

ALLEGATO 7

METODICA ARPA PIEMONTE

Procedura Tecnica
Metodo di prova
Realizzazione del prodotto

Amianto in acqua in Microscopia Elettronica a Scansione

U.RP.M842

Revisione	Data	Oggetto Revisione
01	12/12/06	Prima emissione
02	11/06/08	Modifiche ai paragrafi 4,8
03	21/07/16	Modifiche in tutto il testo

INDICE

1. SCOPO ED OBIETTIVI
2. CAMPO DI APPLICAZIONE
3. DEFINIZIONI, ABBREVIAZIONI E SIGLE
4. RIFERIMENTO A DOCUMENTI ESTERNI
5. REAGENTI E VETRERIE
6. APPARECCHIATURE
7. CRITERI DI QUALIFICAZIONE DEL PERSONALE
8. MODALITÀ OPERATIVE
9. ESPRESSIONE DEI RISULTATI
10. INCERTEZZA DI MISURA
11. REQUISITI DELLE PRESTAZIONI DEL METODO
12. PROVE DI VALIDAZIONE
13. CONTROLLO DELLE PRESTAZIONI NEL TEMPO
14. RIESAME DELLA VALIDAZIONE E DEL METODO
15. ELENCO MODULISTICA UTILIZZATA
16. PAROLE CHIAVE
17. ELENCO ALLEGATI
18. MISURE DI SICUREZZA

COPIA UFFICIALE IN VIGORE

Se firmata in originale dal Responsabile della
Struttura

Approvato da:
Responsabile AFT
Paola Quaglino
Data: 04/08/2016

1. SCOPO ED OBIETTIVI

Il presente metodo di prova consente di valutare la concentrazione di fibre d'amianto disperse in un determinato volume di acqua. Si basa sull'osservazione, l'analisi elementare e il conteggio delle fibre al microscopio elettronico, in seguito a filtrazione su membrana dell'acqua prelevata.

Il metodo è utilizzato ogni volta vi sia la necessità di valutare la presenza di fibre d'amianto nell'acqua, in seguito ad una possibile contaminazione derivante, ad esempio, dalla cessione di materiale dalle tubazioni in fibrocemento degli acquedotti, dal trasferimento in acque superficiali di materiale proveniente da affioramenti naturali di pietre verdi, o acqua di scarico da cantieri di bonifica, ecc..

2. CAMPO DI APPLICAZIONE

Classe: D1.01					
Sottoclasse	Parametro	Campo di prova	LOD	LOQ	Unità di misura
Acque destinate a consumo umano	Tutti i parametri	0-100 fibre conteggiate	(*)	(**)	ff/l

Classe: D1.09					
Sottoclasse	Parametro	Campo di prova	LOD	LOQ	Unità di misura
Acque reflue	Tutti i parametri	0-100 fibre conteggiate	(*)	(**)	ff/l

Classe: D1.29					
Sottoclasse	Parametro	Campo di prova	LOD	LOQ	Unità di misura
Acque sotterranee	Tutti i parametri	0-100 fibre conteggiate	(*)	(**)	ff/l

Classe: D1.30					
Sottoclasse	Parametro	Campo di prova	LOD	LOQ	Unità di misura
Acque superficiali	Tutti i parametri	0-100 fibre conteggiate	(*)	(**)	ff/l

(*) Come definito nella norma Iso 14966:2002: $LOD = (3/A_L) * (A_T/V)$, dove: A_L =area del filtro ispezionata; A_T =area totale del filtro (o area impolverata); V =volume filtrato.

(**) $LOQ = 1/A_L * A_T/V_f$

3. DEFINIZIONI, ABBREVIAZIONI E SIGLE

Campo di lettura: area di osservazione consentita dal monitor utilizzato, misurata a 4000 ingrandimenti.

Area di lettura: porzione del filtro ispezionata costituita dall'unione di tutti campi di lettura

SEM: Microscopio elettronico a scansione

EDXS: Spettrometro a raggi X a dispersione d'energia

I probe: Quantità di corrente che giunge sul campione (pA)

STUB: Supporto in alluminio per campioni

4. RIFERIMENTO A DOCUMENTI ESTERNI

- EPA Method 100.1(1983) e Method 100.2 (1994) (Environmental Protection Agency);
- AWWA Standard Method 2570 (American Water Works Association);

- G. Fornaciai, M. Cherubini, F. Mantelli, "Contaminazione da fibre di amianto nelle acque potabili in Toscana" (1997);
- Guidelines for Drinking-water Quality, 2nd ed. Vol. 2 "Health criteria and other supporting information. Geneva, 1996, "Asbestos in Drinking-water";
- ISO 14966:2002: Ambient air – Determination of numerical concentration of inorganic fibrous particles – Scanning electron microscopy method.
- Bozza "Metodo di analisi per la determinazione qualitativa e quantitativa della concentrazione di fibre di amianto in acque destinate al consumo umano con la tecnica della microscopia elettronica a scansione (SEM)"; ISS, tavolo tecnico del sottogruppo amianto.

