



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

FACOLTÀ DI INGEGNERIA

DIPARTIMENTO DI PRINCIPI E IMPIANTI DI INGEGNERIA CHIMICA “I. Sorgato”

**TESI DI LAUREA MAGISTRALE  
IN INGEGNERIA CHIMICA E DEI PROCESSI INDUSTRIALI**

**PROGETTAZIONE OTTIMALE DI ESPERIMENTI PER  
L'IDENTIFICAZIONE DI MODELLI FARMACODINAMICI  
SULLA RESISTENZA BATTERICA AGLI ANTIBIOTICI**

*Relatore: Prof. Massimiliano Barolo*

*Correlatore: Dr. Federico Galvanin*

*Laureando: CARLO CAMILLO BALLAN*

ANNO ACCADEMICO 2011 – 2012



# Riassunto

Nella pratica clinica le informazioni sull'attività degli antibiotici viene ricavata da prove *in vitro* di batteriocidia, ossia lo studio di come evolve una coltura di batteri nel tempo in funzione di uno o più antibiotici. Dalle prove di batteriocidia si ricavano indici che caratterizzano in maniera qualitativa l'effetto dell'antibiotico su di una popolazione batterica e costituiscono l'antibiogramma. Recentemente, è stato proposto l'uso di modelli matematici per ottenere una descrizione quantitativa delle prove di batteriocidia, in modo da evidenziare fenomeni, quali lo sviluppo di resistenza agli antibiotici, che normalmente non sono misurabili dagli indici riportati nell'antibiogramma. In questa Tesi, tecniche di progettazione di esperimenti basata sul modello (MBD<sub>oE</sub>, *model-based design of experiments*) vengono applicate ad un modello farmacodinamico che descrive l'azione degli antibiotici sulla crescita batterica in esperimenti condotti *in vitro*. Si sono condotti diversi test numerici per verificare l'identificabilità parametrica del modello mostrando che, il modello studiato è difficilmente identificabile, ma consente di ottenere localmente delle stime univoche dei parametri. Sono state proposte, inoltre, delle procedure ottimali per condurre le prove di stima dei suoi parametri. Si sono esplorati i risultati di progettazioni effettuate secondo il criterio *D*-ottimale e *SV*-ottimale, mettendo in luce le potenzialità di quest'ultimo. Si è affrontato il problema della definizione ottimale della campagna di esperimenti, evidenziando la possibilità di ottenere procedure di stima di parametri più rapide eseguendo delle progettazioni che non correlano alcuni parametri con i rimanenti.



# Indice

<b>INTRODUZIONE</b> .....	1
<b>CAPITOLO 1 - Modellazione farmacocinetica e farmacodinamica della sensibilità agli antibiotici</b> .....	3
1.1 FARMACOCINETICA E FARMACODINAMICA.....	3
1.1.1 Modellazione Farmacocinetica .....	4
1.1.1.1 Indici farmacocinetici .....	4
1.1.1.2 Costruzione di modelli farmacocinetici.....	6
1.1.2 Modellazione Farmacodinamica.....	7
1.1.3 PK/PD applicata all'individuo e alla popolazione .....	8
1.2 TERAPIE ANTIMICROBICHE .....	9
1.2.1 Cinetiche batteriche.....	9
1.2.2 Descrizione dell'azione degli antibiotici .....	11
1.2.3 Coltura dei batteri.....	12
1.2.3.1 Determinazione dell'antibiogramma .....	13
1.2.4 Sviluppo della farmaco-resistenza .....	13
1.2.4.1 Test molecolari.....	14
1.2.4.2 Test fenotipici .....	15
1.3 PROGETTAZIONE DI ESPERIMENTI APPLICATA A SISTEMI BIOLOGICI .....	18
<b>CAPITOLO 2 - Progettazione ottimale di esperimenti basata sul modello</b> .....	19
2.1 PROGETTAZIONE DI ESPERIMENTI .....	19
2.2 IDENTIFICABILITÀ .....	23
2.2.1 Identificabilità strutturale .....	23
2.2.2 Identificabilità locale.....	24
2.3 IMPLEMENTAZIONE MBDOE .....	27
2.4 PROGETTAZIONE OTTIMALE BASATA SUL MODELLO.....	30
2.4.1 Misura dell'informazione di un esperimento.....	31
2.4.2 Criteri di progettazione.....	34
2.4.3 Stima dei parametri .....	35

