

VEREIN
DEUTSCHER
INGENIEURE

Bioaerosole und biologische Agenzien
Bestimmung der Gesamtzellzahl mittels
Fluoreszenzanalyse nach Anfärbung mit DAPI

VDI 4253
Blatt 4 / Part 4

Bioaerosols and biological agents
Determination of total cell count by fluorescence
analysis after staining with DAPI

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
Vorbemerkung	2
Einleitung	2
1 Anwendungsbereich	3
2 Begriffe	4
3 Grundlage des Verfahrens	6
4 Grenzen und Schwierigkeiten des Verfahrens	7
5 Geräte, Verbrauchsmaterial, Chemikalien und Lösungen	8
5.1 Reinigung	8
5.2 Geräte, Verbrauchsmaterial	8
5.3 Chemikalien und Lösungen	9
6 Vorbereitung des Sammelguts	9
6.1 Impingerproben	9
6.2 Filterproben	10
6.3 Färbung der fixierten Probe	11
6.4 Hinweise zu Transport und Lagerung	12
7 Quantitativer Nachweis	12
7.1 Grundlegende Hinweise zur Vorgehensweise	12
7.2 Durchführung der Auszählung	13
7.3 Analytischer Blindwert	14
8 Berechnung und Angabe der Ergebnisse	14
9 Verfahrenskenngrößen	17
9.1 Probenaustausch	17
9.2 Standardabweichung	17
9.3 Probenhomogenität und Zählunsicherheiten	20
9.4 Bestimmungsgrenzen	20
Anhang A Ermittlung des Mikroskopfaktors	21
Anhang B Zählprotokoll und Ergebnisprotokoll	23
Schrifttum	27

Contents	Page
Preliminary note	2
Introduction	2
1 Scope	3
2 Terms and definitions	4
3 Method basics	6
4 Limits and difficulties of the method	7
5 Apparatus, consumables, chemicals and solutions	8
5.1 Clean-up	8
5.2 Apparatus, consumables	8
5.3 Chemicals and solutions	9
6 Sample preparation	9
6.1 Impinger samples	9
6.2 Filter samples	10
6.3 Dyeing of the fixed sample	11
6.4 Directions regarding transport and storage	12
7 Quantitative detection	12
7.1 Basic information to the procedure	12
7.2 Enumeration implementation	13
7.3 Analytical blank	14
8 Calculation and presentation of the results	14
9 Process parameters	17
9.1 Sample replacements	17
9.2 Standard deviation	17
9.3 Sample homogeneity and counting uncertainties	20
9.4 Limits of quantification	20
Annex A Establishment of the microscope factor	21
Annex B Count record and summary minutes	25
Bibliography	27

Kommission Reinhaltung der Luft im VDI und DIN – Normenausschuss KRdL
Fachbereich Umweltmesstechnik

VDI/DIN-Handbuch Reinhaltung der Luft, Band 1a: Maximale Immissions-Werte
VDI/DIN-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), 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/4253.

Einleitung

Die Ermittlung und Bewertung der Emissionen und Immissionen von Partikeln und gasförmigen Stoffen sind im Bundes-Immissionsschutzgesetz (BImSchG) und seinen Verordnungen sowie in der TA Luft geregelt. Ziel dieser Regelungen ist es, Menschen, Tiere und Pflanzen, den Boden, das Wasser, die Atmosphäre sowie Kultur- und sonstige Sachgüter vor schädlichen Umwelteinwirkungen zu schützen und 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 den 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], Band 39 [3] und Band 44 [4].

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).

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

A catalogue of all available parts of this series of guidelines can be accessed on the internet at www.vdi.de/4253.

Introduction

The measurement and assessment of particles and gaseous chemical compounds in emissions and ambient air 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 regulations is to protect humans, animals and plants, soil, water, the atmosphere as well as cultural objects and other material goods from harmful effects on the environment and 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. 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. Further information can be obtained from the publication series by the Commission on Air Pollution Prevention (Kommission Reinhaltung der Luft – KRdL) Volume 30 [1], Volume 35 [2], Volume 39 [3] and Volume 44 [4].

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

The series of guidelines 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 und bei der Ausbreitungsmodellierung 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 wird sich mit der Analyse von gasförmigen Luftverunreinigungen mikrobieller Herkunft wie MVOC, Endotoxinen, Mykotoxinen und Glucanen beschäftigen.

