

**INAIL**

**La qualità del dato analitico  
nel monitoraggio ambientale  
del bioaerosol**

**L'esperienza INAIL di intercalibrazione  
dei conteggi microbici su piastra**

**Edizione 2011**

## **Pubblicazione realizzata da**

**INAIL**

Consulenza Tecnica Accertamento Rischi e Prevenzione (CONTARP)

## **Con la collaborazione di**

Consulenza Statistico Attuariale (CSA), INAIL

U.O. Laboratorio - Dipartimento di Genova dell'Agenda Regionale per la Protezione dell'Ambiente Ligure (ARPAL).

## **Autori**

Raffaella Giovinazzo - Direzione Generale, CONTARP

Genoveffa Giaquinta - Direzione Regionale Sicilia, CONTARP

Elena Guerrera - Direzione Regionale Umbria, CONTARP

Marina Mameli - Direzione Regionale Toscana, CONTARP

Gabriella Marena - Direzione Regionale Lombardia, CONTARP

Teresa Mastromartino - Direzione Regionale Veneto, CONTARP

Daniela Sarto - Direzione Regionale Liguria, CONTARP

Paolo Calabrese - Direzione Generale, CSA

Massimiliano Veltroni - Direzione Generale, CSA

Angela Sangiuolo - ARPAL, Dipartimento di Genova - U.O. Laboratorio

## **Fotografie**

Raffaella Giovinazzo

Elena Guerrera

Marina Mameli

## **Partecipanti all'attività di intercalibrazione**

Simona Barca INAIL, Direzione Regionale Lazio

Luigi Caradonna INAIL, Direzione Regionale Puglia

Ugo Caselli INAIL, Direzione Regionale Marche

Genoveffa Giaquinta INAIL, Direzione Regionale Sicilia

Raffaella Giovinazzo INAIL, Direzione Generale

Elena Guerrera INAIL, Direzione Regionale Umbria

Marina Mameli INAIL, Direzione Regionale Toscana

Gabriella Marena INAIL, Direzione Regionale Lombardia

Teresa Mastromartino INAIL, Direzione Regionale Veneto

Angela Sangiuolo ARPAL, Dipartimento di Genova - U.O. Laboratorio, Settore Biologia

Daniela Sarto INAIL, Direzione Regionale Liguria

Francesco Summa INAIL, Direzione Regionale Emilia Romagna

## **Per informazioni**

Direzione Generale, CONTARP

via Roberto Ferruzzi, 40

00143 Roma

contarp@inail.it

**www.inail.it**

© 2011 INAIL

Distribuzione gratuita. Vietata la vendita. La riproduzione anche parziale su qualsiasi mezzo è consentita solo se è citata la fonte

ISBN 978-88-7484-214-8

Tipolitografia INAIL - Milano, dicembre 2011

# INDICE

	Pag.
<b>INTRODUZIONE</b>	5
La Consulenza Tecnica Accertamento Rischi e Prevenzione: ruolo e competenze	5
La misura del bioaerosol nell'accertamento del rischio biologico	5
<b>REQUISITI PER LA QUALITÀ DELLA MISURA</b>	9
L'analisi microbiologica dell'aria: aspetti tecnici e norme tecniche di riferimento	10
<b>INTERCALIBRAZIONE DEI CONTEGGI SU PIASTRA</b>	17
Lo schema adottato	17
Gli obiettivi dell'analisi statistica	19
Modelli statistici utilizzati a supporto del protocollo d'analisi	20
L'analisi dei cicli di intercalibrazione	24
<b>PROPOSTA DI PERCORSO STANDARD PER LA QUALIFICAZIONE ALL'ESECUZIONE DI CONTEGGI SU PIASTRA</b>	47
L'esperienza di intercalibrazione della CONTARP	47
La qualificazione del personale alla luce della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005	47
La standardizzazione del percorso di qualificazione	48
<b>LETTURA DI PIASTRE AGAR RELATIVE A CAMPIONI DI BIOAEROSOL</b>	51
Atlante fotografico	52
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	62



# INTRODUZIONE

## **La Consulenza Tecnica Accertamento Rischi e Prevenzione: ruolo e competenze**

La CONTARP è la struttura dell'INAIL che assicura la funzione tecnica di rilevazione degli elementi per la valutazione del rischio professionale:

- a. nella gestione dell'assicurazione obbligatoria contro gli infortuni e le malattie causate dal lavoro;
- b. nel sostegno alle aziende in materia di prevenzione.

La CONTARP è costituita da professionisti (biologi, chimici, geologi, ingegneri) e periti tecnici ed è organizzata in una struttura centrale, operante presso la Direzione Generale di Roma e in 20 strutture territoriali, presso le Direzioni Regionali e la Direzione Provinciale di Bolzano.

Tra i compiti istituzionali della CONTARP figurano l'accertamento e la valutazione dei rischi derivanti dall'esposizione ad agenti nocivi di natura chimica, fisica e biologica e la promozione di interventi mirati alla prevenzione.

Compito della CONTARP è:

- seguire l'evoluzione dei cicli produttivi;
- individuare i fattori di rischio lavorativi e accertare l'esposizione dei lavoratori ad essi;
- suggerire strategie di controllo e di prevenzione del rischio;
- promuovere la formazione e l'informazione dei lavoratori.

Per lo studio delle principali tipologie di rischio occupazionale, la CONTARP si avvale di unità operative, dislocate sul territorio nazionale e di un Laboratorio di Igiene Industriale, situato presso la CONTARP Centrale, che si occupa anche della messa a punto e della validazione delle metodologie di rilevazione dei fattori di rischio.

## **La misura del bioaerosol nell'accertamento del rischio biologico**

Nell'iter di accertamento del rischio occupazionale da agenti fisici, chimici e biologici, è essenziale acquisire misure di esposizione che siano affidabili e rappresentative. Come noto, in campo biologico non sono disponibili protocolli standard di campionamento e di analisi degli agenti di rischio, né valori limite di esposizione occupazionale. In assenza di indicazioni che orientino l'attività di monitoraggio ambientale verso specifici agenti di rischio, il controllo microbiologico degli ambienti di lavoro si

realizza attraverso misure 'di sintesi' (concentrazioni batteriche e fungine totali, carica stafilococcica etc.), utili alla classificazione e al 'giudizio igienico' degli ambienti, in base ai livelli di contaminazione riscontrati. L'attenzione è rivolta *in primis* al controllo dell'aria e delle superfici - quali, ad esempio, quelle di piani di lavoro, pareti, attrezzature e utensili, indumenti da lavoro etc. su cui gli agenti biologici o loro componenti aerodispersi (c.d. *bioaerosol*) si depositano per sedimentazione - per la stima del rischio di esposizione inalatoria e per contatto.

Poiché nell'aria la maggior parte dei microrganismi presenti è innocua e i patogeni rappresentano una frazione minima, è ragionevole pensare che il contenimento delle concentrazioni microbiche totali al più basso livello possibile riduca il rischio di esposizione ai microrganismi patogeni.

Nella prassi, per la misura del bioaerosol si ricorre a tecniche di tipo colturale, che rilevano la microflora vitale. Tali tecniche consentono di catturare i microrganismi aerodispersi su appositi terreni di coltura agarizzati in *piastre Petri*. La valutazione dei livelli di biocontaminazione è resa possibile dal conteggio del numero di colonie batteriche o fungine visibili e numerabili cresciute sulla superficie del terreno - dopo opportuna incubazione in condizioni standard di laboratorio - ed è espressa in termini di Unità Formanti Colonie (UFC) per m<sup>3</sup> di aria oppure cm<sup>2</sup> di superficie.

La composizione microbiologica dell'aria è caratterizzata da una notevole variabilità quali-quantitativa, conseguenza della distribuzione disomogenea dei componenti il bioaerosol, che influisce sulla ripetibilità della sua misura. Negli ambienti di lavoro, tale caratteristica risente anche della presenza di macchine e impianti e dell'attività lavorativa svolta.

L'utilizzo di tecniche colturali genera, inoltre, un ulteriore elemento di variabilità che incide sul risultato della misura: infatti, le diverse situazioni di crescita microbica osservabili sulla superficie delle piastre, al termine dell'incubazione, possono introdurre un elemento di 'soggettività' nel momento in cui l'operatore, che 'legge' le piastre, deve esprimere il risultato della misura, sia quando il risultato è un dato numerico, sia quando si tratta di un dato meramente qualitativo (ad es. crescita a patina). La fase del conteggio delle colonie su piastra agar rappresenta, perciò, un fattore critico ai fini della misura dei livelli di biocontaminazione ambientale, da cui dipende la stima dell'esposizione ai microrganismi.

L'esigenza di assicurare, in ambito INAIL, procedure e criteri uniformi di accertamento del rischio, anche in ragione dell'esistenza di strumenti e metodologie di indagine estremamente diversificati tra loro, hanno reso necessaria la standardizzazione dei protocolli e dei criteri base per il monitoraggio ambientale degli agenti biologici, da

adottare su scala nazionale. Ciò al fine di disporre di un documento di indirizzo operativo generale unico e di garantire la comparabilità dei dati acquisiti. Sono state dunque definite, nel 2005, Linee guida, ad uso interno, su *Il monitoraggio microbiologico negli ambienti di lavoro. Campionamento e analisi* (Seconda Edizione, INAIL 2010), elaborate da un 'gruppo pilota' di professionisti della CONTARP. Il protocollo prevede il campionamento di volumi noti di aria tramite campionatore attivo ad impatto ortogonale e l'utilizzo di tecniche analitiche di tipo colturale. È previsto anche il controllo della contaminazione delle superfici, tramite utilizzo di piastre a contatto. Successivamente alla realizzazione delle Linee guida, la CONTARP - in collaborazione con la Consulenza Statistico Attuariale (CSA) dell'Istituto e con l'U.O. Laboratorio, Sezione Biologia, dell'Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente Ligure (ARPAL) - ha avviato un'attività sperimentale finalizzata al miglioramento della qualità dei suoi dati analitici attraverso l'allineamento, ai criteri definiti nelle Linee guida, delle letture dei campioni microbiologici (piastre agar) e delle modalità di espressione del risultato, da parte dei professionisti biologi.

L'esperienza è stata condotta in ambienti controllati.

Non essendo possibile adattare, alla misura della contaminazione microbiologica aerodispersa, gli schemi standard di confronti interlaboratorio indicati dalla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 come una modalità per l'assicurazione della qualità dei dati e la valutazione della competenza del personale di laboratorio all'esecuzione di una prova, è stata sperimentata una nuova modalità operativa che tenesse conto dell'impossibilità di far girare, tra le unità operative regionali ed il Laboratorio Centrale della CONTARP, campioni di prova instabili (deperibili), rappresentati dalle piastre agar da sottoporre a lettura.

Sulla base dell'esperienza condotta e dei risultati ottenuti dopo alcuni cicli di intercalibrazione, è stato possibile standardizzare un percorso per la qualificazione interna - e il mantenimento, nel tempo, della stessa - del personale tecnico CONTARP all'esecuzione di conteggi microbici su piastra, per la misura della contaminazione microbiologica aerodispersa negli ambienti di lavoro.

In questa pubblicazione gli Autori intendono presentare l'attività sperimentale sino ad oggi condotta e la modalità operativa validata per l'intercalibrazione dei conteggi su piastra.



## REQUISITI PER LA QUALITÀ DELLA MISURA

L'attività di monitoraggio microbiologico ambientale può essere schematizzata nelle seguenti fasi consecutive:

- a. campionamento dell'aria/di superficie,
- b. incubazione dei campioni (piastre agar),
- c. lettura dei campioni (conteggio delle colonie su piastra),
- d. espressione del risultato.

Nelle Linee guida CONTARP, cui si rimanda per gli approfondimenti, ogni fase operativa del monitoraggio è stata analizzata per la standardizzazione 'documentale' dei comportamenti e delle procedure da adottare nelle attività sia di campionamento che di analisi. Ulteriori spunti di miglioramento dei protocolli operativi possono, comunque, essere desunti dalle norme tecniche della microbiologia applicata, che consentono di colmare carenze dei documenti tecnici specificamente riferiti alla matrice aria.

Molti sono i fattori che determinano la correttezza e l'affidabilità delle prove eseguite da un laboratorio. La norma tecnica UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 individua, al punto 5, contributi da parte di:

- fattore umano (il personale che esegue le prove),
- luogo di lavoro e condizioni ambientali (che non devono compromettere l'esecuzione corretta delle prove e la qualità della misura),
- metodi di prova adottati,
- campionamento,
- manipolazione dei dispositivi da sottoporre a prova,
- apparecchiature utilizzate (per il campionamento, le misurazioni e le prove stesse).

Nelle attività di prova microbiologiche alcuni dei fattori sopra citati, che contribuiscono alla variabilità del risultato analitico, possono essere sottoposti a controllo (ad esempio, l'operatore che esegue la prova, le condizioni ambientali e le attrezzature di laboratorio utilizzate), mentre altri sono difficilmente controllabili. Infatti, nel campo delle analisi ambientali, la misura della contaminazione microbiologica presenta, in generale, aspetti del tutto peculiari, soprattutto nel caso della contaminazione aerodispersa (bioaerosol), ove la natura dell'analita da ricercare è rappresentato da una miscela complessa e variegata di microrganismi viventi e la tipologia della matrice in cui tale analita è distribuito è rappresentata dall'aria. L'aria è difficilmente omogeneabile e non costituisce un ambiente ottimale per i microrganismi viventi.

I vari strumenti indicati dalla norma tecnica 17025, al punto 5.9.1, per monitorare la qualità dei risultati analitici non sono adatti alla misura del bioaerosol: le prove inter-

laboratorio, così come comunemente realizzate per le analisi microbiologiche di matrici ambientali come acqua, suolo o alimenti, l'utilizzo di materiali di riferimento o la ripetizione di prove su campioni conservati non sono applicabili alla misura della contaminazione aerodispersa.

Il fattore umano è imprescindibile ed è puntualmente richiamato dalla norma tecnica sopra citata, al punto 5.2: il personale di laboratorio deve essere competente all'esecuzione delle prove, attraverso programmi di formazione e addestramento, la cui efficacia deve essere monitorata nel tempo.

L'esperienza CONTARP di intercalibrazione dei conteggi microbici è stata condotta per rispondere a tale esigenza, superando le problematiche sopra esposte. L'attenzione è stata focalizzata sul controllo delle fonti di variabilità correlate alle fasi analitiche *c* (lettura dei campioni) e *d* (espressione del risultato) del processo di monitoraggio microbiologico ambientale.

Analoga attività è stata recentemente avviata anche per la fase del campionamento (*a*), in modo da sottoporre a controllo tutto il processo di monitoraggio.

### **L'analisi microbiologica dell'aria: aspetti tecnici e norme tecniche di riferimento**

L'analisi microbiologica dell'aria, oltre a presentare le caratteristiche descritte in termini di disomogeneità del campione, è la meno normata tra le analisi microbiologiche.

Attualmente, solo le norme UNI EN 14583:2005 e la UNI EN 13098:2002 sono riferite specificatamente al bioaerosol negli ambienti di lavoro: la prima, con riguardo agli strumenti di campionamento e la seconda, alle procedure di campionamento e analisi, rimanendo peraltro piuttosto generica.

Non disponendo di altri riferimenti specifici, la CONTARP ha tratto ispirazione dalle norme tecniche sull'analisi microbiologica di altri settori, quali ad esempio quello alimentare o delle acque, che presentano affinità, sotto il profilo tecnico ed in parte operativo, con l'analisi del bioaerosol.

Le norme prese in considerazione sono le seguenti:

- ISO 8199:2005 "*Water quality - General guidance on the enumeration of microorganisms by culture*";
- ISO 7218:2007 "*Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations*";
- ISO TS 11133:2003 "*Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media - Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media*";

- ISO/TR 13843:2000 "Water quality - Guidance on validation of microbiological methods";
- ISO 18593:2004 "Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for sampling techniques from surface using contact plates and swabs".

Di seguito, si riporta una breve disamina delle informazioni desunte da tali norme, per la sola parte di possibile interesse anche per l'analisi del bioaerosol.

### **Campionamento**

Le caratteristiche della matrice aria sono del tutto peculiari e non permettono di mutuare alcuna informazione dalle norme riferite ad altre matrici, per il campionamento del bioaerosol.

Le procedure di campionamento sono state, quindi, definite dal gruppo di lavoro redattore delle Linee guida CONTARP.

Poiché tra i fattori che determinano la qualità del dato analitico, la norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 considera le 'postazioni di lavoro' e le 'condizioni ambientali' (punto 5.3), sottolineando che particolare attenzione deve essere posta quando le attività di campionamento sono eseguite in luoghi diversi dal laboratorio, tutti i requisiti tecnici relativi ai siti di prelievo ed alle condizioni ambientali devono essere appuntati e documentati.

In generale, è necessario rendere minimo il rischio di contaminazione microbiologica crociata. A tal fine sono state definite dal gruppo di lavoro opportune procedure per uniformare le modalità di sterilizzazione delle testate dei campionatori attivi, sia in laboratorio che sul campo, nel passaggio da un punto di prelievo ad un altro.

La norma ISO 18593 descrive le modalità operative del campionamento su superfici tramite piastre a contatto e tamponi. Poiché, come evidenzia la norma al punto 3, tali metodi non sono riproducibili o quantitativamente affidabili, i risultati analitici ottenuti dalla loro applicazione dovrebbero essere usati solo per 'analisi di tendenza' (*trend analysis*).

### **Apparecchiature**

La norma ISO 7218 tratta diffusamente delle apparecchiature di laboratorio e dei relativi requisiti.

#### *a) Incubatori*

Al punto 5.8.1 della norma vengono fornite indicazioni precise sui requisiti degli

incubatori, in particolare sulla stabilità nel tempo e omogeneità nello spazio della temperatura di incubazione, internamente all'apparecchiatura. Importante, quindi, la definizione nel protocollo analitico della tolleranza sulla temperatura di incubazione e la possibilità di verifica del rispetto del requisito nella strumentazione utilizzata. Generalmente, si ritiene accettabile una tolleranza di  $\pm 1$  °C.

#### *b) Campionatori*

Per i campionatori è di fondamentale importanza la taratura dello strumento, al fine di eliminare il contributo di tale fattore alla variabilità del risultato della misura. Ferme restando le indicazioni fornite dalle case produttrici degli strumenti, è consigliata una taratura ogni anno in caso di utilizzo frequente. In caso di utilizzo più sporadico dello strumento sarà preferibile una taratura ad ogni uso, prima dell'avvio dei campionamenti.

#### ***Terreni di coltura***

Il mezzo di coltura deve essere preparato a partire da ingredienti di qualità uniforme e di grado analitico o, in alternativa, utilizzando terreni pronti disidratati e seguendo con esattezza le istruzioni fornite dal produttore.