2.4.4 Simulazione <i>in silico</i> .....	37
<b>CAPITOLO 3 - Progettazione di esperimenti per lo studio della batteriocidia</b> .....	<b>39</b>
3.1 ESPERIENZE REALIZZATE.....	39
3.2 TEST PER L'IDENTIFICABILITÀ .....	41
3.2.1 Identificabilità del sistema <i>I1</i> .....	43
3.2.1.1 Risultati dei test.....	43
3.2.2 Identificabilità del sistema <i>I2</i> .....	46
3.2.2.1 Risultati dei test.....	48
3.2.3 Identificabilità del sistema <i>I3</i> .....	49
3.3 PROGETTAZIONE DI ESPERIMENTI PER L'IDENTIFICAZIONE PARAMETRICA .....	50
3.3.1 Modello dell'errore .....	50
3.3.2 Esperimento <i>E1</i> .....	51
3.3.3 Esperimenti <i>E2</i> .....	52
3.3.4 Esperimenti <i>E3</i> .....	54
3.3.5 Esperimenti <i>E4</i> .....	56
3.3.6 Conclusioni .....	59
<b>CAPITOLO 4 - Confronto tra criteri di progettazione di esperimenti</b> .....	<b>61</b>
4.1 PROGETTAZIONE SV-OTTIMALE .....	61
4.1.1 Criterio SV-ottimale .....	61
4.1.2 Implementazione del criterio SV-ottimale .....	63
4.2 APPLICAZIONE DELLA PROGETTAZIONE SV-OTTIMALE.....	65
4.2.1 Esperimenti <i>E5</i> .....	66
4.2.2 Esperimenti <i>E6</i> .....	72
4.3 SVILUPPI DEL CRITERIO SV-OTTIMALE .....	76
4.3.1 Effetto della correlazione .....	78
4.4 STRATEGIE DI PROGETTAZIONE DEGLI ESPERIMENTI .....	80
4.4.1 Struttura degli esperimenti .....	81
4.4.2 Progettazioni effettuate con errore basso .....	84
4.4.2.1 Progettazioni SV-ottimale <i>SVLow</i> .....	84
4.4.2.2 Progettazioni D-ottimale <i>DLow</i> .....	87

4.4.3 Progettazioni effettuate con errore elevato .....	88
4.4.3.1 Progettazione <i>SV</i> -ottimale/ <i>D</i> -ottimale <i>SVDHigh</i> .....	88
4.4.3.2 Progettazione <i>D</i> -ottimale <i>DHigh</i> .....	90
4.4.4 Confronto tra la progettazioni presentate .....	90
4.4.5 Conclusioni .....	92
<b>CONCLUSIONI</b> .....	<b>93</b>
<b>NOMENCLATURA</b> .....	<b>95</b>
Simboli generici.....	95
Simboli greci .....	96
Matrici .....	97
Acronimi.....	97
<b>RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI</b> .....	<b>99</b>





# Introduzione

Nel campo biologico, farmacologico e medico la necessità di ottenere informazioni quantitative sui sistemi analizzati ha indotto all'uso di modelli matematici in modo ampio. Storicamente, relazioni analitiche sono state sviluppate nel campo della farmacocinetica e farmacodinamica (PK/PD). La misura precisa dell'effetto dei farmaci ha richiesto, accanto all'uso di modelli matematici, l'introduzione di tecniche statistiche per la convalida del modello e la corretta interpretazione dei dati. In questa Tesi si applicano tecniche MBDoE (*model based design of experiments*) a modelli per la descrizione dell'azione degli antibiotici sulla crescita batterica in esperimenti condotti *in vitro*. Nella pratica clinica le informazioni sull'attività degli antibiotici viene ricavata da prove *in vitro* di batteriocidia (*time-kill studies*), ossia lo studio di come evolve una coltura di batteri nel tempo in funzione di uno o più antibiotici. Tradizionalmente, dalle prove di batteriocidia si ricavano indici che caratterizzano in maniera qualitativa l'effetto dell'antibiotico su di una popolazione batterica e costituiscono l'antibiogramma. Recentemente è stato proposto l'uso di modelli matematici per ottenere una descrizione quantitativa delle prove di batteriocidia, in modo da valutare precisamente l'effetto della concentrazione di antibiotico, oppure evidenziare fenomeni, quali lo sviluppo di resistenza agli antibiotici, che normalmente non sono misurabili dagli indici riportati nell'antibiogramma. La progettazione ottimale di esperimenti basata sul modello (MBDoE) introduce un approccio statistico allo sviluppo di modelli matematici e alla loro applicazione sperimentale. L'impiego di un modello matematico che descrive adeguatamente i dati sperimentali permette di caratterizzare il sistema (in questa Tesi si farà riferimento a sistemi biologici) attraverso la stima dei parametri del modello. Il modello permette, inoltre, se la modellazione è stata effettuata sui principi primi che governano il sistema, di formulare previsioni estrapolando dai dati che sono stati necessari per ottenere il modello o la stima dei parametri (capacità predittiva del modello). Assumendo che il modello sia una rappresentazione perfetta del sistema osservato (non c'è *mismatch* del modello), si devono condurre due verifiche: una verifica di identificabilità parametrica *a priori*, e una verifica *a posteriori* di realizzabilità della stima (identificazione parametrica del modello). La verifica di identificabilità parametrica del modello richiede di provare che le soluzioni della stima dei parametri non sono molteplici per tutti i set di parametri ammissibili. La verifica di realizzabilità della stima, invece, consiste nel determinare se è possibile, nella pratica, con misure affette da errore, ideare uno o più esperimenti che consentano la stima precisa dei parametri.