5. REAGENTI E VETRERIE

5.1 Reattivi

Cod. ARPA	Reagenti / solventi / materiali di riferimento	Esigenze di purezza / RM o CRM
n.a.	n.a.	n.a.

5.2 Soluzioni di lavoro

n.a.

5.3 Soluzioni per la taratura

n.a.

5.4 Vetreria e materiali

Cod. ARPA	Vetreria / filtri / SPE / ecc...	Esigenze specifiche
peculiari	Membrane in esteri misti di cellulosa o in policarbonato	Diametro 47 mm
	Beuta da vuoto	
	Normale attrezzatura da laboratorio	

6. APPARECCHIATURE

6.1 Apparecchiature con requisiti metrologici

Apparecchiatura		Conferma metrologica		Documento di registrazione
Codice/ U.A.	Denominazione	Requisiti metrologici (*)	esito	Registri/report/archivio informatico
Unità analitica 7 (017522)	Microscopio elettronico a scansione (SEM) dotato di rivelatore per raggi X a dispersione d'energia (EDXS)	Vedi Par. 8 (Condizioni strumentali)	<input checked="" type="checkbox"/>	Registro degli interventi Quaderno di laboratorio n°1
03200002728	metallizzatore (Splutter coater)			
03200002679 (004613)	Bilancia tecnica BP6100 SARTORIUS AG	U.GR.S097	<input checked="" type="checkbox"/>	Registro degli utilizzi Registro degli interventi
03200002691 (004652)	Stufa essiccatrice SCF9606 FLUID MANAGEMENT SYSTEM		<input checked="" type="checkbox"/>	

Nota: I programmi di manutenzione e taratura contribuiscono al mantenimento degli standard di accuratezza e precisione. Si verificano con cadenza annuale gli interventi di manutenzione preventiva, durante i quali vengono ottimizzati i parametri strumentali del microscopio elettronico e ne viene verificata l'efficienza (realizzazione dell'immagine, taratura del sistema di misurazione a video, sostituzione dei componenti usurati, pulizia della colonna). Si eseguono con cadenza annuale prove di verifica sul sistema di microanalisi.

Tutti gli interventi di manutenzione preventiva sono a cura della ditta fornitrice dello strumento.

Procedura Tecnica
Metodo di prova

7. CRITERI DI QUALIFICAZIONE DEL PERSONALE

7.1. Competenze del personale

Codice competenze	Descrizione
N17025_tra01	Analisi delle Normative nell'ambito specifico
N9001_pa01	Competenze relative alle diverse tipologie di amianto
N9001_pa02	Competenze relative all'utilizzo dell'amianto in ambito civile ed industriale
N9001_pa03	Riconoscimento macroscopico dell'amianto
N17025_sub03	Competenze chimiche di base
N17025_ami02	Analisi in microscopia elettronica
N17025_tra04	Metrologia di base
N17025_sub23	Tecniche statistiche di base
N17025_sub24	Tecniche statistiche avanzate
N17025_tra05	Sistema gestione qualità
N17025_tra06	Competenze informatiche di base

7.2. Criteri di qualificazione del personale

Qualificazione operatori	Effettuazione di almeno una delle seguenti prove: <ul style="list-style-type: none"> • Partecipazione alle prove di validazione del metodo. • Analisi di un campione in affiancamento producendo conteggi compatibili con un analista qualificato.
Mantenimento Qualificazione	Esecuzione di almeno due analisi/anno. Se ciò non avviene, per ricominciare l'attività analitica, è necessario analizzare un campione in affiancamento producendo conteggi compatibili con un analista qualificato.

8. MODALITA' OPERATIVE

8.1 Preparazione del campione

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Il campione di acqua da analizzare deve essere conservato in frigorifero, onde evitare la crescita di microrganismi, muffe ecc.. che, in fase di filtrazione, depositandosi sulla membrana, costituirebbero disturbo all'immagine, interferendo con la ricerca delle fibre.