Sia la ISO 8199 che la ISO 7218 rimandano, per il controllo di qualità dei terreni, alle indicazioni descritte dalle norme ISO/TS 11133 parte 1 e parte 2, che trattano estesamente tutti gli aspetti di preparazione e controllo di qualità dei terreni. Pur essendo state elaborate per la microbiologia dei prodotti alimentari, tali norme sono dichiaratamente adottate, per le parti applicabili, anche per la matrice acqua (è in corso di elaborazione, presso gli organi tecnici ISO, una norma in parte unica, che avrà come campo di applicazione entrambe le matrici).

Le due norme ISO, comunque, si applicano a tutte le tipologie di terreni di coltura, compresi quelli commerciali pronti all'uso.

La necessità di verifica delle prestazioni del terreno utilizzato è un requisito valido per tutte le tipologie di preparazioni, anche per i terreni forniti pronti all'uso; tuttavia, ai fini pratici, giova ricordare che l'utilizzo di terreni pronti prodotti da fornitori qualificati - che esibiscano certificati di analisi adeguati - può rendere l'esigenza del controllo minima.

Pertanto è da valutare attentamente l'opportunità di utilizzare terreni pronti di fornitori qualificati ogniqualvolta sia problematico effettuare il controllo di prestazione sulle partite prodotte.

### ***Sterilizzazione***

Le norme ISO 8199 e ISO 7218 considerano idonea la sterilizzazione in stufa a  $170 \pm 10^\circ\text{C}$  per almeno 1 ora, oppure in autoclave a  $121 \pm 3^\circ\text{C}$  per almeno 15 minuti.

### ***Incubazione delle piastre***

Le piastre devono essere riposte negli incubatori capovolte, impilate in numero massimo di 6 e distanziate di 25 mm l'una dall'altra, a garanzia di un'ottimale distribuzione del calore.

Le piastre per la ricerca di muffe e lieviti devono essere incubate in posizione diritta e non essere disturbate fino al momento della lettura, per evitare che conidi o spore rilasciate dalle muffe stesse diano luogo a sviluppo di colonie satellite, causando una sovrastima della popolazione campionata (ISO 7218, punto 10.4.1).

Le piastre che non possono essere lette al termine dell'incubazione, possono essere conservate ad una temperatura di  $3 \pm 2^\circ\text{C}$ , per brevi periodi: la norma ISO 7218 (punto 10.2.5) indica un tempo massimo di 48 h (o un tempo maggiore, ma solo se non viene compromesso il numero e l'aspetto delle colonie), mentre la ISO 8199 indica, più genericamente, 'alcuni giorni'.

Si è ritenuto opportuno e cautelativo prevedere, nel protocollo operativo CONTARP, una conservazione massima delle piastre per una durata 48 h, a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### ***Conteggio delle colonie su terreno solido ed espressione dei risultati***

Sia ISO 7218 che ISO 8199 descrivono i metodi per il conteggio dei microrganismi su terreno solido, utilizzando la tecnica per inclusione e per semina su superficie (semina su piastra). La ISO 8199 descrive anche il metodo di conta su membrane filtranti. Nel campionamento del bioaerosol effettuato con metodo attivo per impatto ortogonale i microrganismi contenuti nel volume d'aria prelevato, impattando sulle piastre contenenti terreno di coltura solido, sono catturati sulla superficie delle piastre stesse. Ai fini del conteggio la situazione presenta analogie con quanto previsto in ISO 7218 e ISO 8199.

Dopo incubazione alle temperature richieste dal metodo, si procede con il conteggio delle unità formanti colonia che, nel caso di utilizzo di terreni non selettivi, prevede la conta di tutte le colonie cresciute.

Aspetti di rilievo nella fase di conteggio sono:

- i criteri di valutazione da adottare nel caso in cui una porzione dell'area di conteggio della piastra risulti illeggibile per sciamaggio o confluenza delle colonie cresciute;
- il numero massimo/minimo di colonie per piastra valido ai fini del conteggio stesso.

La norma UNI EN 13098, al punto 7.5.5, recita che *“l’accuratezza dell’analisi colturale è scarsamente nota (.. omissis ..). Per la precisione complessiva dei metodi colturali sono stati rilevati valori CV dal 20 al 50%”*. Il conteggio delle colonie può rappresentare una fase critica nei casi in cui siano presenti *“colonie con crescita diffusa”*, *“conte basse”* o colonie così numerose da *“non essere ben separate”*; nel caso di conte fungine, ciò può anche *“causare una sottostima del numero coltivabile presente”*, per inibizione reciproca tra le colonie vicine. È, pertanto, opportuno stabilire regole che minimizzino la soggettività del risultato della conta.

#### *Crescita diffusa di colonie (patina)*

La ISO 7218 (punto 10.3) prevede di considerare le colonie sciamanti (*spreading colonies*) come singole colonie. Ai fini del conteggio totale, se le colonie sciamanti coprono meno di  $\frac{1}{4}$  dell’area di conteggio, il numero di colonie presenti nella parte leggibile della piastra dovrà essere sommato a quello della parte non leggibile ottenuto per proporzione.

Se la sciamatura interessa più di  $\frac{1}{4}$  dell’area di conteggio, la norma prevede di scartare la piastra. La UNI EN 13098 (punto 7.5.5), invece, indica in  $\frac{1}{2}$  dell’area di conteggio il limite oltre il quale scartare la piastra, in caso di crescita diffusa. Tale norma è specifica per *“l’atmosfera degli ambienti di lavoro”* ed evidenzia l’alta variabilità che caratterizza i livelli di esposizione ai microorganismi aerodispersi; tale variabilità, recita la norma, *“può essere molto più alta della precisione dei metodi di misurazione”*. L’indicazione che il gruppo di lavoro ha ritenuto più opportuno adottare è, pertanto, di ritenere leggibili le piastre in cui la crescita diffusa (patina) di colonie interessi fino a  $\frac{1}{2}$  dell’area di conteggio.

#### *Numero minimo di colonie su singola piastra*

La ISO 8199 e la 7218 indicano in 10 colonie/piastra il limite inferiore di determinazione del metodo di conta su mezzo di coltura, non essendo assicurata al di sotto di questo valore una precisione accettabile.

Entrambe le norme, tuttavia, rispettivamente al punto 8.4.4.1 e al punto 10.3.2.4.1, dichiarano che, in caso di conte <10, tale limite può comunque essere definito ad un livello inferiore, in base allo scopo del test. Infatti, facendo riferimento alla definizione di *“limite di determinazione”*<sup>1</sup> di cui alla norma ISO/TR 13843, in caso di una di-tribu-

<sup>1</sup> *“The lowest average particle concentration  $x$  per analytical portion where the expected relative standard uncertainty equals a specified value (RSD)”*; RSD is the relative standard deviation, which is calculated by dividing the estimate of the standard deviations of a population from a sample by the mean  $x$  of that sample.

zione di *Poisson*, considerando una deviazione standard relativa pari a 0.5 (50%), che può assumersi come ragionevole in microbiologia, il limite di determinazione diventa pari a 4 colonie per piastra. Se la piastra contiene un numero di colonie compreso tra 4 e 9 (incluso), il risultato viene espresso come numero stimato di microrganismi. In considerazione della variabilità quali-quantitativa che caratterizza la contaminazione microbiologica aerodispersa, l'indicazione che il gruppo di lavoro ha ritenuto più opportuno adottare è di procedere comunque al conteggio delle colonie, anche nei casi di conte basse, per non perdere l'informazione 'quantitativa' relativa al campione, come *indicazione* dei livelli di contaminazione dell'ambiente in esame.

#### *Numero massimo di colonie su singola piastra*

Secondo la ISO 8199 (punto 8.4.2), per conteggi su terreno non selettivo di piastre di diametro 90 mm o su membrane filtranti di diametro 47-50 mm, il numero di colonie conteggiabili, in caso di conte totali, deve essere compreso tra 10 e 200.

Per la ISO 7218 (punto 10.3.1), invece, il numero massimo di colonie è pari a 300, con l'indicazione, però, di ridurlo o aumentarlo in funzione dell'area delle piastre utilizzate. Per conte totali su piastre, ad es., da 60 mm (che sono del tipo di quelle utilizzate per i campionamenti attivi di bioaerosol), tale valore si tradurrebbe in circa 133 colonie.

Per le colonie tipiche su terreni selettivi il numero massimo di colonie, su piastre da 90 mm, è pari a 150 (ISO 7218, punto 10.3.2); per le muffe, l'indicazione della ISO 7218 è di selezionare, ai fini del conteggio, piastre contenenti un numero inferiore di colonie (punto 10.4.2).

Come già evidenziato, secondo la norma UNI EN 13098 (punto 7.5.5) l'accuratezza del conteggio può essere influenzata "*dove vi siano così tante colonie sull'area di conta da non essere ben separate*". Viene indicata come appropriata una densità di colonie batteriche  $< 5/\text{cm}^2$  e di colonie fungine  $< 2/\text{cm}^2$  di piastra che, per piastre da 60 mm, equivarrebbe a un numero massimo di colonie totali conteggiabili  $< 140$ , nel caso dei batteri e  $< 56$ , nel caso dei funghi.

L'indicazione che il gruppo di lavoro ha ritenuto più opportuno adottare è di ritenere accettabile un numero massimo di colonie pari a 200; ciò al fine di limitare il numero di piastre da scartare, tenuto conto della variabilità della contaminazione microbiologica aerodispersa. Opportuna valutazione sarà necessaria nei casi di piastre che contengano muffe come popolazione dominante, con colonie invasive e variabili in diametro.

#### *Nessuna crescita*

Secondo le norme ISO 8199 ed ISO 7218, nel caso di "nessuna crescita" sulla piastra, si

può esprimere il risultato come "0" oppure "1" UFC/unità di volume, oppure come "organismi non rilevabili", con l'indicazione del volume di campione analizzato.

### ***Espressione del risultato***

Per le modalità di espressione del risultato adottate dal gruppo di lavoro, si rimanda alle Linee guida CONTARP (2010) e all'Atlante fotografico di pag. 52.

Nel caso di "nessuna crescita", l'indicazione che il gruppo di lavoro ha ritenuto più opportuno adottare è di esprimere il risultato come "assenza di crescita" per il volume d'aria (o la superficie) campionato(a).

Nel caso, invece, di superamento del numero massimo di colonie conteggiabili, per non perdere comunque l'informazione quantitativa relativa al campione, si ritiene utile effettuare il calcolo delle UFC attribuendo al risultato del conteggio il valore "Pr" (numero più probabile di unità formanti colonie della piastra) massimo, riportato nelle *Tablette di conversione per il calcolo del numero più probabile di microrganismi campionati*, fornite dalle Ditte produttrici dei campionatori attivi ad impatto ortogonale ed annotare, sul report analitico, che UFC totali >> UFC calcolate sul Pr massimo<sup>2</sup>. Tale risultato deve essere analizzato in relazione alle condizioni ambientali vigenti presso il punto di prelievo, al momento del campionamento, che possono aver comportato un incremento dei livelli di bioaerosol, per evincere eventuali correlazioni utili ai fini della valutazione del rischio di esposizione lavorativa.

<sup>2</sup> Su questo punto, la modifica metodologica apportata rispetto alle indicazioni delle Linee guida (Ediz. 2010), frutto di successivi approfondimenti operativi, sarà recepita nella prossima edizione delle Linee guida stesse.

## **INTERCALIBRAZIONE CONTARP DEI CONTEGGI SU PIASTRA**

Nello spirito della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005, i fattori che contribuiscono alla variabilità di una misura debbono essere individuati e sottoposti a controllo, per il miglioramento della qualità del dato analitico e della prestazione del laboratorio che effettua la prova.

Nella misura della contaminazione microbiologica aerodispersa, la fase di conteggio delle colonie su terreno solido rappresenta, come già evidenziato, un fattore critico, rispetto al quale il personale che effettua la prova deve essere opportunamente addestrato.

Per controllare tale contributo alla variabilità, garantendo, nel contempo, omogeneità nella valutazione dei livelli di biocontaminazione in ambito CONTARP, è stata sperimentata un'attività di laboratorio consistente nell'addestramento del personale tecnico al conteggio microbico su piastra in accordo ai criteri e alla terminologia di espressione del risultato definiti nelle Linee guida CONTARP, e nel controllo periodico del mantenimento di tali prestazioni nel tempo.

Per evidenziare le componenti di variabilità del conteggio da sottoporre a controllo e allineare tra loro le misure, la CSA dell'INAIL ha strutturato un modello statistico da applicare, in via sperimentale, ai risultati di ogni ciclo di intercalibrazione.

Lo schema base è stato sviluppato nell'arco di tre anni, durante i quali i professionisti CONTARP partecipanti all'intercalibrazione hanno eseguito, con cadenza annuale, letture in cieco e parallelo su set di piastre-campione rappresentative di diversi livelli di contaminazione microbiologica riscontrabile, preparate per l'occasione.

I risultati delle letture sono stati analizzati statisticamente secondo procedure messe a punto dalla CSA.

Nei primi cicli di intercalibrazione, l'analisi congiunta dei risultati ha consentito di migliorare lo schema di attività per tenere sotto controllo le fonti di variabilità delle letture dei campioni di prova.

Successivamente, la prosecuzione dell'attività, con cadenza annuale, ha consentito di garantire nel tempo il mantenimento della qualificazione raggiunta.

### **Lo schema adottato**

Come laboratorio-pilota per lo svolgimento di ogni ciclo di intercalibrazione è stato scelto il Laboratorio Centrale di Igiene Industriale della CONTARP. Presso tale laboratorio convergono, ogni anno, i partecipanti al circuito di intercalibrazione, che è svolto in seduta unica (durata: una giornata).

A ciascun partecipante è attribuito un codice identificativo proprio, mantenuto ad ogni ciclo di attività.

L'intercalibrazione è effettuata con le modalità di seguito descritte.

Presso il laboratorio-pilota sono predisposti, in totale, n. 36 campioni di prova (piastre agar), ottenuti effettuando prelievi in triplo (3 repliche per ogni parametro microbiologico) di aria e su superficie, nel medesimo ambiente di lavoro (ufficio), in accordo al protocollo delle Linee guida CONTARP.

I campioni di prova sono così rappresentati:

		Aria (volumi campionati)		Superfici (tempo di contatto)
Campioni per conta batterica totale	9 piastre da 55 mm*	100L	200L	10 secondi
	9 piastre da 84 mm*	300L	400L 500L	
Campioni per conta fungina totale	9 piastre da 55 mm*	100L	200L	10 secondi
	9 piastre da 84 mm*	300L	400L 500L	

(\*) piastre tipo *Surfair plate*, 55 mm d.i. e *Maxi Contact*, 84 mm d.i. - *internationalpbi*

I campionamenti sono condotti dal medesimo operatore.

Per i prelievi d'aria si utilizzano campionatori attivi ad impatto ortogonale SAS Super 100 (portata d'aspirazione: 100L/min) e SAS Super 180 (portata d'aspirazione: 180L/min) (*internationalpbi*), mentre, per quelli su superficie, piastre a contatto montate su applicatore temporizzato RODAC-WEIGHT (*internationalpbi*).

I campionamenti di aria sono effettuati aspirando volumi progressivamente crescenti, per ottenere nei campioni di prova livelli di contaminazione microbica diversi e rappresentativi di quelli riscontrabili negli ambienti di lavoro. Nei prelievi su superficie il tempo di contatto tra piastra e superficie è pari a 10 sec..

Le piastre per i conteggi batterici totali (terreno di coltura *Plate Count Agar - Liofilchem*) sono incubate a  $22 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  per 72 h; quelle per i conteggi fungini (terreno di coltura *Sabouraud Agar cloramfenicolo - BioMerieux*), sono incubate a  $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  per 72 h<sup>3</sup>.

Ogni singola piastra, identificata con codice univoco, è considerata un campione di prova a se stante.

<sup>3</sup> Range di temperatura come da caratteristiche tecniche dei modelli di incubatore in dotazione al Laboratorio Centrale CONTARP.

Al termine dell'incubazione, i partecipanti all'intercalibrazione si alternano, sotto cappa, nella lettura, in cieco e in parallelo, dei campioni di prova secondo i criteri delle Linee guida, registrandone gli esiti su apposite schede.

Per l'armonizzazione dei criteri di lettura e di refertazione delle misure, nel corso dell'intercalibrazione si acquisiscono fotografie di piastre su cui si osservano sviluppi microbici particolari; tali fotografie consentono di alimentare l'atlante relativo alla 'casistica' CONTARP.

I risultati delle letture sono, successivamente, sottoposti ad analisi statistica.

### **Gli obiettivi dell'analisi statistica**

Come premessa generale è bene specificare che la strutturazione del protocollo di analisi che verrà descritto nei paragrafi successivi è chiaramente coerente con gli obiettivi di progetto, ossia con la necessità di uniformare la professionalità del personale INAIL addetto alla lettura dei campioni allo standard declinato nelle Linee guida CONTARP.

In termini tecnici, questa intenzione corrisponde ad un percorso d'analisi statistica che, partendo dagli esiti dei circuiti, sia innanzitutto mirato ad accertare se le realtà operative in cui essi si sono svolti possano o meno permettere di accettare l'ipotesi di omogeneità di condizioni sia nella rilevazione di ogni singola misura che nella esposizione formale di tali misure.

In altre parole, il quesito di partenza è stato quello per cui ci si chiede se ci sia o meno la ragionevole certezza di aver contenuto quanto più possibile errori di tipo sistematico nella misurazione della crescita microbica, ossia se si sia minimizzata l'influenza di fattori esogeni al fenomeno in questione (primo fra tutti il processo di acquisizione dei criteri espressi dalle Linee guida da parte dei biologi partecipanti al progetto, ma anche le condizioni climatiche e l'ora della misurazione, così come l'eventuale ulteriore crescita microbica tra la prima e l'ultima lettura di una stessa piastra e così via).

In questi casi si ricorre spesso a tecniche di analisi multivariata, in quanto tramite esse è possibile evincere dai dati informazioni che non si palesano in via immediata e che, comunque, è difficile desumere dai consueti parametri descrittivi od anche da un approccio inferenziale univariato.

È chiaro, poi, che in contesti che prevedano sistemi ad alta complessità - come certamente possono considerarsi gli svolgimenti di questi circuiti - raramente si ricorre ad un unico modello di analisi; si preferisce, piuttosto, strutturare un protocollo di analisi che permetta di giungere per passi successivi alla definizione degli indicatori sintetici idonei alla soddisfazione degli obiettivi che ci si è prefissi.

