

MW102 d Ausgabe August 2023

INFORMATION

Methode

**Bestimmung der Gesamtzellzahl in Wasserproben mittels
Durchflusszytometrie**

MW102

MW102 d Ausgabe August 2023

INFORMATION

Methode

Bestimmung der Gesamtzellzahl in Wasserproben mittels Durchflusszytometrie

IMPRESSUM

Es gelten die allgemeinen Geschäftsbedingungen unter
www.svgw.ch/AGB

Copyright by SVGW, Zürich

MW102

INHALTSVERZEICHNIS

	Vorwort	5
1	Einführung	7
1.1	Zweck	7
1.2	Prinzip	7
1.3	Haftungsausschluss	7
2	Abkürzungen, Begriffe und Definitionen	8
3	Chemikalien, Farbstoffe und Materialien	10
3.1	Chemikalien	10
3.2	Farbstoffe	10
3.3	Material / Gerätschaften	10
4	Durchflusszytometer	11
4.1	Generell	11
4.2	Minimale Geräteanforderungen	11
4.3	Gerätekontrolle / Messkontrolle (Beads)	11
5	Vorbereitung der Probe	12
5.1	Aufbewahrung / Transport	12
5.2	Fixierung (optional)	13
6	Färbung und Messung von Wasserproben	13
6.1	Verdünnung von Proben	15
6.2	Anfärben von Proben	15
6.3	Negativkontrolle (Blindprobe)	15
6.4	Positivkontrolle	16
6.5	Messung der Probe	17
7	Datenanalyse / Gating	17
8	Angabe von Ergebnissen	18
9	Weiterführende Literatur	18

10	Verfügbare Geräte	20
-----------	--------------------------	-----------

Anhänge

1	Strategie zum Legen eines Gates für die GZZ-Bestimmung in einer Wasserprobe	22
2	Erfahrungswerte	26
3	Nachweis- / Bestimmungsgrenze und linearer Bereich	30
4	Erhebung der Verfahrenskenndaten	32

VORWORT

ALLGEMEINES VORWORT ZU DEN SVGW-METHODEN

Für die Beurteilung der Trinkwasserqualität wird auf standardisierte und allgemein anerkannte Methoden zurückgegriffen. Bis 2017 waren in der Schweiz die Methoden für die Trinkwasseruntersuchung im Schweizerischen Lebensmittelbuch (SLMB) aufgeführt. Über die letzten Jahre erlangten allerdings internationale Methoden (beschrieben z.B. in EN- oder ISO-Normen) im Bereich Trinkwasser immer mehr Bedeutung und verdrängten grösstenteils die Schweizer Methoden des SLMB. Zusammen mit dem Inkrafttreten der neuen Lebensmittelgesetzgebung im Mai 2017 wurde das SLMB zurückgezogen.

Bis auf wenige Ausnahmen stehen für die Trinkwasseruntersuchung international anerkannte und normierte Methoden zur Verfügung, die von den Analyselabors angewendet werden. Dennoch gibt es einige wenige weiterhin angewandte Methoden aus dem SLMB. Zudem gibt es neuentwickelte Methoden oder Interpretationshilfen/Ergänzungen zu international normierten Methoden, die von den Wasserversorgern, Vollzugsbehörden und weiteren Akteuren, angewendet werden. Diese Methoden werden auf der Methodenplattform des SVGW der Branche zur Verfügung gestellt.

VORWORT METHODE DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Die mikrobiologische Trinkwasseranalyse beruhte lange Zeit auf Kultivierungsmethoden. Auch in der Verordnung des EDI über Trinkwasser sowie Wasser in öffentlich zugänglichen Bädern und Duschanlagen (TBDV, SR 817.022.11) sind nur kultivierungsabhängige Parameter festgelegt. In den letzten Jahren wurden immer mehr kultivierungsunabhängige Methoden zur Bestimmung von mikrobiologischen Parametern entwickelt und kommen verstärkt zur Anwendung. Ein Beispiel ist die in der Medizin seit langem eingesetzte Durchflusszytometrie.

Während in der TBDV mikrobiologische Parameter mit den entsprechenden Höchstwerten zur Beschreibung der Trinkwasserqualität festgelegt sind, verwenden Wasserversorger mit Vorteil zusätzliche Parameter mit Indikatorfunktion, die Hinweise auf die Qualität und allfällige Veränderungen des Rohwassers, auf die Wirksamkeit von Aufbereitungsschritten oder Verunreinigungen während Speicherung und Verteilung geben.

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl mittels Durchflusszytometrie ist eine kultivierungsunabhängige Methode, die sich gemäss der SVGW-Richtlinie W12 «Leitlinie für eine gute Verfahrenspraxis in Trinkwasserversorgungen» eignet, um Veränderungen der Rohwasserqualität sowie Veränderungen (Keimvermehrung oder Verunreinigung) während Speicherung und Verteilung rasch zu erkennen. Auch für die Überwachung von Filtrationsprozessen ist der Parameter gut geeignet. In den letzten Jahren wurde die Online-Messung der Gesamtzellzahl in der Praxis erprobt. Praxistaugliche Durchflusszytometer sind im Handel verfügbar und werden eingesetzt.

In der W12 wurden bewusst für den Indikatorparameter Gesamtzellzahl keine allgemeingültigen Grenzen festgelegt, innerhalb derer ein Prozess als gut zu beurteilen ist, denn es müssen für jedes einzelne System Erfahrungswerte gesammelt werden. Zudem sagen Veränderungen und Entwicklungen (Trendüberwachung) mehr aus als ein einzelner, gesondert betrachteter Messwert.

Die hier beschriebene Methode dient nur zur Bestimmung der Gesamtzellzahl. Aus den erhaltenen Messergebnissen lassen sich i.d.R. noch weitere Informationen herausziehen, wie z.B. die Unterscheidung von HNA- (viel Nukleinsäure enthaltende) Zellen und LNA- (wenig Nukleinsäure enthaltende) Zellen. Informationen zu den weitergehenden Untersuchungen und Auswertemöglichkeiten sind im Eawag-SVGW-BLV-Dokument «Durchflusszytometrische Analyse von Wasserproben» zu finden (siehe Kapitel 9).

Die Methode wurde zur Aufnahme in die SVGW-Methodensammlung durch die im Folgenden genannten Autoren eingereicht. Innerhalb der Arbeitsgruppe «Methodenplattform» wurde die Methode geprüft und anschliessend in die Methodensammlung aufgenommen:

Autoren

Frederik Hammes, Eawag
Jürg Sigrist, Eawag

Arbeitsgruppe Methodenplattform

Andreas Peter, WVZ (Vorsitz W-UK2)
Thomas Egli, ehem. Eawag
Sonja Förster, WVZ
Hans Peter Füchslin, KLZH
Frederik Hammes, Eawag
Oliver Köster, WVZ
Christian Schätti, BLV
Patricia Schubert, IWB
Martin Bärtschi, SVGW
Margarete Bucheli, SVGW

1 Einführung

1.1 Zweck

Die Durchflusszytometrie erlaubt die quantitativ präzise und schnelle Detektion der Gesamtzellzahl einer Wasserprobe. Die Methode eignet sich speziell für bakterielle Zellen. Je nach Gerätekonfiguration und eingesetztem Fluoreszenzfarbstoff ist es aber nicht auszuschliessen, dass auch grosse Viren, Archaeen, Hefen, Sporen, Algen, oder kleine Protozoen detektiert werden. Der Haupteinsatz der Methode erstreckt sich von der Wassergewinnung über die Trinkwasseraufbereitung, Speicherung und Verteilung bis hin zu Trinkwasserinstallationen in Gebäuden. Die Methode dient als mikrobiologischer Indikatorparameter (Prozessindikator) und liefert detaillierte Informationen über den allgemeinen mikrobiologischen Zustand einer Wasserprobe. Die hier beschriebene Methode liefert keine direkte Information zum hygienischen Zustand einer Wasserprobe oder einer Entnahmestelle.

1.2 Prinzip

Die Bakterien der zu messenden Wasserprobe werden mit einem präferentiell an doppelsträngige DNA bindenden Fluoreszenzfarbstoff angefärbt und für eine minimale Zeit bei einer bestimmten Temperatur inkubiert. Danach werden die gefärbten Proben im Durchflusszytometer gemessen. Die Zellen werden während der Messung durch eine von einem Laser durchstrahlte Kapillare geschleust. Jede den Laserstrahl passierende Zelle führt sowohl zu einem Streulichtsignal als auch zu einer Fluoreszenzlichtemission, die vom eingesetzten Fluoreszenzfarbstoff abhängt. Das entstehende Fluoreszenzlichtsignal wird über Filter zu Detektoren geleitet und dort erfasst. Durch die an das Durchflusszytometer gekoppelte Analysesoftware kann so jeder einzelnen Zelle ein spezifisches Fluoreszenz- und Streulichtsignal zugeordnet werden. Zudem erlaubt die Software eine Trennung der bakteriellen Signale vom Hintergrundrauschen. Die Kombination aus volumetrischer Zählung und der gerätespezifischen Software ermöglicht eine korrekte Bestimmung der Zellkonzentration.

1.3 Haftungsausschluss

Die zur Validierung dieser Methode genutzten und benannten Durchflusszytometer und Hilfsmittel (Geräte, Fluoreszenzfarbstoffe, Puffer etc.) sind benutzerabhängig und nicht notwendig bindend. Es können Alternativen genutzt werden, jedoch ist zu beachten, dass diese in ihren Spezifikationen den zur Durchführung der hier beschriebenen Methode benötigten Anforderungen entsprechen müssen, was auch nachzuweisen ist.

2 Abkürzungen, Begriffe und Definitionen

Abkürzung	Begriffe	Definition/Erläuterungen
	Beads	Mikrokugeln mit definierter Partikelgrösse und Fluoreszenzintensität, die zur Gerätekontrolle eingesetzt werden.
	Dot-Plot	Diagramm in Form einer Punktwolken-darstellung (zweidimensionale Darstellung von Messwerten, bei der jeder Partikel gemäss seiner X- und Y-Signalintensität als einzelner Punkt eingezeichnet wird).
DZ	Durchflusszytometrie	Verfahren zum Nachweis und zur Messung physikalischer und molekularer Merkmale einzelner Zellen oder Partikel. Eine Population von Zellen oder Partikeln kann damit schnell charakterisiert und quantifiziert werden.
	Gate	Bereich auf dem Dot-Plot, in dem die Zellen weiter analysiert bzw. gezählt werden.
	Gaten	Festlegen eines Gates im Dot-Plot. Beim Gaten wird ein Bereich im erhaltenen Dot-Plot ausgewählt, in dem die Zellen weiter analysiert bzw. gezählt werden.
GZZ	Gesamtzellzahl	Anzahl in einer Probe vorhandenen Zellen; dabei werden neben lebenden Zellen auch geschädigte, tote, aber noch intakte Zellen erfasst. Andere gebräuchliche Begriffe sind: <ul style="list-style-type: none"> • Totale Zellkonzentration (TZK) • Totale Zellzahl oder Totalzellzahl (TZZ) • Total Cell Count (TCC)
LoB	Blindwert, Limit of Blank	Höchste scheinbare Analyten-/Zellkonzentration, die erwartet wird, wenn Wiederholungen einer Negativkontrolle (Blindprobe), die keinen Analyten enthält, getestet werden.
LoD	Nachweisgrenze, Limit of Detection	Niedrigste Analyten-/Zellkonzentration, die zuverlässig vom LoB unterschieden werden kann und bei der ein Nachweis möglich ist.
LoQ	Bestimmungsgrenze, Limit of Quantification	Niedrigste Konzentration, ab der ein Analyt mit einer vorgegebenen Richtigkeit und Präzision quantitativ erfasst wird.

Abkürzung	Begriffe	Definition/Erläuterungen
SD	Standardabweichung, Standard Deviation	Streuungsmaß der Statistik, das die durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert beschreibt.
	Threshold	Schwellenwert, ab dem die Messwerte ausgewertet werden. Der Threshold wird so gewählt, dass das Geräuschen nur minimal in die Erfassung einfließt respektive das Rauschen unterdrückt wird.
	Trigger	System zur Selektion von Messwerten. In der DZ zur Erfassung der GZZ werden durch den Trigger auf die Grünfluoreszenz nur diese Signale erfasst.