Il campione, suddiviso in aliquote, viene filtrato su membrane, in esteri misti di cellulosa o in policarbonato, da 47 mm di diametro, con porosità variabile minore o uguale 0,80 µm.

Nel caso di acqua potabile, filtrare su un'unica membrana almeno 2 litri d'acqua.

E' opportuno prevedere la filtrazione di almeno due aliquote di volume diverso, non conoscendo la natura e la quantità del materiale che può interferire.

Negli altri casi si procede alla filtrazione di più aliquote. I volumi di prova saranno stabiliti in base alla provenienza del campione e alla stima visiva del carico di materiale sulla membrana in seguito alla prima filtrazione.

Nel caso di campioni di acqua provenienti dal bacino idrografico compreso nell'area dell'ex miniera di amianto di Balangero, è necessario prevedere per ogni campione la filtrazione di alcune aliquote, per esempio da 100, 200 e 300 ml.

La scelta della membrana da sottoporre ad analisi deve essere compiuta, in seguito all'osservazione in S.E.M., valutando il miglior rapporto volume filtrato / materiale interferente depositato. Dal volume d'acqua filtrato dipende, infatti, il limite di quantificazione del metodo, ovvero quanto influisce sulla concentrazione il conteggio o meno di una fibra.

E' opportuno fare riferimento a volumi filtrati non inferiori a 100 ml. Nel caso in cui il materiale interferente depositato sulla membrana impedisca l'analisi corrispondente a tale aliquota, si provvederà a filtrare 100 ml dello stesso campione su due membrane differenti, considerando la somma dei relativi parametri nel calcolo della concentrazione, come previsto dal DM 06/09/94 per campioni di materiale aerodisperso prelevati in ambienti polverosi.

Per essere certi del valore corrispondente al volume che si intende filtrare, è necessario porre il contenitore su una bilancia (es. mod. Sartorius BP 6100 con campo di misura da 0,5-2000 g) e segnare il valore corretto in litri, considerando pari a 1 la densità dell'acqua.

Dovendo utilizzare lo stesso contenitore per aliquote diverse e per essere certi del totale trasferimento della quantità d'acqua pesata sul filtro, è opportuno effettuare un lavaggio del recipiente con acqua deionizzata. Versare quindi l'acqua di lavaggio sul filtro, senza incrementare il volume pesato per quella aliquota.

Una volta effettuate le filtrazioni, le membrane in esteri misti di cellulosa vengono poste in stufa a 105°C per circa due ore o in essiccatore se in policarbonato, per l'eliminazione dell'acqua d'imbibizione.

Successivamente è consigliabile osservare le membrane allo stereomicroscopio, per verificare l'assenza di evidenti disomogeneità nella distribuzione del materiale filtrato o di altre situazioni che rendano inutilizzabile il filtro ai fini dell'analisi.

Si sottopone quindi a metallizzazione un quarto di ciascuna membrana, utilizzando supporti in alluminio da 25 mm di diametro.

METALLIZZAZIONE

Inserire il campione nel metallizzatore impostando 50 secondi di ricoprimento, in modo da ottenere uno strato d'oro superficiale adeguato sia per la microanalisi sia per l'osservazione delle fibre. Raggiunto un valore di pressione di 0.05 mbar (corrispondente ad un'intensità di corrente di 40 mA), avviare la metallizzazione. Terminata la procedura, spegnere il metallizzatore e inserire il campione nella camera del microscopio elettronico.

Ripristinare le condizioni di vuoto per l'accensione del filamento. Identificare e segnare sul foglio di lavoro la posizione dello stub sul tavolino porta campioni.

CONDIZIONI STRUMENTALI

Giornalmente, con l'accensione dello strumento, si annota il valore del vuoto nel Gun sul quaderno di laboratorio.

Prima di ogni analisi si esegue la verifica delle prestazioni dello strumento tramite l'ottimizzazione dei parametri che concorrono all'ottimizzazione dell'immagine.

Al termine della prima analisi si controlla la misura di un campo microscopico, per il calcolo dell'area ispezionata (dato presente su foglio di lavoro U.RP.S338).

Eventuali anomalie sono registrate sul quaderno di laboratorio.