Nel caso specifico, il protocollo d'analisi è stato strutturato in sei fasi:

1. definizione (od eventuale revisione) del disegno di ricerca tramite l'analisi dei documenti a disposizione (od anche degli esiti dei precedenti circuiti) ed il confronto interdisciplinare tra le componenti professionali del gruppo di lavoro;
2. elaborazione di una fase di *pre-processing* per l'esposizione formale dei dati, la definizione delle eventuali classi di partizionamento delle rilevazioni e per l'individuazione e la lavorazione di eventuali dati anomali;
3. individuazione, tramite opportune tecniche di *clustering*, di *pattern* significativi rispetto agli scopi progettuali;
4. verifica della significatività statistica delle distanze tra i *pattern* eventualmente individuati;
5. elaborazione, anche sulla base dei risultati di cui al punto precedente, di una fase di *post-processing* per la validazione, l'accorpamento (o lo scorporo) e l'interpretazione dei *pattern* eventualmente individuati;
6. calcolo di indicatori sintetici della variabilità dei conteggi.

Infine, è bene precisare che in questa fase progettuale sono state condotte tutte le operazioni necessarie per affrontare il concetto di incertezza estesa associata alla misura, ma in nessuno modo tale incertezza è stata oggetto di quantificazione, in quanto le condizioni per procedere alla predetta quantificazione e le modalità per farlo saranno oggetto di lavori successivi.

### **Modelli statistici utilizzati a supporto del protocollo d'analisi**

Come conseguenza di quanto declinato all'interno del protocollo di analisi, sono stati individuati gli strumenti statistici adatti a sostenere l'indagine in ogni sua fase. Di seguito vengono riportate brevemente le caratteristiche principali e le condizioni di validità dei test statistici utilizzati per esaminare i risultati dei circuiti.

#### ***Il test z-score normalizzato per l'individuazione di dati anomali***

Il test Z-score consiste nel ricavare dei punteggi, mediante l'utilizzo di parametri medi ed indici di variabilità calcolati sulla distribuzione campionaria, da associare alle singole osservazione, in modo da verificare se tali punteggi siano o meno in un intervallo di accettabilità.

Classicamente si ricorre alla seguente trasformazione:

$$z_i = \frac{\text{osservazione} - \text{media}}{\text{scarto tipo}}$$

ma è frequente il ricorso a parametri robusti, quali la mediana e l'intervallo interquartile normalizzato, per cui il punteggio è calcolato nel modo seguente:

$$z_i = \frac{\text{osservazione} - \text{mediana}}{\text{intervallo interquartile normalizzato}}$$

In entrambi i casi, l'osservazione è accettabile se il valore assoluto del punteggio è compreso tra 0 e 2, è dubbia se tale valore assoluto è tra 2 e 3, non accettabile quando è oltre 3.

Conformemente al fatto che in questo ambito ci si potevano attendere rilevazioni anche fortemente anomale, il test utilizzato è quello che fa riferimento a parametri robusti.

### ***Two-step cluster analysis***

La *cluster analysis*, come è noto, è un modello di analisi multivariata attraverso il quale è possibile raggruppare le unità statistiche in classi non note a priori, utilizzando algoritmi che lavorano in modo da minimizzare la "lontananza logica" interna a ciascun gruppo, massimizzando di contro quella tra i gruppi (Barbaranelli C., 2006); la "lontananza logica" in questione viene quantificata per mezzo di misure di similarità definite tra le unità statistiche secondo la natura dei dati a disposizione.

Esistono, ovviamente, moltissime tecniche di *clustering*; in questo particolare contesto si farà riferimento alla metodologia detta di "*two-step clustering*", in quanto dotata di caratteristiche che ben si adattano alle rilevazioni a nostra disposizione. Tale metodologia, in particolare, possiede le seguenti proprietà:

1. fa riferimento ad una misura di similarità basata sulla funzione di log-verosimiglianza, estendendo dunque i modelli basati su misure di distanza (Banfield J. D. and A. E. Raftery, 1993) e consentendo, quindi, la gestione di variabili sia continue che categoriali;
2. utilizza un approccio a due stadi simile a quello utilizzato dal ben noto algoritmo BIRCH (Zhang T. *et al.*, 1996), permettendo, pertanto, anche il trattamento di grandi quantità di dati;
3. contrariamente ai metodi classici, offre la possibilità di definire automaticamente il numero ottimale di *cluster*.

In termini operativi, il procedimento prevede una prima fase in cui viene applicato ai dati un algoritmo sequenziale di raggruppamento (Theodoridis S. and Koutroumbas K., 1999), in base al quale viene costruito un numero di *cluster* dipendente dai criteri con cui si è strutturato l'albero delle caratteristiche dei *cluster* (la soglia iniziale di distanza, il numero massimo di ramificazioni per nodo foglia, il numero massimo di livelli dell'albero).

La seconda fase utilizza come input i *cluster* ottenuti nella fase precedente, applicando ad essi un algoritmo agglomerativo di tipo gerarchico ed implementando una procedura di individuazione del numero ottimale di gruppi basata sul *Bayes Information Criterion* (BIC).

Al modello in questione sono associate delle assunzioni in base alle quali esso risulta valido; in particolare, avendo definito la misura di similarità con riferimento alla funzione di log-verosimiglianza, per accettare le soluzioni che esso propone bisogna verificare che:

1. le variabili utilizzate nel modello siano tra loro indipendenti;
2. ad ogni variabile continua sia associata una distribuzione normale;
3. ad ogni variabile categoriale sia associata una distribuzione multinomiale.

Bisogna, poi, accennare al fatto che la definizione dell'albero delle caratteristiche dei *cluster* può essere influenzata dall'ordine in cui si presentano i dati; sarebbe, quindi, buona norma disporre i dati in ordine casuale e, quando possibile, testare la stabilità delle soluzioni replicando la procedura in relazione a diversi ordinamenti casuali.

### ***Il modello di analisi della varianza (ANOVA)***

L'analisi della varianza è una tecnica di analisi dei dati volta a verificare ipotesi in merito alle eventuali differenze tra le medie di due o più popolazioni; i modelli di analisi che rientrano in questa famiglia possono essere classificati in vari modi, in base al numero di variabili indipendenti e dipendenti che vengono prese in considerazione. In particolare, si dice *univariata* l'analisi che prevede una sola variabile dipendente, mentre è ovviamente *multivariata* quella che ne prevede più d'una; in entrambe le ipotesi il disegno si dice *ad una via* se è prevista una sola variabile indipendente, mentre si parla di disegno *fattoriale* in caso di una molteplicità di variabili indipendenti.

In questo contesto sono stati utilizzati esclusivamente modelli univariati con disegni ad una via o fattoriali, a seconda delle esigenze.

I modelli in questione prevedono una relazione lineare tra la variabile dipendente ed i livelli (o modalità) dei fattori considerati come variabili indipendenti; ad esempio,

nel caso più semplice di disegno ad una via, il modello è individuato dalla seguente equazione:

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

Ossia ogni singola osservazione è il risultato della composizione della media generale del fenomeno ( $\mu$ ) con l'effetto del livello del fattore ( $\alpha_i$ ) più una componente residua d'errore casuale ( $\varepsilon_{ij}$ ); il modello, ovviamente, si complica un pò nel caso di più fattori, in quanto è necessario considerare anche le eventuali interazioni tra di essi. L'ipotesi che si sottopone a test è la seguente:

$$H_j: \alpha_1 = \alpha_2 = \dots = \alpha_i$$

che corrisponde all'assunzione che i livelli del fattore non hanno alcun effetto significativo sulle medie dei gruppi e, quindi, esse sono tra loro uguali a meno di scostamenti casuali; ovviamente l'ipotesi alternativa è che almeno una delle medie dei gruppi sia significativamente diversa dalle altre, a causa del livello del fattore.

L'effetto dei livelli del fattore viene quantificato in termini di varianza spiegata, ossia di percentuale di varianza totale del fenomeno attribuibile alle differenze tra gli effetti dei diversi livelli del fattore.

Perché il modello possa ritenersi valido è necessario sottoporre a verifica il rispetto delle seguenti assunzioni:

1. gli errori  $\varepsilon_{ij}$  devono seguire la distribuzione normale ed avere media nulla;
2. la varianza degli errori deve essere uguale in ogni gruppo (condizione di omoschedasticità);
3. gli errori  $\varepsilon_{ij}$  devono essere tra loro indipendenti.

Per completezza di esposizione, c'è da dire che il test F di Fisher, su cui è basata l'analisi della varianza, è piuttosto robusto rispetto alla violazione della seconda assunzione.

### ***Il modello di analisi della covarianza (ANOVA)***

L'analisi della covarianza prende le mosse dal modello ANOVA, inserendo nell'analisi gli eventuali effetti perturbatori di variabili concomitanti, dette covariate, che possano presentare correlazione con la variabile dipendente.

La logica alla base del modello è quella di far regredire la variabile dipendente sulle variabili di disturbo, in modo da poter considerare il residuo di tale regressione ciò che rimane ancora da spiegare tramite l'analisi della varianza, che così opera la valutazione dell'effetto dei fattori, al netto delle perturbazioni.

In termini di modello, l'equazione lineare viene esplicitata nel modo seguente:

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta(x_{ij} - \bar{x}) + \varepsilon_{ij}$$

formalizzando, appunto, l'effetto della regressione ( $\beta(x_{ij} - \bar{x})$ ) all'interno dei termini che compongono il fenomeno.

Il modello ANCOVA, oltre a dover, ovviamente, rispettare le assunzioni di validità prospettate per il modello ANOVA, prevede anche la verifica della sussistenza di ulteriori vincoli. In particolare, deve risultare che:

4. la relazione tra la variabile dipendente e le covariate deve essere lineare;
5. non si abbiano effetti dovuti all'interazione tra covariate e variabili indipendenti, ossia l'effetto della regressione sia invariante rispetto ai gruppi;
6. le covariate devono essere misurate senza errore.

La violazione delle condizioni 4 e 5 invalida il modello, il non rispetto della condizione 6 porta solo ad un test meno potente.

## **L'analisi dei cicli di intercalibrazione**

Come doverosa premessa alla presentazione dell'analisi effettuata sui cicli di intercalibrazione ad oggi effettuati, c'è da dire che, per non appesantire l'esposizione, sono state omesse le verifiche effettuate sulle assunzioni di validità dei modelli, presentando i risultati solamente in relazione alle situazioni in cui tali verifiche hanno dato esito positivo.

Chiaramente, è anche stato dato conto di quei casi in cui le verifiche sulle assunzioni di validità abbiano portato a non accettare i risultati dei modelli o, comunque, a far conto sulla loro robustezza rispetto alla violazione intervenuta.

C'è inoltre da dire che, per quanto riguarda i casi anomali, quelli certamente tali sono sempre stati al di sotto dell'1% delle rilevazioni totali, mentre quelli dubbi sono stati poco al di sopra di tale percentuale (mediamente intorno al 3%).

Le analisi sono state condotte al netto delle suddette rilevazioni.

### **Prima intercalibrazione**

Questa prima fase, oltre ad essere centrata sull'analisi delle eventuali differenze tra le modalità operative dei redattori le Linee guida CONTARP ("gruppo pilota") e di chi le ha recepite (c.d. "non redattori"), ha avuto, più delle altre, anche un carattere orientativo rispetto al problema, in quanto si è avuta attenzione al fatto di dare espressione formale a quelle che erano e sono evidenze esperienziali (prima fra tutte la variabilità tra le repliche).

In fase di redazione del disegno d'analisi, con attenzione a quanto appena detto, sulla base dei documenti disponibili e con il conforto del parere professionale dei biologi redattori partecipanti all'intercalibrazione, s'è ritenuto opportuno provvedere alle seguenti operazioni di preparazione dei dati:

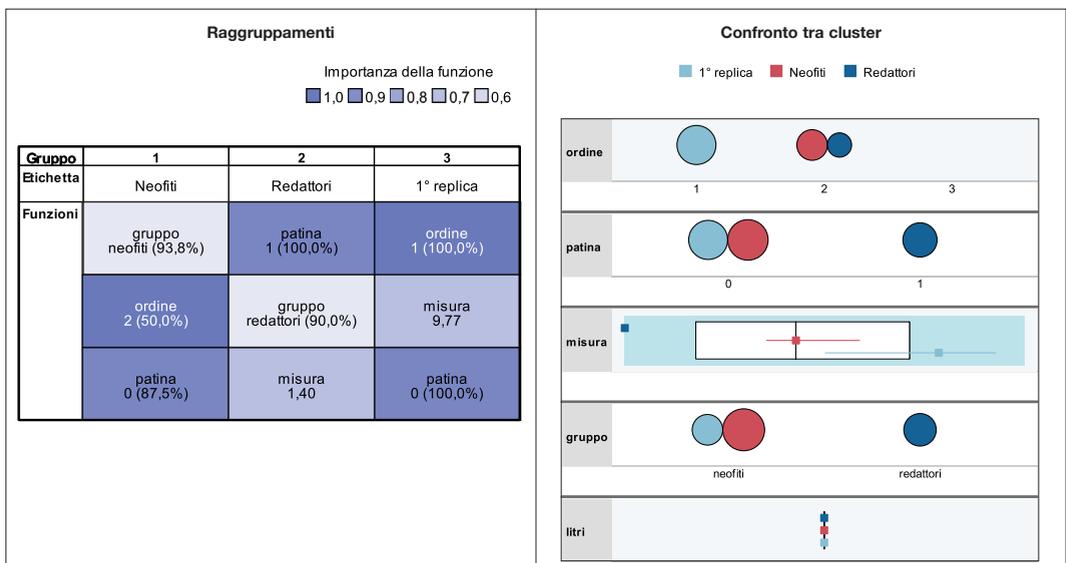
1. le rilevazioni sono state suddivise in partizioni dipendenti dal tipo di carica rilevata (batterica piuttosto che fungina), dal tipo di campionamento (di aria piuttosto che di superficie) e dal tipo di piastra utilizzata (d.i. 55mm piuttosto che 84mm), in modo da replicare il processo di analisi singolarmente su ognuna delle sei partizioni così ottenute;
2. le Linee guida dispongono che, in caso di formazione di patina, questa venga dichiarata omettendo di effettuare il conteggio su piastra; questa impostazione si traduce tecnicamente nel fatto che la dizione "patina" rappresenta un valore semantico d'incertezza assoluta della misura; pertanto, accanto alla variabile che riporta i valori di conteggio, è stata introdotta una variabile binomiale, che assume il valore 0 in caso di assenza di patina ed il valore 1 in caso di presenza di patina, che dia conto della presenza o meno di tale incertezza.

Le operazioni di *clustering* sono state, quindi, effettuate sulle partizioni individuate, con attenzione alle seguenti variabili:

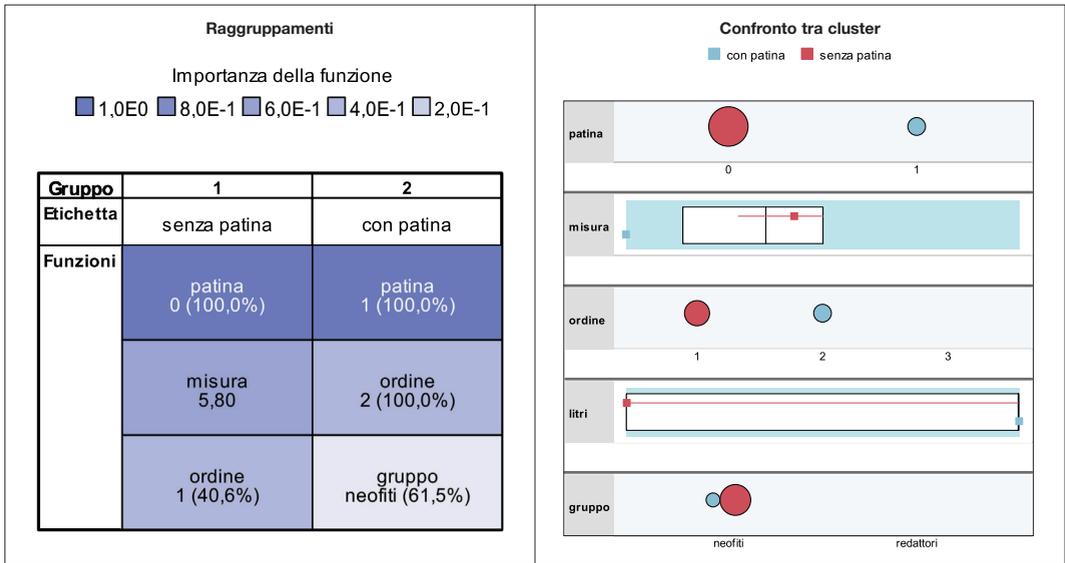
- gruppo di appartenenza del biologo (redattori delle Linee guida piuttosto che non redattori);
- misura (ossia il conteggio occhiometrico delle unità formanti colonia);
- patina (ossia la rilevazione della presenza o meno della formazione di patina);
- ordine delle repliche (1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup>);
- per i soli campionamenti di aria, i volumi d'aria prelevati, espressi in litri (100, 200, 300, 400, 500).

Il risultato, a prescindere che si considerasse la carica batterica, piuttosto che quella fungina od il campionamento di superficie, piuttosto che di aria, è stato univoco, ossia ha decretato che la variabile "gruppo di appartenenza a priori" era fondamentale per

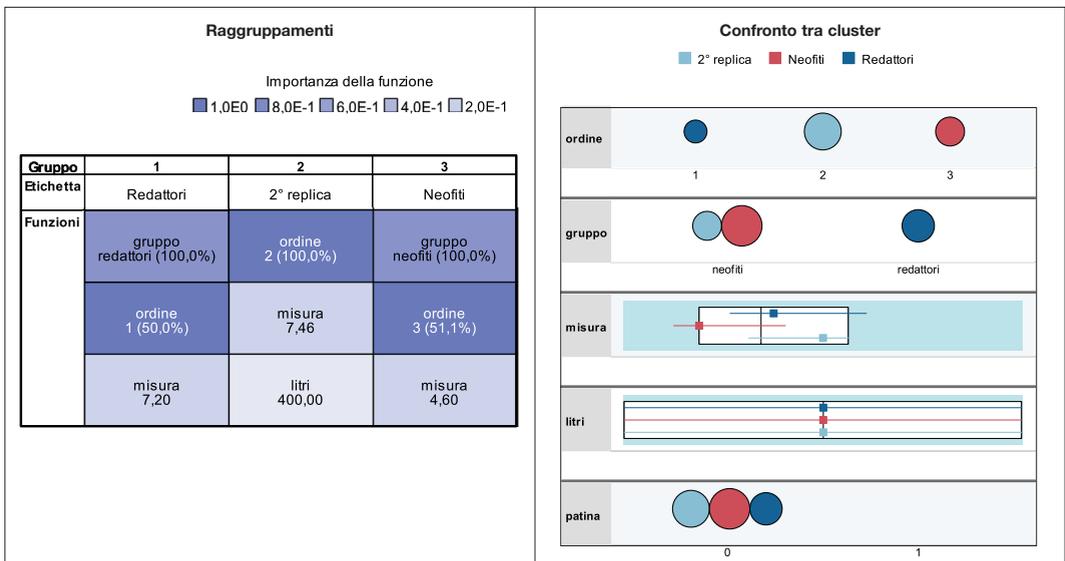
la costituzione dei *cluster* e che la distanza tra questi era fortemente influenzata da 'se e come' veniva rilevata l'incertezza assoluta associata alla dizione "patina". In altri termini, si sono riscontrati problemi di allineamento tra i biologi, sia in termini di quantificazione della misura (conteggi mediamente più bassi per i non redattori, nel caso di colonie batteriche e mediamente più alti in relazione a colonie fungine), sia nella rilevazione della formazione di patina sulla piastra (spesso non rilevata dai non redattori, a fronte di una rilevazione unanime di tutti i redattori), sia nelle modalità di espressione dell'incertezza (come, ad esempio, la dichiarazione, da parte dei non redattori, di una conteggio associato alla dizione 'patina', quando le Linee guida non prevedono il conteggio, a fronte della presenza di quest'ultima). I risultati sono sinteticamente riportati nelle figure che seguono; per dare chiarezza alla loro consultazione, c'è da sottolineare che il colore con cui sono evidenziate le variabili all'interno del box **Raggruppamenti** rappresenta l'importanza che la variabile ha avuto, in termini generali, per la formazione dei raggruppamenti, mentre l'ordine in cui le variabili compaiono al di sotto delle etichette dei singoli gruppi indica, in senso decrescente, l'importanza che esse hanno avuto per la formazione di quello specifico gruppo. Con la dizione "neofiti" sono indicati i biologi "non redattori" delle Linee guida, partecipanti all'intercalibrazione.