Nel lavoro presentato, si conducono test di identificabilità *a priori* e *a posteriori* sul modello presentato da Tam *et al.* (2005), relativo alla descrizione delle prove di batteriocidia. I test di

identificabilità *a priori* vengono condotti localmente realizzando test numerici, poiché i metodi analitici non sono applicabili. Non si è riusciti a fornire una prova della identificabilità globale del modello, ma solo delle prove locali. La verifica *a posteriori*, invece, viene condotta, progettando diverse configurazioni possibili di esperimenti (in sequenza ed in parallelo) e osservando che, almeno in un caso, si ottiene un'incertezza della stima che è accettabile per tutti i parametri. La progettazione ottimale di esperimenti (MBD<sub>oE</sub>) si basa sulla scelta degli input da fornire al sistema con lo scopo di ottimizzare alcune metriche della varianza-covarianza dei parametri. La varianza-covarianza può essere bene approssimata localmente, sotto alcune ipotesi statistiche, dall'inversa della matrice di informazione di Fisher, la quale può essere impiegata per risolvere un problema di ottimizzazione equivalente a quello basato sulla varianza-covarianza. Nella Tesi si approfondiscono le metriche legate ai criteri di progettazione; in modo particolare viene messa in luce l'efficienza del criterio di progettazione *SV*-ottimale (Galvanin *et al.*, 2007) confrontata con l'efficienza del criterio *D*-ottimale. Si affronta anche il problema della correlazione tra parametri e si suggeriscono alcuni metodi, dov'è possibile, per progettare esperimenti i cui parametri sono non correlati. La Tesi è strutturata come segue.

Nel Capitolo 1 viene condotta una descrizione delle applicazioni generali della farmacocinetica e della farmacodinamica. In particolare si descrivono le tecniche con cui si ottiene l'antibiogramma. Nell'ultima parte del capitolo si presentano alcuni modi di modellazione delle cinetiche dei farmaci e viene riportato il modello di Tam *et al.* (2005a).

Il Capitolo 2 contiene la descrizione delle tecniche per l'identificazione del modello, le strategie per implementare la progettazione di esperimenti, i fondamenti teorici della progettazione di esperimenti MBD<sub>oE</sub> e il metodo di stima basato sulla massima verosimiglianza.

Nel Capitolo 3 si presentano i test numerici per valutare l'identificabilità del modello studiato e varie progettazioni per la stima dei parametri del modello di Tam, tutte realizzate applicando il criterio *D*-ottimale.

Con il Capitolo 4 si introduce il criterio *SV*-ottimale e se ne valuta l'efficacia realizzando diverse progettazioni di esperimenti secondo varie configurazioni. Viene indagato l'effetto della correlazione tra varianza dei parametri e questo viene messo in relazione all'orientamento della matrice di informazione attraverso l'individuazione delle direzioni principali. Si accenna anche al criterio di progettazione *P*-ottimale. Nell'ultima parte del capitolo viene indagato, attraverso degli esempi, come la scelta del criterio di progettazione (*D*-ottimale oppure *SV*-ottimale) influisca sulla struttura degli esperimenti. Infine, una discussione sui risultati ottenuti e sulle prospettive di sviluppo future conclude il lavoro di Tesi.