Per una corretta realizzazione dell'immagine al microscopio elettronico, in seguito al riscaldamento della sorgente, si procede alla centratura del fascio e alla regolazione di luminosità, contrasto, messa a fuoco e astigmatismo, avendo fissato i seguenti parametri:

Corrente del filamento = saturazione della sorgente

Corrente del fascio = 80 μ A

EHT (alta tensione) = 20 KV

Corrente sul campione (I probe) = 80 pA

Distanza di lavoro (WD) = 15 mm

Altezza tavolino porta campioni (Z) = 15 mm

I parametri strumentali riportati possono essere modificati a seconda delle esigenze, in relazione al sistema strumento-campione che si prende in considerazione. In particolare, nel corso dell'analisi si renderà necessario ridurre I probe e WD, evitando l'accumulo di carica sul campione, per riuscire ad ottenere microfotografie definite e prive di eccessivi contrasti.

AREA DI LETTURA

Si effettua un'ispezione preliminare dei campioni inseriti al microscopio, per osservare la distribuzione e la quantità del materiale depositato.

Per l'analisi, viene scelto il campione che corrisponde al volume filtrato maggiore, caratterizzato nel contempo da una quantità di matrice che permetta un'agevole ricerca delle fibre d'amianto.

L'analisi è condotta ad ingrandimenti non inferiori a 4000X, in quanto l'azione disgregante dell'acqua favorisce la dispersione dei fasci fibrosi e la loro suddivisione in fibre molto sottili, non visibili ad ingrandimenti inferiori. La lettura (o esame) si compie su una porzione del campione (area di lettura) pari ad almeno 1 mm², calcolando il numero di campi necessari a coprire tale superficie.

CRITERI DI CONTEGGIO

Si individua un'area centrale della porzione di filtro visibile al minimo degli ingrandimenti. L'area individuata viene suddivisa in un certo numero di campi da osservare per il conteggio delle fibre. È opportuno impostare un valore di sovrapposizione dei campi pari a -100% in modo da essere sicuri di non osservare due volte la stessa porzione di filtro (fields overlap), quando il software lo consente.

- Vengono conteggiate tutte le fibre d'amianto osservate; non si applicano i criteri dimensionali delle fibre respirabili (sono contate anche le fibre con diametro superiore a 3 µm; vanno contate tutte le fibre in contatto con particelle di qualsiasi dimensione).
- Tutte le fibre che giacciono completamente entro l'area di un campo vengono contate come "una fibra".
- Le fibre di cui si osserva una sola estremità entro l'area di un campo vengono contate come "mezza fibra".
- Le fibre di cui entrambe l'estremità giacciono all'esterno del campo d'osservazione non vengono conteggiate.
- Se più di 1/4 dell'area di conteggio è coperta da particolato, si respinge il campo e si passa al successivo.
- Un fascio di fibre unite fra loro (o groviglio) viene contato come "una fibra".
- Gli aggregati fibrosi in cui le fibre sono orientate casualmente devono essere comunque sempre segnalati:
 - a. se le fibre all'interno dell'aggregato risultano essere sufficientemente distinguibili, vengono contate come fibre singole.
 - b. se nell'aggregato non è possibile distinguere le singole fibre, la struttura viene contata nel foglio di lavoro.

IDENTIFICAZIONE DELLE FIBRE

L'analisi elementare si ottiene tramite lo spettrometro a raggi X a dispersione di energia (EDXS). Individuata una fibra, per catalogarne la natura è necessario scegliere ad alti ingrandimenti (intorno a 15000X) una zona della stessa sufficientemente in evidenza.

Nel caso in cui una fibra rappresenti un "caso dubbio" può essere talvolta utile analizzare il materiale che in parte la ricopre, o che la circonda, per ottenere informazioni sulla provenienza.

Nel caso in cui non si ottenga uno spettro sufficientemente chiaro, a causa delle dimensioni della fibra o della posizione sul filtro o per la presenza di oggetti "schermanti" nelle vicinanze, è consigliabile aumentare la quantità di corrente sul campione (I probe), oltre ad aumentare ulteriormente gli ingrandimenti per accertarsi della posizione del fascio. L'immagine subirà un peggioramento temporaneo, ma si otterrà un segnale migliore a proposito della composizione elementare.

Nel caso di campioni provenienti da corsi d'acqua superficiali, è opportuno tener presente che si possono trovare alghe filamentose e mucillagini, che possono generare oggetti fibrosi anche molto sottili (con diametri inferiori a $0,2 \mu\text{m}$, come le microfibre di crisotilo).