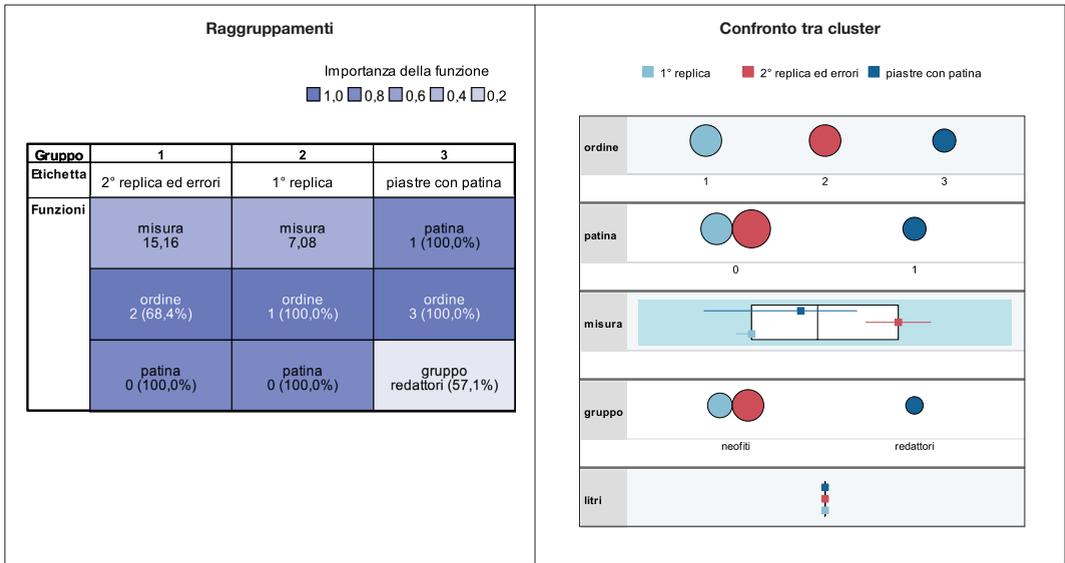
**Figura 1:** Risultati della cluster analysis condotta sulle rilevazioni di carica batterica relativa a campionamenti di superficie e piastra di 55mm.



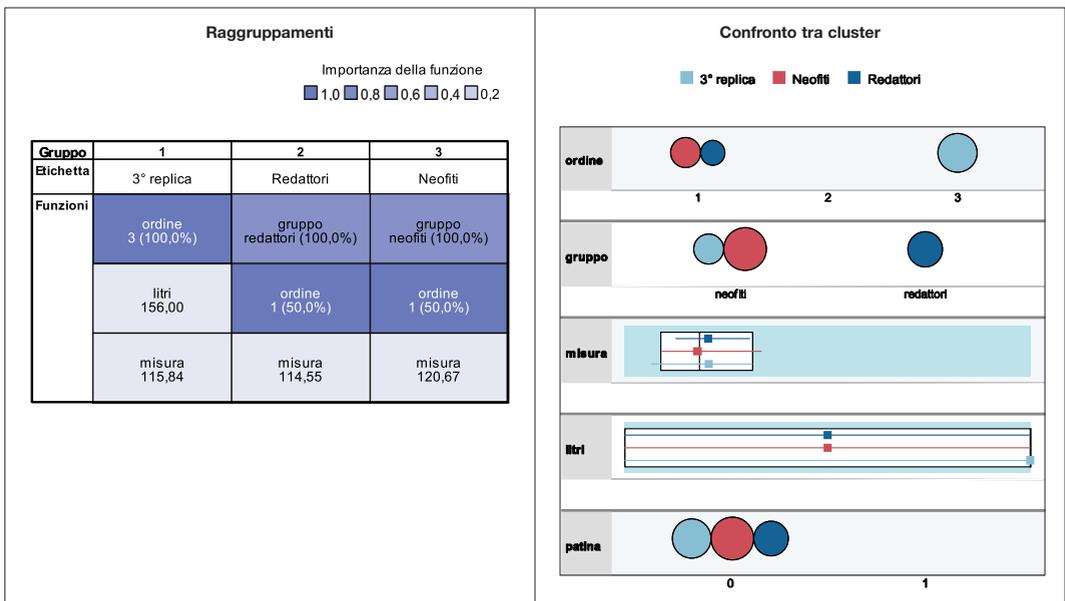
**Figura 2:** Risultati della cluster analysis condotta sulle rilevazioni di carica batterica relativa a campionamenti di aria e piastra di 55mm.



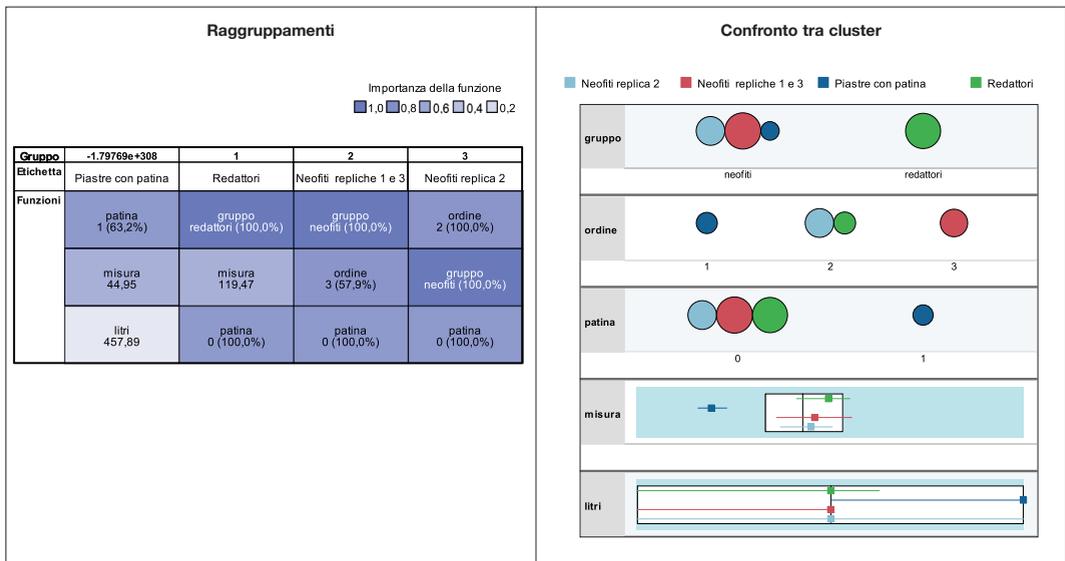
**Figura 3:** Risultati della cluster analysis condotta sulle rilevazioni di carica batterica relativa a campionamenti di aria e piastra di 84mm.



**Figura 4:** Risultati della cluster analysis condotta sulle rilevazioni di carica fungina relativa a campionamenti di superficie e piastra di 55mm.



**Figura 5:** Risultati della cluster analysis condotta sulle rilevazioni di carica fungina relativa a campionamenti di aria e piastra di 55mm.



**Figura 6:** Risultati della cluster analysis condotta sulle rilevazioni di carica fungina relativa a campionamenti di aria e piastra di 84mm.

Questi dati, dando evidenza ad una sostanziale disomogeneità delle rilevazioni, hanno reso assai difficile un'analisi che desse conto della significatività statistica delle distanze tra i conteggi in termini di analisi multivariata, in quanto, essendo troppi i punti di disallineamento da approfondire rispetto al numero delle osservazioni disponibili, in molti casi sono venute meno le condizioni di validità dei modelli a disposizione.

Pur tuttavia è stato possibile effettuare il test t di Student<sup>4</sup> per i conteggi di ogni singola piastra, mettendo a confronto le letture dei redattori con quelle dei non redattori, sia per ciò che concerne la rilevazione di colonie batteriche che per quella di colonie fungine (**Tab. 1** e **Tab. 2**).

<sup>4</sup> È appena il caso di ricordare che il test t di Student è del tutto assimilabile ai risultati di un modello ANOVA univariato ad una via, in cui la variabile indipendente è caratterizzata da due soli livelli.

*Tabella 1: Test t per confrontare, in relazione alla rilevazione di colonie batteriche, la media dei conteggi per piastra effettuati dai redattori con la media dei conteggi per piastra effettuati dai non redattori*

campione			Test di Levene di uguaglianza delle varianze		Test t di uguaglianza delle medie						
			F	Sig.	t	df	Sig. (2-code)	Differenza fra medie	Differenza errore standard	Intervallo di confidenza per la differenza al 95%	
										Inferiore	Superiore
1	misura	Assumi varianze uguali Non assumere varianze uguali	1,858	,200	1,285 1,585	11 8,836	,225 ,148	2,00000 2,00000	1,55651 1,26208	-1,42586 -,86314	5,42586 4,86314
2	misura	Assumi varianze uguali Non assumere varianze uguali	1,088	,319	1,476 1,792	11 9,464	,168 ,105	2,75000 2,75000	1,86322 1,53472	-1,35092 -,69601	6,85092 6,19601
3	misura	Assumi varianze uguali Non assumere varianze uguali	3,202	,101	,416 ,486	11 10,619	,685 ,637	,47500 ,47500	1,14115 ,97683	-2,03665 -1,68444	2,98665 2,63444
4	misura	Assumi varianze uguali Non assumere varianze uguali	2,692	,129	,221 ,279	11 7,873	,829 ,787	,42500 ,42500	1,91927 1,52195	-3,79927 -3,09454	4,64927 3,94454
6	misura	Assumi varianze uguali Non assumere varianze uguali	2,889	,117	,930 1,043	11 10,996	,372 ,319	1,02500 1,02500	1,10163 ,98230	-1,39966 -1,13713	3,44966 3,18713
7	misura	Assumi varianze uguali Non assumere varianze uguali	3,806	,077	2,373 2,871	11 9,590	,037 ,017	4,60000 4,60000	1,93860 1,60223	,33316 1,00921	8,86684 8,19079
8	misura	Assumi varianze uguali Non assumere varianze uguali	,941	,353	-3,523 -3,114	11 5,779	,005 ,022	-6,87500 -6,87500	1,95133 2,20743	-11,16984 -12,32692	-2,58016 -1,42308
9	misura	Assumi varianze uguali Non assumere varianze uguali	,298	,596	-1,363 -1,331	11 7,983	,200 ,220	-1,82500 -1,82500	1,33891 1,37136	-4,77191 -4,98852	1,12191 1,33852
19	misura	Assumi varianze uguali Non assumere varianze uguali	,597	,456	1,253 1,190	11 7,281	,236 ,271	1,65000 1,65000	1,31694 1,38654	-1,24855 -1,60315	4,54855 4,90315
20	misura	Assumi varianze uguali Non assumere varianze uguali	7,465	,019	2,329 2,866	11 8,931	,040 ,019	2,95000 2,95000	1,26662 1,02939	,16220 ,61862	5,73780 5,28138
21	misura	Assumi varianze uguali Non assumere varianze uguali	7,241	,021	1,751 2,041	11 10,860	,108 ,067	1,97500 1,97500	1,12813 ,96765	-,50799 -1,16310	4,45799 4,11310
22	misura	Assumi varianze uguali Non assumere varianze uguali	,180	,679	1,947 2,011	11 9,528	,078 ,073	1,32500 1,32500	,68053 ,65894	-,17284 -1,5313	2,82284 2,80313
23	misura	Assumi varianze uguali Non assumere varianze uguali	,494	,497	2,782 3,014	11 10,640	,018 ,012	3,75000 3,75000	1,34798 1,24427	,78312 1,00002	6,71688 6,49998
24	misura	Assumi varianze uguali Non assumere varianze uguali	,705	,419	2,929 3,193	11 10,741	,014 ,009	4,72500 4,72500	1,61314 1,47983	1,17451 1,45829	8,27549 7,99171
25	misura	Assumi varianze uguali Non assumere varianze uguali	3,145	,104	2,922 3,340	11 10,939	,014 ,007	2,97500 2,97500	1,01799 ,89078	,73442 1,01308	5,21558 4,93692
26	misura	Assumi varianze uguali Non assumere varianze uguali	2,799	,122	1,652 1,909	11 10,814	,127 ,083	1,77500 1,77500	1,07447 ,93001	-,58990 -2,27622	4,13990 3,82622
27	misura	Assumi varianze uguali Non assumere varianze uguali	1,781	,209	2,127 1,949	11 6,475	,057 ,096	3,55000 3,55000	1,66917 1,82120	-,12382 -8,2832	7,22382 7,92832

Come si può immediatamente vedere, per ciò che riguarda le colonie batteriche, per molte piastre i conteggi dei redattori differiscono in media da quelli dei non redattori ed anche le varianze riscontrate sono spesso distanti tra i due gruppi.

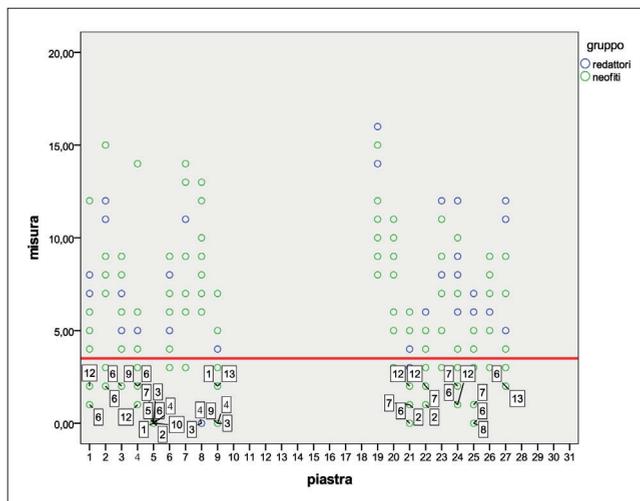
*Tabella 2: Test t per confrontare, in relazione alla rilevazione di colonie fungine, la media dei conteggi per piastra effettuati dai redattori con la media dei conteggi per piastra effettuati dai non redattori*

campione	Test di Levene di uguaglianza delle varianze		Test t di uguaglianza delle medie							
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-code)	Differenza fra medie	Differenza errore standard	Intervallo di confidenza per la differenza al 95%		
								Inferiore	Superiore	
10,00 misura	Assumi varianze uguali	2,526	,140	-,404	11	,694	-9,02500	22,35011	-58,21725	40,16725
	Non assumere varianze uguali			-,518	7,105	,620	-9,02500	17,41737	-50,08774	32,03774
11,00 misura	Assumi varianze uguali	1,631	,230	,190	10	,853	2,65714	13,98896	-28,51221	33,82650
	Non assumere varianze uguali			,222	7,255	,830	2,65714	11,97093	-25,44904	30,76333
12,00 misura	Assumi varianze uguali	3,604	,087	-,572	10	,580	-14,17143	24,79802	-69,42041	41,07755
	Non assumere varianze uguali			-,686	6,021	,519	-14,17143	20,67298	-64,71291	36,37006
13,00 misura	Assumi varianze uguali	3,728	,082	-,362	10	,725	-10,28571	28,40650	-73,57933	53,00790
	Non assumere varianze uguali			-,434	6,073	,679	-10,28571	23,70967	-68,13277	47,56134
14,00 misura	Assumi varianze uguali	,776	,397	-,345	11	,737	-7,70000	22,33670	-56,86275	41,46275
	Non assumere varianze uguali			-,412	10,006	,689	-7,70000	18,68548	-49,33019	33,33019
15,00 misura	Assumi varianze uguali	2,749	,126	-,340	11	,741	-7,60000	22,37529	-56,84768	41,64768
	Non assumere varianze uguali			-,434	7,303	,677	-7,60000	17,51599	-48,67278	33,47278
16,00 misura	Assumi varianze uguali	1,123	,312	,650	11	,529	,52500	,80760	-1,25251	2,30251
	Non assumere varianze uguali			,798	9,026	,445	,52500	,65785	-,96252	2,01252
17,00 misura	Assumi varianze uguali	1,891	,197	1,060	11	,312	2,37500	2,24032	-2,55591	7,30591
	Non assumere varianze uguali			1,309	8,777	,224	2,37500	1,81401	-1,74450	6,49450
18,00 misura	Assumi varianze uguali	,086	,775	-,249	11	,808	-,82500	3,30934	-8,10882	6,45882
	Non assumere varianze uguali			-,239	7,511	,818	-,82500	3,45201	-8,87643	7,22643
28,00 misura	Assumi varianze uguali	2,295	,158	,393	11	,702	11,87500	30,21263	-54,62255	78,37255
	Non assumere varianze uguali			,505	7,018	,629	11,87500	23,49775	-43,65985	67,40985
29,00 misura	Assumi varianze uguali	1,311	,277	-,1,103	11	,294	-29,50000	26,75164	-88,37995	29,37995
	Non assumere varianze uguali			-,961	5,533	,377	-29,50000	30,70354	-106,19417	47,19417
30,00 misura	Assumi varianze uguali	1,496	,247	-,267	11	,794	-5,87500	21,99015	-54,27500	42,52500
	Non assumere varianze uguali			-,337	7,878	,745	-5,87500	17,44014	-46,20051	34,45051
31,00 misura	Assumi varianze uguali	1,177	,301	,118	11	,908	1,77500	14,98196	-31,20006	34,75006
	Non assumere varianze uguali			,144	9,399	,888	1,77500	12,31958	-25,91443	29,46443
32,00 misura	Assumi varianze uguali	,419	,531	,316	11	,758	4,27500	13,53018	-25,50473	34,05473
	Non assumere varianze uguali			,370	10,563	,719	4,27500	11,55162	-21,27901	29,82901
33,00 misura	Assumi varianze uguali	,064	,778	1,180	11	,263	9,90000	8,39123	-8,56897	28,36897
	Non assumere varianze uguali			1,267	10,477	,233	9,90000	7,81318	-7,40202	27,20202
34,00 misura	Assumi varianze uguali	4,042	,070	,265	11	,796	2,02500	7,82740	-14,76279	18,81279
	Non assumere varianze uguali			,329	8,606	,750	2,02500	6,15113	-11,98743	16,03743
35,00 misura	Assumi varianze uguali	3,527	,087	1,238	11	,241	9,32500	7,53111	-7,25087	25,90087
	Non assumere varianze uguali			1,534	8,638	,161	9,32500	6,07794	-4,51266	23,16266
36,00 misura	Assumi varianze uguali	2,212	,165	-,1,061	11	,311	-19,65000	18,51186	-60,39432	21,09432
	Non assumere varianze uguali			-,907	5,224	,404	-19,65000	21,66962	-74,64176	35,34176

La situazione è certamente migliore in relazione ai conteggi relativi alle colonie fungine, per le quali i conteggi dei due gruppi sono risultati uguali in media, permanendo però una certa distanza tra le varianze.