# Capitolo 1

## Modellazione farmacocinetica e farmacodinamica della sensibilità agli antibiotici

In farmacologia, fisiologia, radiologia e in generale nella pratica clinica è necessario ottenere delle informazioni quantitative sull'azione dei farmaci. Tuttavia, i sistemi che vengono trattati in questi campi sono estremamente complessi e sono descritti principalmente in base all'esperienza accumulata nello studio dei singoli casi. Per ottenere informazioni quantitative è necessario che l'approccio euristico sperimentale, tipico della medicina e della biologia, sia affiancato da un approccio basato sulla modellazione matematica. L'introduzione di modelli matematici consente di interpretare i risultati sperimentali in maniera più generale. Esempi di applicazioni che condividono questa necessità, si riscontrano in settori molto diversi che vanno dallo sviluppo di nuovi farmaci alla ricerca sul cancro (Bellomo *et al.*, 2008).

### 1.1 Farmacocinetica e farmacodinamica

Storicamente, le branche della farmacologia denominate farmacocinetica e farmacodinamica raccolgono alcuni tra i primi esempi di descrizione matematica di sistemi biologici. Anche oggi gran parte dei modelli matematici realizzati in medicina appartengono a quest'area della farmacologia. Con farmacocinetica (*pharmacokinetics* – PK) si intende la descrizione di come i composti chimici vengono assorbiti, distribuiti, trasformati ed eliminati dall'organismo (Rescigno, 2004). La farmacodinamica (*pharmacodynamics* – PD) invece, lega la concentrazione del farmaco con gli effetti fisiologici e biochimici, descrivendo a vari livelli l'interazione tra il farmaco e il sistema biologico. La distinzione tra PK e PD non è netta e spesso un modello farmacocinetico è costruito in parte su un modello farmacodinamico; ciò che distingue maggiormente la PK dalla PD nella pratica, è il campo di applicazione: la PK viene studiata grazie ad esperimenti *in vivo*, mentre la PD è applicata per lo più ad esperimenti *in vitro*.

La PK e la PD si sviluppano parzialmente su basi descrittive, specialmente in ambiente medico, e questo è da attribuirsi alla necessità di ottenere un risultato pratico, che sia utile a livello clinico, anche trattando fenomeni che non sono ben compresi.

### 1.1.1 Modellazione Farmacocinetica

L'assorbimento del farmaco nell'organismo avviene attraverso modalità diverse: assunzione orale che permette al farmaco di essere assorbito attraverso la parete gastrica e intestinale, la somministrazione sublinguale, l'assorbimento transdermale, la somministrazione rettale. L'assorbimento polmonare rappresenta un'altra via che permette la rapida assunzione di sostanze gassose o volatili. Sostanze liquide vengono introdotte anche attraverso iniezione che in generale si può distinguere in intravenosa, sottocutanea, intramuscolare o intratecale. Per applicazioni locali invece si effettuano delle applicazioni topiche. Il metodo di somministrazione del farmaco viene scelto in base alle proprietà chimiche del farmaco, il percorso che deve fare per raggiungere l'obiettivo, le vie attraverso le quali viene metabolizzato. La via di assunzione influenza la successiva distribuzione all'interno dell'organismo. La distribuzione è determinata, inoltre, da fattori come la gittata cardiaca, il flusso ematico regionale, la permeabilità capillare e la massa dei tessuti coinvolti. In generale il farmaco tende a distribuirsi velocemente negli organi ben irrorati dal sangue, ossia il cervello, il fegato, i reni ecc., per poi raggiungere i muscoli, la pelle, l'adipe, ecc.. L'equilibrio chimico del farmaco cambia nei vari tessuti, ed è influenzato dalla presenza di biomolecole con le quali può reagire reversibilmente, oltre che dipendere da altri fattori quali il pH. Alcuni farmaci tendono a legarsi preferenzialmente con determinati tessuti, dove si accumulano per poi venire rilasciati e ridistribuirsi nell'organismo.