Tabelle 1: Begriffe und Definitionen

3 Chemikalien, Farbstoffe und Materialien

3.1 Chemikalien

Für die Verdünnung von Proben können folgende Wässer eingesetzt werden:

- Handelsübliches stilles Mineralwasser oder Trinkwasser frei von Desinfektionsmitteln: Das Wasser wird zuvor durch einen Filter mit einer Porenweite von maximal 0.22 µm filtriert.
- Reinstwasser: Besonders gereinigtes/aufbereitetes Wasser, das keine bakteriellen Zellen und so gut wie keine Fremdstoffe enthält.

Anmerkung: Kleine Bakterienzellen werden von 0.22 oder 0.1 µm-Filter nicht komplett zurückgehalten. Für alle Verdünnungsmedien gilt deshalb die Anforderung: GZZ ≤ 1000 Zellen/ml.

Für die Verdünnung des Farbstoffes wird benötigt:

- Tris-Base-Puffer (10 mM; pH 8.0): Der Puffer wird autoklaviert und bei 5°C±3°C gelagert (der Puffer kann bei 5°C±3°C bis zu einem Jahr gelagert werden). Alternativ: Filtration mit einer Porenweite von maximal 0.22 µm direkt vor der Anwendung.

3.2 Farbstoffe

Folgender Fluoreszenzfarbstoff wird benötigt:

- Sybr Green I® Nucleic Acid Gel Stain, 10'000-fach konzentriert in DMSO

Anmerkung:

- Dieser Fluoreszenzfarbstoff wird mit Blaulicht angeregt ($\lambda_{\max} = 494 \text{ nm}$), bindet bevorzugt an doppelsträngige DNA und fluoresziert dann stark (ca. 1000-mal stärker als im ungebundenen Zustand) im grünen Bereich ($\lambda_{\max} = 521 \text{ nm}$); er fluoresziert aber auch noch schwach bis in den roten Bereich (bis 750 nm).
- Produkte anderer Hersteller mit ähnlichen Eigenschaften, welche den Geräteanforderungen entsprechen, können ebenfalls verwendet werden.

Vorverdünnung des Fluoreszenzfarbstoffes (Gebrauchslösung, optional):

- Der Fluoreszenzfarbstoff wird 100-fach in Tris-Base-Puffer (10 mM; pH 8.0) vorverdünnt.
- Der so vorverdünnte Fluoreszenzfarbstoff kann bis zu einem Jahr bei -20°C gelagert und mehrfach aufgetaut werden.

3.3 Material / Gerätschaften

- Durchflusszytometer (siehe Kapitel 4)
- Heizblock oder Inkubator (37°C±2°C)
- Reaktionsgefäße passend zum Messgerät respektive Autolader
- Pipettenspitzen und Pipetten
- Vortex (für Einzelproben)

4 Durchflusszytometer

4.1 Generell

Das für die Analyse von Wasserproben verwendete Durchflusszytometer ist nach den Herstellervorgaben installiert und betriebsbereit. Dies beinhaltet eine gründliche Reinigung und eine Gerätekontrolle zur Sicherstellung der Zählgenauigkeit sowie der Funktionstüchtigkeit des Gerätes.

4.2 Minimale Geräteanforderungen

- Anregungslaser: 488 nm, mindestens 20 mW
- Emissionsfilter: 500-560 nm (Grünfluoreszenz) und > 610 nm (Rotfluoreszenz)
- Volumetrisches Zählverfahren (Hardware und Software)

4.3 Gerätekontrolle / Messkontrolle (Beads)

Bei jeder Inbetriebnahme sollte die Funktionalität (Laserstärke, Ausrichtung des Lasers und der Messzelle, Blockaden in der Probenadel oder der Messzelle, Fluidik etc.) des Durchflusszytometers mit Hilfe der vom jeweiligen Hersteller zu diesem Zweck ausgewiesenen Fluoreszenzpartikel (Beads) für die Gerätekontrolle überprüft werden (Abbildung 1).

Zur Prüfung der Zählgenauigkeit des verwendeten Durchflusszytometers sollte eine Bead-Kontrolle (counting beads) verwendet werden, welche eine definierte Konzentration an gefärbten Beads enthält. Diese werden im Idealfall mit denselben Einstellungen gemessen wie die nachfolgenden Wasserproben. Es ist möglich, für die Gerätekontrolle und die Überprüfung der Zählgenauigkeit dieselben Beads zu verwenden. Abbildung 1 zeigt ein Beispiel für eine Gerätekontrolle mit standardisierten Beads.

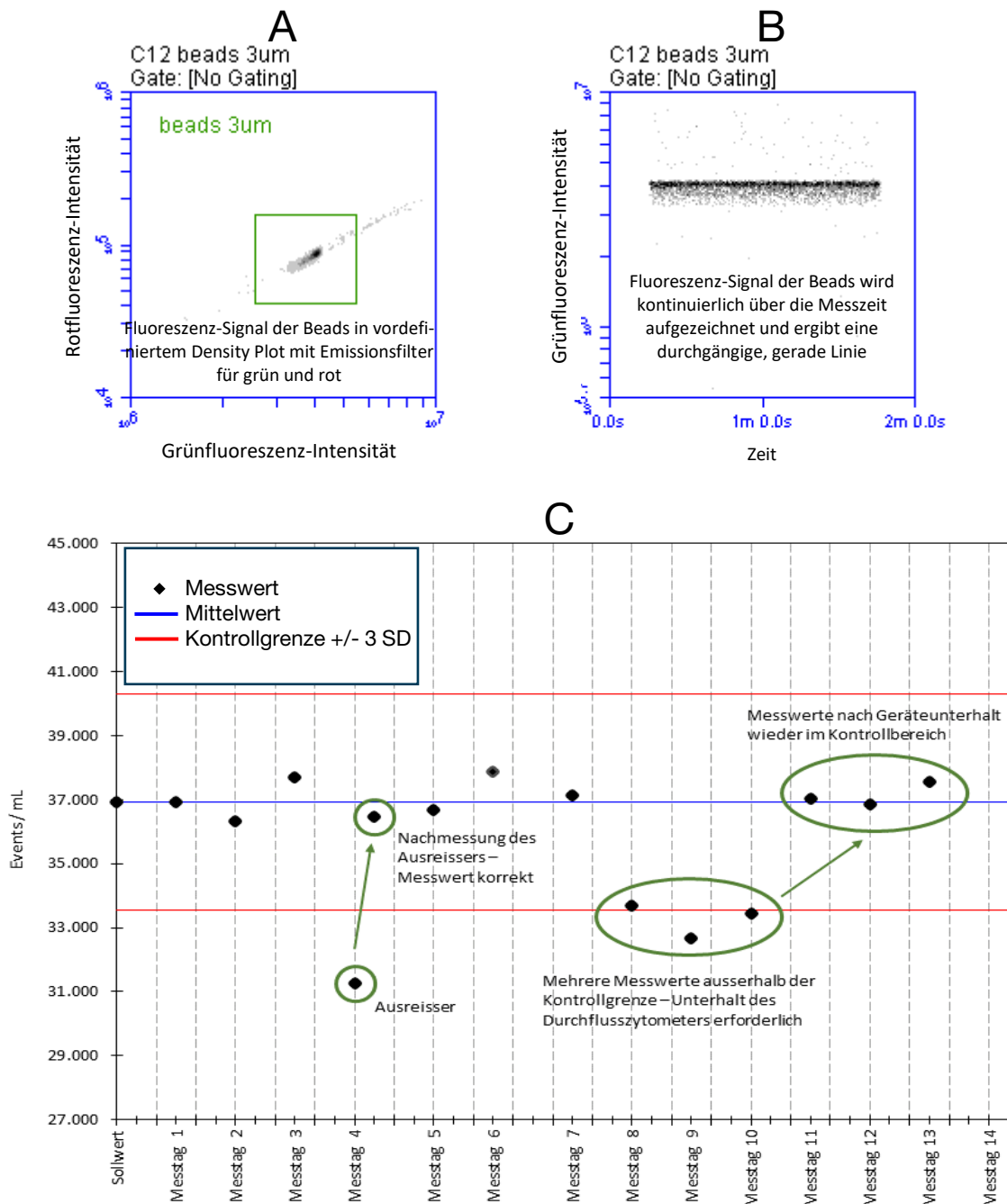


Abbildung 1: Beispiel der Verwendung von käuflich zu erwerbenden Fluoreszenz-Beads zur Qualitätskontrolle eines Gerätes (3-µm-Validierungspartikel). (A) Die Beads werden im gleichen vordefinierten Gate wie die spätere Messung der Proben erfasst; (B) bei einem korrekt betriebenen Gerät ergibt die Messung der Beads über die Messzeit der Analyse hinweg eine durchgängige gerade Linie; (C) Beispiel eines Kontrollblattes der Messungen mit Beads über eine längere Messperiode. Diese dient zur Überprüfung der Geräteperformance.

5 Vorbereitung der Probe

5.1 Aufbewahrung / Transport

Die zu analysierenden Wasserproben können für max. 8 h bei $5^{\circ} \pm 3^{\circ} \text{C}$ gelagert werden. Längere Lagerungszeiten müssen vorgängig getestet werden.

5.2 Fixierung (optional)

Proben können in speziellen Fällen (z.B. lange Transportzeiten) fixiert werden. Es wird empfohlen, das Fixierungsprotokoll vorgängig zu testen.

Beispiel für einen Fixierungspuffer:

12.0	ml	Reinstwasser
0.5	ml	Paraformaldehyd (32% Stocklösung)
3.0	ml	Glutaraldehyd (5.6 M; 50% Stocklösung)
<hr/>		
15.5	ml	Gebrauchslösung

Anwendung: Die Gebrauchslösung wird 100-fach in der zu analysierenden Probe verdünnt.

6 Färbung und Messung von Wasserproben

Der Ablauf der Färbung und Messung von Wasserproben ist im Fließdiagramm der Abbildung 2 wiedergegeben.

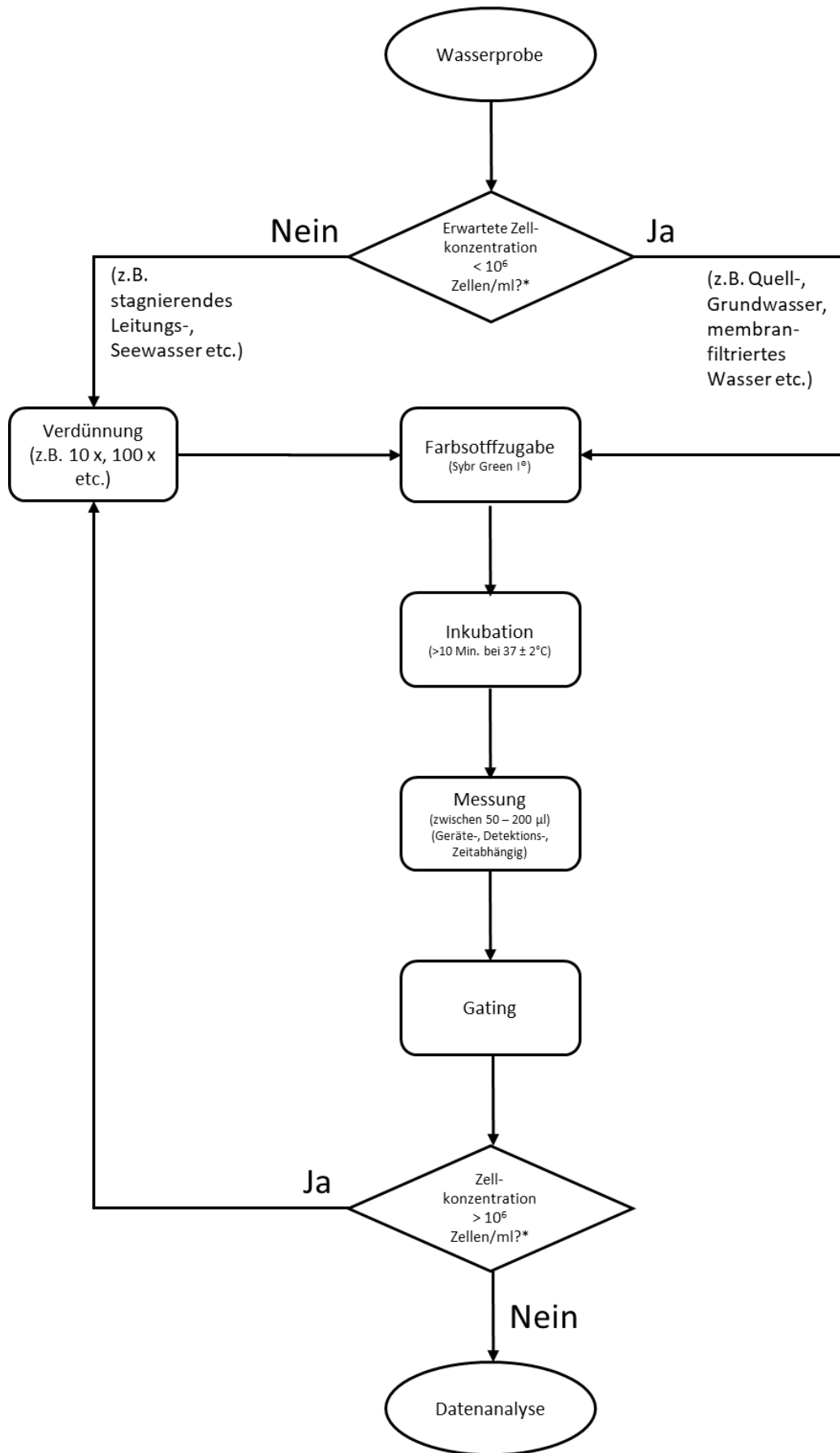


Abbildung 2: Ablauf der Färbung und Messung einer Wasserprobe.