Collegati a questi risultati principali vi sono spunti ed osservazioni che si sono rivelati utili sia a soddisfare il carattere esplorativo di questa prima analisi che ad impostare il disegno d'analisi successivo; in particolare, le operazioni di *clustering* ed i successivi test hanno evidenziato che:

- la variabilità tra le repliche, come ci aspettava, incide in modo importante sulla variabilità della misura, ma non costituisce un elemento di separazione tra i due gruppi posti a confronto;
- i litri d'aria prelevati influiscono sulla formazione dei *cluster*; pertanto tale variabile, al fine di ben individuare le differenze di conteggio tra redattori e non redattori, è da considerarsi come elemento di partizionamento *ex ante* e non come variabile di modello;
- la maggiore variabilità delle misure effettuate dal gruppo dei non redattori ha suggerito un approfondimento d'indagine che, tramite una semplice analisi grafica (**Fig. 7**), ha portato a concludere che le distanze riscontrate tra i due gruppi sono in buona sostanza dovute all'effetto di un sottogruppo del gruppo dei non redattori, che fornisce conteggi costantemente inferiori a quelli di tutti gli altri. L'ipotesi è, quindi, che vi siano processi non sottoposti a rilevazione (ad esempio, la stanchezza del biologo con il progredire del numero di letture effettuate; eventuali processi di crescita delle colonie da conteggiare, nel periodo che copre la durata del circuito, con conseguente disallineamento delle letture; l'utilizzo o meno di strumenti correttivi per la vista da parte del biologo, etc.) che possano porsi in correlazione con la distanza tra redattori e non redattori.



**Figura 7:** Grafico a dispersione delle misure per piastra distinte per gruppi (le etichette riportano l'identificativo associato al biologo che ha effettuato la misurazione)

Per fornire, infine, una misura dell'entità della variabilità dei conteggi per piastra, prescindere dal gruppo di appartenenza dei biologi, sono stati calcolati i coefficienti di variazione per piastra; il risultato ha evidenziato una dispersione maggiore dei dati per i campioni batterici, in corrispondenza di bassi livelli di crescita microbica ( $CV\% > 30$ ) ed una dispersione minore ( $CV\% < 30$ ) per i campioni fungini, i cui livelli di crescita sono stati mediamente più alti rispetto a quelli batterici.

In generale, i livelli di disomogeneità delle rilevazioni sono sinteticamente ben fotografati dalla tabella seguente:

N. piastre (TOT. 33)*	CV% (DevStd*100/M)
4	>50
10	30-49
19	<30
<i>* 3 di 36 piastre hanno sviluppato patina</i>	

dalla quale si evince con chiarezza che l'indice di variabilità è superiore al 30% in 14 casi su 33 (in 4 casi addirittura oltre il 50%), risultato ancora lontano dagli standard di qualità desiderati.

### **Seconda intercalibrazione**

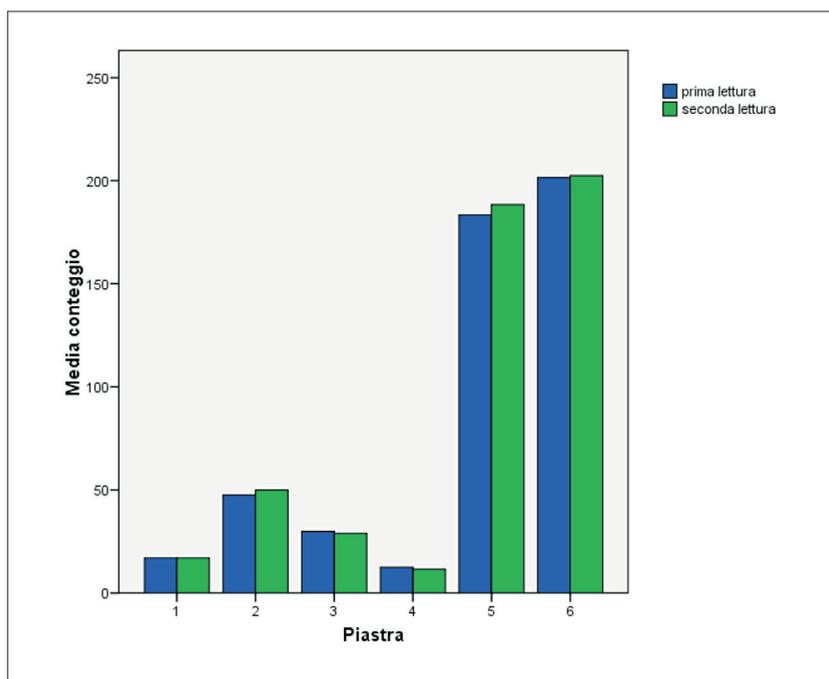
Alla luce delle evidenze generate dallo svolgimento e dall'analisi dei dati della prima intercalibrazione, nel secondo ciclo il disegno progettuale è stato arricchito e modificato in modo tale da recepire, all'interno del protocollo di analisi, gli *input* necessari alla verifica delle ipotesi scaturite dalle suddette evidenze; in particolare è stato concordato:

- di effettuare in via preliminare un'esercitazione di gruppo pre-intercalibrazione, consistente nella lettura comune di alcune piastre, guidata dai redattori delle Linee guida partecipanti all'attività;
- di richiedere, ad ognuno dei partecipanti, la registrazione degli orari di lettura delle piastre e l'eventuale utilizzo di strumenti correttivi della vista;
- di effettuare un'attività di monitoraggio delle piastre, a cura dei redattori delle Linee guida, mediante 'letture di controllo', ossia riconteggiando, al termine dell'intercalibrazione, il numero di colonie cresciute nei campioni di prova preparati per lo svolgimento del circuito;
- di provvedere, ad intervalli di tempo regolari, alla registrazione dei valori di temperatura e umidità relativa dell'aria sotto la cappa di sicurezza biologica in cui

erano stoccati i campioni di prova, durante le letture; questo, ovviamente, con lo scopo di individuare variazioni significative di tali parametri e, quindi, di valutare il loro effetto sulle eventuali anomalie di riconteggio evidenziate dall'attività di monitoraggio di cui al punto precedente;

- di partizionare le rilevazioni per tipo di campionamento (di aria piuttosto che di superficie) e, nel caso di campionamenti di aria, per volumi d'aria prelevati, espressi in litri (100, 200, 300, 400, 500).

In conseguenza della nuova impostazione, in fase di *pre-processing* dei dati, si è provveduto a verificare la stabilità dei campioni durante la durata del circuito; il confronto tra le letture iniziali e le 'letture di controllo', come si evince immediatamente anche dalla visualizzazione grafica dei valori medi dei conteggi (**Fig. 8**), non ha evidenziato differenze significative tra le letture di medesimi campioni effettuate ad inizio e fine lavori; per le due serie di valori, infatti, è stata verificata, tramite il test t, l'uguaglianza in media ad un livello di significatività del 5%.



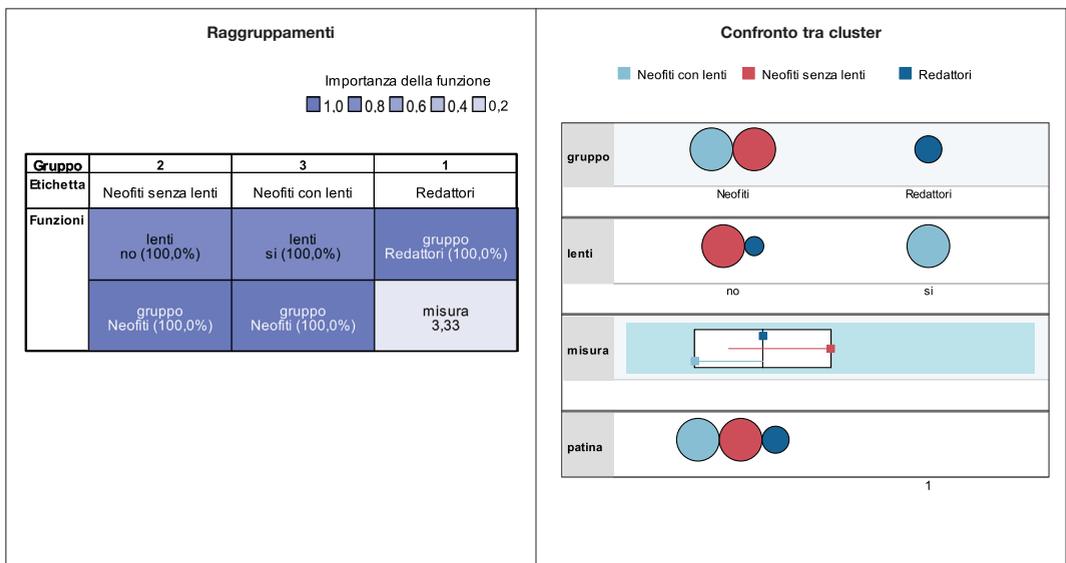
**Figura 8:** Media dei conteggi distinti per ordine di lettura, per i campioni della seconda intercalibrazione sottoposti a lettura di controllo da parte dei 'redattori'

Questo dato ha confortato l'ipotesi che, vigendo le normali condizioni ambientali di laboratorio (attestate da variazioni non significative di temperatura ed umidità), il numero delle colonie non subisce modifiche nell'arco della durata dell'intercalibrazione. Avendo riguardo delle conclusioni appena esposte ed in riferimento al nuovo partizionamento dei dati, è stata dunque avviata la fase di *clustering*, con attenzione alle seguenti variabili:

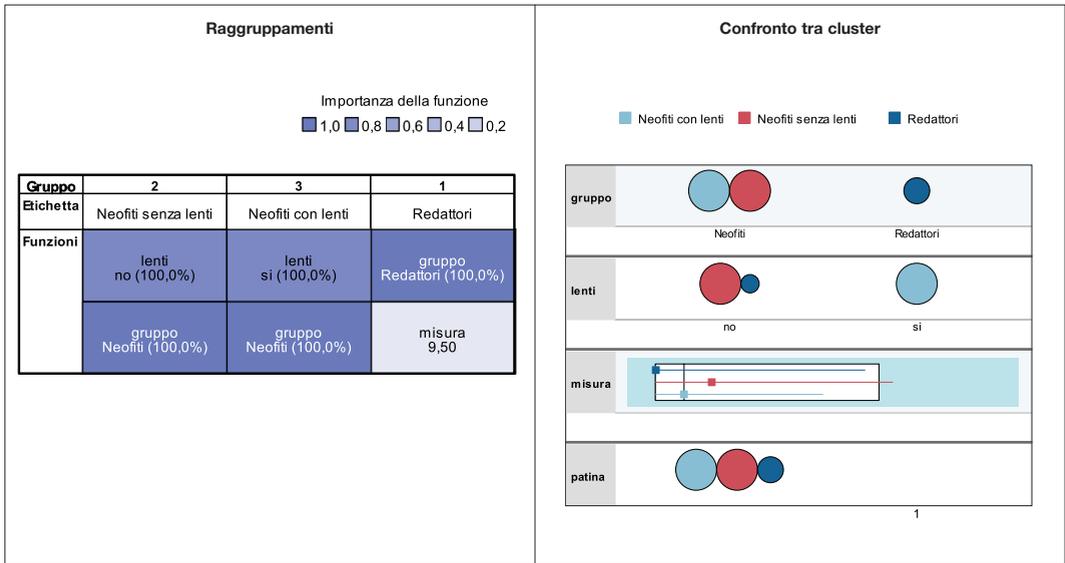
- gruppo di appartenenza del biologo (redattori piuttosto che non redattori);
- misura (ossia il conteggio "occhiometrico" delle unità formanti colonia);
- patina (ossia la rilevazione della presenza o meno della formazione di patina);
- ordine delle repliche (1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup>);
- lenti (*flag* di assenza-presenza di strumenti correttivi per la vista).

ossia introducendo, rispetto all'esperienza precedente, la nuova informazione in merito all'utilizzo o meno di strumenti correttivi per la vista.

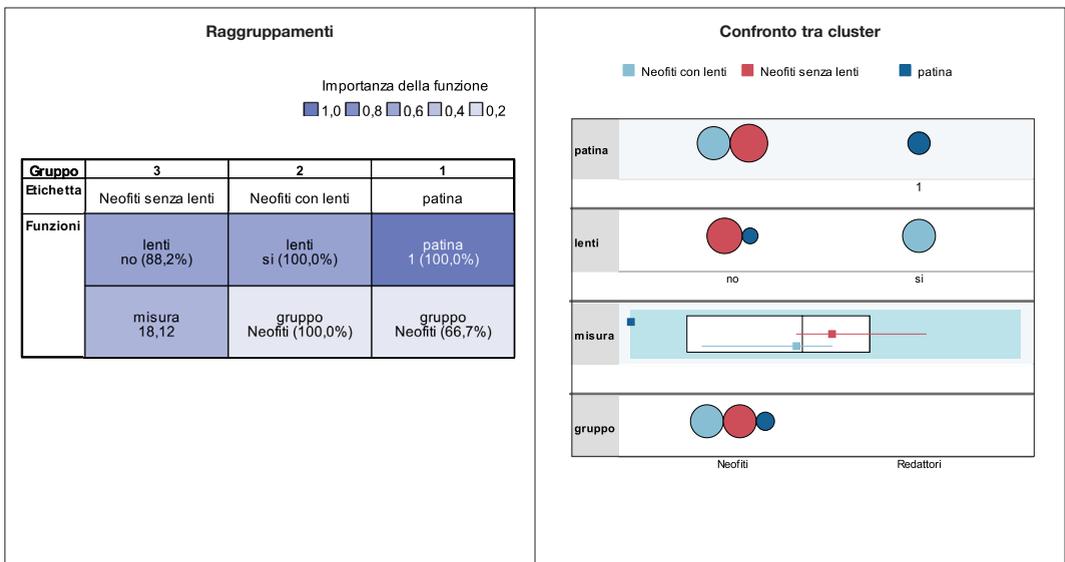
Il risultato ottenuto è stato particolarmente interessante, in quanto la procedura ha portato sempre alla costituzione di tre *cluster*, di cui uno formato dalle sole rilevazioni dei redattori e gli altri due dalle sole rilevazioni dei non redattori, questi ultimi distinti fra di loro in base all'utilizzo o meno di strumenti di correzione della vista (**Figg. 9-10-11-12-13-14-15-16-17-18-19-20**).



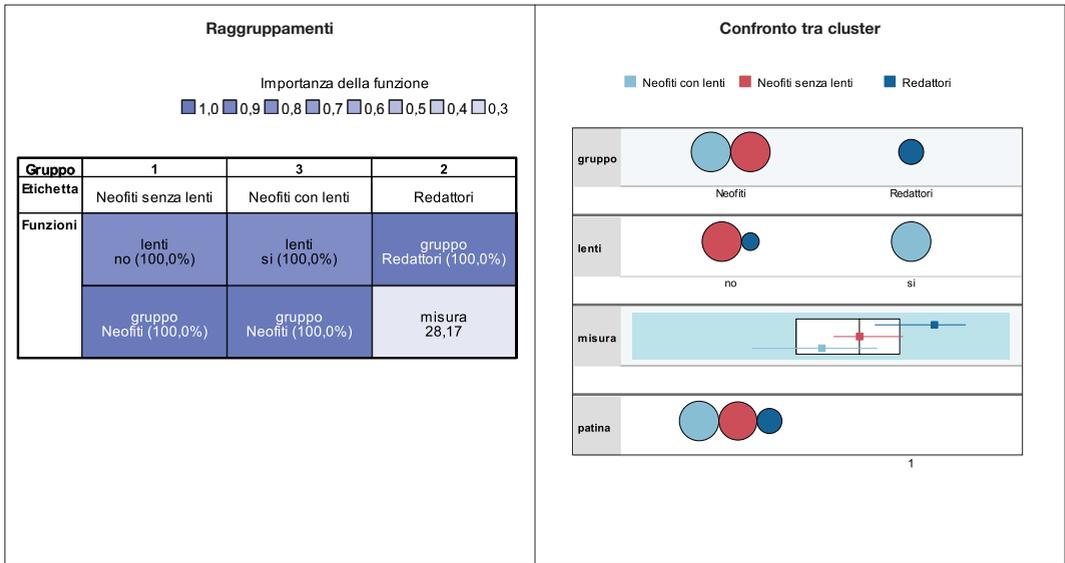
**Figura 9:** Risultati della cluster analysis condotta sulle rilevazioni di carica batterica relativa a campionamenti di superficie.



