:100 in 0,2 µm filtriertem DMSO verdünnt.

Anmerkung: Die vorbereiteten Farbstoffaliquote können bei -20°C über einen längeren Zeitraum in Glasfläschchen (siehe 5.4, bspw.) aufbewahrt werden. Beim Umgang mit dem Fluoreszenzfarbstoff sind Handschuhe zu tragen.

6.2 Anfärben (Staining) der Proben

- Der Probe wird das Farbstoffaliquot im Verhältnis 1:100 zugegeben (z.B.: 10 µl SYBR Green I 100x in DMSO (6.1) auf 1000 µl Probe).
- Die Probe mittels Vortex für 5 Sekunden mischen.
- Die angefärbte Probe wird mittels eines Heizblocks für mindestens 13 Minuten bei 37 °C (± 2 °C) in Dunkelheit inkubiert.
- Auf diese Weise können mehrere Proben gleichzeitig vorbereitet und nach erfolgter Inkubation im Dunkeln aufbewahrt werden.

Anmerkung: In Laboren werden Proben normalerweise bei 4 °C gelagert. Bei einem Probenvolumen von 1 ml werden durchschnittlich 3 Minuten benötigt, um die Kerntemperatur der Probe von 4 °C auf 37 °C zu erhöhen. Daraus setzt sich die Inkubationszeit von 13 Minuten zusammen (3 Minuten bis zum Erreichen der Kerntemperatur, 10 Minuten Inkubationszeit).

6.3 Probenverdünnung und Messbereiche

- Während des Messvorgangs darf die Obergrenze von ungefähr 1.000 counts/Sekunde (Anzahl/Sekunde) nicht überschritten werden. Der Wert ist von den jeweiligen Gerätespezifikationen abhängig. Dies entspricht einer Zellzahl in der zu messenden Probe – je nach spezifischem Probenhintergrundsignal – von ungefähr 1.0×10^5 – 2.0×10^5 Zellen/ml. Andernfalls ist die Probe mit einem der unter 4.3 aufgeführten Medien für Wasserproben zu verdünnen, bis die Obergrenze von 1.000 counts/Sekunde erreicht oder unterschritten wird.

Anmerkung: Es wird empfohlen, die Proben bei zu hohen Konzentrationen (Zellzahl/ml) vor Anfärbung und Inkubation zu verdünnen. Der Farbstoff bindet nicht irreversibel an der Zell-DNA und kann bei Verdünnung nach Anfärbung wieder aus der Zelle diffundieren, was eine Verschlechterung des Signals zur Folge hat.

6.4 Probenanalyse

6.4.1 Kontrollen

- Bei jeder Inbetriebnahme sollte die Funktionstüchtigkeit des Durchflusszytometers mittels der vom jeweiligen Hersteller zu diesem Zweck ausgewiesenen Kalibrationsbeads überprüft werden. Das durchführende Labor kann diese Überprüfung bei Bedarf verändern/erweitern.
- Es wird empfohlen, das jeweils verwendete Verdünnungsmedium (Punkt 4.3) als Blindprobe zu analysieren. Der Blindprobe ist das Farbstoffaliquot (siehe 6.1) zuzugeben und sie ist wie unter 6.2 beschrieben zu behandeln.

6.4.2 Messung

- Die in der Analysesoftware der in dieser Methodenschrift erwähnten DZ-Geräte „Trigger“ genannte Funktion muss auf den Parameter Grünfluoreszenz (G-FL) gesetzt werden.
- Die optimalen „Gain“-Einstellungen für Partec-Geräte müssen individuell für das zur Analyse verwendete Gerät ermittelt werden. Sind die optimalen Einstellungen gefunden, dürfen (und müssen) diese nicht mehr verändert werden.
- Die „log“-Einstellungen für Partec-Geräte sollten wie folgt gewählt werden:

	Möglichkeit 1 (empfohlen)	Möglichkeit 2
SSC	log 3	log 3
G-FL	log 3	log 4
R-FL	log 3	log 4

- Für Partec-Geräte (PAS III & Cyflow-Serie) sollte eine nominale Fließrate („Speed“) von ≤ 5 (entsprechend $\leq 5 \mu\text{l/s}$) gewählt werden.
- Für Accuri C6 Geräte sollte eine nominale Fließrate („Speed“) von $35 \mu\text{l/min}$ (entsprechend d. Stufe „Medium“ i. d. CFlow-Software) gewählt werden.

Anmerkung: Innerhalb der Software anderer als der hier erwähnten DZ-Hersteller könnten Funktionen wie „Gain“, „Trigger“, „log“ oder „Speed“ eventuell eine andere Bezeichnung tragen.

7 Auswertung

Für die Auswertung der Messungen werden folgende Signalkombinationen benötigt:

- G-FL/R-FL Densityplot
- G-FL/SSC Densityplot
- G-FL Histogramm

7.1 Bestimmung der TZZ

Die Bestimmung TZZ {G1} erfolgt unter Nutzung der Gating-Option im G-FL/R-FL Densityplot.

Die Software zeigt die jeweiligen Konzentrationsverhältnisse für {G1} in counts/*Volumeneinheit* (counts/ml oder counts/ μ l) an (*Abb. 1*).

7.2 Bestimmung des LNA/HNA Verhältnisses

Option 1:

Die Bestimmung der LNA {G2} und HNA {G3} erfolgt unter Nutzung der Gating-Option im G-FL/SSC Densityplot. Dabei wird wie folgt vorgegangen:

Es wird ein Gate-Transfer der TZZ {G1} auf den G-FL/SSC Densityplot durchgeführt.

→ Im G-FL/SSC Densityplot werden die Gates 2 {G2} und 3 {G3} definiert.

Durch die Software erfolgt die jeweilige Konzentrationsauswertung von {G2} und {G3} in counts/*Volumeneinheit* (counts/ml oder counts/ μ l). Die Gates {G2} und {G3} werden anschliessend prozentual berechnet (*Abb. 1*).

Option 2:

Die Bestimmung der LNA {G2} und HNA {G3} erfolgt unter Nutzung der Gating-Option im G-FL Histogramm. Dabei wird wie folgt vorgegangen:

Es wird ein Gate-Transfer der TZZ {G1} auf das G-FL Histogramm durchgeführt.

→ Im G-FL Histogramm werden die Gates 2 {G2} und 3 {G3} definiert.

Durch die Software erfolgt die jeweilige Konzentrationsauswertung von G2 und G3 in counts/*Volumeneinheit* (counts/ml oder counts/ μ l). Die Gates {G2} und {G3} werden anschliessend prozentual berechnet (*Abb. 1*).

Anmerkung 1: Für Geräte von Accuri wird empfohlen, die LNA/HNA-Bestimmung mittels Option 2 durchzuführen.

Anmerkung 2: Für detaillierte Informationen bezüglich der Bestimmung der TZZ und des LNA/HNA-Verhältnisses siehe [Methodenhandbuch](#).

Beispiel (Option 1 und Option 2 werden identisch berechnet. Die Ergebnisse variieren nur minimal.):

$$\text{LNA \{G2\}} = 5.05 \times 10^4 \text{ Zellen/ml}$$

$$\text{HNA \{G3\}} = 3.65 \times 10^4 \text{ Zellen/ml}$$

Prozentual:

$$\frac{\text{LNA \{G2\}}}{(\text{LNA \{G2\}} + \text{HNA \{G3\}})} \times 100 = \text{LNA in \%}, \text{ hier } 58\% \text{ LNA}$$

$$\frac{\text{HNA \{G3\}}}{(\text{LNA \{G2\}} + \text{HNA \{G3\}})} \times 100 = \text{HNA in \%}, \text{ hier } 42\% \text{ HNA}$$