Per l'identificazione della fibra occorre considerare:

- la morfologia (andamento, estremità, luminosità d'immagine)
- la composizione elementare ottenuta con lo spettro a raggi X (per fibre con diametro di circa $0,1 \mu\text{m}$, lo spettro potrebbe non essere sufficientemente chiaro)
- la matrice inglobante la fibra o presente nelle vicinanze

8.2 Determinazione strumentale

8.2.1 CONDIZIONI STRUMENTALI

Vedi sopra

8.2.2 TARATURA

I programmi di manutenzione e taratura contribuiscono al mantenimento degli standard di accuratezza e precisione.

Si verificano con cadenza annuale gli interventi di manutenzione preventiva, durante i quali vengono ottimizzati i parametri strumentali del microscopio elettronico e ne viene verificata l'efficienza (realizzazione dell'immagine, taratura del sistema di misurazione a video, sostituzione dei componenti usurati, pulizia della colonna).

Si eseguono con cadenza annuale prove di verifica sul sistema di microanalisi.

Tutti gli interventi di manutenzione preventiva sono a cura della ditta fornitrice dello strumento.

In occasione dell'acquisto dei materiali di riferimento (amianti standard) si è provveduto a registrarne la risposta analitica in microscopia elettronica, attraverso l'acquisizione di immagini e spettri di composizione.

Ogni qualvolta si debba eseguire l'analisi di un materiale nuovo, se ne conservano le informazioni analitiche per gli eventuali riconoscimenti successivi.

8.2.3 CONTROLLI (BIANCHI, RM O CRM, ICV, ECC...)

Il laboratorio deve essere in grado di escludere la possibilità di una contaminazione ambientale del laboratorio, degli accessori, dei reagenti e dei filtri utilizzati per l'analisi attivando un opportuno e specifico programma interno di controlli di qualità e di analisi dei bianchi.

Il controllo del bianco viene eseguito filtrando acqua deionizzata e facendo proseguire la membrana come se fosse un campione.

8.2.4 ANALISI QUANTITATIVA

I calcoli per determinare la concentrazione in fibre per litro di amianto nell'acqua in esame e per la stima dell'incertezza associata sono eseguiti su fogli di calcolo validati e conservati su server nella cartella: Analisi/liquidi dell'anno in corso.

9. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

- Concentrazione fibre d'amianto in fibre/litro:

$$\frac{ff}{A_L} \times \frac{A_T}{V} \quad (2)$$

dove:

ff = n° fibre conteggiate

A_L = area del filtro analizzata

A_T = area del filtro interessata dalla filtrazione

V = volume filtrato in litri

Il risultato da riportare sul rapporto di prova, in termini di ff/l, è da approssimare, trascurando le cifre decimali.

L'espressione del risultato deve comprendere l'incertezza associata ed il valore calcolato sul conteggio di una fibra.

10. INCERTEZZA DI MISURA

Tipo di approccio	Classe	Sottoclasse	Parametro/i	Livello di concentrazione/ Campo di prova	Incetezza estesa
Distribuzione di Poisson	D1.01, D1.09, D1.29, D1.30	Acque potabili, reflue, sotterranee, superficiali	Fibre conteggiate	0÷100 fibre conteggiate	$LFI(ff/l) = LFI \times \frac{1}{A_L} \times \frac{A_T}{V}$ $LFS(ff/l) = LFS \times \frac{1}{A_L} \times \frac{A_T}{V}$

(*) I limiti fiduciarci LFI e LFS dipendono dalla distribuzione di riferimento che è quella di Poisson. Per i valori limite, si fa riferimento alla tabella ISPESL, Fogli d'Informazione n. 4/91.

11. REQUISITI DELLE PRESTAZIONI DEL METODO

CLASSE: D1.01, D1.09, D1.29, D1.30		SOTTOCLASSE: Acque potabili, reflue, sotterranee, superficiali	
Analita	Attributo/Caratteristica	Riferimento	Valore
Amianti	Ripetibilità stretta (*)	Compatibilità conteggi dimostrata tramite calcolo indice di dispersione (vedi All. 3)	Non superiore a quella prevista dalla distribuzione di Poisson
	Ripetibilità intermedia (**)	vedi All. 3	<15%
	Accuratezza (***)	—	Esito positivo nella partecipazione a circuito

(*) La ripetibilità stretta è valutata attraverso la lettura di cinque porzioni di uno stesso filtro, caratterizzato da una quantità di fibre d'amianto stimata non inferiore a 15, alle stesse condizioni strumentali, da parte di uno stesso operatore. Con i dati dei cinque conteggi, si calcola l'indice di dispersione X_{sp}^2 (vedi allegato 3 – "Prove di validazione" per i dettagli).