Die Richtlinienreihe VDI 4255 stellt die unterschiedlichen Quellen 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 wird die Herstellung von Prüfbioaerosolen zur Validierung von Messverfahren beschreiben.

Die Anwendung der Richtlinie setzt die Berücksichtigung der oben aufgeführten Richtlinienreihen voraus. Eine Übersicht der aktuellen Richtlinien ist im Internet unter www.vdi.de/bioaerosole abrufbar.

1 Anwendungsbereich

Die vorliegende Richtlinie beschreibt ein Auswerteverfahren zur Quantifizierung von Mikroorganismen durch mikroskopische Zählung von Partikeln nach einer Färbung DNA-haltiger Strukturen (DNA, Desoxyribonukleinsäure). Es handelt sich um ein kultivierungsunabhängiges Verfahren, das es ermöglicht, Proben auszuwerten, die z. B. nach

The series of guidelines VDI 4251 defines the conditions to be taken into account in ambient air measurement planning and dispersion modelling for microbial air pollutants.

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

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

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

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

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

The series of guidelines VDI 4258 will describe the preparation of testing bioaerosols for the validation of measurement methods.

The application of this guideline presupposes the consideration of the above guideline series. An overview of all relevant guidelines can be accessed on the internet at www.vdi.de/bioaerosols.

1 Scope

The present guideline describes an evaluation method for quantification of microorganisms by microscopic particle count after staining of DNA containing structures (DNA: deoxyribonucleic acid). It is a matter of a cultivation-free method that enables evaluation of samples that have been collected, for example, after the guidelines

VDI 4252 Blatt 2¹⁾, VDI 4252 Blatt 3 für Außenluftmessungen oder VDI 4257 für Emissionsmessungen gesammelt wurden. Durch die kultivierungsunabhängige Analyse werden lebende und tote Mikroorganismen erfasst. Der Einsatz dieses Nachweisverfahrens bietet sich insbesondere dann an, wenn Mikroorganismen auf dem Weg von der Emissionsquelle zum Probenahmeort in besonderem Maße lebensfeindlichen Umwelteinflüssen, z. B. Einwirkung von Hitze, Strahlung, Trockenheit oder mechanischem Stress, ausgesetzt sind, sodass die Mikroorganismen nicht mehr kultiviert werden können oder zumindest von einer deutlich verminderten Kultivierbarkeit auszugehen ist. Eine Differenzierung von Mikroorganismen ist mit dieser Methode nicht möglich. Die Anwendung dieses Verfahrens setzt voraus, dass Anwender grundsätzlich in der Lage sind, luftgetragene biogene Partikeln wie Bakterien, Sporen, Hyphen, Pollen oder Pflanzenhaare (Trichome) anhand von morphologischen Kriterien unterscheiden zu können.

Diese Richtlinie ist für einen Konzentrationsbereich ab einer Größenordnung von $GZZ = 10^5$ Zellen/m³ (GZZ – Gesamtzellenzahl) für die Probenahme mit Impingern bei einem Luftprobenahmevolumen von 0,5 m³ ausgelegt. Bei geringeren zu erwartenden GZZ sind größere Luftprobenahmevolumina erforderlich, die mithilfe von Filtrationsverfahren mit Polycarbonatfiltern¹⁾ erreicht werden können (siehe Tabelle 2, Abschnitt 9.4).

VDI 4252 Part 2¹⁾ and VDI 4252 Part 3 for ambient air measurements or VDI 4257 for emission measurements. Both living and dead microorganisms are measured by the cultivation-free method. Application of this verification procedure is recommended especially in cases where microorganisms are exposed on their way from the emission source to the sampling location to a special degree to environmental impacts that are hostile to life, e.g. the impacts of heat, radiation, drought or mechanical stress, with the result that microorganisms can no longer be cultivated or a distinctly reduced cultivability must at least be assumed. A differentiation of the microorganisms is not possible with this method. The application of this method requires that the operators are principally capable of distinguishing between air borne biogenic particles such as bacteria, spores, hyphae, pollens or trichomes on the basis of morphological criteria.

This guideline is designed for a concentration range starting from an order of magnitude of $GZZ = 10^5$ cells/m³ (GZZ – total cell count) for sampling with impingers at an air sampling volume of 0,5 m³. Larger air sampling volumes are required in case of anticipated lower total cell count. That can be achieved by means of filtration methods with polycarbonate filters¹⁾ (see Table 2, Section 9.4).