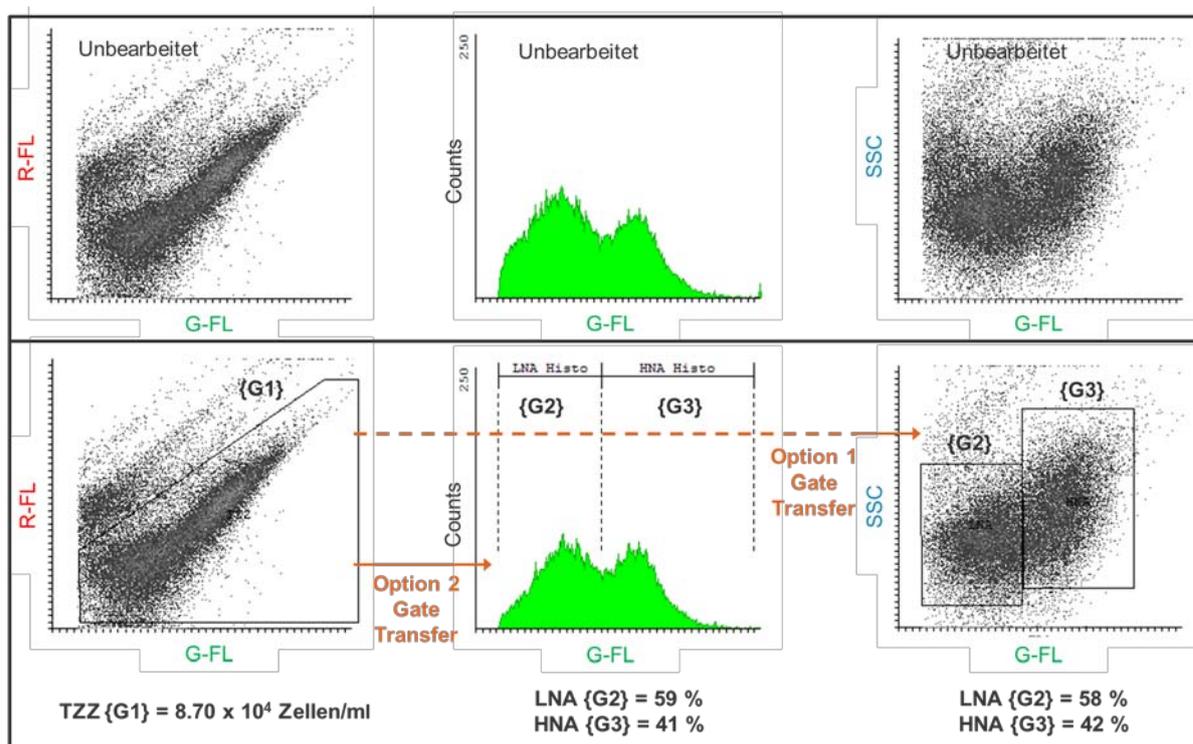


Abbildung 1: Beispiel zur Bestimmung der TZZ {G1} im G-FL/R-FL Densityplot. *Option 1*: Gate-Transfer vom G-FL/R-FL Densityplot {G1} auf den G-FL/SSC Densityplot. *Option 2*: Gate-Transfer vom G-FL/R-FL Densityplot {G1} auf das G-FL Histogramm. Beide Optionen dienen der Ermittlung der LNA {G2}- und HNA {G3}-Zahlen.

8 Validierung

Die Validierung erfolgte nach den Vorgaben des BAG [21].

Angaben zum Messbereich, zur Nachweis- und Bestimmungsgrenze sowie zur Richtigkeit finden sich in der Zusammenfassung zur Methode. Die nachfolgend im Detail dargestellte Validierung hatte zum Ziel nachzuweisen, dass das Verfahren bei Anwendung in verschiedenen Laboratorien zu vergleichbaren Ergebnissen führt. Zu diesem Zweck wurde ein externer Vergleichstest unter aktiver Teilnahme und Anleitung der Eawag, Abteilung Umweltmikrobiologie, Dübendorf, durchgeführt und die Vergleichspräzision (R), die Wiederholpräzision (r) sowie die Messunsicherheit (R-STABW) ermittelt.

Die Finanzierung des Validierungsprojektes erfolgte durch die Kommission für Technologie und Innovation (KTI), Projektnummer 12121.1 PFIW-IW. Die Finanzierung des Projektes zur Ausarbeitung der Methode für das SLMB erfolgte durch den Forschungsfond Wasser (FOWA) des Schweizerischen Vereins des Gas- und Wasserfaches (SVGW), Projektnummer 5221.00532.

Gruppe 1

Probanden: 7 externe, 4 interne

Parameter: Analyse der Bead-Zahl, der Totalzellzahl und des LNA/HNA-Verhältnisses in Triplikaten von Wasserproben

Probenbehandlung:

- Speziell für den Vergleichstest wurden die Proben mittels Glutaraldehyd (5.6 M, 50 %) fixiert.
- Verdünnung 1:1000 (1 ml Glutaraldehyd auf 1000 ml Probe). Die auf diese Weise stabilisierten Wasserproben können ohne Kühlung versendet werden.
- Alle 45 Proben wurden direkt nach der Probennahme zur Kontrolle analysiert, um den unbehandelten Ist-Zustand zu erfassen. Eine Kontroll-Messung der mittels Glutaraldehyd fixierten Proben ergab, dass die Fixierung keinen Einfluss auf die TZZ bzw. auf das LNA/HNA-Verhältnis hat.

- Die Proben wurden in 40 ml-Gläser mit Teflon-Dichtung abgefüllt und an die (in *Tab. 2* aufgeführten) externen Probanden versendet.
- Die 40 ml-Gläser wurden zuvor bei 500 °C für 3 Stunden ausgebrannt. Während der Lieferzeit wurden die Referenzproben im Eawag-Labor bei Raumtemperatur gelagert, um für alle Proben möglichst identische Versuchsbedingungen zu schaffen.

Gruppe 2

Probanden: 2 externe, 2 interne

Parameter: Analyse der Bead-Zahl, der Totalzellzahl und des LNA/HNA-Verhältnisses in Triplikaten

Probenbehandlung:

- Es erfolgte eine Kühlung der Proben auf 8 °C.
- Alle 20 Proben wurden zur Kontrolle direkt nach der Probennahme analysiert, um den Ist-Zustand zu erfassen.
- Die Proben wurden anschliessend in 40 ml-Gläser mit Teflon-Dichtung abgefüllt und zusammen mit Kühllakkus an die (in *Tab. 2* aufgeführten) externen Probanden versendet.
- Die 40 ml-Gläser wurden zuvor bei 500 °C für 3 Stunden ausgebrannt.
- Während der Lieferzeit wurden die Referenzproben im Eawag-Labor ebenfalls bei 8 °C gelagert, um für alle Proben möglichst identische Versuchsbedingungen zu schaffen.

Tabelle 1: Auflistung aller im Vergleichstest versendeten Proben bezüglich ihrer Herkunft, Totalzellzahlen und LNA/HNA-Verhältnisse. MW = Mittelwert; n = Anzahl der Messungen.

Probenherkunft	Bezeichnung	MW Bead-Zahl & MW TZZ in Counts/ml (n=3)	MW LNA in % (n=3)	MW HNA in % (n=3)
Kalibrations-Beads Partec (d = 3 µm) REF: 05-4018	Beads (3 µm)	1.08 x 10 ⁴	-	-
Grundwasser Hardhof Zürich	Probe 1	3.43 x 10 ⁴	61	39
Quellwasser Hardhof Zürich	Probe 2	6.60 x 10 ⁴	51	49
Trinkwasser nach Aufbereitung Lengg Zürich	Probe 3	1.13 x 10 ⁵	48	52
Trinkwasser Oetwil a. See (Hausinstallation nach Spülung)	Probe 4	1.35 x 10 ⁵	36	64

Anmerkung: Die Kalibrations-Beads wurden für den Vergleichstest verdünnt, gut gemischt und aus dieser Referenzlösung auf die einzelnen Probengläser verteilt. Die Beads dienten dem Vergleich und der Absicherung der Gerätetauglichkeit. Keine der im Vergleichstest ausgewählten Wasserproben enthielt einen Netzschutz (z.B. Chlor), noch wurden die Proben nach ihrer Aufbereitung anderen Desinfektionsschritten (z.B. UV) unterzogen. Des Weiteren musste für die Analyse keine Verdünnung des Probenmaterials durchgeführt werden. Den Probanden wurden Aliquote der Originalprobe abgefüllt, um sicher zu stellen, dass die Zellzahl in allen Proben weitestgehend identisch ist.

Tabelle 2: Auflistung der am Vergleichstest teilnehmenden Institutionen, der Anzahl der aktiven Probanden und der verwendeten Geräte. Die einzelnen Geräte sind zwecks eindeutiger Zuordnung der Daten nummeriert (in Klammern).