(**) Il metodo di stima prevede che tutti gli operatori leggano la stessa porzione di un filtro caratterizzato da una quantità di fibre d'amianto stimata non inferiore a 15. La dispersione relativa dei conteggi di tutti gli operatori non deve essere superiore al 15%. In caso contrario deve essere incrementata l'incertezza di misura.

(***) L'accuratezza del metodo è valutabile per mezzo di confronti interlaboratorio. Al momento non esistono circuiti dedicati, pertanto non è possibile specificare un riferimento a criteri di valutazione.

12. PROVE DI VALIDAZIONE

12.1 Dettaglio delle prove per la messa a punto del metodo

Sono state eseguite prove di filtrazione per la stima dei volumi ottimali necessari per l'analisi secondo la classe, da verificare su ogni campione, in modo empirico.

In presenza di membrane molto cariche di matrice e/o fibre, si scartano i campi con più del 25% occupato da materiale filtrato. Se più del 10% della membrana risulta da scartare, è necessario ripetere la preparazione del campione, filtrando un volume minore.

Classe	Sottoclasse	Volume indicativo (ml)
D1.01	Acque potabili	1000-4000
D1.09	Acque reflue	100-300
D1.29	Acque sotterranee	100-500
D1.30	Acque superficiali	100-300

Studio dei criteri di conteggio (vedi sopra)

Registrazione delle immagini per la descrizione del campione

Si eseguono le microfotografie delle fibre d'amianto e/o degli agglomerati ritenuti rappresentativi per dare una descrizione qualitativa del campione.

Le prove di validazione sono state eseguite su un campione di acqua potabile, valutando la compatibilità fra i conteggi ottenuti in seguito all'analisi di cinque porzioni della stessa membrana (vedi allegato 3 – "Prove di validazione" per i dettagli).

12.2 Prestazioni del metodo

Classe/i : D1.01, D1.09, D1.29, D1.30 Sottoclasse/i : Acque potabili, reflue, sotterranee, superficiali					
ANALITA : Amianto					
Parametro di validazione	Esito prove (P/N)	Prove	Riepilogo risultati	Rif. Modulo dati	data
Ripetibilità stretta	P	Si è calcolato l'indice di dispersione (all. 3) sulla base di cinque letture per un campione.	Compatibilità conteggi dimostrata tramite calcolo indice di dispersione	-	2006

Al fine di valutare l'impatto dovuto alla disomogeneità della matrice, che può rappresentare un fattore critico nell'ambito della validazione dei dati di laboratori terzi, sono stati eseguiti in sequenza prelievi e analisi in doppio, secondo quanto sotto riportato.

- ✓ 7 coppie di valori su acque superficiali (livello di concentrazione >10⁵ ff/l); anno 2013;
- ✓ 10 coppie di valori su acque potabili (livello di concentrazione intorno al limite di quantificazione); anno 2010;

La valutazione di compatibilità dei dati è stata eseguita, tramite analisi da parte di uno stesso operatore, considerando ciascun valore con la sua incertezza.

In tutti i casi si sono ottenuti dati compatibili, dimostrando l'esistenza di una sufficiente omogeneità della matrice.

13. CONTROLLO DELLE PRESTAZIONI NEL TEMPO

N°	Tipologia	Criteri di accettabilità	Frequenza	Carta di controllo
1	Ripetibilità stretta (*)	$K_p = \frac{ C_1 - C_2 }{\sqrt{C_1 + C_2}}$ $K_p \leq 2.58$	annuale	NO
2	Ripetibilità intermedia (*)	Errore relativo <15%	annuale	NO
3	Accuratezza (**)	Vedi U.RP.H757	annuale	NO

(*) Vedi Allegato 4.

(**) L'accuratezza del metodo di conteggio è valutata per mezzo di confronti interlaboratorio.

14. RIESAME DELLA VALIDAZIONE E DEL METODO

14.1 Rivalidazione/riconferma del metodo

Le prove di validazione verranno ripetute o integrate in seguito a:

- nuove indicazioni della legislazione di riferimento per i limiti di legge che implicino la necessità di modificare il campo di prova o il campo di applicazione
- nuove indicazioni della legislazione di riferimento per i criteri di prestazione che implicino la variazione dei limiti di accettabilità o la necessità di verificare parametri diversi
- nuove esigenze del cliente
- variazioni apportate al metodo di prova che devono essere verificate per valutare un'eventuale perdita di efficienza
- esito negativo di un circuito interlaboratorio non attribuibile ad una causa individuabile e rimovibile
- esito negativo ripetuto ai controlli previsti per il metodo non attribuibile ad una causa individuabile e rimovibile, se non risultano sufficienti le azioni correttive previste