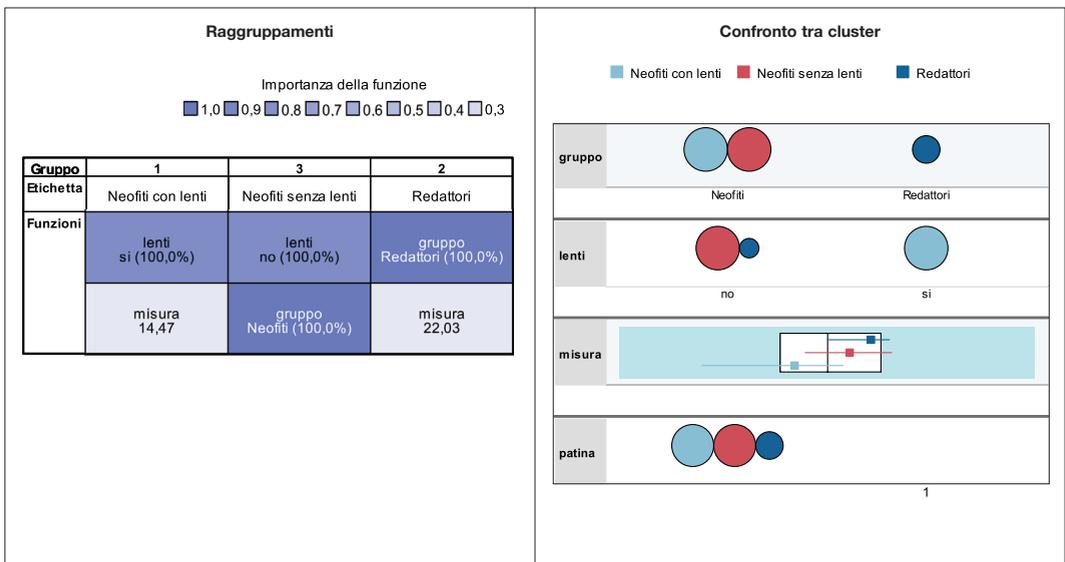
**Figura 10:** Risultati della cluster analysis condotta sulle rilevazioni di carica batterica relativa a campionamenti di aria e volume prelevato pari a 100 litri.



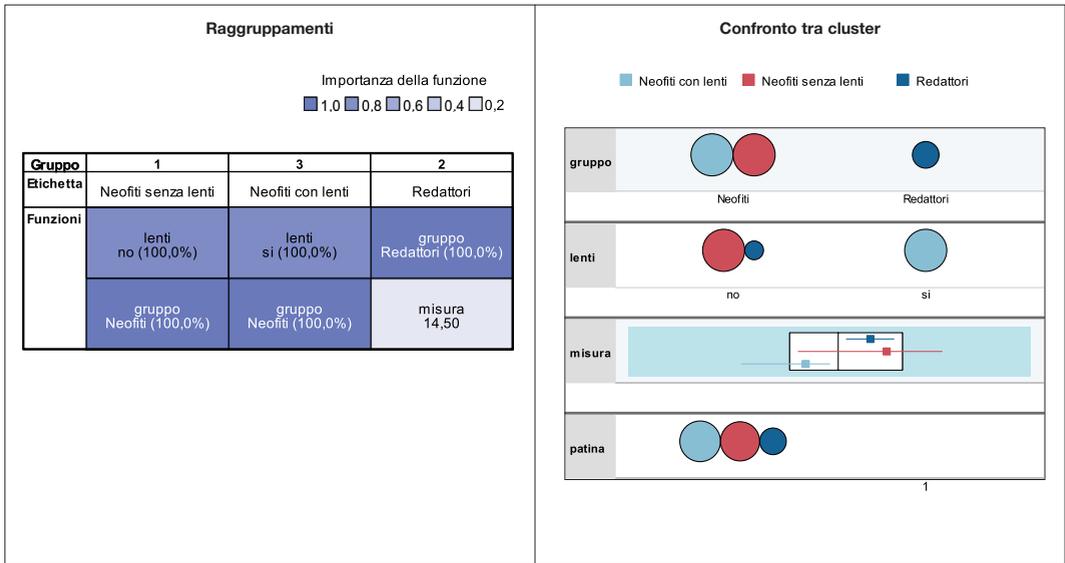
**Figura 11:** Risultati della cluster analysis condotta sulle rilevazioni di carica batterica relativa a campionamenti di aria e volume prelevato pari a 200 litri.



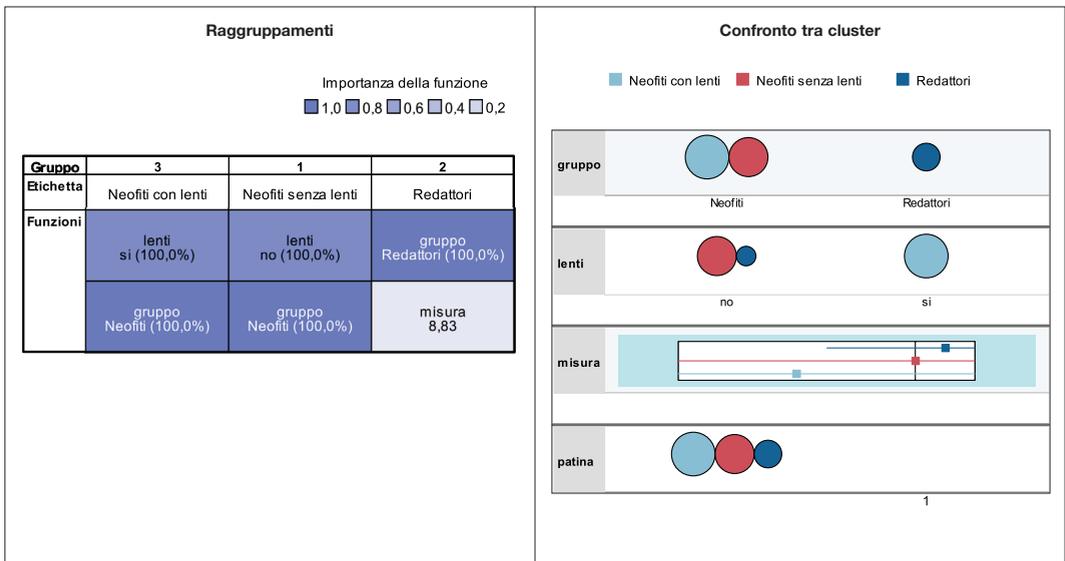
**Figura 12:** Risultati della cluster analysis condotta sulle rilevazioni di carica batterica relativa a campionamenti di aria e volume prelevato pari a 300 litri.



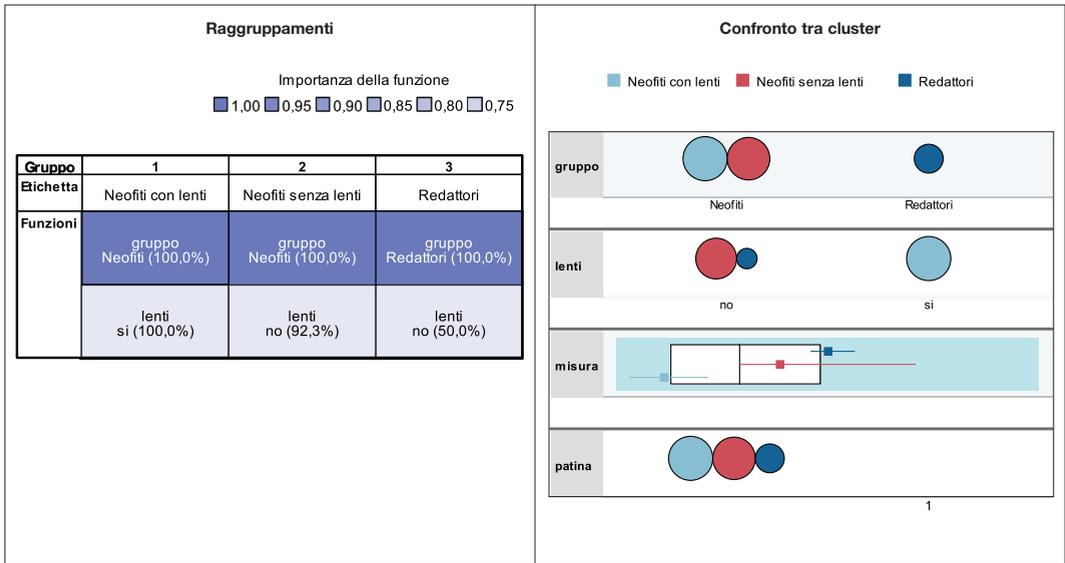
**Figura 13:** Risultati della cluster analysis condotta sulle rilevazioni di carica batterica relativa a campionamenti di aria e volume prelevato pari a 400 litri.



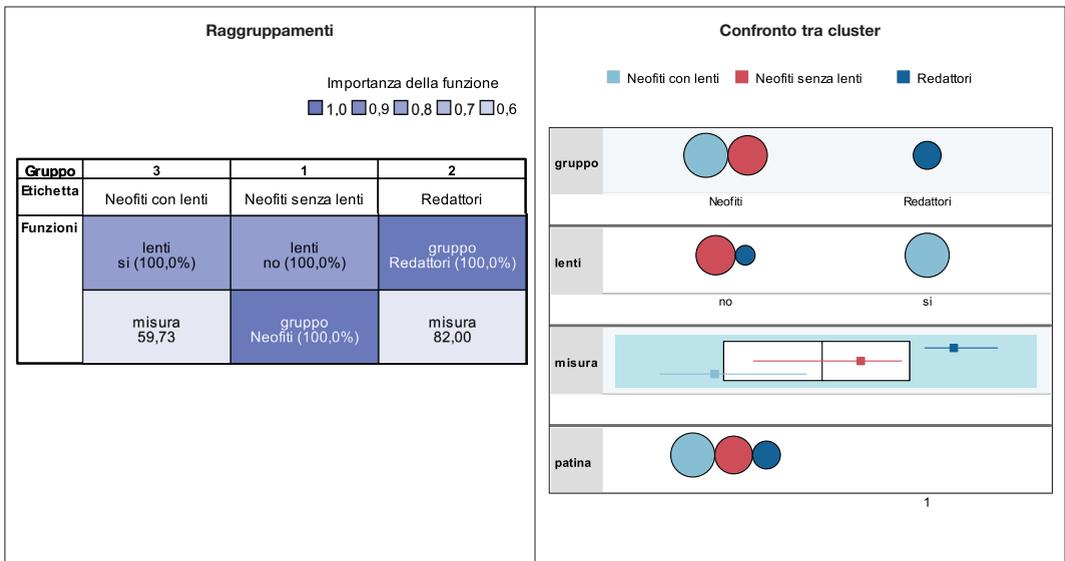
**Figura 14:** Risultati della cluster analysis condotta sulle rilevazioni di carica batterica relativa a campionamenti di aria e volume prelevato pari a 500 litri.



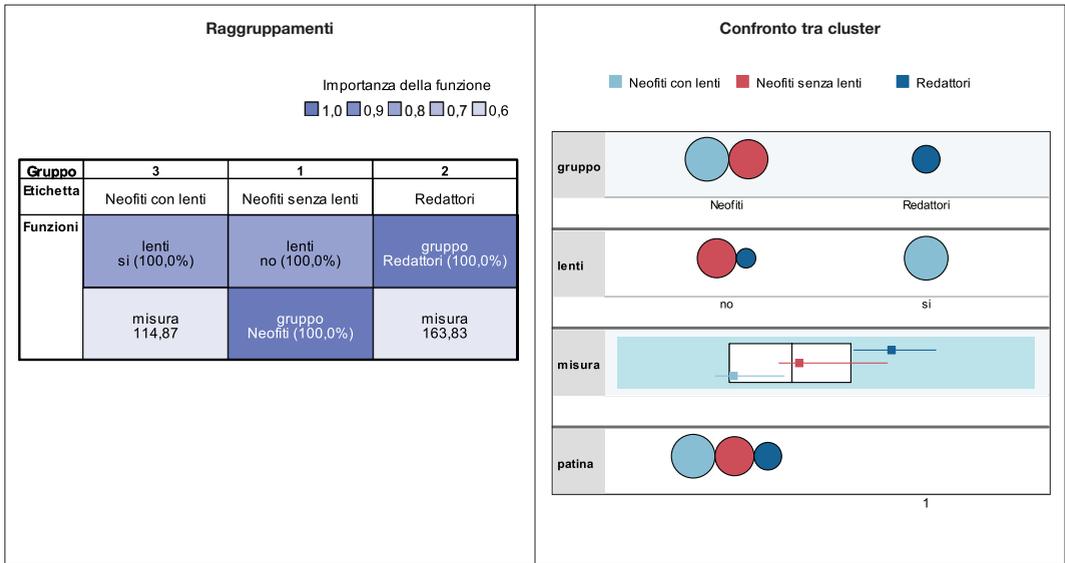
**Figura 15:** Risultati della cluster analysis condotta sulle rilevazioni di carica fungina relativa a campionamenti di superficie.



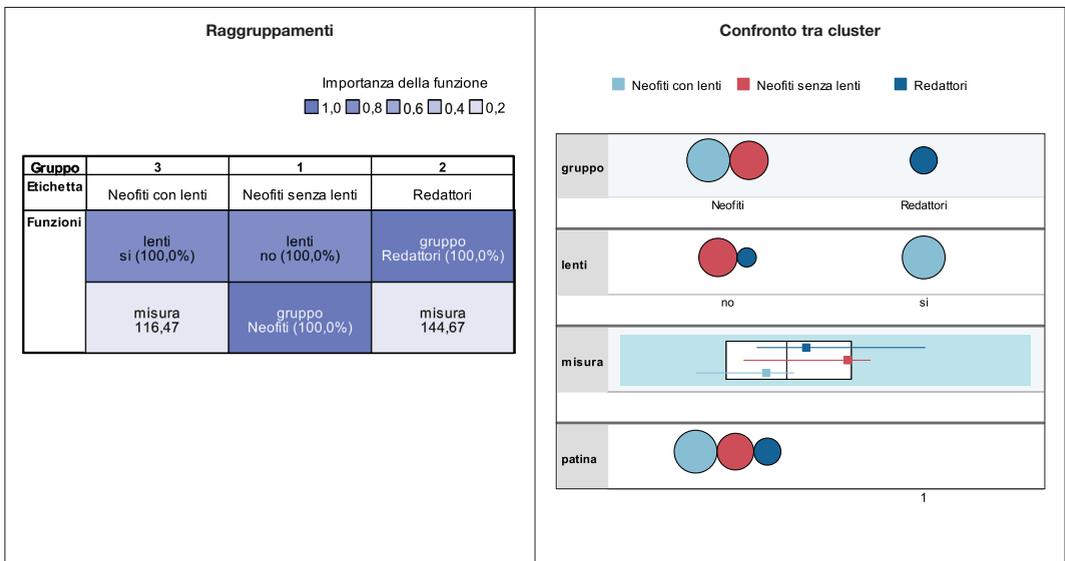
**Figura 16:** Risultati della cluster analysis condotta sulle rilevazioni di carica fungina relativa a campionamenti di aria e volume prelevato pari a 100 litri.



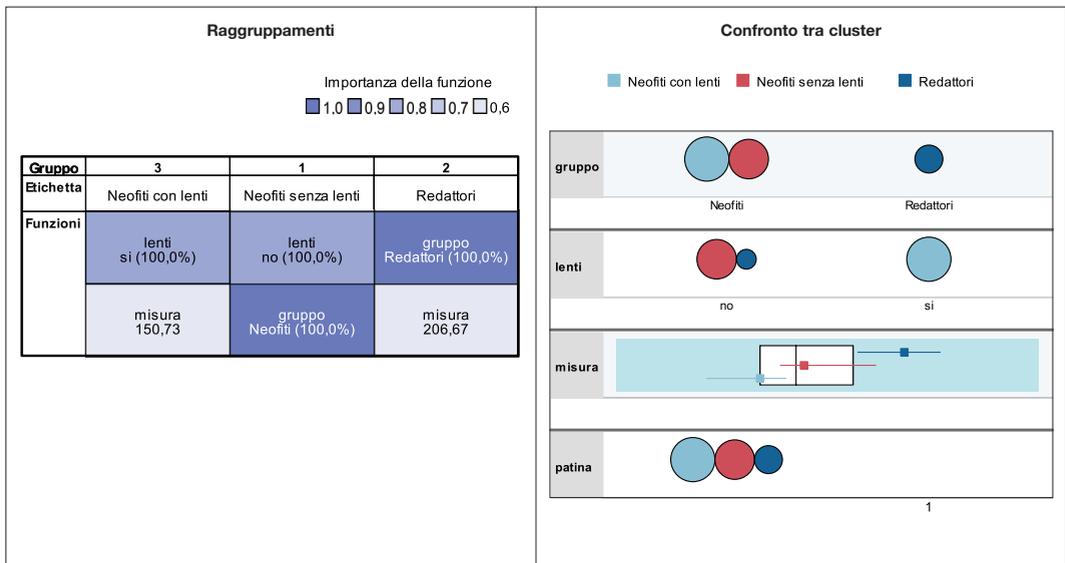
**Figura 17:** Risultati della cluster analysis condotta sulle rilevazioni di carica fungina relativa a campionamenti di aria e volume prelevato pari a 200 litri.



**Figura 18:** Risultati della cluster analysis condotta sulle rilevazioni di carica fungina relativa a campionamenti di aria e volume prelevato pari a 300 litri.



**Figura 19:** Risultati della cluster analysis condotta sulle rilevazioni di carica fungina relativa a campionamenti di aria e volume prelevato pari a 400 litri.

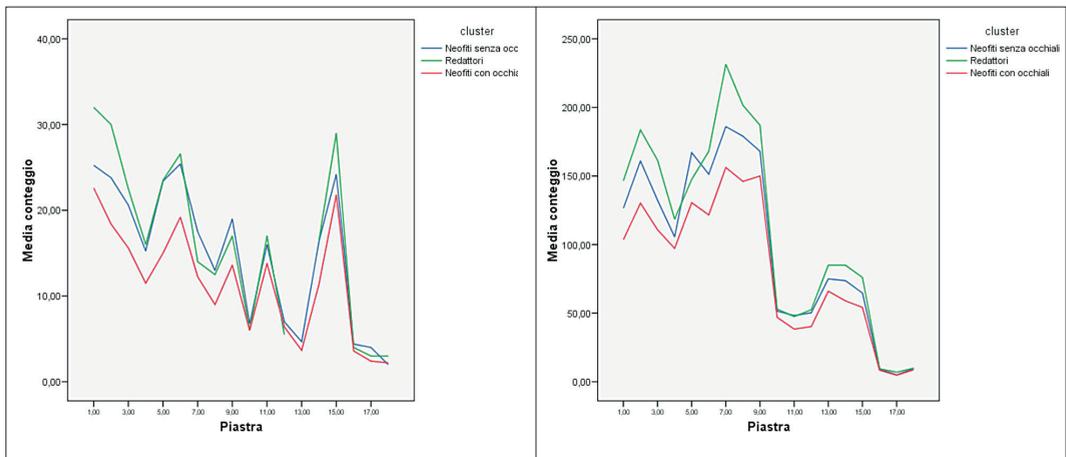


**Figura 20:** Risultati della cluster analysis condotta sulle rilevazioni di carica fungina relativa a campionamenti di aria e volume prelevato pari a 500 litri.

Più in particolare, rispetto all'intercalibrazione precedente, si è constatato che:

- è stata confermata una certa distanza, in termini di conteggio, tra i redattori ed i non redattori;
- si è aggiunta la constatazione che il fattore relativo all'utilizzo o meno di strumenti correttivi della vista risulta rilevante;
- non si sono più osservate distanze dovute alla rilevazione della formazione di patina ed alle modalità di dichiarazione della medesima.