Teilnehmende Institutionen Gruppe 1	Abkürzung	Anzahl Probanden	Geräte
Eidgenössische Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und Gewässerschutz	Eawag	4	Partec SL (1) Partec Space (2) Partec Space (3)
Kantonales Labor Zürich	KLZ	1	Accuri C6 (4)
Wasserversorgung Zürich	WVZ	1	Partec Space (5)
Bundesamt für Gesundheit	BAG	1	Partec ML (6)
Labor Spiez	-	1	Partec SL (7)
Technische Universität Hamburg-Harburg / DVGW Forschungsstelle	TUHH-DVGW	1	Partec SL (8)
European Aeronautic Defense and Space Company / Innovation Works	EADS / IW	1	Partec SL (9)
Technische Universität Dresden / Professur Wasserversorgung	TU Dresden	1	Accuri C6 (10)
Teilnehmende Institutionen Gruppe 2			
Eidgenössische Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und Gewässerschutz	Eawag	2	Partec SL (1) Partec PAS III (11)
Industrielle Werke Basel	IWB	1	Partec SL (12)
Bachema AG	-	1	Partec SL (13)

8.1 Anmerkungen zur Validierung

Die Werte des im Zuge der Validierung durchgeführten Vergleichstests beweisen, dass die Durchflusszytometrie eine robuste Methode darstellt, um den mikrobiologischen Zustand in Süß- und somit auch im Trinkwasser zu erfassen und abzubilden. Die Durchflusszytometrie liefert dieses Zustandsbild detailliert und schnell, basierend auf einem mikrobiologischen Summenparameter.

Der Vergleichstest erfolgte unter Anleitung und aktiver Teilnahme der Eidgenössischen Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und Gewässerschutz (Eawag), Abteilung Umweltmikrobiologie, Dübendorf. Das zuständige Eawag-Labor zeichnete ausserdem für die Probennahme, die Probenaufbereitung und den Versand des Probenmaterials an die Versuchsteilnehmer verantwortlich. Die Zahl der insgesamt 15 Probanden verteilte sich auf zehn unterschiedliche Institutionen; ansässig sowohl in der Schweiz, als auch in Deutschland.

Es kamen 13 Durchflusszytometer zum Einsatz. Im Verlauf des Vergleichstests wurden die Probanden in zwei Gruppen aufgeteilt.

Gruppe 1 erhielt mittels Glutaraldehyd fixierte Proben, Gruppe 2 erhielt Proben ohne Fixierung, die gekühlt (~ 8 °C) versendet wurden.

Die zu ermittelnden Parameter für beide Gruppen waren die Bead-Zahl, die TZZ und das LNA/HNA-Verhältnis.

Bei einer Gesamtmenge von 655 generierten Datenpunkten (inkl. der LNA/HNA-Werte) wiesen die im Vergleichstest gewonnenen Werte sehr geringe Varianzen auf.

Die relative Standardabweichung der Probe „Beads“ lag in Gruppe 1 bei 6.74 % (Abb. 2) und bei Gruppe 2 bei 3.33 % (Abb. 4). Für die Wasserproben lag der Mittelwert der relativen Standardabweichungen bezüglich der TZZ in Gruppe 1 (Abb. 2) bei 6.88 % und in Gruppe 2 (Abb. 4) bei 5.72 %.

Hier die Werte der relativen Standardabweichung im Einzelnen:

Gruppe 1, TZZ (siehe Abb. 2):

„Probe 1“ = 4.56 %, „Probe 2“ = 7.97 %, „Probe 3“ = 6.92 % und „Probe 4“ = 8.08 %

Gruppe 2, TZZ (siehe Abb. 4):

„Probe 1“ = 4.76 %, „Probe 2“ = 11.43 %, „Probe 3“ = 3.37 % und „Probe 4“ = 3.33 %

Für die Bestimmung der LNA- und HNA-Zahlen in Gruppe 1 ergab sich aus den Datenpunkten eine mittlere relative Standardabweichung von 12.53 % bezüglich der LNA-Zellzahlen und eine mittlere relative Standardabweichung von 16.16 % für die Zahl der HNA-Zellen.

Hier die Werte der relativen Standardabweichung im Einzelnen (siehe Abb. 3):

Gruppe 1, LNA-Zahlen:

„Probe 1“ = 7.81 %, „Probe 2“ = 13.68 %, „Probe 3“ = 15.22 % und „Probe 4“ = 13.42 %

Gruppe 1, HNA-Zahlen:

„Probe 1“ = 17.73 %, „Probe 2“ = 14.44 %, „Probe 3“ = 15.86 % und „Probe 4“ = 16.85 %

In Gruppe 2 wurden ähnliche Werte generiert. So betrug der Mittelwert der relativen Standardabweichungen für die Ermittlung der LNA-Zahlen 9.79 % und 12.53 % für die Ermittlung der HNA-Zahlen.

Hier die Werte der relativen Standardabweichung im Einzelnen (siehe Abb. 5):

Gruppe 2, LNA-Zahlen:

„Probe 1“ = 8.70 %, „Probe 2“ = 10.17 %, „Probe 3“ = 10.15 % und „Probe 4“ = 10.14 %

Gruppe 2, HNA-Zahlen:

„Probe 1“ = 10.00 %, „Probe 2“ = 23.15 %, „Probe 3“ = 5.56 % und „Probe 4“ = 11.40 %

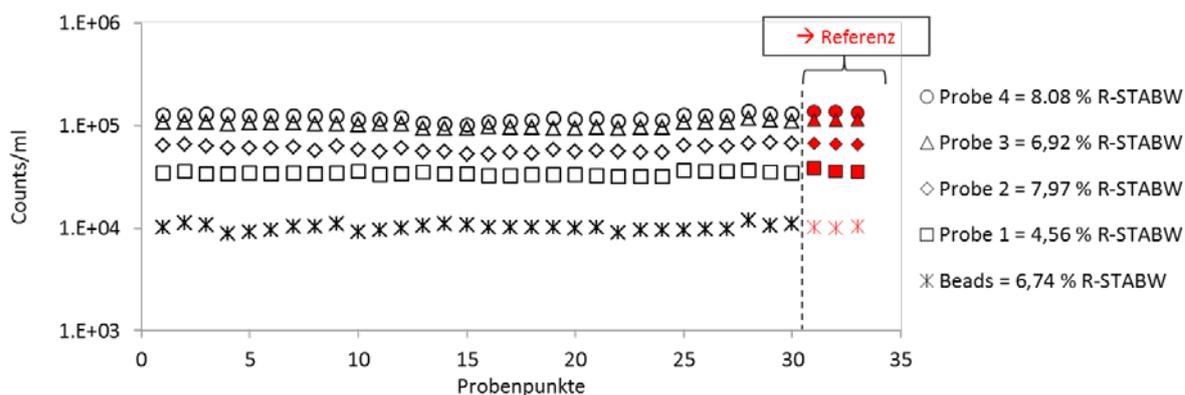


Abbildung 2: Übersicht der im Vergleichstest produzierten Resultate der Gruppe 1 (fixierte Proben) zu den Bead-Zahlen bzw. Totalzellzahlen und deren relative Standardabweichungen (R-STABW).