*) Die maximale Zellkonzentration kann gerätespezifisch unterschiedlich sein (siehe 6.1)

6.1 Verdünnung von Proben

Bei der zu messenden Probe sollte die Detektionsobergrenze des verwendeten Gerätes (typischerweise ca. 10^6 Zellen/ml) nicht überschritten werden. Ansonsten muss die Probe vor der Färbung verdünnt werden. Hierzu wird eines der in Kapitel 3.1 beschriebenen Verdünnungsmedien verwendet.

Die Detektionsobergrenze ist abhängig vom linearen Bereich des Gerätes. Die Bestimmung des linearen Bereichs wird im Anhang 3 beschrieben.

6.2 Anfärben von Proben

Für das Anfärben der Probe wird 1 Teil vorverdünnter Fluoreszenzfarbstoff in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und 99 Teile Wasserprobe hinzugegeben. Die Endkonzentration des Fluoreszenzfarbstoffes in der zu messenden Wasserprobe entspricht somit einer 10'000-fachen Verdünnung der originalen Stocklösung (vgl. Kapitel 3.2).

Die Probe gut mischen (vortexen für Einzelproben; bei Verwendung von Multi-Platten die Probe durch mehrfaches Aufziehen mit der Pipette und anschließendes Ausstossen mischen).

Die angefärbte Probe wird für mindestens 10 Minuten und bis maximal 60 Minuten bei 37°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) im Dunkeln inkubiert.

Über verschiedene Messreihen hinweg sind die gewählten Färbebedingungen konstant zu halten.

6.3 Negativkontrolle (Blindprobe)

Ziel der Negativkontrolle ist, Informationen über die Sauberkeit des Gerätes, des Verdünnungsmediums und der eingesetzten Farbstofflösung zu erhalten.

Als Negativkontrolle wird eines der in Kapitel 3.1 beschriebenen Verdünnungsmedien verwendet. Die Negativkontrolle wird nach dem gleichen Färbeprotokoll behandelt, wie in Kapitel 6.2 beschrieben.

Anforderung an die Negativkontrolle: $\text{GZZ} \leq 1000$ Zellen/ml

Abbildung 3 zeigt das Punktwolkendiagramm (Dot-Plot, links) und das Histogramm (rechts) einer Negativkontrolle (filtriertes, stilles Mineralwasser). Zum Vergleich ist die Originalprobe vor der Filtration in Abbildung 4 gezeigt.

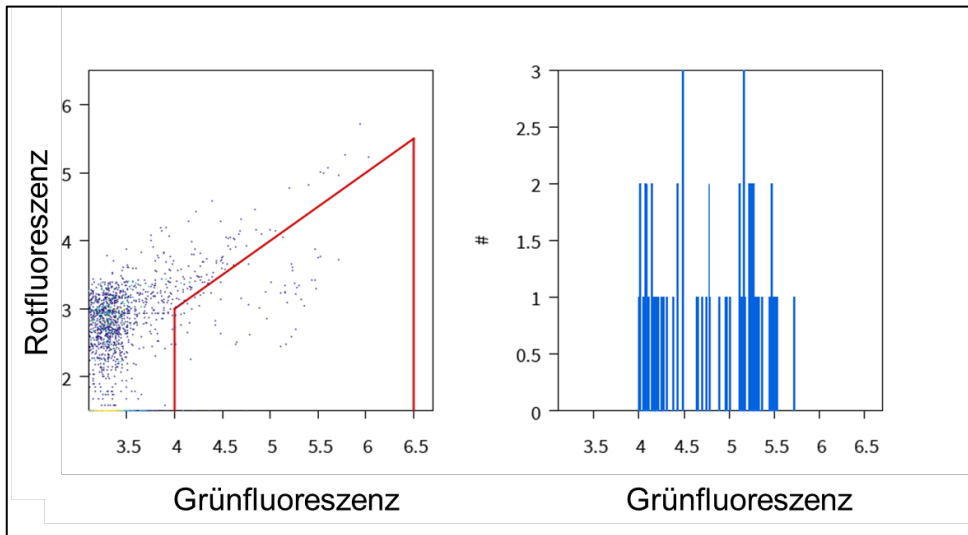


Abbildung 3: Dot-Plot (links) und Histogramm (rechts) einer Negativkontrolle (stilles Mineralwasser zweimal durch 0.2 µm-Membranfilter filtriert). Im Histogramm sind die wenigen Zellen noch zu sehen (GZZ = 720 Zellen/ml), die vom Instrumentenrauschen her ins GZZ-Gate fallen.

Beachte, im Histogramm wird das im Dot-Plot ersichtliche Geräterauschen auf der linken Seite nicht erfasst, da es sich ausserhalb des gesetzten Gates befindet.

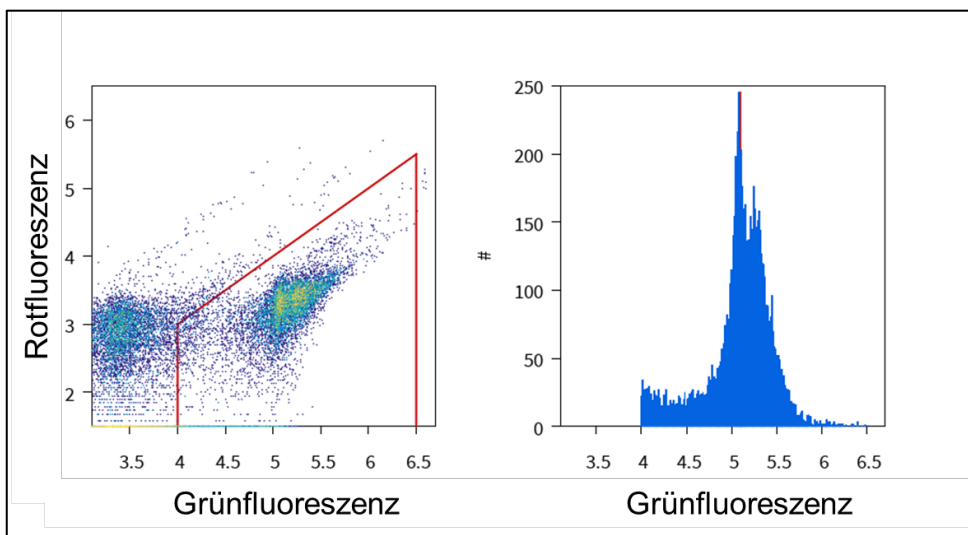


Abbildung 4: Dot-Plot (links) und Histogramm (rechts) der in Abb. 3 gezeigten Negativprobe vor der Filtration (stilles Mineralwasser mit einer GZZ von 109'250 Zellen/ml).

6.4 Positivkontrolle

Ziel der Positivkontrolle ist, die Färbung bezüglich Qualität oder auf Kontaminationen zu testen.

Als Positivkontrolle wird eine Wasserprobe mit bekanntem Messergebnis verwendet. Es kann sich hierbei um eine Reinkultur, eine bekannte Wasserprobe, fixiertes stilles Mineralwasser etc. handeln.

Abbildung 5 zeigt den Dot-Plot und das Histogramm einer Positivkontrolle.

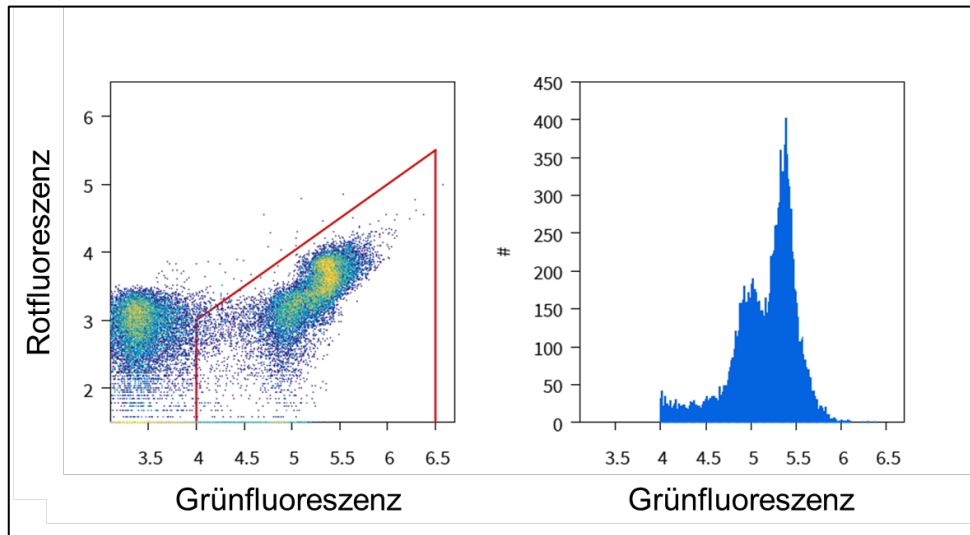


Abbildung 5: Dot-Plot (links) und Histogramm (rechts) einer Positivkontrolle (stilles Mineralwasser mit einer GZZ = 193'870 Zellen/ml) zeigt klar detektierbare Events im Gate für Bakterien. Beachte: Im Histogramm wird das im Dot-Plot ersichtliche Geräterauschen auf der linken Seite nicht erfasst, da es sich ausserhalb des gesetzten Zähl-Gates befindet.

6.5 Messung der Probe

Die zu messende angefärbte Wasserprobe wird dem Durchflusszytometer zugeführt und mit den entsprechenden Einstellungen gemessen (vgl. Kapitel 4 und 7). Es sollte ein minimales Probevolumen von 50 µl gemessen werden.

Es werden nur die Partikel mit grüner Fluoreszenz (Trigger) über einem definierten Schwellenwert (Threshold) erfasst.

Falls bei der Analyse der Proben ein geräteinterner «Autoloader» mit der Möglichkeit zum Mischen der Probe verwendet wird, sollte dies vorgängig getestet werden, um sicherzustellen, dass kein Anhaften der Zellen an der Gefässwand oder eine Verschleppung von Zellen von Proben mit hoher GZZ in eine nachfolgende Probe mit kleiner GZZ erfolgt.

7 Datenanalyse / Gating

Ziel des Gatens: Die Festlegung des Bereichs der auszuzählenden Signale. Damit werden die Zellsignale vom Hintergrund und Geräterauschen abgegrenzt.

- Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wird ein zweidimensionales Punktwolken-Diagramm (Dot-Plot) verwendet. Dabei ist auf der X-Achse die Signalstärke der Grünfluoreszenz G-FL (z.B. 530±30 nm) und auf der Y-Achse die Signalstärke der Rotfluoreszenz R-FL (z.B. > 610 nm) aufgetragen.
- Durch Legen eines Gates im G-FL/R-FL-Dot-Plot wird der Bereich definiert, innerhalb dessen die Signale (Punkte) zur Bestimmung der Gesamtzellzahl gezählt werden.
- Es wird empfohlen, ganze Probeserien mit konstant gesetztem Gate sowie den definierten Geräteeinstellungen zu messen und nicht für jede Probe ein optimales Gate zu definieren.

In Abbildung 6 sind typische Dot-Plots verschiedener Wasserproben mit dem Gate für Bakterien zu sehen.

