

VEREIN  
DEUTSCHER  
INGENIEURE

Bioaerosole und biologische Agenzien  
Ermittlung von Verfahrenskenngrößen  
Zählverfahren basierend auf kulturellem Nachweis  
Bioerosols and biological agents  
Determination of performance characteristics  
Culture-based counting methods

VDI 4256  
Blatt 1 / Part 1

Ausg. deutsch/englisch  
Issue German/English

*Der Entwurf dieser Richtlinie wurde mit Ankündigung im Bundesanzeiger einem öffentlichen Einspruchsverfahren unterworfen. Die deutsche Version dieser Richtlinie ist verbindlich.*

*The draft of this guideline has been subject to public scrutiny after announcement in the Bundesanzeiger (Federal Gazette). The German version of this guideline shall be taken as authoritative. No guarantee can be given with respect to the English translation.*

Inhalt	Seite	Contents	Page
Vorbemerkung.....	2	Preliminary note.....	2
Einleitung.....	2	Introduction .....	2
<b>1 Anwendungsbereich.....</b>	<b>4</b>	<b>1 Scope.....</b>	<b>4</b>
<b>2 Grundannahmen.....</b>	<b>5</b>	<b>2 Basic assumptions.....</b>	<b>5</b>
<b>3 Begriffe.....</b>	<b>5</b>	<b>3 Terms and definitions .....</b>	<b>5</b>
<b>4 Formelzeichen.....</b>	<b>8</b>	<b>4 Symbols.....</b>	<b>8</b>
<b>5 Validierung.....</b>	<b>10</b>	<b>5 Validation.....</b>	<b>10</b>
5.1 Charakterisierung des Messverfahrens.....	10	5.1 Characterization of the measurement method.....	10
5.2 Vergleich mit Qualitätsanforderungen.....	12	5.2 Comparison with the quality requirements .....	12
5.3 Nachweis der Erfüllung.....	12	5.3 Proof of compliance .....	12
<b>6 Ermittlung der Verfahrenskenngrößen .....</b>	<b>13</b>	<b>6 Determination of performance characteristics.....</b>	<b>13</b>
6.1 Messobjekt, Messgröße.....	13	6.1 Measurement object, measurand.....	13
6.2 Nachweisgrenze.....	13	6.2 Detection limit .....	13
6.3 Bestimmungsgrenze.....	14	6.3 Limit of quantification.....	14
6.4 Wiederholstandardabweichung/ Wiederholgrenze .....	14	6.4 Repeatability standard deviation/ repeatability limit.....	14
6.5 Vergleichstandardabweichung/ Vergleichgrenze.....	15	6.5 Reproducibility standard deviation/ reproducibility limit .....	15
6.6 Proportionalität .....	17	6.6 Proportionality .....	17
6.7 Überdispersion.....	17	6.7 Overdispersion .....	17
6.8 Robustheit .....	18	6.8 Robustness .....	18
6.9 Messunsicherheit .....	19	6.9 Measurement uncertainty.....	19
<b>7 Verifizierung.....</b>	<b>25</b>	<b>7 Verification .....</b>	<b>25</b>
7.1 Vergleichstandardabweichungen .....	25	7.1 Reproducibility standard deviation.....	25
7.2 Wiederholstandardabweichungen .....	26	7.2 Repeatability standard deviations.....	26
7.3 Überdispersionsfaktor .....	26	7.3 Overdispersion factor .....	26
7.4 Unsicherheit der Volumenbestimmung bei der Probenahme .....	25	7.4 Uncertainty of the volume determination during sampling .....	25
<b>Anhang A</b> Beispiel zur Berechnung von Kenngrößen .....	<b>27</b>	<b>Anhang A</b> Example for the calculation of performance characteristics .....	<b>27</b>
<b>Anhang B</b> Datenträger.....	<b>37</b>	<b>Anhang B</b> Data carrier.....	<b>37</b>
Schrifttum .....	40	Bibliography .....	40

Kommission Reinhaltung der Luft im VDI und DIN – Normenausschuss KRdL

Fachbereich Umweltmesstechnik

VDI-Handbuch Reinhaltung der Luft, Band 1a: Maximale Immissions-Werte  
VDI-Handbuch Reinhaltung der Luft, Band 4: Analysen- und Messverfahren I  
VDI-Handbuch Biotechnologie

## Vorbemerkung

Der Inhalt dieser Richtlinie ist entstanden unter Beachtung der Vorgaben und Empfehlungen der Richtlinie VDI 1000.