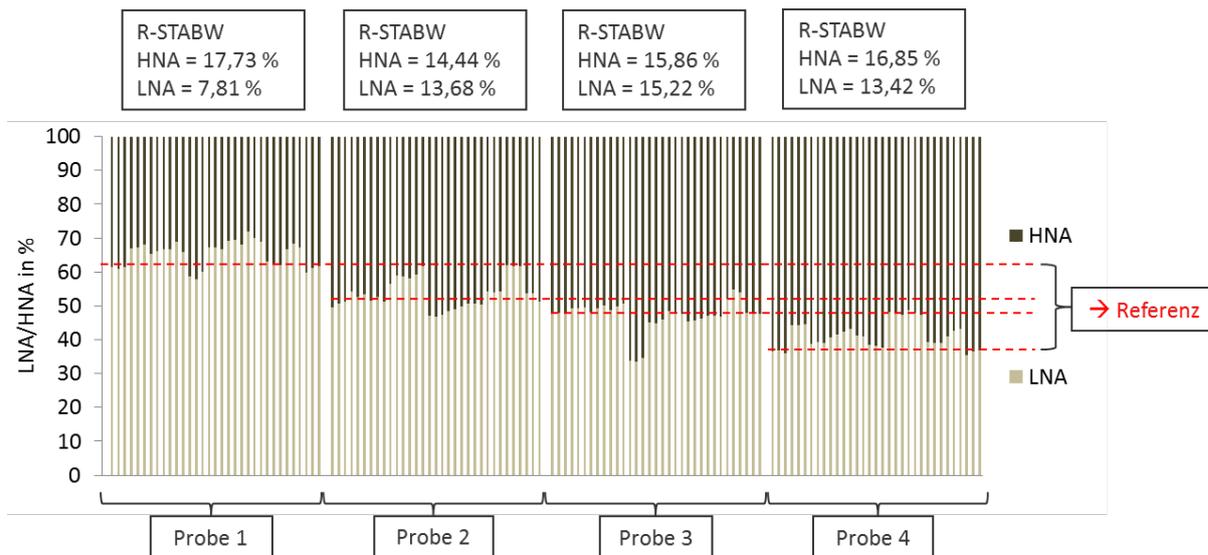


Abbildung 3: Übersicht der im Vergleichstest produzierten Resultate der Gruppe 1 (fixierte Proben) zu den LNA- und HNA-Zahlen und deren relative Standardabweichungen (R-STABW), aufgetragen als prozentuales Verhältnis zueinander (LNA/HNA in %).

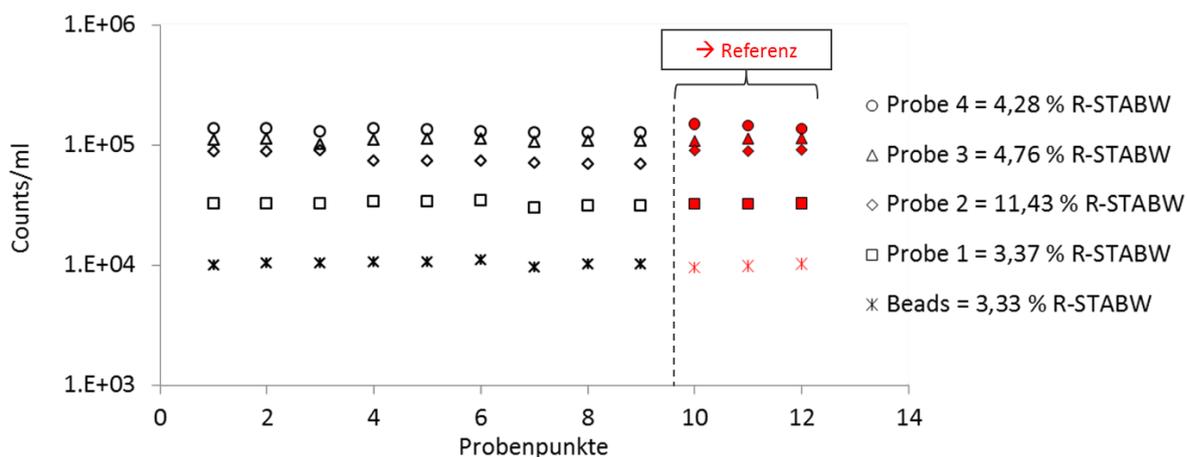


Abbildung 4: Übersicht der im Vergleichstest produzierten Resultate der Gruppe 2 (nicht fixierte Proben) zu den Bead-Zahlen bzw. Totalzellzahlen und deren relative Standardabweichungen (R-STABW). Bei Probe 2 kam es in den internen Probensätzen trotz Kühlung zu einem geringen Anstieg der Zellzahlen.

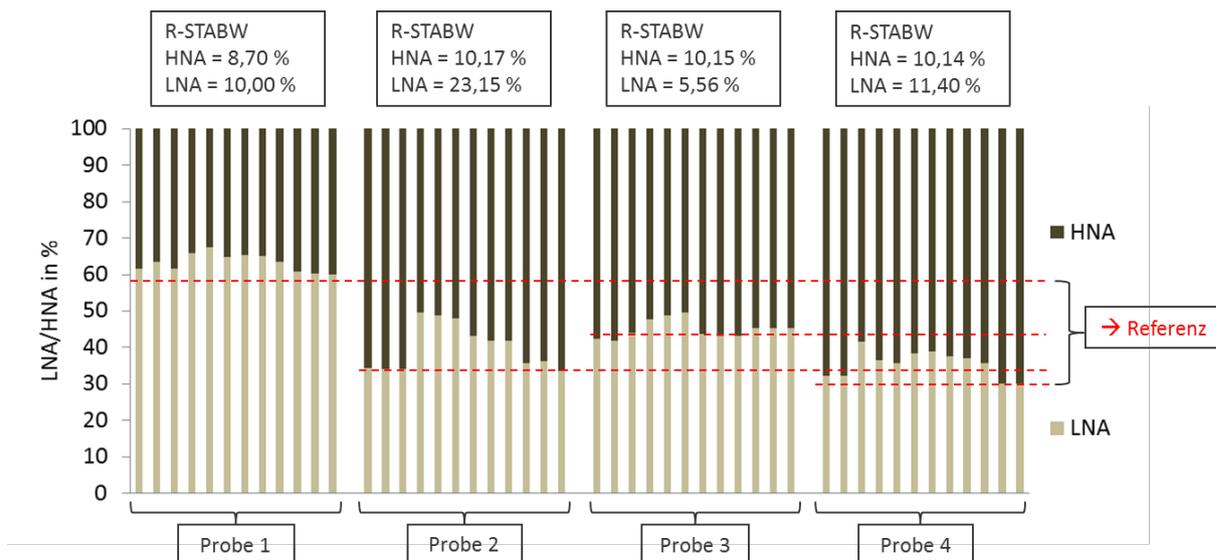


Abbildung 5: Übersicht der im Vergleichstest produzierten Resultate der Gruppe 2 (nicht fixierte Proben) zu den LNA- und HNA-Zahlen und deren relative Standardabweichungen (R-STABW), aufgetragen als prozentuales Verhältnis zueinander (LNA/HNA in %). Bei Probe 2 kam es in den internen Probensätzen trotz Kühlung zu einer geringen Veränderung des LNA/HNA-Verhältnisses.

Tabelle 3: Vergleichsresultate der Probe "Beads" (3 µm), Gruppe 1 bzgl. der Bestimmung der Bead-Zahl.

Proband / Gerät	MW Beads (3 µm) in Counts/ml (n=3)	Beads Wiederholpräzision (r) in Counts/ml (n=3)	Beads Messunsicherheit R-STABW in % (n=3)
*Proband 1 / Partec SL (1)	1.01E+04	1.48E+03	5.21
*Proband 2 / Partec Space (2)	8.85E+03	8.82E+02	3.56
*Proband 3 / Partec SL (1)	1.04E+04	1.04E+03	3.58
*Proband 4 / Partec Space (3)	1.02E+04	6.02E+02	2.12
Proband 5 / Accuri C6 (4)	9.22E+03	8.98E+02	3.48
Proband 6 / Partec Space (5)	1.04E+04	7.02E+02	2.4
Proband 7 / Partec ML (6)	1.00E+04	2.52E+02	0.9
Proband 8 / Partec SL (7)	9.58E+03	3.02E+02	1.13
Proband 9 / Partec SL (8)	1.00E+04	4.11E+02	1.46
Proband 10 / Partec SL (9)	8.94E+03	9.39E+02	3.75
Proband 11 / Accuri C6 (10)	1.19E+04	2.05E+03	6.15
Beads Vergleichspräzision (R) in Counts/ml (n=33)	1.91E+03		
Beads Messunsicherheit R-STABW in % (n=33)	6.74		

*=Eawag intern, MW = Mittelwert, n = Anzahl der Messungen, R-STABW = Relative Standardabweichung

Tabelle 4: Vergleichstestresultate der Probe "1", Gruppe 1 bzgl. der Bestimmung der Totalzellzahl.