Mögliche Strategien zum Legen eines Gates sind in Anhang 1 beschrieben. Mehr Informationen zum Gating in kritischen Fällen können dem Leitfaden von Eawag, SVGW, BLV (Kapitel 9) entnommen werden.

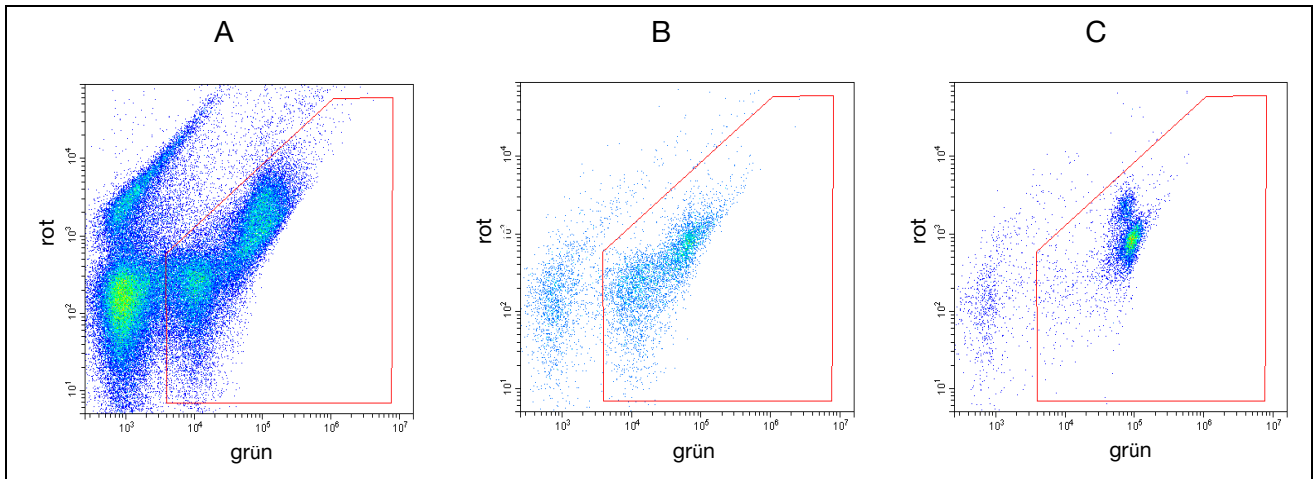


Abbildung 6: Typische Dot-Plots verschiedener Wasserproben mit identischen Gates und identischen Geräteeinstellungen. (A) Flusswasser, (B) Leitungswasser, (C) stilles Mineralwasser.

8 Angabe von Ergebnissen

Das Messergebnis wird als Anzahl Zellen pro Milliliter angegeben (x Zellen/ml).

9 Weiterführende Literatur

1. SLMB 333.1

Originalmethode, die als primäre Grundlage zur Aktualisierung der Methode diente.

Schweizerisches Lebensmittelbuch - Untersuchungsmethode 333.1: Bestimmung der Totalzellzahl und des qualitativen Verhältnisses der Zellen niedrigen bzw. hohen Nukleinsäuregehaltes in Süßwasser mittels Durchflusszytometrie (Bundesamt für Gesundheit, Bern)

<https://www.svgw.ch/wasser/methodenplattform/methodenkatalog/mw-102-zusatzdokumente/>

2. Leitfaden von Eawag, SVGW und BLV

Der Leitfaden wurde erstellt, um Erstanwendern den Einstieg in die durchflusszytometrische Analyse von Wasserproben zu erleichtern. Er dient ausserdem der Erweiterung und Erläuterung der Methodenschrift 333 «Bestimmung der Totalzellzahl und des quantitativen Verhältnisses der Zellen niedrigen bzw. hohen Nukleinsäuregehaltes in Süßwasser mittels Durchflusszytometrie» des Schweizerischen Lebensmittelbuchs (SLMB).

Kötzsch S, Alisch S, Egli T (2012): Durchflusszytometrische Analyse von Wasserproben. (Bundesamt für Gesundheit, Bern)

<https://www.svgw.ch/wasser/methodenplattform/methodenkatalog/mw-102-zusatzdokumente/>

3. Prest et al. (2013)

Publikation, welche die Bedeutung von standardisierten Einstellungen und Gaten für die mikrobielle Analyse von Wasserproben mit einem Durchflusszytometer beschreibt.

Prest EI, Hammes F, Köttsch S, van Loosdrecht MC, Vrouwenvelder JS (2013): Monitoring microbiological changes in drinking water systems using a fast and reproducible flow cytometric method. Water Research 47: 7131-7142

<https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.07.051>

4. Ho et al. (2020)

Weiterentwicklung und Validierung der Durchflusszytometrie als schnelle Detektionsmethode für Bakterien in Roh- und Trinkwasser (Deutscher Verein des Gas- und Wasserfaches e.V.):

Ho J, Tiehm A, Nocker A, Bendinger B, West S, Trimbach A (2020): Durchflusszytometrie als schnelle Detektionsmethode für Bakterien in Roh- und Trinkwasser. Energie Wasser Praxis 1/2020: 56-59

<https://www.dvgw.de/medien/dvgw/forschung/berichte/2001ho.pdf>

Ho J et al. (2020) Durchflusszytometrie als schnelle Detektionsmethode für Bakterien. Band 94. TZW: DVGW-Technologiezentrum Wasser, Karlsruhe. ISSN 1434-5765.

5. Zunabovic-Pichler et al. (2018)

Durchflusszytometrie in der Wasserversorgung; Mikrobiologische Charakterisierung von Einflussfaktoren und Zustandsveränderungen bei der Wasserversorgung (Bundesministerium; Nachhaltigkeit und Tourismus, Wien):

<https://info.bmlrt.gv.at/service/publikationen/wasser/Durchflusszytometrie-in-der-Wasserversorgung.html>

10 Verfügbare Geräte

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über kommerziell erhältliche Durchflusszytometer. Die Tabelle wurde in angepasster Form übernommen aus: Ho J et al. (2020) Durchflusszytometrie als schnelle Detektionsmethode für Bakterien. Band 94. TZW: DVGW-Technologiezentrum Wasser, Karlsruhe. ISSN 1434-5765.

Es besteht kein Anspruch auf Vollständigkeit.

Firma	Land	Gerätenamen
Laborgeräte		
BD Biosciences	USA	BD Accuri C6
Beckman Coulter	USA, Deutschland	Diverse Geräte, z.B. CytoFLEX Analyser
Bio-Rad	USA	S3e
Bucher Biotec	Schweiz	iQue Screener
Cenibra	Deutschland	Celigo S - Imaging Cytometer
Handyem	Kanada	HPC-100 Portable
Life Technologies	USA	2020 Attune NxT Flow Cytometer
Merck Millipore	USA, Deutschland	Muse Cell Analyser guava easyCyte 5
Miltenyi Biotec	Deutschland	MACSQuant Analyzer 10
OLS Omni Life Science	USA, Deutschland	NovoCyte
Sony	USA	SP6800 Spectral Analyzer SH800 Cell Sorter
Sysmex Partec	Deutschland	CyFlow Cube 6 CyFlow Cube 8 CyFlow Space CyFlow Ploidy Analyser
Zellkraftwerk	Deutschland	ZellScannerONE
ACEA	USA	NovoCyte
Cytec	USA	Aura
Sartorius	USA	iQue3
Luminex Corporation	USA	CellStream® Flow Cytometer
Union Biometrica	USA	COPAS VISION
Apogee Flow Systems	USA	A50-Micro
Online Geräte (Monitoring)		
oncyt	Schweiz	OC-400 (als Upgrade für bestehende Flowzytometer)
bNovate	Schweiz, Deutschland	Bactosense
Metanor	Schweiz	Online Bacteria Analyser

Tabelle 2: Übersicht der verfügbaren Durchflusszytometer

Auf der Methodenplattform sind Application Notes von verschiedenen Herstellern zu finden, welche die gerätespezifischen Anforderungen und Einstellung beschreiben, um die hier beschriebene Methode durchzuführen:

<https://www.svgw.ch/wasser/methodenplattform/methodenkatalog/mw-102-zusatzdokumente/>

Anhang 1 Strategie zum Legen eines Gates für die GZZ-Bestimmung in einer Wasserprobe

Hintergrund:

Das korrekte Setzen eines Gates einer Probe bereitet neuen Anwendern der Methode meist Schwierigkeiten und kann die Vergleichbarkeit von Proben unterschiedlicher Wässer beeinträchtigen. Hier wird zusammengefasst, was beim Gating zu beachten ist und wie ein Gate, das für unterschiedliche Trinkwasserproben anwendbar ist, erstellt werden kann.

Ziel des Gates:

Mit dem Erstellen des Gates werden in der Regel zwei Ziele verfolgt:

- Das Gate soll eine wiederholbare Auszählung der Bakterien im Trinkwasser ermöglichen, um Veränderung in der Zellzahl möglichst gut zu erkennen.
- Das Gate soll den Vergleich nicht nur unterschiedlicher Proben, sondern auch zwischen verschiedenen Messgeräten ermöglichen.

Um diese beiden Ziele zu erreichen, ist es notwendig, dass die Zellen von anderen (Stör-) Signalen separiert und letztere so gut wie möglich ausgeblendet werden. Die folgenden Störfaktoren können dabei auftreten (vergleiche Abbildung 7):

- Es werden zusätzlich zu den Zellen nicht-zelluläre Partikel (im oberen Bereich) erfasst
- Das Instrumentenrauschen zieht sich (von links her) ins Gate, wodurch «Phantompartikel» gezählt werden.

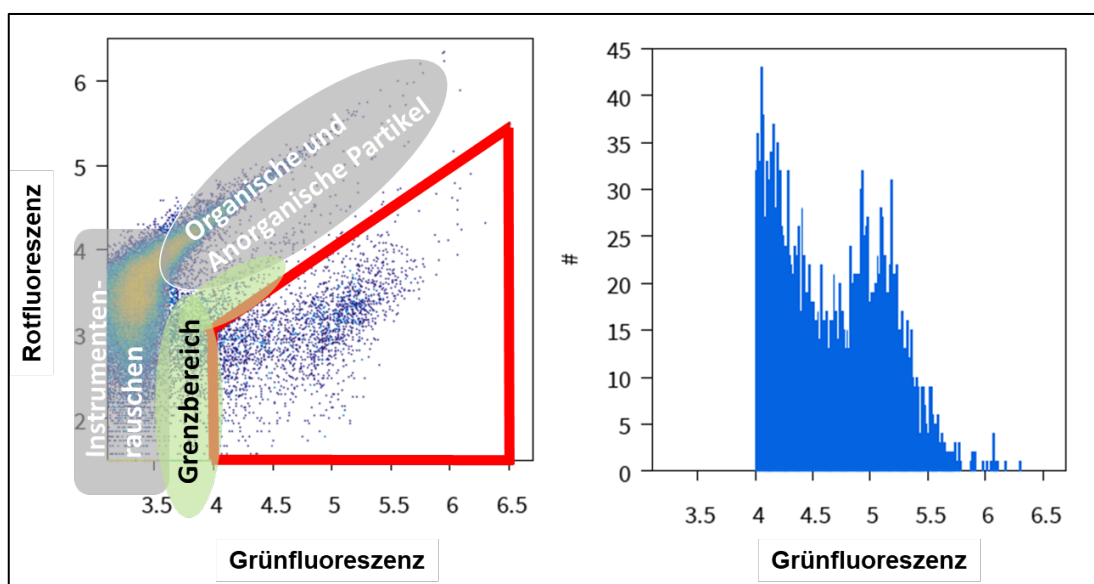


Abbildung 7: Lokalisierung von Instrumentenrauschen, nicht-zellulärer Partikel und der angefärbten Zellen im Dot-Plot (links) und Histogramm (rechts). Die angefärbten Bereiche können bei der GZZ-Bestimmung die Datenauswertung beeinflussen. Innerhalb des durch die roten Linien begrenzten Trapezes, werden die erfassten Signale als angefärbte mikrobielle Zellen bewertet und für die Auszählung erfasst. Der gezeigte Dot-Plot visualisiert die Resultate für ein Quellwasser.

Kommentar:

Einige Durchflusszytometer verfügen über ein Mustergate für Trinkwasserproben mit den entsprechenden Einstellungen der Optik oder ein solches kann aus den Application Notes abgeleitet werden.

Neuanwendern wird empfohlen, sich über die entsprechenden Geräteeinstellungen bei erfahrenen Wasserversorgungen oder Institutionen zu informieren. Kontakte können über den SVGW vermittelt werden.