Alle Rechte, insbesondere die des Nachdrucks, der Fotokopie, der elektronischen Verwendung und der Übersetzung, jeweils auszugsweise oder vollständig, sind vorbehalten.

Die Nutzung dieser VDI-Richtlinie ist unter Wahrung des Urheberrechts und unter Beachtung der Lizenzbedingungen ([www.vdi-richtlinien.de](http://www.vdi-richtlinien.de)), die in den VDI-Merkblättern geregelt sind, möglich.

Allen, die ehrenamtlich an der Erarbeitung dieser VDI-Richtlinie mitgewirkt haben, sei gedankt.

Eine Liste der aktuell verfügbaren Blätter dieser Richtlinienreihe ist im Internet abrufbar unter [www.vdi.de/4256](http://www.vdi.de/4256).

## Einleitung

Die Messung von Partikeln und gasförmigen chemischen Verbindungen in der Außenluft wird seit vielen Jahren vorgenommen und ist im Bundes-Immissionsschutzgesetz und seinen Verordnungen sowie in der TA Luft geregelt. Ziel dieser Messungen ist es, Menschen, Tiere und Pflanzen, den Boden, das Wasser, die Atmosphäre sowie Kultur- und sonstige Sachgüter vor schädlichen Umwelteinwirkungen zu schützen und – soweit es sich um immissionsschutzrechtlich genehmigungsbedürftige Anlagen handelt – dem Entstehen schädlicher Umwelteinwirkungen vorzubeugen. Die gesetzlichen Vorgaben zur Begrenzung mikrobieller Emissionen sind bislang nur allgemein formuliert. So schreibt die TA Luft für bestimmte Anlagen vor, *„die Möglichkeiten, die Emissionen an Keimen und Endotoxinen durch dem Stand der Technik entsprechende Maßnahmen zu vermindern, sind zu prüfen“*. Ergänzend wurden zahlreiche Technische Regeln im Arbeitsschutz (Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA)) und Umweltschutz erstellt. Weiterführende Informationen finden sich in der Schriftenreihe der Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL) Band 30 [1], Band 35 [2] und Band 39 [3].

Der Themenbereich „Bioaerosole und biologische Agenzien“ ist aufgrund seiner Komplexität in mehrere Richtlinienreihen unterteilt.

Die Richtlinienreihe VDI 4250 beschreibt die Wirkung mikrobieller Luftverunreinigungen auf den Menschen.

## Preliminary note

The content of this guideline has been developed in strict accordance with the requirements and recommendations of the guideline VDI 1000.

All rights are reserved, including those of reprinting, reproduction (photocopying, micro copying), storage in data processing systems and translation, either of the full text or of extracts.

The use of this guideline without infringement of copyright is permitted subject to the licensing conditions specified in the VDI notices ([www.vdi-richtlinien.de](http://www.vdi-richtlinien.de)).

We wish to express our gratitude to all honorary contributors to this guideline.

A catalogue of all available parts of this series of guideline can be accessed on the internet at [www.vdi.de/4256](http://www.vdi.de/4256).

## Introduction

The measurement of particles and gaseous chemical compounds in ambient air has been carried out for many years and is regulated by the German Federal Immission Control Act (BImSchG) and the associated implementing ordinances including the Technical Instructions on Air Quality Control (TA Luft). The purpose of these measurements is to protect humans, animals and plants, soil, the atmosphere as well as cultural objects and other material goods from harmful effects on the environment and – to the extent plants subject to licensing are involved – to prevent the occurrence of any such harmful effects on the environment. The statutory requirements for the limitation of microbial emissions have so far not been detailed and are of a general nature only. The Technical Instructions on Air Quality Control (TA Luft) specifies for certain facilities, that *“the possibilities to reduce emissions of germs and endotoxins by state of the art techniques shall be examined”*. Additionally numerous Technical Rules have been established in the field of occupational health and safety (Technical Rules for Biological Agents (TRBA)) and environmental protection. Continuitive information can be obtained from the publication series by Commission on Air Pollution Prevention (Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL) Volume 30 [1], Volume 35 [2] and Volume 39 [3].

The subject area “Bioaerosols and biological agents“ is divided into several guideline series due to its complexity.

The guideline series VDI 4250 describes the impact of microbial air pollution on humans.