Proband / Gerät	MW TZZ in Counts/ml (n=3)	TZZ Wiederholpräzision (r) in Counts/ml (n=3)	TZZ Messunsicherheit R-STABW in % (n=3)
*Proband 1 / Partec SL (1)	3.42E+04	2.70E+03	2.83
*Proband 2 / Partec Space (2)	3.38E+04	1.01E+03	1.07
*Proband 3 / Partec SL (1)	3.45E+04	1.31E+03	1.36
*Proband 4 / Partec Space (3)	3.81E+04	4.08E+03	3.82
Proband 5 / Accuri C6 (4)	3.60E+04	4.00E+03	3.97
Proband 6 / Partec Space (5)	3.47E+04	1.77E+03	1.82
Proband 7 / Partec ML (6)	3.22E+04	1.75E+03	1.94
Proband 8 / Partec SL (7)	3.64E+04	1.19E+03	1.17
Proband 9 / Partec SL (8)	3.28E+04	1.70E+03	1.86
Proband 10 / Partec SL (9)	3.14E+04	6.65E+02	0.76
Proband 11 / Accuri C6 (10)	3.64E+04	2.98E+03	2.92
TZZ Vergleichspräzision (R) in Counts/ml (n=33)	4.36E+03		
TZZ Messunsicherheit R-STABW in % (n=33)	4.56		

*=Eawag intern, MW = Mittelwert, n = Anzahl der Messungen, R-STABW = Relative Standardabweichung

Tabelle 5: Vergleichstestresultate der Probe "2", Gruppe 1 bzgl. der Bestimmung der Totalzellzahl.

Proband / Gerät	MW TZZ in Counts/ml (n=3)	TZZ Wiederholpräzision (r) in Counts/ml (n=3)	TZZ Messunsicherheit R-STABW in % (n=3)
*Proband 1 / Partec SL (1)	6.35E+04	2.31E+03	1.3
*Proband 2 / Partec Space (2)	6.05E+04	1.01E+03	0.6
*Proband 3 / Partec SL (1)	6.16E+04	8.72E+03	5.06
*Proband 4 / Partec Space (3)	6.70E+04	2.56E+03	1.36
Proband 5 / Accuri C6 (4)	5.76E+04	6.71E+03	4.16
Proband 6 / Partec Space (5)	5.55E+04	5.01E+03	3.22
Proband 7 / Partec ML (6)	5.22E+04	3.62E+03	2.48
Proband 8 / Partec SL (7)	6.39E+04	1.91E+03	1.06
Proband 9 / Partec SL (8)	5.77E+04	2.46E+03	1.52
Proband 10 / Partec SL (9)	5.54E+04	1.90E+03	1.22
Proband 11 / Accuri C6 (10)	6.70E+04	3.19E+03	1.7
TZZ Vergleichspräzision (R) in Counts/ml (n=33)	1.33E+04		
TZZ Messunsicherheit R-STABW in % (n=33)	7.97		

*=Eawag intern, MW = Mittelwert, n = Anzahl der Messungen, R-STABW = Relative Standardabweichung

Tabelle 6: Vergleichstestresultate der Probe "3", Gruppe 1 bzgl. der Bestimmung der Totalzellzahl.

Proband / Gerät	MW TZZ in Counts/ml (n=3)	TZZ Wiederholpräzision (r) in Counts/ml (n=3)	TZZ Messunsicherheit R-STABW in % (n=3)
*Proband 1 / Partec SL (1)	1.08E+05	1.95E+03	0.65
*Proband 2 / Partec Space (2)	1.03E+05	2.92E+03	1.02
*Proband 3 / Partec SL (1)	1.06E+05	3.06E+03	1.03
*Proband 4 / Partec Space (3)	1.14E+05	8.88E+02	0.28
Proband 5 / Accuri C6 (4)	1.01E+05	2.84E+03	1
Proband 6 / Partec Space (5)	9.43E+04	1.89E+03	0.72
Proband 7 / Partec ML (6)	9.80E+04	4.45E+03	1.62
Proband 8 / Partec SL (7)	1.08E+05	1.04E+03	0.34
Proband 9 / Partec SL (8)	9.42E+04	4.39E+02	0.17
Proband 10 / Partec SL (9)	9.31E+04	4.20E+03	1.61
Proband 11 / Accuri C6 (10)	1.16E+05	1.01E+04	3.11
TZZ Vergleichspräzision (R) in Counts/ml (n=33)	1.99E+04		
TZZ Messunsicherheit R-STABW in % (n=33)	6.92		

*=Eawag intern, MW = Mittelwert, n = Anzahl der Messungen, R-STABW = Relative Standardabweichung

Tabelle 7: Vergleichstestresultate der Probe "4", Gruppe 1 bzgl. der Bestimmung der Totalzellzahl.

Proband / Gerät	MW TZZ in Counts/ml (n=3)	TZZ Wiederholpräzision (r) in Counts/ml (n=3)	TZZ Messunsicherheit R-STABW in % (n=3)
*Proband 1 / Partec SL (1)	1.27E+05	3.88E+03	1.09
*Proband 2 / Partec Space (2)	1.27E+05	5.56E+03	1.56
*Proband 3 / Partec SL (1)	1.24E+05	1.91E+03	0.55
*Proband 4 / Partec Space (3)	1.37E+05	7.39E+03	1.93
Proband 5 / Accuri C6 (4)	1.13E+05	7.29E+03	2.3
Proband 6 / Partec Space (5)	1.05E+05	5.12E+03	1.73
Proband 7 / Partec ML (6)	1.08E+05	4.80E+03	1.58
Proband 8 / Partec SL (7)	1.26E+05	4.32E+03	1.23
Proband 9 / Partec SL (8)	1.17E+05	3.29E+03	1
Proband 10 / Partec SL (9)	1.09E+05	6.82E+03	2.23
Proband 11 / Accuri C6 (10)	1.36E+05	1.17E+04	3.08
TZZ Vergleichspräzision (R) in Counts/ml (n=33)	2.72E+04		
TZZ Messunsicherheit R-STABW in % (n=33)	8.08		

*=Eawag intern, MW = Mittelwert, n = Anzahl der Messungen, R-STABW = Relative Standardabweichung

Tabelle 8: Vergleichstestresultate der Probe "1", Gruppe 1 bezüglich der Bestimmung des LNA/HNA-Verhältnisses.

Proband / Gerät	MW LNA in Counts/ml (n=3)	LNA Wiederholpräzision (r) in Counts/ml (n=3)	LNA Messunsicherheit R-STABW in % (n=3)	MW HNA in Counts/ml (n=3)	HNA Wiederholpräzision (r) in Counts/ml (n=3)	HNA Messunsicherheit R-STABW in % (n=3)	MW LNA + MW HNA in Counts/ml	LNA Anteil in %	HNA Anteil in %
*Proband 1 / Partec SL (1)	2.32E+04	2.24E+02	0.34	1.45E+04	4.53E+02	1.11	3.78E+04	61	39
*Proband 2 / Partec Space (2)	2.26E+04	5.83E+02	0.92	1.11E+04	8.08E+02	2.60	3.36E+04	67	33
*Proband 3 / Partec SL (1)	2.31E+04	1.19E+03	1.84	1.22E+04	7.71E+02	2.25	3.51E+04	66	34
*Proband 4 / Partec Space (3)	2.07E+04	8.88E+02	1.53	1.39E+04	1.19E+03	3.04	3.44E+04	61	39
Proband 5 / Accuri C6 (4)	1.75E+04	8.54E+02	1.74	8.74E+03	1.46E+03	5.96	2.59E+04	67	33
Proband 6 / Partec Space (5)	2.04E+04	1.39E+03	2.43	1.44E+04	1.45E+03	3.60	3.40E+04	59	41
Proband 7 / Partec ML (6)	2.16E+04	3.23E+01	0.05	1.05E+04	3.60E+02	1.22	3.23E+04	67	33
Proband 8 / Partec SL (7)	2.24E+04	1.49E+03	2.37	1.31E+04	2.03E+02	0.55	3.49E+04	62	38
Proband 9 / Partec SL (8)	2.04E+04	1.56E+03	2.74	9.11E+03	6.03E+02	2.36	2.99E+04	69	31
Proband 10 / Partec SL (9)	2.22E+04	5.74E+02	0.92	8.60E+03	1.80E+03	7.47	3.14E+04	70	30
Proband 11 / Accuri C6 (10)	2.32E+04	3.02E+03	4.64	1.16E+04	2.28E+03	7.00	3.28E+04	67	33
Vergleichspräzision (R) in Counts/ml (n=33)	4.68E+03			5.71E+03					
Messunsicherheit R-STABW in % (n=33)	7.81			17.73					

*=Eawag intern, MW = Mittelwert, n = Anzahl der Messungen, R-STABW = Relative Standardabweichung

Tabelle 9: Vergleichstestresultate der Probe "2", Gruppe 1 bezüglich der Bestimmung des LNA/HNA-Verhältnisses.