L'analisi grafica (**Fig. 21**) suggerisce, poi, almeno due considerazioni: la prima riguarda il fatto che la distanza sembra essere più significativa tra i non redattori che usano strumenti correttivi della vista ed i redattori, piuttosto che tra quest'ultimi ed i non redattori che non hanno bisogno di tali strumenti; la seconda è che la tendenza media delle letture dei distinti *cluster*, se non è identica, è quantomeno molto simile.



**Figura 21:** Media dei conteggi di colonie batteriche (sinistra) e fungine (destra), distinti per cluster, relativi alla seconda intercalibrazione.

Per verificare la significatività della distanza tra i *cluster* in termini di conteggio è stato specificato un modello ANCOVA individuando il *cluster* come 'fattore' e l'ora di lettura come 'variabile correlata' (covariata) applicato distintamente per tipo di campionamento e per quantità di volumi aspirati.

Il modello non ha avuto problemi di rispetto dei vincoli sopra menzionati per volumi d'aria a partire dai 300 litri, mentre, per i campionamenti di superficie e per volumi d'aria sotto i 300 litri, in qualche occasione l'ipotesi di normalità è stata accettata sul limite di significatività (5%). Questa constatazione è connessa con l'estrema variabilità di conteggio tra le differenti repliche (peraltro crescente al decrescere dei volumi d'aria aspirati).

Per quel che, invece, concerne i risultati del modello, in generale è stato constatato che il *cluster* di appartenenza non aveva rilevanza nella lettura delle piastre relative a campionamenti di superficie, mentre assumeva significatività per quel che concerne i campionamenti di aria: per le colonie fungine sempre, per quelle batteriche a partire dai 300 litri di aria prelevata. L'analisi dei contrasti ha poi rivelato che il *cluster* a cui ascrivere questo risultato è soprattutto quello dei non redattori che utilizzano strumenti di correzione visiva, in quanto, tra redattori e non redattori che non utilizzano strumenti di correzione visiva, la significatività della distanza non è quasi mai netta e, in alcuni casi, per nulla rilevante.

In termini di varianza, il modello ritorna dei dati assai interessanti: infatti, ci dice che il *cluster* di appartenenza spiega tra il 20% (per le colonie batteriche) ed il 40% (per le colonie fungine) della varianza osservata.

Infine, non vi è stata alcuna evidenza statistica che la covariata "ora di rilevazione" abbia effetti rilevanti sul conteggio delle colonie.

Le risposte del modello, in concomitanza con la precedente osservazione sulla similarità degli andamenti tendenziali dei conteggi relativi ad ogni singolo *cluster*, hanno portato a concludere che le differenze di conteggio erano da imputare non tanto ad una diversa modalità di misurazione, quanto ad un problema di taratura e di sensibilità dello strumento di misurazione.

In conclusione, si è potuto quindi affermare che il processo di acquisizione delle Linee guida fosse da considerarsi pressoché terminato; infatti, benché in alcuni casi si sia constatato il permanere di differenze statisticamente significative di misurazione, esse sono state comunque ascritte alla necessità di un maggiore consolidamento d'esperienza, soprattutto per chi fa uso di strumenti correttivi della vista.

In questa seconda intercalibrazione è stato predisposto anche un modello ANOVA per verificare l'ipotesi che la misura non fosse influenzata dall'interazione tra il *cluster* di appartenenza e la variabilità delle repliche; il modello in questione è stato implementato sia con attenzione ai tre *cluster* di *output* della procedura di *two step clustering*, sia accorpando in un solo *cluster* il gruppo dei redattori con quello dei non redattori senza lenti. In entrambi i casi l'interazione non è risultata significativa.

Il miglioramento, in termini di qualità dei risultati, è immediatamente percepibile dai coefficienti di variazione, riportati nella seguente tabella:

N. piastre (TOT. 35)*	CV% (DevStd*100/M)
0	>44
9	31-44
7	21-30
19	<20
* 1 di 36 piastre ha sviluppato patina	

Come infatti si può notare, solamente in 9 casi su 35 il coefficiente di variazione è superiore al 30% ed in nessun caso supera il 45%.

### **Terza intercalibrazione**

Per lo svolgimento dei lavori della terza intercalibrazione non sono state apportate particolari variazioni allo schema predisposto per il circuito precedente; l'unica differenza ha riguardato il fatto che, contrariamente alle volte precedenti, si è ritenuto opportuno suddividere l'attività in due sessioni, separate nel tempo - una per la let-

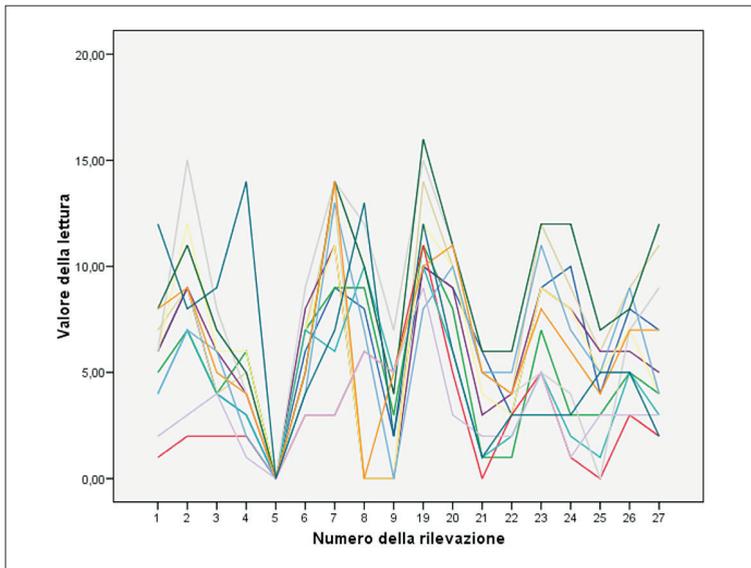
tura dei campioni batterici e una per la lettura di quelli fungini - con lo scopo di minimizzare gli effetti della stanchezza visiva.

I risultati proposti sia dalle operazioni di *clustering* che dalle analisi della varianza non hanno evidenziato alcuna distanza statisticamente rilevabile tra i conteggi dei biologi partecipanti.

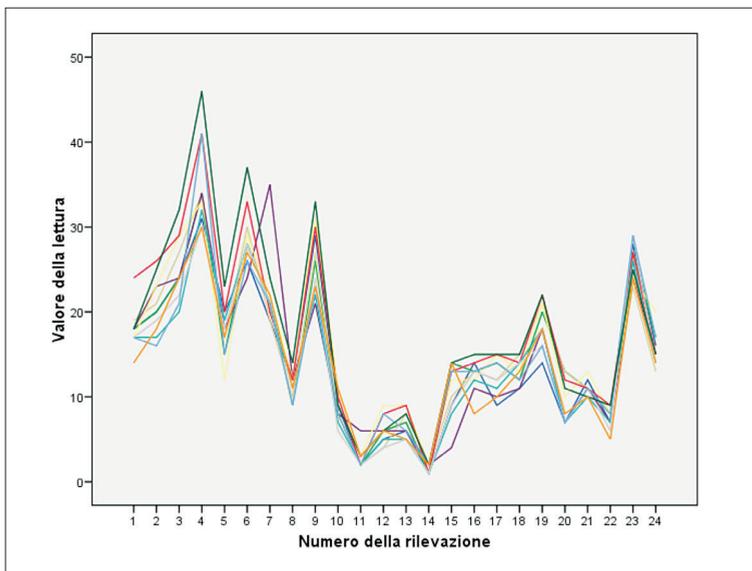
I risultati hanno, perciò, dimostrato inequivocabilmente come dalla prima esperienza caratterizzata da pronunciata disomogeneità, sia in termini di misura che di esposizione formale della misura medesima, si sia raggiunta una situazione finale in cui non è percepibile alcuna significativa differenza tra i conteggi effettuati dai partecipanti all'intercalibrazione.

La realtà di quanto appena affermato è immediatamente percepibile confrontando tra loro i grafici relativi ai conteggi di colonie batteriche del primo e del terzo circuito (**Fig. 22 e 23**), riportati a titolo puramente esemplificativo, per dare conto della quantità e della qualità del lavoro svolto e visualizzare il percorso di allineamento delle letture, con il progredire delle esperienze condotte.

Da questi grafici, infatti, si evince con chiarezza la sostanziale differenza di allineamento nella lettura, che caratterizza la prima intercalibrazione, opposta alla similarità che, viceversa, contraddistingue la terza.



**Figura 22:** Valori per piastra-campione dei conteggi di colonie batteriche, distinti per biologo, per la prima intercalibrazione



**Figura 23:** Valori per piastra dei conteggi di colonie batteriche, distinti per biologo, per la terza intercalibrazione

Quanto appena affermato è, peraltro, corroborato dalle tabelle sintetiche relative ai coefficienti di variazione, dove i risultati vengono suddivisi per carica rilevata, per dare il giusto risalto al fatto che, in relazione ai conteggi fungini, non si superi mai il valore del 12%:

#### Conteggi batterici

N. piastre PCA (TOT. 24)	CV% (DevStd*100/M)
2	>30
4	20-30
18	<20

#### Conteggi fungini

N. piastre SAB (TOT. 24)*	CV% (DevStd*100/M)
23	>12
* 1 di 24 piastre ha sviluppato patina	

In ogni caso, in termini più generali, si vede chiaramente come vi sono solo 2 piastre per cui viene superata la soglia del 30%.



# **PROPOSTA DI PERCORSO STANDARD PER LA QUALIFICAZIONE DEL PERSONALE ALL'ESECUZIONE DI CONTEGGI SU PIASTRA**

Come già evidenziato nelle pagine precedenti, la qualità di una misura si basa sul controllo dei fattori che possono essere fonte di variabilità.

Tali fattori sono riconducibili ad aspetti:

- tecnici;
- legati al fattore umano.

Il problema del controllo degli aspetti tecnici è stato affrontato negli anni dalla CONTARP attraverso un percorso di condivisione e standardizzazione di procedure e metodologie di lavoro, culminato con la stesura delle "Linee guida per il monitoraggio microbiologico degli ambienti di lavoro".

Per controllare, invece, il contributo alla variabilità legato al fattore umano, è stato sperimentato un protocollo di addestramento e di controllo periodico del mantenimento, nel tempo, delle prestazioni del personale tecnico CONTARP per l'attività di monitoraggio microbiologico ambientale.

Il protocollo è stato descritto nel capitolo precedente: come primo obiettivo, si è mirato alla qualificazione del personale alla lettura delle piastre per l'armonizzazione dei conteggi e dell'espressione dei risultati analitici.

## **L'esperienza di intercalibrazione della CONTARP**

Per evidenziare le componenti di variabilità delle letture da sottoporre a controllo e allineare tra loro le letture stesse, si è fatto ricorso a modelli statistici di analisi multivariata, applicati ai risultati dei conteggi.

I dati ottenuti dopo tre cicli di intercalibrazione hanno dimostrato il passaggio da una fase iniziale di evidente disomogeneità ad una situazione finale in cui non è percepibile alcuna significativa differenza tra i conteggi effettuati dai partecipanti al circuito. Ciò ha dato prova dell'opportunità e dell'importanza della messa a punto di un percorso di addestramento di questo tipo.

## **La qualificazione del personale alla luce della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005**

Analizzando quanto previsto dalla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 in riferimento alla qualificazione del personale, è di interesse verificare i 'requisiti' a tutt'oggi com-

piutamente recepiti dalla CONTARP attraverso l'esperienza di intercalibrazione e quanto possa essere spunto di miglioramento per l'attività futura.

Secondo tale norma, la 'competenza' ad effettuare le analisi deve essere garantita da un adeguato percorso formativo: il personale deve essere qualificato sulla base di appropriata "istruzione, formazione, addestramento, esperienza e/o comprovata abilità" (verifica della *performance*).

Ciò impone l'individuazione di requisiti in riferimento ai singoli aspetti indicati dalla norma, al cui rispetto consegue l'autorizzazione del singolo a eseguire campionamenti e prove (punto 5.2.5 della norma).

Le registrazioni attestanti il possesso dei requisiti da parte dei singoli autorizzati devono essere tenute aggiornate e disponibili, a garanzia del mantenimento della qualifica. Dovendo tradurre nella pratica i concetti espressi nella norma, come 'istruzione' si possono intendere il/i titolo/i di studio posseduti dal personale che esegue le prove; come 'formazione', l'istruzione specifica attinente all'ambito in cui si colloca l'attività di prova (corsi di formazione); come 'addestramento', lo svolgimento pianificato dell'attività di prova in esame sotto la guida e la supervisione di persona già qualificata (*tutor*); come 'esperienza', l'attività lavorativa svolta in campo affine a quello di interesse.

La qualificazione all'esecuzione dell'attività di prova richiede il rispetto del requisito, mentre il mantenimento della qualifica richiede la continuità nell'attività e il rispetto della *performance*.

Analizzando il percorso di intercalibrazione seguito dalla CONTARP, è evidente che, sull'attività di lettura delle piastre (conteggi microbici), i punti fondamentali sopra citati hanno avuto riscontro: la selezione del personale impegnato nell'attività (biologi dell'INAIL abilitati all'esercizio della professione) ha garantito un requisito omogeneo di base riguardo al titolo di studio e i cicli di intercalibrazione condotti sotto la guida di un gruppo esperto (gli estensori delle Linee guida) hanno garantito l'addestramento e la verifica della *performance* tramite anche l'apporto dei professionisti statistici, per la valutazione dei risultati; lo svolgimento dell'attività di monitoraggio microbiologico ambientale, unitamente alla prosecuzione nel tempo di quella di intercalibrazione, garantisce il mantenimento della qualifica.

## **La standardizzazione del percorso di qualificazione**

La naturale conseguenza dell'attività svolta, anche nello spirito della norma UNI CEI ISO 17025, è l'inquadramento dei requisiti sopra esposti in un percorso standard che garantisca alla CONTARP, per il futuro e in caso di assunzione di nuovo personale tec-

nico, il livello base accettabile di competenza per il conferimento e il mantenimento della qualificazione all'esecuzione di conteggi su piastra agar in accordo alle Linee guida CONTARP.

In base all'esperienza sino ad oggi condotta, è possibile definire un prototipo di *scheda di qualificazione*, con i requisiti sotto riportati.

**Misura di bioaerosol**  
**SCHEDA 'QUALIFICAZIONE AL CONTEGGIO MICROBICO SU PIASTRA'**

<b>Titolo di studio</b>	<b>Esperienza</b>	<b>Addestramento/Formazione</b>	<b>Performance</b>
Laurea in discipline biologiche, diploma tecnico a indirizzo equivalente	Frequenza di un laboratorio microbiologico	Partecipazione ad almeno un evento di intercalibrazione dei conteggi microbici su piastra/ Partecipazione ad almeno un corso, un seminario o altro evento formativo attinente	È in corso di elaborazione un protocollo di valutazione della <i>performance</i> dell'operatore, basato sull'impostazione teorica della pubblicazione Seppo I. Niemelä (2003), che sarà testato sul campo
<b>Condizioni per il mantenimento della qualifica</b>			
Partecipazione ad ogni evento annuale di intercalibrazione o ad almeno 3 eventi di intercalibrazione nell'arco di 5 anni			
Verifica della <i>performance</i> , con esito positivo			

La scheda è applicabile al personale tecnico dell'INAIL che svolge attività di campionamento e analisi del bioaerosol secondo il protocollo delle Linee guida e, relativamente al conteggio microbico su piastra, secondo le indicazioni contenute nel presente documento.

I requisiti riportati nella scheda proposta attengono al possesso di laurea in discipline biologiche o equivalenti e all'esperienza presso un laboratorio; per quanto riguarda la formazione e l'addestramento, è necessaria la partecipazione ad almeno un evento di intercalibrazione o a corsi attinenti la materia in esame.

Tra le condizioni per il mantenimento della qualifica è prevista la partecipazione ad ogni ciclo di intercalibrazione o ad almeno 3 cicli nell'arco di 5 anni, nel caso in cui il personale tecnico sia impegnato sporadicamente nell'attività di monitoraggio microbiologico ambientale.

Un eventuale esito negativo della *performance* obbliga alla ripetizione della lettura; nel caso di reiterazione dell'esito negativo, l'addestramento dell'operatore dovrà essere ripetuto.



## LETTURA DI PIASTRE AGAR RELATIVE A CAMPIONI DI BIOAEROSOL

L'esperienza acquisita nel corso dei monitoraggi condotti negli ambienti di lavoro sia *indoor* che *outdoor* (che sono ambienti tipicamente 'non controllati') dimostra che le caratteristiche della contaminazione microbiologica aerodispersa cui si è accennato nei capitoli precedenti, unitamente alle condizioni ambientali normalmente vigenti durante i campionamenti (difficilmente standardizzabili), giocano un ruolo importante sulla 'densità', 'distribuzione' e 'crescita' delle colonie sui terreni di coltura di piastre agar comunemente utilizzati per la misura delle concentrazioni microbiche totali aerodisperse.

Tenuto conto delle indicazioni contenute nelle norme tecniche di riferimento per l'analisi microbiologica, della scarsa ripetibilità che caratterizza le misure di bioaerosol, della possibile difficoltà di reiterare gli accessi ed i campionamenti nell'ambiente di lavoro in esame, per modificare i parametri di campionamento al fine di ottenere campioni leggibili e considerato che, in tema di rischio biologico, a fronte della mancanza di limiti di esposizione occupazionale, è tuttavia possibile valutare la qualità microbiologica dell'aria di un ambiente di lavoro facendo riferimento a *intervalli di concentrazione* (delle cariche totali batteriche e fungine) *indicativi*, proposti a livello nazionale ed internazionale (vd. Indici e Classi di contaminazione microbiologica dell'aria - Dacarro C. et al., 2000; Categorie di inquinamento microbiologico dell'aria - *European Collaborative Action*, 1993), che contemplano fluttuazioni sufficientemente ampie dei valori di concentrazione, la CONTARP ha standardizzato i criteri di lettura e le modalità di espressione del risultato delle letture descritti nell'Atlante fotografico che segue.

La raccolta fotografica implementa quella allegata alle Linee guida CONTARP: ogni raggruppamento di foto contempla una particolare tipologia di crescita batterica o fungina su terreno solido (*Plate Count Agar - Liofilchem* o *Tryptic Soy Agar - BioMerieux* per le conte batteriche totali; *Sabouraud Agar cloramfenicolo* con/senza *gentamicina - BioMerieux*, per le conte fungine totali).

Poiché il protocollo di monitoraggio descritto nelle Linee guida CONTARP prevede la raccolta di campioni (piastre agar) in triplo per ogni singolo parametro microbiologico da determinare in ogni punto di prelievo, si applica la regola generale che segue.

Ai fini del calcolo delle UFC totali, nel caso in cui:

- **1 su 3** piastre debba essere scartata, si considerano solo le altre due piastre;
- **2 su 3 piastre** debbano essere scartate, il conteggio è invalido (si scarta tutto il triplicato).  
La misura deve essere ripetuta.