14.2 Riesame del metodo

Il metodo viene riesaminato da parte della struttura di laboratorio in seguito a:

- variazione nelle modalità di applicazione del metodo
- nuove prove di validazione
- comunque almeno una volta ogni 5 anni

15. ELENCO MODULISTICA UTILIZZATA

Codice	Descrizione	Archivio
U.RP.S343	Foglio di prova	Allegato ai rapporti di prova
U.RP.S092	Campioni inseriti nel microscopio	Archivio SEM

16. PAROLE CHIAVE

Fibre, amianto, acqua, grunerite d'amianto, crisotilo, crocidolite, tremolite d'amianto, actinolite d'amianto, antofillite d'amianto, microscopia elettronica a scansione.

17. ELENCO ALLEGATI

Allegato 1 – Dichiarazione Idoneità del metodo.

18. MISURE DI SICUREZZA

Sono sufficienti le ordinarie misure di sicurezza presenti nel laboratorio così come indicato sul documento di valutazione del rischio

Ulteriori requisiti di sicurezza:

Documenti per il personale addetto	Ubicazione
Schede di sicurezza reagenti	-
Schede mansioni	Rete intranet
Schede sicurezza apparecchiature	Laboratorio
Documento di valutazione dei rischi	Rete intranet

Allegato 1

**Dichiarazione di idoneità del metodo U.RP.M842 rev.03
Laboratorio Polo Amianto Sede di Grugliasco (TO)**

Parametro	Requisiti di riferimento per la valutazione d'idoneità del metodo	Limiti di legge / Valori di riferimento	Idoneo
Amianto (ff/l)	Immagine microscopica finalizzata alla visione di fibre con diametri intorno a 0,05 mm.	-	<input checked="" type="checkbox"/>

Sulla base delle caratteristiche prestazionali del metodo ricavate sperimentalmente e delle modalità applicative in laboratorio, descritte nel metodo U.RP.M842 rev.03, dichiara la sua validità all'utilizzo per la valutazione della conformità/non conformità ai requisiti sopra riportati.

Data

Il Responsabile del Laboratorio

Allegato 2: Requisiti delle risorse strumentali

Giornalmente, con l'accensione dello strumento, si annota il valore del vuoto nel Gun sul quaderno di laboratorio.

Prima di ogni analisi si esegue la verifica delle prestazioni dello strumento tramite l'ottimizzazione dei parametri che concorrono all'ottimizzazione dell'immagine.

Al termine della prima analisi si controlla la misura di un campo microscopico, per il calcolo dell'area ispezionata (dato presente su foglio di lavoro U.RP.S343).

Eventuali anomalie sono registrate sul quaderno di laboratorio.

CONDIZIONI STRUMENTALI

Per una corretta realizzazione dell'immagine al microscopio elettronico, in seguito al riscaldamento della sorgente, si procede alla centratura del fascio e alla regolazione di luminosità, contrasto, messa a fuoco e astigmatismo, avendo fissato i seguenti parametri:

Corrente del filamento = saturazione della sorgente

Corrente del fascio = 80 μ A

EHT (alta tensione) = da 17 a 20 KV

Corrente sul campione (I probe) = da 80 a 200 pA

Distanza di lavoro (WD) = da 15 a 20

Altezza tavolino porta campioni (Z) = 10 o 15 (distanza ottimale indicata dal tecnico)

I parametri strumentali riportati possono essere modificati secondo le esigenze, in relazione al sistema strumento-campione che si prende in considerazione.

Allegato 3: Prove di validazione

Le prove di validazione del metodo sono effettuate su campioni significativi rispetto al limite di legge, ovvero caratterizzati da una quantità stimata di fibre d'amianto non inferiore a 15, presenti nell'area di lettura (circa 2 mm²).

Nella determinazione dei valori di concentrazione, è considerato predominante l'errore relativo al conteggio delle fibre, ovvero si ritengono trascurabili, rispetto ad esso, gli errori riferiti ad altre grandezze, quali la misura delle aree (area totale del filtro e area ispezionata), misura del volume prelevato.

L'errore di conteggio sarà quindi l'unica componente oggetto delle prove di precisione.

Precisione

Si ritiene significativo verificare la precisione del metodo in termini di ripetibilità stretta e ripetibilità intermedia, in relazione ai parametri: fibre d'amianto e fibre totali.