Proband / Gerät	MW LNA in Counts/ml (n=3)	LNA Wiederholpräzision (r) in Counts/ml (n=3)	LNA Messunsicherheit R-STABW in % (n=3)	MW HNA in Counts/ml (n=3)	HNA Wiederholpräzision (r) in Counts/ml (n=3)	HNA Messunsicherheit R-STABW in % (n=3)	MW LNA + MW HNA in Counts/ml	LNA Anteil in %	HNA Anteil in %
*Proband 1 / Partec SL (1)	3.09E+04	1.09E+03	1.26	3.13E+04	1.80E+03	2.05	6.21E+04	51	49
*Proband 2 / Partec Space (2)	3.28E+04	2.10E+03	2.29	2.75E+04	1.01E+03	1.31	5.99E+04	53	47
*Proband 3 / Partec SL (1)	3.04E+04	3.17E+03	3.72	2.86E+04	5.32E+03	6.64	5.76E+04	52	48
*Proband 4 / Partec Space (3)	3.68E+04	5.28E+03	5.13	3.16E+04	3.06E+02	0.35	6.72E+04	53	47
Proband 5 / Accuri C6 (4)	2.51E+04	3.92E+03	5.57	1.95E+04	3.00E+03	5.49	4.51E+04	58	42
Proband 6 / Partec Space (5)	3.23E+04	1.13E+03	1.25	2.32E+04	4.71E+03	7.26	5.47E+04	60	40
Proband 7 / Partec ML (6)	2.46E+04	1.48E+03	2.15	2.76E+04	2.18E+03	2.82	5.32E+04	47	53
Proband 8 / Partec SL (7)	3.48E+04	1.22E+03	1.25	2.94E+04	9.19E+02	1.12	6.34E+04	54	46
Proband 9 / Partec SL (8)	2.48E+04	1.23E+03	1.77	2.63E+04	7.33E+02	1.00	5.11E+04	49	51
Proband 10 / Partec SL (9)	2.64E+04	9.26E+02	1.25	2.58E+04	6.97E+02	0.96	5.27E+04	51	49
Proband 11 / Accuri C6 (10)	3.59E+04	2.14E+03	2.13	2.21E+04	1.65E+03	2.67	5.92E+04	62	38
Vergleichspräzision (R) in Counts/ml (n=33)	1.17E+04			1.07E+04					
Messunsicherheit R-STABW in % (n=33)	13.68			14.44					

*=Eawag intern, MW = Mittelwert, n = Anzahl der Messungen, R-STABW = Relative Standardabweichung

Tabelle 10: Vergleichstestresultate der Probe "3", Gruppe 1 bezüglich der Bestimmung des LNA/HNA-Verhältnisses.

Proband / Gerät	MW LNA in Counts/ml (n=3)	LNA Wiederholpräzision (r) in Counts/ml (n=3)	LNA Messunsicherheit R-STABW in % (n=3)	MW HNA in Counts/ml (n=3)	HNA Wiederholpräzision (r) in Counts/ml (n=3)	HNA Messunsicherheit R-STABW in % (n=3)	MW LNA + MW HNA in Counts/ml	LNA Anteil in %	HNA Anteil in %
*Proband 1 / Partec SL (1)	4.92E+04	6.45E+02	0.47	5.34E+04	1.09E+03	0.73	1.02E+05	48	52
*Proband 2 / Partec Space (2)	5.04E+04	1.91E+03	1.35	5.19E+04	1.22E+03	0.84	1.04E+05	49	51
*Proband 3 / Partec SL (1)	4.89E+04	2.16E+03	1.58	5.24E+04	3.17E+03	2.16	1.01E+05	49	51
*Proband 4 / Partec Space (3)	5.45E+04	7.21E+02	0.47	5.92E+04	1.23E+03	0.74	1.14E+05	48	52
Proband 5 / Accuri C6 (4)	3.36E+04	1.90E+03	2.02	3.55E+04	2.19E+03	2.21	6.92E+04	50	50
Proband 6 / Partec Space (5)	3.19E+04	2.00E+03	2.24	6.24E+04	1.82E+03	1.04	9.36E+04	34	66
Proband 7 / Partec ML (6)	4.41E+04	2.25E+03	1.82	5.39E+04	3.30E+03	2.19	9.62E+04	45	55
Proband 8 / Partec SL (7)	4.94E+04	1.14E+03	0.83	5.59E+04	6.58E+02	0.42	1.05E+05	47	53
Proband 9 / Partec SL (8)	4.20E+04	1.85E+03	1.57	4.45E+04	9.75E+02	0.78	8.61E+04	48	52
Proband 10 / Partec SL (9)	4.13E+04	2.89E+03	2.50	4.95E+04	2.17E+03	1.56	9.27E+04	46	54
Proband 11 / Accuri C6 (10)	4.46E+04	1.32E+03	1.05	4.11E+04	6.46E+03	5.62	8.29E+04	54	46
Vergleichspräzision (R) in Counts/ml (n=33)	1.90E+04			2.24E+04					
Messunsicherheit R-STABW in % (n=33)	15.22			15.86					

*=Eawag intern, MW = Mittelwert, n = Anzahl der Messungen, R-STABW = Relative Standardabweichung

Tabelle 11: Vergleichstestresultate der Probe "4", Gruppe 1 bezüglich der Bestimmung des LNA/HNA-Verhältnisses.

Proband / Gerät	MW LNA in Counts/ml (n=3)	LNA Wiederholpräzision (r) in Counts/ml (n=3)	LNA Messunsicherheit R-STABW in % (n=3)	MW HNA in Counts/ml (n=3)	HNA Wiederholpräzision (r) in Counts/ml (n=3)	HNA Messunsicherheit R-STABW in % (n=3)	MW LNA + MW HNA in Counts/ml	LNA Anteil in %	HNA Anteil in %
*Proband 1 / Partec SL (1)	4.69E+02	4.69E+02	0.38	7.71E+04	4.31E+03	2.00	1.21E+05	36	64
*Proband 2 / Partec Space (2)	2.38E+03	2.38E+03	1.51	7.05E+04	3.34E+03	1.69	1.25E+05	45	55
*Proband 3 / Partec SL (1)	1.00E+03	1.00E+03	0.81	6.99E+04	2.24E+03	1.15	1.14E+05	39	61
*Proband 4 / Partec Space (3)	2.53E+03	2.53E+03	1.95	8.46E+04	6.30E+03	2.66	1.30E+05	36	64
Proband 5 / Accuri C6 (4)	2.72E+03	2.72E+03	3.09	4.59E+04	1.05E+03	0.82	7.78E+04	41	59
Proband 6 / Partec Space (5)	5.78E+03	5.78E+03	4.52	5.97E+04	6.61E+02	0.40	1.03E+05	42	58
Proband 7 / Partec ML (6)	5.09E+02	5.09E+02	0.43	6.64E+04	4.57E+03	2.45	1.09E+05	38	62
Proband 8 / Partec SL (7)	2.42E+03	2.42E+03	1.80	7.38E+04	2.54E+03	1.23	1.20E+05	39	61
Proband 9 / Partec SL (8)	1.91E+03	1.91E+03	1.38	5.35E+04	1.74E+03	1.16	1.02E+05	48	52
Proband 10 / Partec SL (9)	2.35E+03	2.35E+03	1.57	5.62E+04	4.57E+03	2.90	1.12E+05	48	52
Proband 11 / Accuri C6 (10)	1.13E+03	1.13E+03	0.96	6.04E+04	7.57E+03	4.48	9.92E+04	42	58
Vergleichspräzision (R) in Counts/ml (n=33)	1.71E+04			3.01E+04					
Messunsicherheit R-STABW in % (n=33)	13.42			16.58					

*=Eawag intern, MW = Mittelwert, n = Anzahl der Messungen, R-STABW = Relative Standardabweichung

Tabelle 12: Vergleichsergebnisse der Probe "Beads" (3 µm), Gruppe 2 bzgl. der Bestimmung der Bead-Zahl.