Hier kann das Mustergate durch bekannte Trinkwasserproben und Filtrieren der Probe, wie in den Kapiteln 6.3 «Negativkontrolle (Blindprobe)» und 6.4 «Positivkontrolle» beschrieben, überprüft werden.

Bei Instrumenten, die veränderbare Optikeinstellungen haben und über kein Mustergate verfügen, ist eine Kalibrierung mit Referenzbeads hilfreich. Mit Hilfe von Referenzbeads können die Optikeinstellungen geprüft und die Grobform des Gates festgelegt werden (vgl. «Vorgehen Beads-Kalibration unten).

Wasserspezifische Anpassung des Gates ausgehend von einer bestehenden Vorlage / Mustergate:

Abbildung 8 zeigt das Histogramm und den Dot-Plot einer Trinkwasserprobe (stilles Mineralwasser mit einer GZZ von 65'280 Zellen/ml) eines Instruments, das über ein Standardgate für Trinkwasserproben verfügt. Die obere diagonale Grenzlinie verläuft parallel, leicht unterhalb der Punktwolke der organischen und anorganischen Partikel, so dass diese in der Zählung nicht erfasst werden. Auf der linken unteren Seite drückt die Punktwolke des Instrumentenrauschens noch leicht in das Gate der Zellen. Solche Störsignale können nicht immer vollständig eliminiert werden. Ihr Anteil am Zählergebnis wird aber durch gutes Gating minimiert.

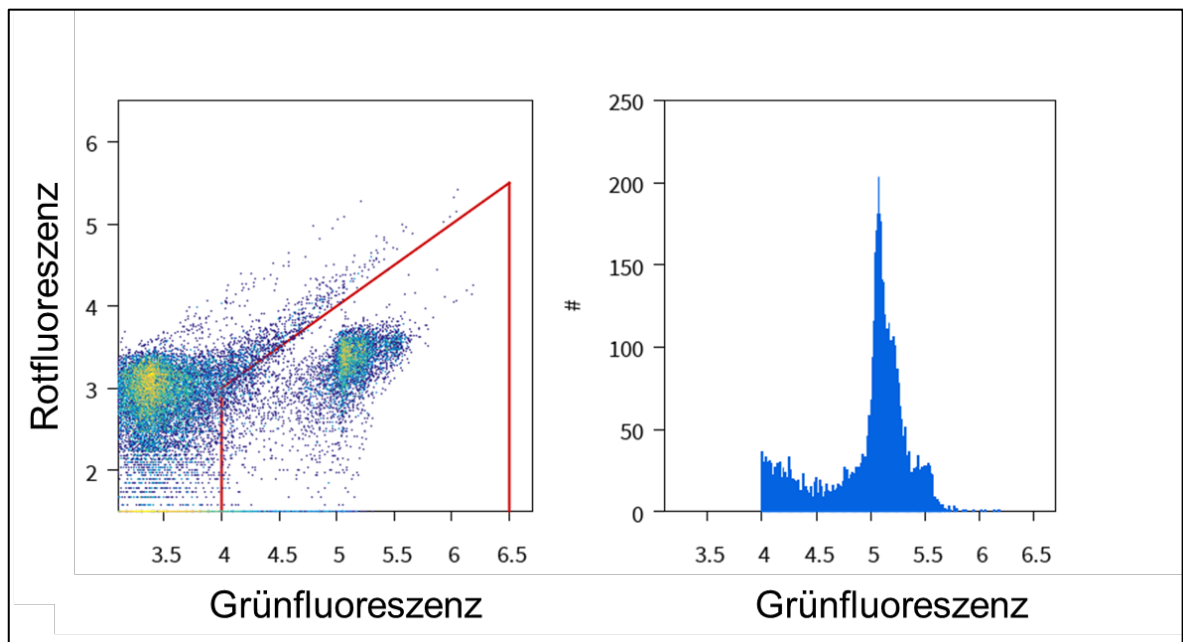


Abbildung 8: Dot-Plot und Histogramm eines Geräts mit Standardgate für Trinkwasser. Bei der Probe handelt es sich um käufliches, stilles Mineralwasser.

Ob das vorgegebene Gate für eine gewählte Serie von Proben möglichst robust und präzise ist, kann folgendermassen abgeklärt werden:

- Durch das Messen eines «ultrapuren» Wassers wird geprüft, ob diese Grenze sinnvoll gesetzt wurde. Ultrapures Wasser oder filtriertes Wasser sollte nur wenige Zellen (<1'000 /ml) innerhalb des Gates aufweisen (vergleiche Kapitel 6.3. Negativkontrolle).
- Durch die Messung eines Referenzwassers (z.B. stilles Mineralwasser) sollte sichergestellt werden, dass die Bakterienpopulationen innerhalb des Gates liegen und gleichzeitig das Instrumentenrauschen von links her keinen signifikanten Beitrag zur Zellzahl macht (vgl. Abbildung 8). Der Anteil dieser Zellen im Grenzbereich kann durch Verschieben der linken senkrechten Grenzlinie nach links oder rechts und erneutes Auszählen bestimmt werden.

- Es wird empfohlen nach Durchführung der ersten Messungen anhand des Histogramms nochmals zu kontrollieren, ob mit dem gewählten Gate kein starker Einfluss des Instrumentenrauschens auf die Zellzahl entsteht (vergleiche Abbildung 9).

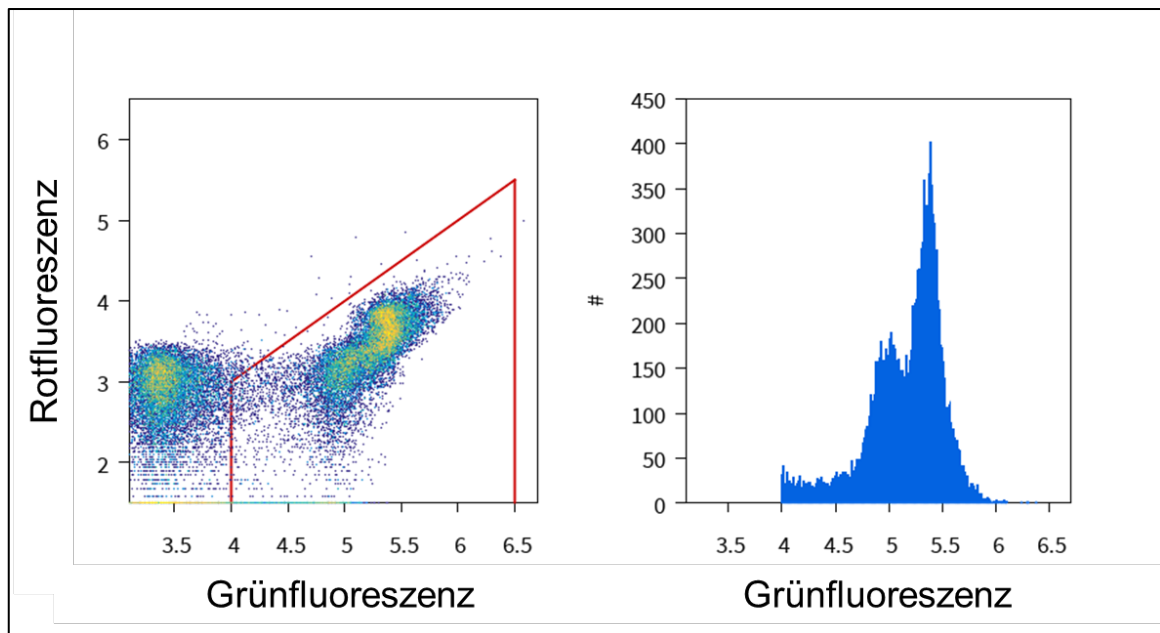


Abbildung 9: Überprüfung eines korrekt gelegten Gates mit Hilfe eines Referenzwassers (käufliches, stilles Mineralwasser mit einer GZZ von 193'870 Zellen/ml). Auf dem Histogramm unten links ist klar ersichtlich, dass das Instrumentenrauschen (links auf FL1 Achse) höchstens einen irrelevanten Beitrag zur Zellzahl beiträgt.

Vorgehen für Instrumente ohne Standard-Gate für Trinkwasser mit Hilfe von Beads:

Für diese Methode sind ein sauberes und korrekt kalibriertes Durchflusszytometer sowie die käuflich zu erwerbenden Validierungsbeads (Spherotech 8-Peak Validation Beads (BD Cat-Nr. 653144)) erforderlich.

Das Vorgehen in zwei Schritten ist in Abbildung 10 beschrieben.

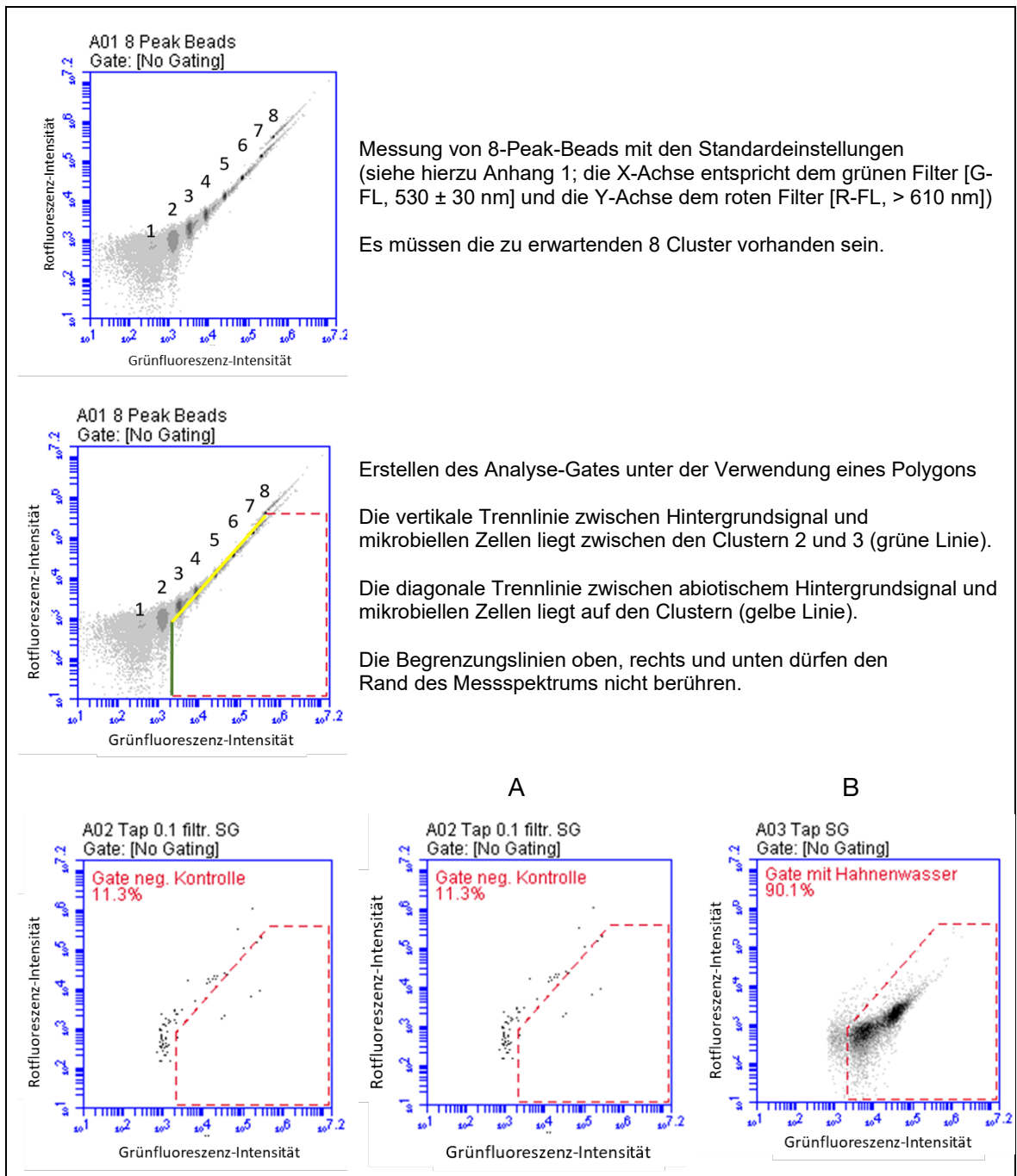


Abbildung 10: Vorgehen zum Legen des Gates (oben) und zwei Beispiele, bei denen dieses Gate verwendet wurde (A: Negativkontrolle, B: Leitungswasser).