La ripetibilità stretta è valutata attraverso la lettura di cinque porzioni di uno stesso filtro, caratterizzato da una quantità di fibre d'amianto stimata non inferiore a 15, alle stesse condizioni strumentali, da parte di uno stesso operatore. Con i dati dei cinque conteggi, si calcola l'indice di dispersione (X_{sp}^2 nel seguito), in relazione all'ipotesi fondamentale che i dati seguano la distribuzione di Poisson:

$$\mathfrak{X}_{sp}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (C_i - C_m)^2}{C_m}$$

dove C_i è il valore del conteggio corrispondente alla lettura "i" e C_m è la media dei risultati, mentre n rappresenta il numero di letture effettuate (cinque nel nostro caso).

L'ampiezza di tale indice è indicativa della compatibilità dei conteggi effettuati, ovvero permette di verificare se la dispersione dei conteggi è compatibile con l'ipotizzata dispersione poissoniana.

A tale scopo, l'indice ottenuto viene confrontato con il valore tabulato della distribuzione \mathfrak{X}^2 , per n-1 gradi di libertà e per i livelli di probabilità $p = 0,95$ e $0,99$.

- Se $X_{sp}^2 \leq X_{0,95;n-1}^2$, i conteggi sono compatibili.
- Se $X_{0,95;n-1}^2 < X_{sp}^2 \leq X_{0,99;n-1}^2$, la compatibilità tra i conteggi potrebbe essere comunque affermata, ma solo dopo ulteriori approfondimenti (come di seguito descritto).
- Se $X_{sp}^2 > X_{0,99;n-1}^2$, la compatibilità tra i conteggi è insufficiente e le prove non possono essere considerate valide.

Nel caso di conteggi non compatibili, prima di decidere la ripetizione delle prove, viene effettuata la ricerca dei valori anomali, applicando il test di Huber:

Calcolare la mediana dei conteggi ottenuti (C_{med}).

Calcolare le differenze fra i singoli conteggi e la mediana ($D_i = C_i - C_{med}$)

Porre in ordine crescente i valori assoluti delle differenze e calcolarne la mediana (D_{med})

Si considerano anomali i conteggi per i quali vale la seguente relazione:

$$\frac{|D_i|}{D_{med}} > 4.5$$

Se un dato risulta anomalo viene scartato e si ripete il test di compatibilità con i valori rimasti. Se non sono rilevate anomalie o se le anomalie risultano essere più di una, le prove devono essere ripetute.

La ripetibilità intermedia considera il contributo delle differenze tra operatori all'errore relativo associato al conteggio. Tale ulteriore componente di errore è stata stimata essere non superiore al 15%. Il metodo di stima prevede che tutti gli operatori leggano la stessa porzione di un filtro caratterizzato da una quantità di fibre d'amianto stimata non inferiore a 15. Osservando la stessa area di lettura è esclusa, infatti, la variabilità causata dalla dispersione naturale delle fibre sul filtro, evidenziando le differenze tra gli operatori.

Allegato (4)

CONTROLLO DELLE PRESTAZIONI NEL TEMPO

Controllo periodico della precisione

Uno operatore abilitato analizza due porzioni diverse di uno stesso filtro, caratterizzato da una quantità stimata di fibre d'amianto non inferiore a 15. Con i valori dei due conteggi si calcola il seguente indice, la cui ampiezza indica la minore o maggiore compatibilità dei due valori.

$$K_p = \frac{|C_1 - C_2|}{\sqrt{C_1 + C_2}}$$

Di conseguenza si adotta la seguente regola di decisione:

- se $K_p \leq 2,58$ i conteggi sono accettabili
- se $K_p > 2,58$ la differenza tra i conteggi deve essere considerata anomala

Nel secondo caso il percorso di conferma non si può considerare valido.

Controllo periodico dell'errore dovuto agli operatori

Tutti gli operatori leggano la stessa porzione di un filtro caratterizzato da una quantità di fibre d'amianto stimata non inferiore a 15. La dispersione relativa, espressa calcolando la dev. standard e rapportandola alla media dei conteggi di tutti gli operatori, non deve essere superiore al 15%.

Nel caso in cui non fosse possibile eseguire conteggi sulla stessa area di lettura, si considera valido il criterio utilizzato per la stima dell'errore degli operatori relativo al metodo U.RP.M793 (Conteggio fibre in Microscopia Ottica su campioni aerodispersi), in base al quale il $CV_{sp}\%$ delle misure deve essere inferiore al CV_{rif} previsto (cfr. foglio di calcolo su server/qualità/controllo metodi).