Die Richtlinienreihe VDI 4251 legt die Bedingungen fest, die bei der Planung von Immissionsmessungen mikrobieller Luftverunreinigungen berücksichtigt werden müssen.

In der Richtlinienreihe VDI 4252 werden die verschiedenen Verfahren zur Probenahme von Bioaerosolen beschrieben und die Anforderungen an die Durchführung der Immissionsmessungen festgelegt.

Die Richtlinienreihe VDI 4253 legt die Bedingungen für die Anzucht und Detektion von Mikroorganismen sowie für die Analyse von Viren fest und baut auf der in VDI 4252 und VDI 4257 beschriebenen Probenahme auf.

Die Richtlinienreihe VDI 4254 beschäftigt sich mit der Analyse von gasförmigen Luftverunreinigungen mikrobieller Herkunft wie MVOC Endotoxinen, Mykotoxinen und Glucanen.

Die Richtlinienreihe VDI 4255 stellt die unterschiedlichen Emissionsquellen mikrobieller Luftverunreinigungen dar und beschreibt Verfahren zur Minderung dieser Emissionen.

In der Richtlinienreihe VDI 4256 werden die statistischen Kenngrößen, die für die Beschreibung und Vergleichbarkeit der Verfahren notwendig sind, festgelegt.

Die Richtlinienreihe VDI 4257 beschreibt die Planung, die Durchführung und die verschiedenen Verfahren der Emissionsmessung von mikrobiellen Luftverunreinigungen.

Die Richtlinienreihe VDI 4258 beschreibt die Herstellung von Prüfbioaerosolen zur Validierung von Messverfahren.

Die Anwendung der vorliegenden Richtlinie setzt die Berücksichtigung der oben aufgeführten Richtlinienreihen voraus, sobald diese verfügbar sind. Eine Übersicht der aktuellen Richtlinien ist im Internet unter [www.vdi.de/bioaerosole](http://www.vdi.de/bioaerosole) abrufbar.

## 1 Anwendungsbereich

Die Richtlinie VDI 4256 Blatt 1 legt fest, welche statistische Kenngrößen für die Charakterisierung von auf Zählung beruhenden Verfahren zur Ermittlung mikrobieller Luftverunreinigungen zu ermitteln sind.

Unter zählenden Verfahren werden hier Methoden zur quantitativen Bestimmung von vermehrungsfähigen, das heißt koloniebildenden Einheiten (KBE) aus einem definierten Probenahmenvolumen auf einem geeigneten Nährmedium zusammengefasst.

Man unterscheidet dabei direkte Verfahren, bei denen die Zählung unmittelbar von der Probe erfolgt (z.B. auf Nährboden aufgelegte Filter, Impaktions-

The guideline series VDI 4251 defines the conditions to be taken into account in ambient air measurement planning for the assessment of microbial air pollutants.

In guideline series VDI 4252 different bioaerosol sampling methods are described and the requirements for the realization of the ambient air measurement are laid down.

The guideline series VDI 4253 lays down the conditions for cultivation and detection of bioaerosols as well as for the analysis of viruses and is based on the sampling method described in VDI 4252 and VDI 4257.

The guideline series VDI 4254 is concerned with the analysis of air pollution of microbial origin such as MVOC (microbial volatile organic compounds), endotoxins, mycotoxins and glucanes.

The guideline series VDI 4255 presents different sources of emission of microbial air pollution and describes methods for the reduction of these emissions.

Guideline series VDI 4256 defines the statistical characteristics required for the description and comparability of the methods.

Guideline series VDI 4257 describes the planning, the procedure and the different methods for emission measurements of microbial air pollutants.

Guideline series VDI 4258 describes the preparation of testing bioaerosols for the validation of measurement methods.

The application of this guideline presupposes the consideration of the above guideline series to the extent these are already available. An overview of all relevant guidelines can be accessed on the internet at [www.vdi.de/bioaerosole](http://www.vdi.de/bioaerosole).

## 1 Scope

The guideline VDI 4256 Part 1 specifies which statistical characteristics have to be identified for the characterization of the methods for determination of microbial air pollutants based on counting.

Under counting methods are summarized here the methods for quantitative determination of units that are capable of reproduction, i.e. colony-forming units (CFU) from a defined sampling volume on a suitable culture medium.

A difference is made thereby between direct methods where counting takes place directly from the sample (e.g. filters, impaction plates applied on

platten) und indirekte Verfahren, bei denen die Zählung erst nach einer weitergehenden Aufarbeitung der Probe (z.B. Ablösen der Bioaerosole vom Filter, Suspension und Verdünnung) erfolgt.