Wird das Gate mit Hilfe von Beads bestimmt, so muss das erhaltene Gate analog der Beschreibung «Wasserspezifische Anpassung des Gates ausgehend von einer bestehenden Vorlage / Mustergate» überprüft werden.

Anhang 2 Erfahrungswerte

Verwendung von Erfahrungswerten

Gemäss SVGW-Richtlinie W12 dient die GZZ-Bestimmung mittels Durchflusszytometrie primär dazu, Veränderungen der Bakterien-Gesamtpopulation zu erkennen (Stabilitäts-, Zustands-, Trendüberwachung oder abnormale Veränderungen). Sie liefert hingegen nur sehr eingeschränkte Aussagen über die Einhaltung von trinkwasserhygienischen Höchstwerten, die für Parameter basierend auf kulturellen Nachweismethoden festgelegt wurden. Insbesondere gibt es keine Korrelation zwischen der durchflusszytometrisch bestimmten GZZ und der mittels Plattierung gemessenen Anzahl AMK (aerobe mesophile Keime). Sind Erfahrungswerte in einer Wasserversorgung vorhanden, ist die durchflusszytometrische GZZ-Bestimmung jedoch ein äusserst nützliches Instrument zur Kontrolle und Steuerung von Prozessschritten (Prozessindikator).

Ermittlung von Erfahrungswerten

Weil die Gesamtzellzahl (GZZ) in verschiedenen Roh- und Trinkwässern erheblich variiert (10^3 bis 10^7 Zellen/ml) in Abhängigkeit von deren geografischer Herkunft, der Wasserresource/-quelle und den vorangegangenen Aufbereitungsschritten (siehe Abbildung 11), werden in der W12 keine Erfahrungswerte für die GZZ angegeben. Vielmehr ist es an jedem einzelnen Wasserversorger, für sein System von der Wassergewinnung über die allfällige Aufbereitung bis hin zur Speicherung und Verteilung Erfahrungswerte zu sammeln.

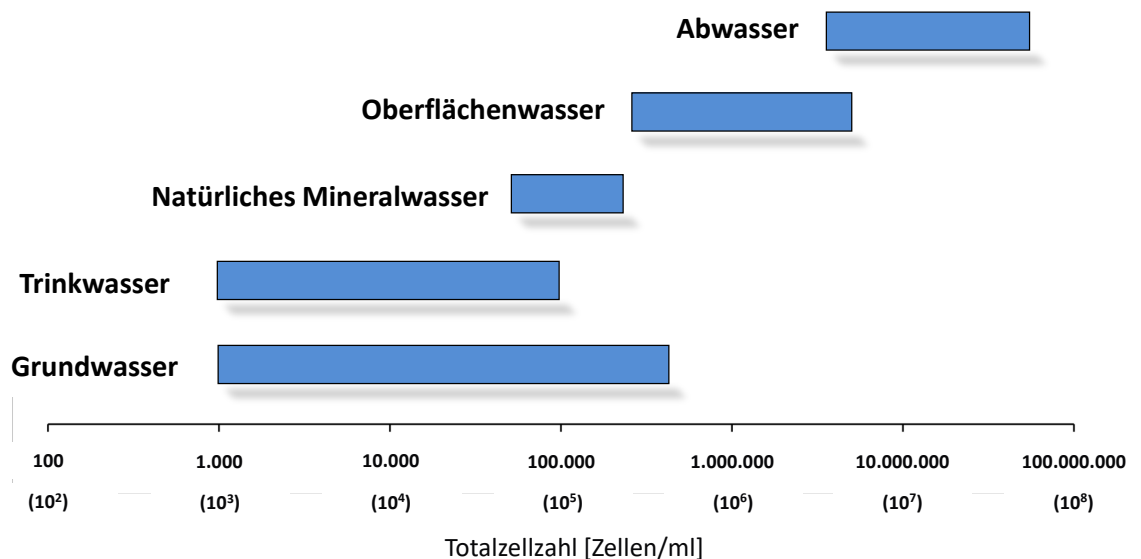


Abbildung 11: Bereiche GZZ, die in verschiedenen Wassertypen üblicherweise gefunden werden. Aus: S. Köttsch; M. Sinreich (2014): Zellzahlen zum Grundwasser – Bestimmung mittels Durchflusszytometrie. Aqua & Gas 3/2014: 14-21

Der Mehrwert von Erfahrungswerten besteht darin zu prüfen, (1) ob eine neue Messung mit früheren Messungen derselben Wasserprobe oder Wasserkategorie übereinstimmt (interner Vergleich) oder (2) ob eine Wasserprobe anderen Wässern derselben Kategorie von verschiedenen Standorten ähnlich ist (externer Vergleich). Neuen Anwendern wird empfohlen, die standardisierte Durchflusszytometrie-Methode auf eine grosse Anzahl ihrer eigenen Proben aus jeder der für sie interessanten Wasserkategorien anzuwenden und so ihre eigenen Erfahrungswerte für ihr spezifisches System zu erhalten.

Verschiedene schweizerische Wasserversorger, Forschungsinstitutionen und auch die Nationale Grundwasserbeobachtung NAQUA haben bereits in Roh- und Trinkwässern die GZZ mithilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Die dabei ermittelten Werte können bei der Einordnung eigener Werte hilfreich sein, vor allem zu Beginn der Sammlung eigener Erfahrungswerte. Im Folgenden werden daher relevante Aqua & Gas-Artikel aufgelistet sowie die Erfahrungswerte dreier Wasserversorger zusammengefasst.

Artikel im Aqua & Gas zur Durchflusszytometrie und mit GZZ-Werten

In der SVGW-Fachzeitschrift Aqua & Gas (bzw. gwa) wurden bereits zahlreiche Artikel veröffentlicht, in denen die Anwendung der Durchflusszytometrie in Roh- und Grundwässern, in Wasserversorgungen und in Trinkwasserinstallationen in Gebäuden beschrieben wie auch die dabei ermittelten GZZ-Werte angegeben wurden (geordnet nach Erscheinungsdatum):

Egli, T.; Hammes, F. (2010): Neue Methoden für die Wasseranalytik. gwa 4/2010: 315-323

Helbing, J. et al. (2012): Online-Flowzytometrie in der Praxis – von der Platte über die Zelle zur Clusteranalyse. A&G 5/2012: 28-33

Köster, O. (2012): Durchflusszytometrie beim Wasserversorger – heutige Anwendungen und künftige Bedürfnisse. A&G 5/2012: 24-27

Kötzsch, S.; Egli, T. (2013): Kunststoffe in Kontakt mit Trinkwasser – Labortests und Realität. A&G 3/2013: 44-52

Egli, T.; Bucheli, M. (2014): Wie viele Zellen sind im Trinkwasser? – Durchflusszytometrie in der mikrobiologischen Trinkwasseranalyse: wie weiter? A&G 11/2014: 90-97

Kötzsch, S.; Sinreich, M. (2014): Zellzahlen zum Grundwasser – Bestimmung mittels Durchflusszytometrie. A&G 3/2014: 14-21

Besmer, M.D. et al. (2016): Online-Durchflusszytometrie in der Praxis: Fenster in die Welt mikrobiologischer Dynamiken in Wasser – von der Quelle bis zum Wasserhahn. A&G 7+8/2016: 73-77

Epting, J. et al. (2017): Variabilität der Grundwasserqualität – Einflussfaktoren für die Grundwasserqualität flussnaher Trinkwasserfassungen. A&G 2/2017: 30-39

Bürgmann, H.; Imminger, S. (2017): Antibiotikaresistenzen im Trinkwasser? A&G 10/2017: 60-66

Egli, T. et al. (2017): Automatische Online-Überwachung – Bestimmung der Bakterienzahl im Roh- und Trinkwasser: Resultate aus der Praxis. A&G 10/2017: 52-59

Füchslin, H.P. et al. (2018): Durchflusszytometrie – von der Forschung in die Routine: Standardisierung, Beurteilungskriterien, Anwendung. A&G 5/2018: 15-18

Prest, E.I. et al. (2018): Analyse microbiologique en ligne – Etude des variations de la qualité microbiologique de l'eau potable dans une usine de traitement. A&G 5/2018: 20-24

Brand, P.; Wülser, R. (2018): Online-Messung mikrobiologischer Parameter – Überwachung von Fluss- und Grundwasser mittels Online-Analyseverfahren. A&G 6/2018: 22-28

Montandon, P.-E. et al. (2019): Cytométrie de flux – Réseaux de la Chaux-de-Fonds et du Locle: Analyse de la qualité microbiologique de l'eau potable. A&G 6/2019: 26-35

Boss, R. et al. (2020): Legionellen-Nachweismethoden im Vergleich – Fallabklärungen: Resultate abhängig von Analysemethode und Beprobungstechnik. A&G 6/2020: 36-42

Pronk, M. et al. (2020): Etat microbiologique de l'eau potable – Etude par cytométrie en flux des eaux alimentant la région Yverdon-les-Bains – Grandson. A&G 6/2020: 22-29

Hauret, A. et al. (2021): Cytométrie de flux en ligne sur la production d'eau potable: Appréciation de l'efficacité de la filtration et de la désinfection – cas de Lausanne. A&G 7+8/2021: 30-38

Bürgmann, H. et al. (2022): Antibiotikaresistenz bei Wasserbakterien – Sind nur grosse resistent? Durchflusszytometrie verknüpft mit Molekularbiologie gibt Aufschluss. A&G 7+8/2022: 42-48

Egli, C. et al. (2022): Ein Flowcytometer im Pfadilager – Trinkwassersicherheit in einem Bundeslager. A&G 12/2022: 24-32

Jacquemettaz, G. et al. (2023): Cytométrie en flux en ligne – De l'eau potable malgré les intempéries: Automatiser pour garantir la qualité de l'eau. A&G 7+8/2023: 24-29

Alle Artikel sind im Aqua & Gas-E-Paper ([Shop/Regelwerk | SVGW](#)) zu finden oder können bei Margarete Bucheli (m.bucheli@svgw.ch) nachgefragt werden.

Eine aktualisierte Liste mit den Aqua & Gas-Artikeln ist unter folgendem Link zu finden: <https://www.svgw.ch/wasser/methodenplattform/methodenkatalog/mw-102-zusatzdokumente/>

Zusammenfassung der Erfahrungswerte von drei Wasserversorgern

In Abbildung 12 ist die Bandbreite der Erfahrungswerte, die von drei Schweizer Wasserversorgern ermittelt wurden, sowie der Median und der Mittelwert dargestellt.

- Die in Grundwasserproben bestimmte GZZ schwankte zwischen 8.8×10^3 und 8.2×10^5 Zellen/ml, mit Medianwerten von 2.2×10^4 , 1.2×10^4 und 3.6×10^4 Zellen/ml für die drei Wasserversorger. Schwankungen der GZZ im Grundwasser können durch hohe Niederschlagsmengen vor der Probenahme verursacht werden.
- Die in Quellwasserproben bestimmte GZZ schwankte zwischen 8.2×10^3 und 1.4×10^5 Zellen/ml, mit Medianwerten von 2.9×10^4 und 1.4×10^4 Zellen/ml für zwei Wasserversorger. Schwankungen im Quellwasser können durch starke Regenfälle vor der Probenahme verursacht werden.
- In Wasser nach Aufbereitung (Ausgang Wasserwerk) reichte die GZZ von 3.1×10^2 bis 1.8×10^6 Zellen/ml, mit Medianwerten von 1.0×10^5 und 1.4×10^5 Zellen/ml für zwei Wasserversorger. Diese Werte werden sowohl vom Rohwasser als auch von den vorangegangenen Aufbereitungsschritten erheblich beeinflusst.
- Für Wasser im Reservoir lag die GZZ zwischen 8.5×10^3 und 6.0×10^5 Zellen/ml, mit Medianwerten von 1.3×10^5 , 2.0×10^4 und 1.0×10^5 Zellen/ml für die drei Wasserversorger. Diese Werte entsprechen dem Wasser nach Aufbereitung und werden sowohl durch das Rohwasser als auch durch die vorangegangenen Aufbereitungsschritte erheblich beeinflusst.
- Der GZZ-Bereich von Netzwasser reichte von 8.8×10^3 bis 1.4×10^6 Zellen/ml, mit Medianwerten von 1.2×10^5 , 2.0×10^4 und 1.3×10^5 Zellen/ml für die drei Wasserversorger. Diese Werte ähneln denen des Wassers im Reservoir und werden durch das

Rohwasser, die vorangegangenen Aufbereitungsschritte und die Verweildauer im Verteilsystem sowie saisonale Schwankungen erheblich beeinflusst.