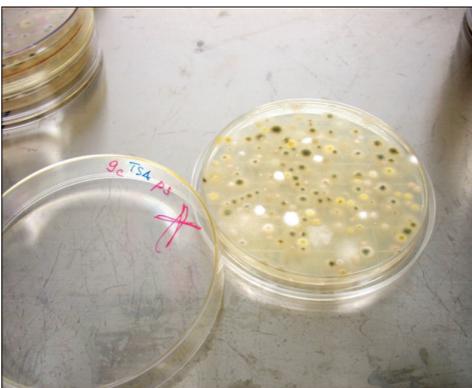
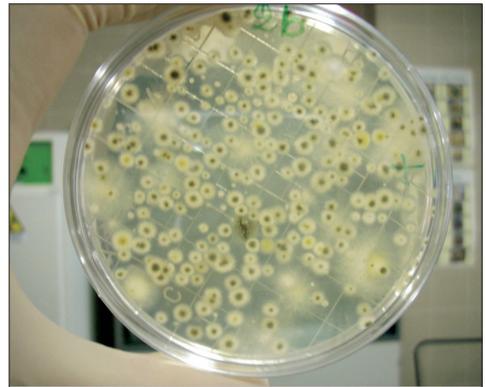
## Atlante fotografico

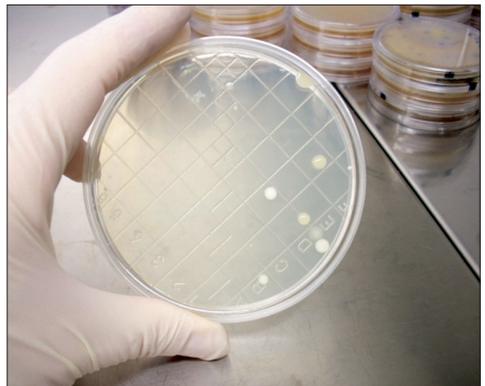
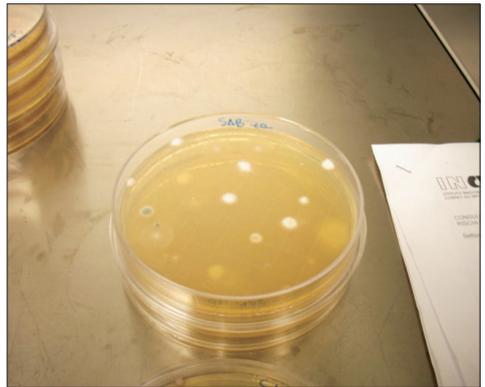
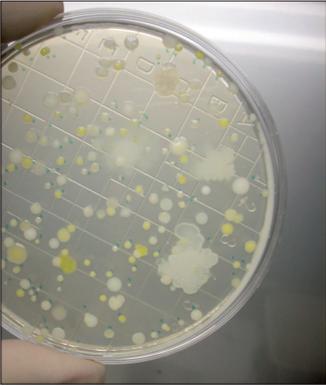
### a. Assenza di crescita

Se al termine dell'incubazione non è visibile alcuna colonia, batterica o fungina, sulla superficie del terreno, esprimere il risultato come 'assenza di crescita' per il volume d'aria (o per la superficie) campionato(a).

### b. Piastre leggibili (UFC numerabili)

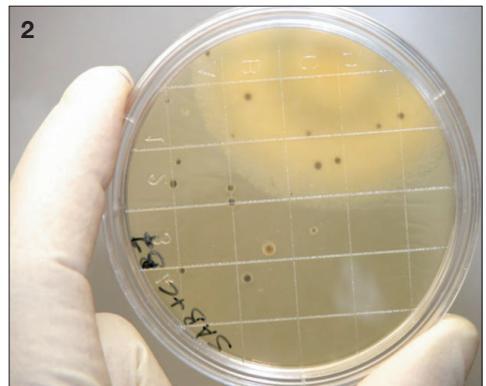
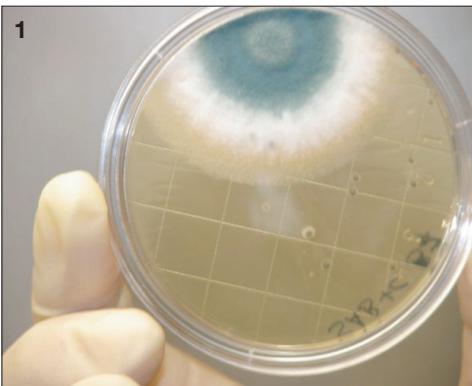
Le colonie cresciute sulla superficie del terreno sono ben isolate e distinte tra loro; pertanto sono agevolmente conteggiabili.





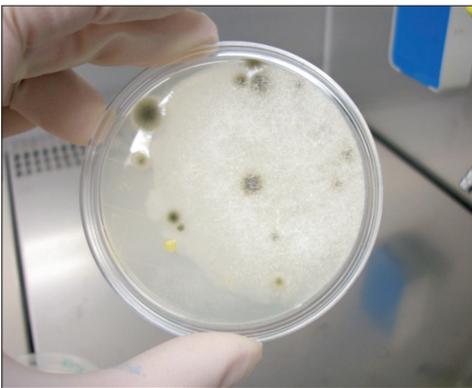


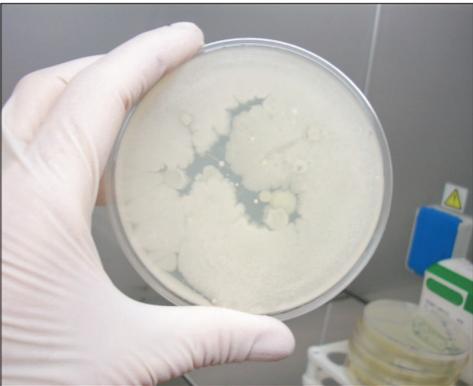
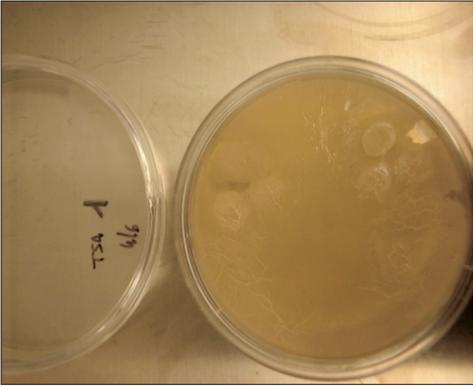
Per il conteggio dei funghi, contare i nuclei di crescita sulla superficie dell'agar **(1)**. Rovesciare, poi, la piastra ed effettuare un conteggio di controllo anche sul retro **(2)**.



### c. Crescita diffusa (patina)

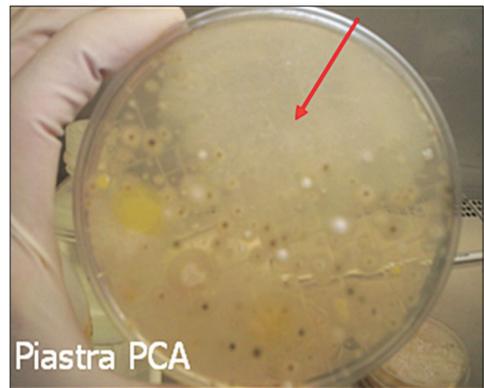
In accordo alla norma tecnica UNI EN 13098:2002, si è in presenza di "patina" ogniqualvolta la crescita (batterica o fungina) omogenea e diffusa copre più della metà dell'area di conteggio della piastra. Poiché tale formazione può inglobare le altre colonie presenti, la piastra non può essere sottoposta a lettura.





Nei casi rappresentati dalle fotografie che seguono, la crescita omogenea e diffusa interessa  $< \frac{1}{2}$  dell'area di conteggio della piastra.

In questi casi, la piastra è leggibile (UFC numerabili) e, ai fini del conteggio totale il numero di colonie presenti nella parte leggibile è sommato a quello della parte non leggibile ottenuto per proporzione.



#### d. Piastre non leggibili (UFC non numerabili)

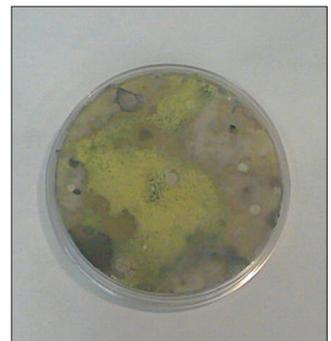
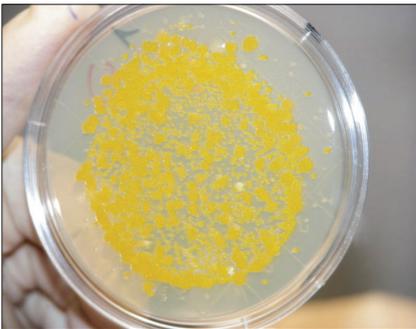
Qualunque piastra su cui non è possibile *esprimere con un numero* le colonie cresciute. Le colonie possono essere indistinguibili tra loro oppure oscurate da una sovra-contaminazione fungina (il micelio aereo è così sviluppato da rendere difficoltoso o impreciso il conteggio delle colonie sottostanti). È utile annotare, in calce al risultato della lettura, le motivazioni della 'non leggibilità' della piastra.



Fronte della piastra



Retro della piastra



### e. Superamento del valore massimo di colonie conteggiabili

Le colonie saturano l'area di conteggio della piastra superando il valore massimo di  $r$  (numero di unità formanti colonie conteggiate sul terreno) riportato nelle *Tablelle di conversione per il calcolo del numero più probabile di microrganismi campionati, usando campionatori attivi ad impatto ortogonale*.

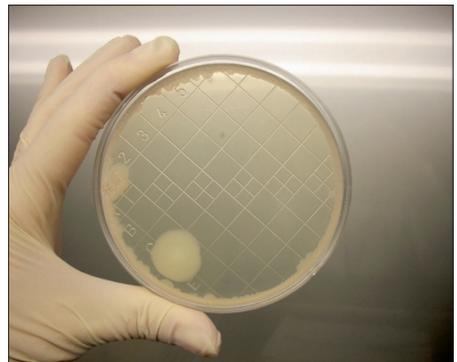
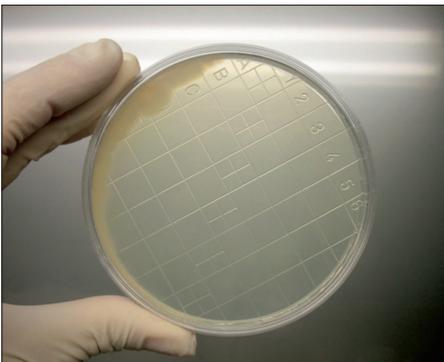
In questo caso particolare, la piastra è leggibile, ma le UFC non sono numerabili: tuttavia, per non perdere l'informazione quantitativa relativa a questo campione, si ritiene utile effettuare comunque il calcolo delle UFC totali, attribuendo ad  $r$  il valore  $P_r$  (numero più probabile di unità formanti colonie della piastra) massimo riportato nelle *Tablelle di conversione* e annotare, sul report analitico, che UFC totali » valore ottenuto dal calcolo (UFC calcolate su  $P_r$  massimo).

Il risultato deve essere analizzato in relazione alle condizioni ambientali vigenti presso il punto di prelievo, al momento del campionamento, per evincere eventuali correlazioni utili ai fini della valutazione del rischio di esposizione.



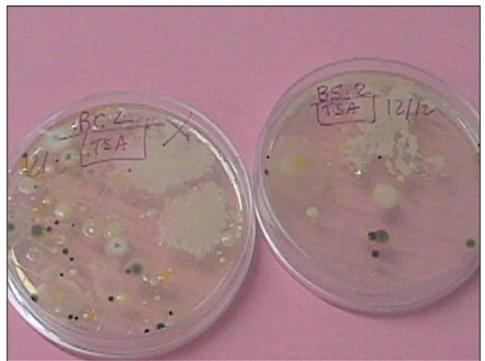
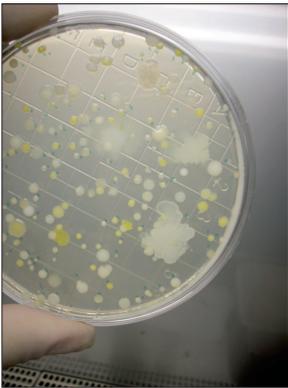
### f. Effetto 'corona'

Con tale neologismo si è voluta descrivere una possibile conseguenza della non corretta preparazione e/o conservazione delle piastre, addebitabile alla formazione di condensa. Alla formazione circolare, più o meno continua, che si sviluppa lungo il perimetro interno della piastra non si può attribuire alcun valore numerico: la formazione, pertanto, deve essere esclusa dal conteggio.



**g. Crescite a margini irregolari**

Nei casi riportati nelle fotografie, ad ogni formazione a margini irregolari si è stabilito di attribuire valore 1.



## BIBLIOGRAFIA

1. Ballati L.: La validazione dei metodi microbiologici: aspetti applicativi, controllo del processo analitico e valutazione dell'operatore. Giornata di formazione: Validazione dei metodi e incertezza di misura nei laboratori di prova addetti al controllo di alimenti e bevande, ARPA Emilia Romagna - ARPA Marche. Bologna, 25 novembre 2004.
2. Banfield J. D. and A. E. Raftery: Model-based Gaussian and non-Gaussian clustering. *Biometrics*, 49. p. 803-821, 1993.
3. Barbaranelli C.: L'analisi dei dati con SPSS, Volume II - Le analisi multivariate. Edizioni LED, 2006.
4. Dacarro C., Grignani E., Lodola L., Grisoli P., Cottica D.: Proposta di indici microbiologici per la valutazione della qualità dell'aria degli edifici. *G. It. Med. Lav. Erg.* 2000; 22 (3) pagg. 229-235.
5. European Collaborative Action, Indoor Air Quality & Its Impact on Man, Report No. 12 Biological particles in Indoor Environments, Commission of the European Communities EUR 14988 EN 1993.
6. Fraley C. and Raftery A.E.: How many clusters? Which clustering method? Answers via model-based cluster analysis. *Computer Journal*, 4. p. 578-588, 1998.
7. Fraley C.: Algorithms for model-based Gaussian hierarchical clustering. *SIAM Journal on Scientific Computing*, 20. p. 270-281, 1998.
8. Giovinazzo R., Anzidei P., Calabrese P., Frusteri L., Guerrera E., Sarto D., Venanzetti F., Veltroni M.: Qualità della misura degli agenti biologici negli ambienti di lavoro: esperienza di intercalibrazione tra laboratori INAIL-CONTARP. Atti 268 Congresso Nazionale AIDII, pagg. 87-96. Siena 25-27 giugno 2008.
9. Giovinazzo R., Anzidei P., Frusteri L., Guerrera E., Sarto D., Venanzetti F.: Biological risk assessment in workplaces: the Italian Workers' Compensation Authority Approach. Atti del 28th International Congress on Occupational Health (ICOH), p.354. Milano 11-16 giugno 2006.
10. Giovinazzo R., Barca S., Calabrese P., Caradonna L., Caselli U., Giaquinta G., Guerrera E., Mameli M., Marena G., Mastromartino T., Sarto D., Summa F., Veltroni M.: Il monitoraggio microbiologico negli ambienti di lavoro: confronti interlaboratorio per la qualità del dato. Atti del VI Seminario CONTARP "Sicurezza e prevenzione: esperienze a confronto", pagg. 201-208. Varese 29 settembre-1 ottobre 2009.
11. Giovinazzo R., Massera S., Incocciati E.: L'efficacia delle misure di agenti chimici e biologici aerodispersi negli ambienti di lavoro: il contributo dell'INAIL-CONTARP. *G Ital Med Lav Erg* Volume XXIX N. 3, Luglio-settembre 2007, pagg. 732-733. Atti del 708 Congresso Nazionale SIMLII, Roma 12-15 dicembre 2007.

12. Giovinazzo R., Venanzetti F., Frusteri L., Guerrera E., Sarto D., Anzidei P.: Il monitoraggio microbiologico degli ambienti di lavoro. Proposta CONTARP di linee guida per il campionamento e l'analisi. Atti del IV Seminario CONTARP "Il sostegno dell'Inail alle aziende: dall'assicurazione alla prevenzione. Il ruolo della Contarp", pagg. 177-184. Assisi, 22-24 novembre 2005.
13. Huang Z.: Extensions to the k-means algorithm for clustering large data sets with categorical values. *Data Mining and Knowledge Discovery*, 2. p. 283-304, 1998.
14. ISO 18593:2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for sampling techniques from surface using contact plates and swabs.
15. ISO 7218:1996/Amd 1:2001 Microbiology of food and animal feeding stuffs - General rules for microbiological examinations.
16. ISO 7218:2007 Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations.
17. ISO 8199:2005 Water quality - General guidance on the enumeration of microorganisms by culture.
18. ISO/TR 13843:2000 Water quality - Guidance on validation of microbiological methods.
19. ISO/TS 11133-1:2009 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media - Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory
20. ISO/TS 11133-2:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media - Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media
21. Kaufman L. and Rousseeuw P.J.: Finding groups in data: An introduction to cluster analysis. Wiley, New York, 1990.
22. Linee guida INAIL: Il monitoraggio microbiologico negli ambienti di lavoro. Campionamento e analisi. Ediz. INAIL, 2010 (on line).
23. Maiello A., Spolaor D.: Guida per l'espressione dell'incertezza di misura nelle prove microbiologiche. Revisione 2 gennaio 2011 (on line).
24. Melia M. and Heckerman D.: An experimental comparison of several clustering and initialization methods. Microsoft Research Technical Report MSR-TR-98-06, 1998.
25. Seppo I. Niemelä: Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms. Advisory Commission For Metrology. Chemistry Section, Expert Group for Microbiology. In: METROLOGIA, MIKES Publication J4/2003, Helsinki, Finland, 2003 (on line).
26. Soliani L.: Manuale di statistica per la ricerca e la professione. Ed. 2005 (on line).

27. Theodoridis S. and Koutroumbas K.: Pattern recognition. Academic Press, New York, 1999.
28. UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura.
29. UNI CEI EN ISO/IEC 17043:2010 Valutazione della conformità - Requisiti generali per prove valutative interlaboratorio.
30. UNI EN 13098:2002 Atmosfera nell'ambiente di lavoro - Linee guida per la misurazione di microrganismi e di endotossine aerodispersi.
31. UNI EN 14583:2005 Atmosfere nell'ambiente di lavoro - Dispositivi di campionamento volumetrici di bioaerosol - Requisiti e metodi di prova.
32. Zhang T., Ramakrishnon R. and Livny M.: BIRCH: An efficient data clustering method for very large databases. Proceedings of the ACM SIGMOD Conference on Management of Data.p. 103-114, Montreal, Canada, 1996.