Proband / Gerät	MW Beads (3 µm) in Counts/ml (n=3)	Wiederholpräzision (r) in Counts/ml (n=3)	Messunsicherheit R-STABW in % (n=3)
*Proband 12 / Partec SL (1)	9.57E+03	9.30E+02	3.47
*Proband 13 / Partec PAS III (11)	9.66E+03	8.19E+02	3.03
Proband 14 / Partec SL (12)	9.31E+03	9.11E+02	3.49
Proband 15 / Partec SL (13)	1.03E+04	6.86E+02	2.38
Beads Vergleichspräzision (R) in Counts/ml (n=12)	1.21E+03		
Beads Messunsicherheit R-STABW in % (n=12)	4.28		

*=Eawag intern, MW = Mittelwert, n = Anzahl der Messungen, R-STABW = Relative Standardabweichung

Tabelle 13: Vergleichstestresultate der Probe "1", Gruppe 2 bzgl. der Bestimmung der Totalzellzahl.

Proband / Gerät	MW TZZ in Counts/ml (n=3)	TZZ Wiederholpräzision (r) in Counts/ml (n=3)	TZZ Messunsicherheit R-STABW in % (n=3)
*Proband 12 / Partec SL (1)	3.23E+04	7.23E+02	0.80
*Proband 13 / Partec PAS III (11)	3.24E+04	5.25E+02	0.58
Proband 14 / Partec SL (12)	2.98E+04	2.25E+03	2.70
Proband 15 / Partec SL (13)	3.38E+04	1.15E+03	1.21
TZZ Vergleichspräzision (R) in Counts/ml (n=12)	4.31E+03		
TZZ Messunsicherheit R-STABW in % (n=12)	4.76		

*=Eawag intern, MW = Mittelwert, n = Anzahl der Messungen, R-STABW = Relative Standardabweichung

Tabelle 14: Vergleichstestresultate der Probe "2", Gruppe 2 bzgl. der Bestimmung der Totalzellzahl.

Proband / Gerät	MW TZZ in Counts/ml (n=3)	TZZ Wiederholpräzision (r) in Counts/ml (n=3)	TZZ Messunsicherheit R-STABW in % (n=3)
*Proband 12 / Partec SL (1)	9.03E+04	3.17E+03	1.25
*Proband 13 / Partec PAS III (11)	8.68E+04	8.62E+02	0.35
Proband 14 / Partec SL (12)	6.87E+04	1.48E+03	0.77
Proband 15 / Partec SL (13)	7.15E+04	1.54E+03	0.77
TZZ Vergleichspräzision (R) in Counts/ml (n=12)	2.42E+04		
TZZ Messunsicherheit R-STABW in % (n=12)	11.43		

*=Eawag intern, MW = Mittelwert, n = Anzahl der Messungen, R-STABW = Relative Standardabweichung

Tabelle 15: Vergleichstestresultate der Probe "3", Gruppe 2 bzgl. der Bestimmung der Totalzellzahl.

Proband / Gerät	MW TZZ in Counts/ml (n=3)	TZZ Wiederholpräzision (r) in Counts/ml (n=3)	TZZ Messunsicherheit R-STABW in % (n=3)
*Proband 12 / Partec SL (1)	1.08E+05	9.19E+03	3.03
*Proband 13 / Partec PAS III (11)	1.08E+05	1.43E+04	4.73
Proband 14 / Partec SL (12)	1.03E+05	3.64E+03	1.26
Proband 15 / Partec SL (13)	1.07E+05	5.84E+03	1.95
TZZ Vergleichspräzision (R) in Counts/ml (n=12)	1.01E+04		
TZZ Messunsicherheit R-STABW in % (n=12)	3.37		

*=Eawag intern, MW = Mittelwert, n = Anzahl der Messungen, R-STABW = Relative Standardabweichung

Tabelle 16: Vergleichstestresultate der Probe "4", Gruppe 2 bzgl. der Bestimmung der Totalzellzahl.

*=Eawag intern, MW = Mittelwert, n = Anzahl der Messungen, R-STABW = Relative Standardabweichung

Proband / Gerät	MW TZZ in Counts/ml (n=3)	TZZ Wiederholpräzision (r) in Counts/ml (n=3)	TZZ Messunsicherheit R-STABW in % (n=3)
*Proband 12 / Partec SL (1)	1.50E+05	1.97E+04	4.68
*Proband 13 / Partec PAS III (11)	1.37E+05	1.30E+04	3.40
Proband 14 / Partec SL (12)	1.27E+05	3.98E+02	0.11
Proband 15 / Partec SL (13)	1.36E+05	1.02E+04	2.69
TZZ Vergleichspräzision (R) in Counts/ml (n=12)	1.23E+04		
TZZ Messunsicherheit R-STABW in % (n=12)	3.33		

*=Eawag intern, MW = Mittelwert, n = Anzahl der Messungen, R-STABW = Relative Standardabweichung

Tabelle 17: Vergleichstestresultate der Probe "1", Gruppe 2 bezüglich der Bestimmung des LNA/HNA-Verhältnisses.

Proband / Gerät	MW LNA in Counts/ml (n=3)	LNA Wiederholpräzision (r) in Counts/ml (n=3)	LNA Messunsicherheit R-STABW in % (n=3)	MW HNA in Counts/ml (n=3)	HNA Wiederholpräzision (r) in Counts/ml (n=3)	HNA Messunsicherheit R-STABW in % (n=3)	MW LNA + MW HNA in Counts/ml	LNA Anteil in %	HNA Anteil in %
*Proband 12 / Partec SL (1)	2.04E+04	1.61E+03	2.82	1.31E+04	1.17E+03	3.18	3.33E+04	60	40
*Proband 13 / Partec PAS III (11)	2.05E+04	9.39E+02	1.63	1.28E+04	9.10E+02	2.54	3.33E+04	62	38
Proband 14 / Partec SL (12)	1.84E+04	6.17E+02	1.20	9.73E+03	1.11E+03	4.09	2.86E+04	65	35
Proband 15 / Partec SL (13)	2.23E+04	8.41E+02	1.35	1.16E+04	1.55E+03	4.78	3.41E+04	66	34
Vergleichspräzision (R) in Counts/ml (n=12)	5.01E+03			3.20E+03					
Messunsicherheit R-STABW in % (n=12)	8.70			10.00					

*=Eawag intern, MW = Mittelwert, n = Anzahl der Messungen, R-STABW = Relative Standardabweichung

Tabelle 18: Vergleichstestresultate der Probe "2", Gruppe 2 bezüglich der Bestimmung des LNA/HNA-Verhältnisses.

Proband / Gerät	MW LNA in Counts/ml (n=3)	LNA Wiederholpräzision (r) in Counts/ml (n=3)	LNA Messunsicherheit R-STABW in % (n=3)	MW HNA in Counts/ml (n=3)	HNA Wiederholpräzision (r) in Counts/ml (n=3)	HNA Messunsicherheit R-STABW in % (n=3)	MW LNA + MW HNA in Counts/ml	LNA Anteil in %	HNA Anteil in %
*Proband 12 / Partec SL (1)	3.25E+04	1.67E+03	1.84	5.82E+04	7.74E+03	4.75	9.12E+04	35	65
*Proband 13 / Partec PAS III (11)	3.05E+04	5.88E+02	0.69	5.81E+04	9.24E+02	0.57	8.88E+04	34	66
Proband 14 / Partec SL (12)	2.77E+04	1.97E+03	2.53	3.67E+04	1.77E+02	0.17	6.36E+04	42	58
Proband 15 / Partec SL (13)	3.55E+04	1.05E+03	1.05	3.59E+04	2.40E+03	2.39	7.21E+04	49	51
Vergleichspräzision (R) in Counts/ml (n=12)	8.88E+03			3.10E+04					
Messunsicherheit R-STABW in % (n=12)	10.17			23.15					

*=Eawag intern, MW = Mittelwert, n = Anzahl der Messungen, R-STABW = Relative Standardabweichung

Tabelle 19: Vergleichstestresultate der Probe "3", Gruppe 2 bezüglich der Bestimmung des LNA/HNA-Verhältnisses.