Die Differenzierung und Identifizierung einzelner Gattungen oder Spezies und ihre zahlenmäßige Erfassung sowie die mit den Identifizierungsverfahren verbundenen Kenngrößen, sind **nicht** Gegenstand dieser Richtlinie.

Diese Richtlinie beschreibt hauptsächlich Kenngrößen, die bei der Entwicklung eines Verfahrens bestimmt werden müssen. Für die Begrenzung von mikrobiellen Luftverunreinigungen existieren derzeit noch keine gesetzlichen Vorgaben und Grenzwerte. Obwohl inzwischen bereits mehrere Messverfahren standardisiert wurden und somit die Vergleichbarkeit der Messergebnisse erhöht wurde, wurden diese Verfahren noch nicht in dem hier beschriebenen, umfassenden Maß validiert. Diese Richtlinie liefert das Rüstzeug für eine zukünftig erforderliche vollständige Validierung.

Darüber hinaus gibt Abschnitt 7 Hinweise für die Verfahrensanwender beim Einsatz der entsprechend standardisierten und validierten Verfahren. Diese Richtlinie ist somit auch ein Hilfsmittel für die interne Qualitätssicherung eines Labors.

In Anhang A wird ein anschauliches Rechenbeispiel gegeben, bei dem die Ergebnisse eines Ringversuchs mithilfe dieser Richtlinie ausgewertet wurden. Zur Erleichterung der Validierung und Verifizierung ist dieser Richtlinie ein MS-Excel<sup>®</sup>-Auswerteprogramm beigelegt, mit dem sich die hier beschriebenen Kenngrößen berechnen lassen.

## 2 Grundannahmen

Die Streuung der Messergebnisse, die auf zählenden Verfahren beruhen (z.B. die Zählung lebender Objekte), können idealerweise durch eine Poisson-Verteilung beschrieben werden.

Da bei realen Messungen durch Verfahrensschritte (Probenahme, Probenbehandlung, Aufarbeitung) und biologische Aspekte (biologische Sammeleffizienz, Absterbeprozesse, Überwachsen, gegenseitige Beeinflussung etc.) weitere Einflussfaktoren auftreten und die Streuung der Messergebnisse erhöhen, werden diese zusätzlichen Unsicherheiten bei der Berechnung der Gesamtstreuung in Form der sogenannten Überdispersion berücksichtigt. Insbesondere die Auswirkungen der biologischen Effekte können nicht im Einzelnen statistisch erfasst werden, sodass die Gesamtheit der durch sie verursachten Unsicherheiten im Überdispersionsfaktor berücksichtigt wird.

culture media) and indirect methods where counting does not take place before an advanced preparation of the sample (e.g. removal of the bioaerosols from the filter, suspension and dilution).

The differentiation and identification of individual genera and species and their numerical determination as well as the characteristics related to the methods of identification are **not** subject of this guideline.

This guideline primarily describes such characteristics that shall be determined in the course of a method development. At present there are still no legal regulations and limit values for the limitation of microbial air pollutants. While numerous measurement methods have already been standardized in the meantime thus increasing the comparability of measurement results, these methods have not yet been validated to the global extent as described herein. This guideline provides the instrument for a complete validation as required in the future.

In addition thereto, Section 7 gives guidance to the user of the method when applying the relevant standardized and validated method. This guideline is thus also an aid to the internal quality assurance of a laboratory.

An illustrative computational example where the results of a round robin test have been evaluated with the aid of this guideline is given in Annex A. To facilitate validation and verification, an MS-Excel<sup>®</sup> evaluation programme is added to this guideline, by means of which the characteristics as herein described can be computed.

## 2 Basic assumptions

Variation of the measurement results based on counting methods (e.g. counting of living objects) can ideally be described by means of a Poisson distribution.

Since additional influence factors occur in the course of real measurements induced the method steps (sampling, sample treatment, reconditioning) and the biological aspects (biological sampling efficiency, processes of dieing off, overgrowth, mutual influencing, etc.) and thus increase the variation of the measurement results, such additional uncertainties in the course of calculation of the overall variation shall be considered in the form of the so called overdispersion. In particular, the consequences of the biological effects cannot be statistically evaluated individually, hence the totality of the uncertainties caused thereby in the overdispersion factor have to be taken into consideration.