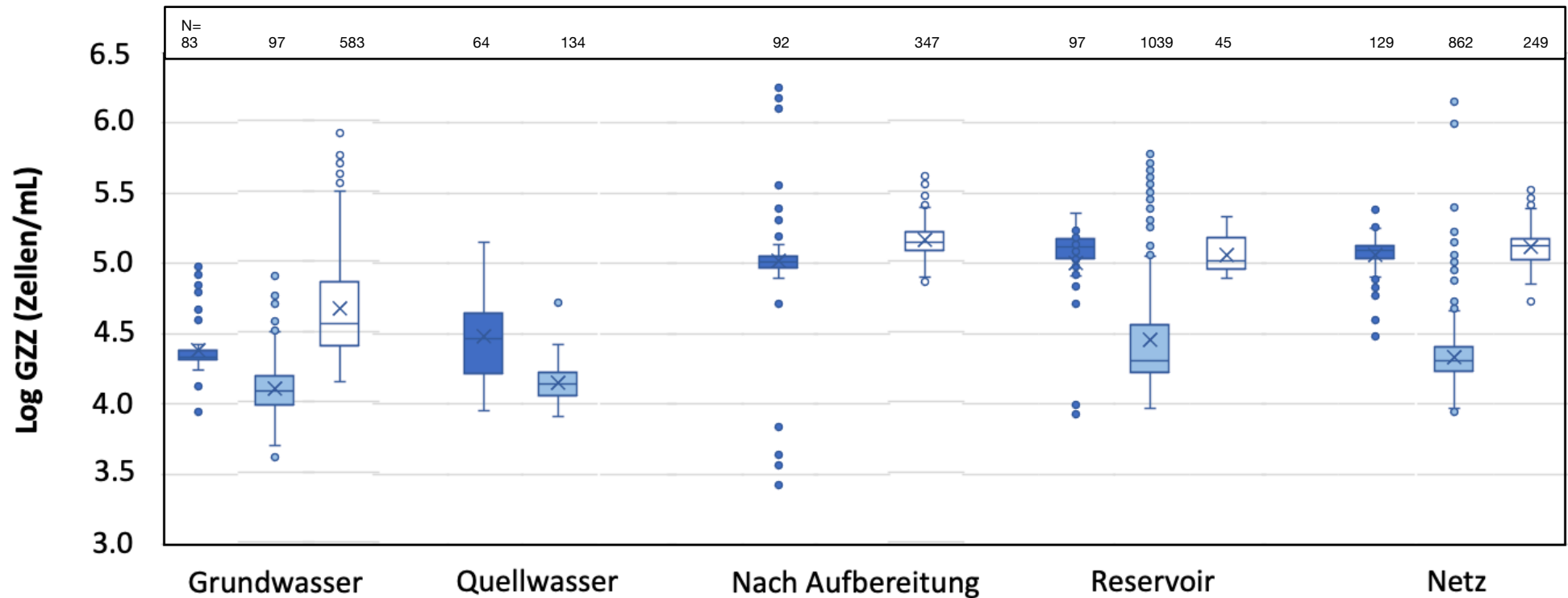


Abbildung 12: Beispiele für GZZ-Erfahrungswerte erhoben von drei verschiedenen Schweizer Wasserversorgern (dunkelblau, hellblau und weiss dargestellt) an unterschiedlichen Entnahmeorten. Im Boxplot (in Logarithmischer Darstellung) beschreibt die Box den Bereich vom unteren bis oberen Quartil, d.h. 50% aller Messwerte liegen innerhalb der Box. Die Linie in der Box gibt den Median an und mit x ist das arithmetische Mittel dargestellt. Die Whisker werden als der Wert berechnet, der nicht grösser ist als das Quartil plus das 1,5-fache des Interquartilsbereichs. Bei den Datenpunkten ober- und unterhalb der Whisker handelt es sich um Ausreisser.

Anhang 3 Nachweis- / Bestimmungsgrenze und linearer Bereich

Hintergrund

Neben der nachfolgend beschriebenen Methode (nach Armbruster und Pry; 2008) sind ebenfalls andere anerkannte Methoden, wie z.B. die DIN 32645 «Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung», zum Nachweis der Bestimmungsgrenze anwendbar.

Trinkwasser kann aus unterschiedlichen Wasserarten gewonnen werden. Entsprechend unterscheiden sich die Aufbereitungsmethoden zur Gewinnung von Trinkwasser erheblich. Sie reichen von der einfachen Filtration bis hin zu komplexen mehrstufigen Aufbereitungsprozessen, bevor das Trinkwasser ins Verteilsystem abgegeben wird. Daher ist es bei der Nutzung von Durchflusszytometer zur Analyse der GZZ wichtig, dass auch Wasserarten mit tiefen Zellkonzentrationen zuverlässig bestimmt werden können.

Der typische Bereich der Bestimmungsgrenze liegt zwischen 200 und 1000 Zellen/ml.

Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Wie bei Armbruster und Pry (2008)¹ gezeigt wird, kann die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze bei Analysengeräten, bei denen der Messwert weit über der unteren analytischen Grenze liegt, schwierig sein. Für die im Beispiel aufgeführten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurde die erwähnte Publikation als Grundlage zur Berechnung herangezogen.

Zur Bestimmung wurde Leitungswasser einer Verdünnungsreihe (in 0,1-µm-filtriertem Evian) unterzogen und die totale Zellkonzentration in Mehrfachmessungen (technische Replikate) durchflusszytometrisch bestimmt (siehe Tabelle 3). Für die Ermittlung des Blindwertes wurde zellfreies (mit 0,1-µm-filtriertes) Leitungswasser (Negativkontrolle) verwendet, das mit Sybr-Green I nach Protokoll (Kapitel 6.2) angefärbt wurde.

Blindwert (LoB), Nachweisgrenze (LoD) und Bestimmungsgrenze (LoQ) wurden gemäss den folgenden Gleichungen berechnet:

Blindwert (LoB):

$$\text{LoB} = \text{Mittelwert}_{\text{Negativkontrolle}} + 1,645(\text{SD}_{\text{Negativkontrolle}})$$

Nachweisgrenze (LoD):

$$\text{LoD} = \text{LoB} + 1,645(\text{SD}_{\text{Probe mit niedriger Konzentration}})$$

Bestimmungsgrenze (LoQ):

$$\text{LoQ} = \text{LoB} + 6(\text{SD}_{\text{Probe mit niedriger Konzentration}})$$

Hierbei gilt:

SD: Standardabweichung

Probe mit niedriger Konzentration: Für die «Probe mit niedriger Konzentration» wurde die am höchsten verdünnte Probe verwendet, für die gilt: $\text{Mittelwert}_{\text{Probe}} + 2 \text{SD}_{\text{Probe}} > \text{LoB}$

¹ Armbruster DA, Pry T (2008): Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. Clin Biochem Rev 29 Suppl 1: 49-52

Nachweisgrenze FCM (Accuri C6); TAP Wasser; 100x vorverdünnt																	
Praxis; Einzelmesswerte									Verd. TAP	Vol.	Z/100 uL Mittelwert	Z/ml Mittelwert	StAbw	1,645 StAbw	CV	CV%	
filtr. TAP (LoB)	14	11	25	17	22	19	20	18	unverd.	100 uL	18	183	4,400	7,237	0,241	24,108	
TAP, Verdünnung	25	31	28	23	26	19	23	29	1500x	100 uL	26	255	3,854	6,341	0,151	15,116	
TAP, Verdünnung	23	28	28	22	21	31	25	26	1400x	100 uL	26	255	3,423	5,630	0,134	13,422	
TAP, Verdünnung	39	32	34	24	29	27	43	34	1200x	100 uL	33	328	6,228	10,245	0,190	19,016	
TAP, Verdünnung	47	36	38	40	50	34	36	41	1000x	100 uL	40	403	5,625	9,253	0,140	13,976	
TAP, Verdünnung	66	64	52	51	45	47	56	71	750x	100 uL	57	565	9,487	15,606	0,168	16,791	
TAP, Verdünnung	97	74	69	89	78	61	71	80	500x	100 uL	77	774	11,451	18,837	0,148	14,799	
TAP, Verdünnung	171	163	154	151	178	177	140	171	100x	100 uL	163	1631	13,643	22,442	0,084	8,363	
TAP, Original	10135	10173	9996	10201	10273	10106	10245	10121	unverd.	100 uL	10156	101563	87,578	144,066	0,009	0,862	
LoB (Zellen/mL)	190	Blindwert															
LoD (Zellen/mL)	196	Nachweisgrenze															
LoQ (Zellen/mL)	209	Bestimmungsgrenze															

Tabelle 3: Beispiel einer Bestimmung des Blindwertes (LoB), der Nachweisgrenze (LoD) und der Bestimmungsgrenze (LoQ) mit Leitungs- respektive Trinkwasser (TAP). CV entspricht der relativen Standardabweichung.

Ermittlung des linearen Bereichs

Für die Ermittlung des linearen Bereichs wird aus einer konzentrierten Wasserprobe eine Verdünnungsreihe hergestellt und gemessen. Die Korrelation der Messwerte wird anschliessend überprüft. Die DIN 38402-51 beschreibt mögliche Methoden, um den linearen Bereich zu ermitteln. Mögliche konzentrierte Wasserproben können sein:

- Oberflächenwasserprobe
- Mechanisch und biologisch gereinigte Abwasserprobe
- Eine aufkonzentrierte Trink- oder Grundwasserprobe

Grundsätzlich sollte die verwendete Wasserprobe ähnliche Bakterienpopulationen wie die zu messenden Proben aufweisen. Die Gesamtzellzahl muss mindestens 10^6 Zellen/ml betragen.

Anhang 4 Erhebung der Verfahrenskennndaten

Hintergrund

Die vorliegende Erhebung der Verfahrenskennndaten wurde aus der Original-Validierung aus dem schweizerischen Lebensmittelbuch, Methode 333.1 «Bestimmung der Totalzellzahl und des quantitativen Verhältnisses der Zellen niedrigen bzw. hohen Nukleinsäuregehaltes in Süßwasser mittels Durchflusszytometrie» übernommen (siehe Kapitel 9 «Weiterführende Literatur»).

Die nachfolgend im Detail dargestellte Erhebung der Verfahrenskennndaten 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. In den letzten fünf Jahren wurden mehrere zusätzliche Ringversuche unter der Aufsicht des kantonalen Labors Zürich (KLZH) durchgeführt.

Weitere Ringversuchsdaten wurden in den unabhängigen Arbeiten von Ho et. al. (2020; Deutscher Verein des Gas- und Wasserfaches e.V.) und Zunabovic-Pichler et. al. (2018; Bundesministerium; Nachhaltigkeit und Tourismus, Wien) publiziert (siehe auch Kapitel 9 «Weiterführende Literatur»). In beiden Fällen wurden ähnliche Resultate erhalten, wie hier beschrieben.

Durchführung der Vergleichstests

Der Vergleichstest erfolgte unter Anleitung und aktiver Teilnahme der Eawag, Abteilung Umweltmikrobiologie, Dübendorf. Das zuständige Eawag-Labor zeichnete ausserdem für die Probenahme, die Probenaufbereitung und den Versand des Probenmaterials an die Versuchsteilnehmer verantwortlich. Die Zahl der insgesamt 15 Probanden verteilte sich auf zehn unterschiedliche Institutionen sowohl in der Schweiz als auch in Deutschland (Tabelle 4).

Es kamen 13 Durchflusszytometer zum Einsatz. Im Verlauf des Vergleichstests wurden die Probanden in zwei Gruppen aufgeteilt (siehe Tabelle 4). Gruppe 1 erhielt mit Glutaraldehyd fixierte Proben, Gruppe 2 erhielt Proben ohne Fixierung, die gekühlt (~ 8°C) versendet wurden.

Die für den Vergleichstest verwendeten Proben sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Gruppe 1

Probanden: 7 externe, 4 interne

Parameter: Analyse der Bead-Zahl, der totalen Zellkonzentration in Triplikaten von Wasserproben

Probenbehandlung:

- Speziell für den Vergleichstest wurden die Proben mit Glutaraldehyd (5.6 M) 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 mit Glutaraldehyd behandelten Proben ergab, dass die Fixierung keinen Einfluss auf die totale Zellkonzentration hat.
- Die Proben wurden in 40 ml-Gläser mit Teflondichtung abgefüllt und an die in Tabelle 4 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 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 externen Probanden (siehe Tabelle 5) 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.