Proband / Gerät	MW LNA in Counts/ml (n=3)	LNA Wiederholpräzision (r) in Counts/ml (n=3)	LNA Messunsicherheit R-STABW in % (n=3)	MW HNA in Counts/ml (n=3)	HNA Wiederholpräzision (r) in Counts/ml (n=3)	HNA Messunsicherheit R-STABW in % (n=3)	MW LNA + MW HNA in Counts/ml	LNA Anteil in %	HNA Anteil in %
*Proband 12 / Partec SL (1)	3.25E+04	1.67E+03	1.84	5.82E+04	7.74E+03	4.75	9.12E+04	35	65
*Proband 13 / Partec PAS III (11)	3.05E+04	5.88E+02	0.69	5.81E+04	9.24E+02	0.57	8.88E+04	34	66
Proband 14 / Partec SL (12)	2.77E+04	1.97E+03	2.53	3.67E+04	1.77E+02	0.17	6.36E+04	42	58
Proband 15 / Partec SL (13)	3.55E+04	1.05E+03	1.05	3.59E+04	2.40E+03	2.39	7.21E+04	49	51
Vergleichspräzision (R) in Counts/ml (n=12)	8.88E+03			3.10E+04					
Messunsicherheit R-STABW in % (n=12)	10.17			23.15					

*=Eawag intern, MW = Mittelwert, n = Anzahl der Messungen, R-STABW = Relative Standardabweichung

Tabelle 20: Vergleichstestresultate der Probe "4", Gruppe 2 bezüglich der Bestimmung des LNA/HNA-Verhältnisses.

Proband / Gerät	MW LNA in Counts/ml (n=3)	LNA Wiederholpräzision (r) in Counts/ml (n=3)	LNA Messunsicherheit R-STABW in % (n=3)	MW HNA in Counts/ml (n=3)	HNA Wiederholpräzision (r) in Counts/ml (n=3)	HNA Messunsicherheit R-STABW in % (n=3)	MW LNA + MW HNA in Counts/ml	LNA Anteil in %	HNA Anteil in %
*Proband 12 / Partec SL (1)	3.25E+04	1.67E+03	1.84	5.82E+04	7.74E+03	4.75	9.12E+04	35	65
*Proband 13 / Partec PAS III (11)	3.05E+04	5.88E+02	0.69	5.81E+04	9.24E+02	0.57	8.88E+04	34	66
Proband 14 / Partec SL (12)	2.77E+04	1.97E+03	2.53	3.67E+04	1.77E+02	0.17	6.36E+04	42	58
Proband 15 / Partec SL (13)	3.55E+04	1.05E+03	1.05	3.59E+04	2.40E+03	2.39	7.21E+04	49	51
Vergleichspräzision (R) in Counts/ml (n=12)	8.88E+03			3.10E+04					
Messunsicherheit R-STABW in % (n=12)	10.17			23.15					

*=Eawag intern, MW = Mittelwert, n = Anzahl der Messungen, R-STABW = Relative Standardabweichung

9 Literatur

- [1] Füchslin, H.P., Kötzsch, S., Keserue, H.A., Egli, T. 2009.
Rapid and quantitative detection of *Legionella pneumophila* applying immunomagnetic separation and Flow Cytometry. *Cytometry Part A*, 77A:264–274.
- [2] Hammes, F., Berney, M., Wang, Y., Vital, M., Köster, O., Egli, T., 2007.
Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. *Water Res.*, 42:269–277.
- [3] Monfort, P., Baleux, B., 1991.
Comparison of flow cytometry and epifluorescence microscopy for counting bacteria in aquatic ecosystems. *Cytometry*, 13:188–192.
- [4] Siebel, E., Wang, Y., Egli, T., Hammes, F., 2008.
Correlations between total cell concentration, total adenosine tri-phosphate concentration and heterotrophic plate counts during microbial monitoring of drinking water. *Drink. Water Eng. Sci. Discuss.*, 1:71–86.
- [5] Egli, T., Hammes, F., 2010.
Neue Methoden für die Wasseranalytik. *gwa*, 4:315–324
- [6] Berney, M., Vital, M., Hülshoff, I., Weilenmann, H.U., Egli, T., Hammes, F., 2008. Rapid, cultivation-independent assessment of microbial viability in drinking water. *Water Res.*, 42:4010–4018.
- [7] Wang, Y., Hammes, F., De Roy, K., Verstraete, W., Boon, N., 2010.
Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *Trends Biotechnol.*, 28:416–424.
- [8] Hammes, F., Egli, T., 2010.
Cytometric methods for measuring bacteria in water: advantages, pitfalls and applications. *Anal. Bioanal. Chem.*, 397:1083–1095.
- [9] Wang, Y., Hammes, F., Boon, N., Chami, M. Egli, T., 2009.
Isolation and characterization of low nucleic acid (LNA)-content bacteria. *ISME*, 3:889–902.
- [10] Wang, Y., 2009. “The unseen majority”: heterotrophic bacteria in freshwater, more than just small and non-cultivable. ETH Zürich, Switzerland, Diss. ETH-No. 17894
- [11] Hammes, F., Goldschmidt, F., Vital, M., Wang, Y., Egli, T., 2010.
Measurement and interpretation of microbial adenosine tri-phosphate (ATP) in aquatic environments. *Water Res.*, 44:3915–3923.
- [12] Hammes, F., Egli, T., 2005.
New method for assimilable organic carbon determination using flow-cytometric enumeration and a natural microbial consortium as inoculum. *Environ. Sci. Technol.*, 39:3289–3294.
- [13] Wang, Y., Hammes, F., Egli, T., 2008.
The impact of industrial-scale cartridge filtration on the native microbial communities from groundwater. *Water Res.*, 42:4319–4326.
- [14] Hammes, F., Boon, N., Vital, M., Ross, P., Magic-Knezev, A., Dignum, M., 2010. Bacterial colonization of pellet softening reactors used during drinking water treatment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77:1041–1048.
- [15] Hammes, F., Berger, C., Köster, O., Egli, T., 2010.
Assessing biological stability of drinking water without disinfectant residuals in a full-scale water supply system. *Res. Technol.*, 59:31–40.
- [16] Lautenschlager, K., Boon, N., Wang, Y., Egli, T., Hammes, F., 2010.
Overnight stagnation of drinking water in household taps induces microbial growth and changes in community composition. *Water Res.*, 44:4868–4877.

- [17] Lautenschlager, K., 2011.
Origin, function and stability of microbial communities in non-chlorinated public drinking water. ETH Zürich, Switzerland, Diss. ETH-No. 19950.
- [18] Vital, M., Dignum, M., Magic-Knezev, A., Ross, P., Rietveld, L., Hammes, F., 2012.
Flow cytometry and adenosine tri-phosphate analysis: Alternative possibilities to evaluate major bacteriological changes in drinking water treatment and distribution systems. *Water Res.*, in Press.
- [19] Bouvier, T., del Giorgio, P.A., Gasol, J.M., 2007.
A comparative study of the cytometric characteristics of high and low nucleic-acid bacterioplankton cells from different aquatic ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 9:2050–2066.
- [20] Vila-Costa, M., Gasol, J.M., Shalabh, S., Moran, M.A., 2012.
Community analysis of high- and low-nucleic acid-containing bacteria in NW Mediterranean coastal waters using 16S rDNA pyrosequencing. *Environ. Microbiol.*, 14:1390–1402.
- [21] Schweizerische Akkreditierungsstelle, Dokument Nr. 328.dw, 2006, Rev. 01.
Leitfaden zur Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren und zur Abschätzung der Messunsicherheit im Bereich Lebensmittel- und Umweltmikrobiologie

10 Glossar

<i>Autoloader</i>	–	automatischer Probengeber für Durchflusszytometer
<i>Beads</i>	–	Kalibrationskügelchen für Durchflusszytometer
<i>Counts</i>	–	Anzahl der Zählereignisse (hier: Zellen bzw. Partikel)
<i>Densityplot</i>	–	Punkt-Diagramm zur Auswertung der DZ-Analysedaten
<i>Gain</i>	–	Hochspannungseinstellung der Photomultiplikatoren
<i>Gate</i>	–	definierter Bereich im Densityplot
<i>Gate-Transfer</i>	–	Übertragung des durch ein Gate definierten Bereiches auf andere Histogramme oder Densityplots
<i>Sheath fluids</i>	–	Hüllflüssigkeiten
<i>Speed</i>	–	nominale Fließrate des Probenstroms
<i>Staining</i>	–	Anfärben einer Probe
<i>Trigger</i>	–	ausgewählter Hauptparameter

III Änderungschronik

Übersichtstabelle

Version	Kommentar
333.1	Erstfassung