Teilnehmende Institutionen Gruppe 1	Abkürzung	Anzahl Probanden	Geräte
Eawag	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	Abkürzung	Anzahl Probanden	Geräte
Eawag	Eawag	2	Partec SL (1) Partec PAS III (11)
Industrielle Werke Basel	IWB	1	Partec SL (12)
Bachema AG	-	1	Partec SL (13)

Tabelle 4: 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).

Probenherkunft	Bezeichnung	MW in Beads/ml bzw. MW in Zellen/ml (n=3)
Kalibrations-Beads Partec (d = 3 µm) REF: 05-4018	Beads (3 µm)	1.08 x 10 ⁴
Trinkwasser (Grundwasser nach Aufbereitung), Hardhof Zürich	Probe 1	3.43 x 10 ⁴
Trinkwasser (Quellwasser nach Aufbereitung), Hardhof Zürich	Probe 2	6.60 x 10 ⁴
Trinkwasser (Seewasser nach Aufbereitung), Lengg Zürich	Probe 3	1.13 x 10 ⁵
Trinkwasser (Hausinstallation nach Spülung), Oetwil a. See	Probe 4	1.35 x 10 ⁵

Tabelle 5: Auflistung aller im Vergleichstest versendeten Proben mit Angaben zu ihrer Herkunft und der im Eawag-Labor bestimmten totalen Zellkonzentration. MW = Mittelwert; n = Anzahl der Messungen.

Anmerkung: Die Kalibrations-Beads wurden für den Vergleichstest verdünnt, gut gemischt und aus dieser Referenzlösung auf die einzelnen Probengläser verteilt. Die Beads dienen 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 sicherzustellen, dass die Zellzahl in allen Proben weitestgehend identisch ist.

Ergebnisse der Validierung

Die zu ermittelnden Parameter für beide Gruppen waren die Bead-Zahl und die totale Zellkonzentration.

Bei einer Gesamtmenge von 655 generierten Datenpunkten wiesen die im Vergleichstest gewonnenen Werte sehr geringe Varianzen auf.

In den Abbildung 13 und Abbildung 14 sind die Werte der relativen Standardabweichung für die Gruppen 1 und 2 im Einzelnen wiedergegeben.

Die relative Standardabweichung der Probe «Beads» lag in Gruppe 1 bei 6.74 % (Abbildung 13) und in Gruppe 2 bei 3.33 % (Abbildung 14). Für die Wasserproben lag der Mittelwert der relativen Standardabweichungen bezüglich der totalen Zellkonzentration in Gruppe 1 (Abbildung 13) bei 6.88 % und in Gruppe 2 (Abbildung 14) bei 5.72 %.

Für die vier Wasserproben (siehe Tabelle 5) wurden in Gruppe 1 folgende Standardabweichungen bestimmt:

- Probe 1: 4.56 %
- Probe 2: 7.97 %
- Probe 3: 6.92 %
- Probe 4: 8.08 %

In Gruppe 2 wurden folgende Standardabweichungen bestimmt:

- Probe 1: 3.37 %
- Probe 2: 11.43 %
- Probe 3: 4.76 %
- Probe 4: 4.28 %

Die Ergebnisse der Vergleichstest für die verschiedenen Proben (siehe Tabelle 5) sind in den Tabelle 6 bis Tabelle 10 und in den Tabelle 11 bis Tabelle 15 für die Gruppe 1 respektive für die Gruppe 2 aufgelistet.

Die Resultate 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.

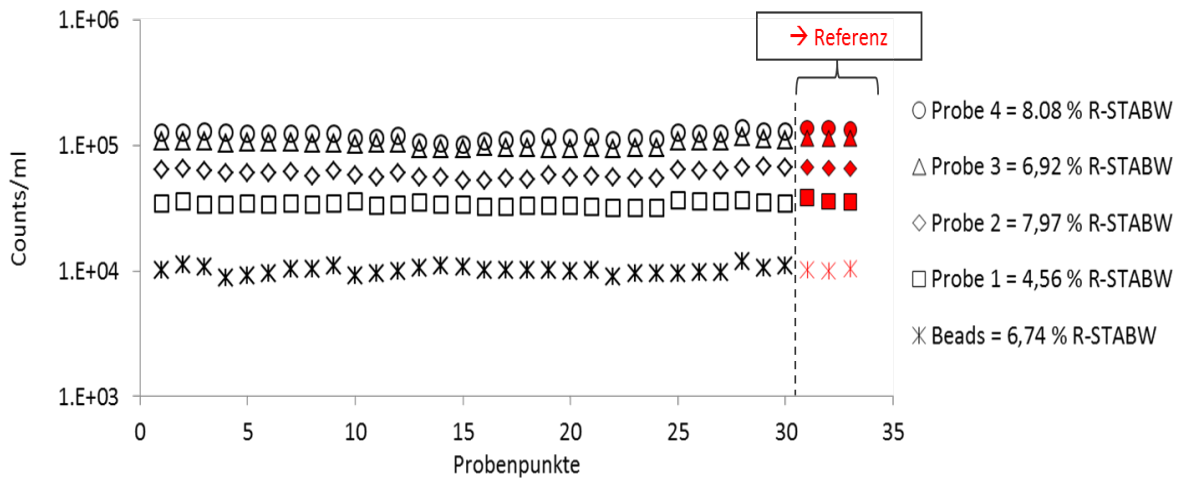


Abbildung 13: Übersicht der im Vergleichstest produzierten Resultate der Gruppe 1 (fixierte Proben) zu den Bead-Zahlen bzw. Totalzellzahlen und deren relative Standardabweichungen (R-STABW).

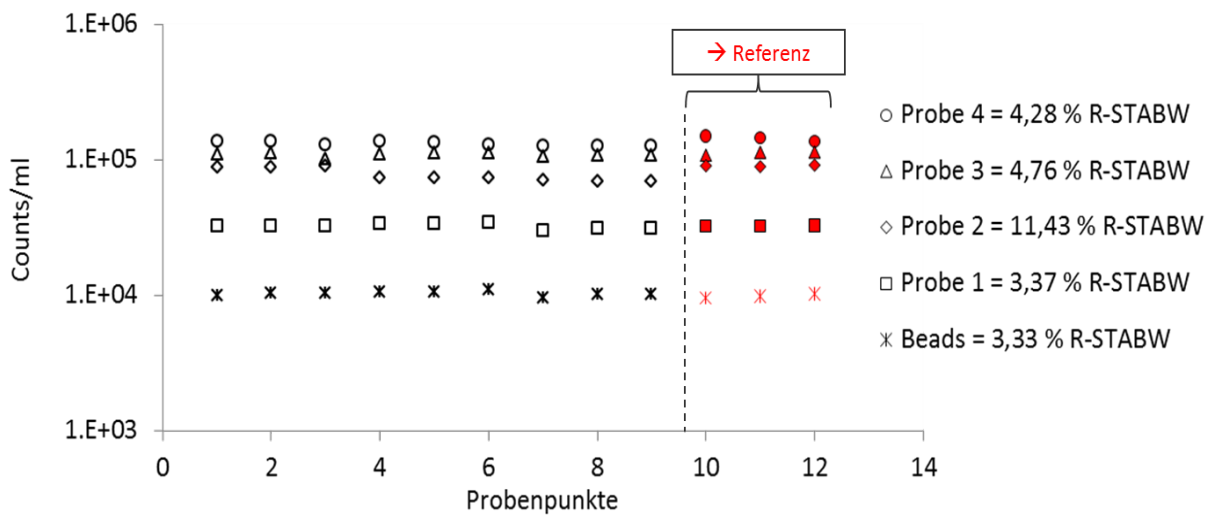


Abbildung 14: Übersicht der im Vergleichstest produzierten Resultate der Gruppe 2 (nicht fixierte Proben) zu den Bead-Zahlen bzw. Totalzellzahlen und deren relative Standardabweichungen (R-STABW). Bei Probe 2 kam es in den internen Probensätzen trotz Kühlung zu einem geringen Anstieg der Zellzahlen.

Proband / Gerät	MW Beads (3 µm) in Zellen/ml (n=3)	Beads Wiederholpräzision (r) in Zellen/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 Zellen/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 6: Vergleichsergebnisse der Probe Beads (3 µm), Gruppe 1 bzgl. der Bestimmung der Bead-Zahl.

Proband / Gerät	MW in Zellen/ml (n=3)	Wiederholpräzision (r) in Zellen/ml (n=3)	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
Vergleichspräzision (R) in Zellen/ml (n=33)	4.36E+03		
totale Zellkonzentration Messunsicherheit R-STABW in % (n=33)	4.56		

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

Tabelle 7: Vergleichstestresultate der Probe 1, Gruppe 1 bzgl. der Bestimmung der totalen Zellkonzentration.

Proband / Gerät	MW in Zellen/ml (n=3)	Wiederholpräzision (r) in Zellen/ml (n=3)	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
Vergleichspräzision (R) in Zellen/ml (n=33)	1.33E+04		
totale Zellkonzentration Messunsicherheit R-STABW in % (n=33)	7.97		

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

Tabelle 8: Vergleichstestresultate der Probe 2, Gruppe 1 bzgl. der Bestimmung der Totalzellzahl.

Proband / Gerät	MW in Zellen/ml (n=3)	Wiederholpräzision (r) in Zellen/ml (n=3)	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
Vergleichspräzision (R) in Zellen/ml (n=33)	1.99E+04		
totale Zellkonzentration Messunsicherheit R-STABW in % (n=33)	6.92		

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

Tabelle 9: Vergleichstestresultate der Probe 3, Gruppe 1 bzgl. der Bestimmung der Totalzellzahl.

Proband / Gerät	MW in Zellen/ml (n=3)	Wiederholpräzision (r) in Zellen/ml (n=3)	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
Vergleichspräzision (R) in Counts/ml (n=33)	2.72E+04		
totale Zellkonzentration Messunsicherheit R-STABW in % (n=33)	8.08		

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

Tabelle 10: Vergleichstestresultate der Probe 4, Gruppe 1 bzgl. der Bestimmung der Totalzellzahl.

Proband / Gerät	MW Beads (3 µm) in Zellen/ml (n=3)	Wiederholpräzision (r) in Zellen/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 Zellen/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 11: Vergleichsresultate der Probe Beads (3 µm), Gruppe 2 bzgl. der Bestimmung der Bead-Zahl.

Proband / Gerät	MW in Zellen/ml (n=3)	Wiederholpräzision (r) in Zellen/ml (n=3)	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
Vergleichspräzision (R) in Counts/ml (n=12)	4.31E+03		
totale Zellkonzentration Messunsicherheit R-STABW in % (n=12)	4.76		

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

Tabelle 12: Vergleichstestresultate der Probe 1, Gruppe 2 bzgl. der Bestimmung der Totalzellzahl.

Proband / Gerät	MW in Zellen/ml (n=3)	Wiederholpräzision (r) in Zellen/ml (n=3)	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
Vergleichspräzision (R) in Counts/ml (n=12)	2.42E+04		
totale Zellkonzentration Messunsicherheit R-STABW in % (n=12)	11.43		

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

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

Proband / Gerät	MW in Zellen/ml (n=3)	Wiederholpräzision (r) in Zellen/ml (n=3)	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
Vergleichspräzision (R) in Counts/ml (n=12)	1.01E+04		
totale Zellkonzentration Messunsicherheit R-STABW in % (n=12)	3.37		

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

Tabelle 14: Vergleichstestresultate der Probe 3, Gruppe 2 bzgl. der Bestimmung der Totalzellzahl.

Proband / Gerät	MW in Zellen/ml (n=3)	Wiederholpräzision (r) in Zellen/ml (n=3)	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
Vergleichspräzision (R) in Counts/ml (n=12)	1.23E+04		
totale Zellkonzentration Messunsicherheit R-STABW in % (n=12)	3.33		

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

Tabelle 15: Vergleichstestresultate der Probe 4, Gruppe 2 bzgl. der Bestimmung der Totalzellzahl. *=Eawag intern, MW = Mittelwert, n = Anzahl der Messungen, R-STABW = Relative Standardabweichung

[Klicken oder tippen Sie hier, um Text einzugeben.](#)