Parte del farmaco viene trasformato dopo aver raggiunto l'obiettivo, mentre un'altra parte viene metabolizzata da vari organi, principalmente fegato e reni. L'eliminazione dipende strettamente da come il farmaco viene metabolizzato, perché i prodotti delle reazioni biochimiche sono più facilmente escreti quanto più presentano un carattere polare. L'eliminazione è compiuta dall'azione dei reni che separano le sostanze polari attraverso la filtrazione glomerulare. Invece le sostanze lipofile, separate nella filtrazione glomerulare, ritornano in circolazione nell'organismo passando attraverso i tubuli renali e quindi sono di difficile eliminazione per l'organismo. Un'introduzione alle basi biochimiche della farmacocinetica può essere trovata in Goodman e Gilman (2008).

#### 1.1.1.1 Indici farmacocinetici

La PK cerca di rappresentare i fenomeni elencati nel paragrafo precedente in maniera matematica. Tuttavia, non sempre è nota una relazione che legghi l'effetto farmacologico con la concentrazione misurabile del farmaco, e neppure è sempre possibile misurarne la concentrazione. Il dosaggio di un farmaco è basato sull'osservazione dei suoi effetti positivi o negativi e alla correzione di questi ultimi attraverso l'aggiustamento dei tempi e delle dosi prescritte, senza che avvenga una calibrazione precisa della terapia. Molto frequentemente la terapia è definita attraverso un processo che parte dalla conoscenza acquisita in precedenza e

procede attraverso prove ed errori. La farmacocinetica clinica costituisce il contesto all'interno del quale applicare delle disposizioni di massima, legate alla stima di indici e parametri, al fine di impostare la cura. La farmacocinetica si avvale del concetto di compartimento o "pool" per rappresentare il luogo dove una molecola è localizzata. Il compartimento non coincide necessariamente con una regione circoscritta, ma è identificabile come il luogo nel quale una sostanza forma particolari legami chimici o fisici. Il modello più semplice che è possibile costruire rappresenta l'intero organismo come un singolo comparto identificato da alcuni indici. Gli indici essenziali per comprendere come viene correntemente impostata la terapia sono la *clearance*, il volume di distribuzione, il tempo di emivita, e la biodisponibilità. Accanto a questi indici può essere ricavato anche l'*AUC* (*area under curve*, [mg·L<sup>-1</sup>·h]) che è l'integrale della concentrazione del farmaco nel comparto osservato dal tempo di immissione ad un tempo infinito. Tali indici sono descritti nel seguito.

Clearance ( $CL$  [L·hr<sup>-1</sup>]). E' la rimozione ( $r$  [mg·hr<sup>-1</sup>]) di una sostanza da un comparto (ma genericamente viene riferita a tutto l'organismo) normalizzata sulla concentrazione media ( $C_m$  [mg·L<sup>-1</sup>]) presente nel comparto o nell'organismo:

$$CL = \frac{r}{C_m}$$

se viene raggiunto uno stato stazionario nel dosaggio del farmaco, la rimozione è proporzionale alla clearance. Quando invece si assume istantaneamente una singola dose di farmaco (bolo,  $B$  [mg]) la clearance è ricavata come  $CL = B / AUC$ . Una definizione operativa di clearance è il volume di sangue che viene filtrato (dal compartimento o dall'organismo) in una unità di tempo per rimuovere una quantità unitaria di farmaco.

Volume di distribuzione ( $V$  [L]). Il volume di distribuzione è per definizione:

$$V = \frac{B}{C_m}$$

Il volume di distribuzione può risultare anche più grande delle dimensioni fisiche del compartimento perché la concentrazione viene misurata localmente e all'interno del compartimento possono esserci delle variazioni di concentrazione dovute all'assorbimento del farmaco su specifici tessuti o per il non perfetto mescolamento iniziale.

Tempo di emivita ( $t_{1/2}$  [h]). Il tempo di emivita è il tempo trascorso dall'assunzione del farmaco dopo il quale la concentrazione misurata è la metà di quella iniziale. E' un parametro utile quando il farmaco viene dosato attraverso un bolo iniziale.

Biodisponibilità ( $F$  [-]). La biodisponibilità lega la quantità di farmaco che può raggiungere il comparto di interesse e la quantità di farmaco dosata. Rappresenta l'efficienza con cui il farmaco arriva sul bersaglio. Se la somministrazione del farmaco raggiunge lo stato stazionario allora si può scrivere la relazione:

$$F \cdot D = CL \cdot C_{ss}$$

dove  $C_{ss}$  è la concentrazione a stato stazionario, e  $D$  [ $\text{mg} \cdot \text{hr}^{-1}$ ] è la dose di farmaco introdotta a brevi intervalli regolari. Gli indici presentati sono riportati in Goodman e Gillman (2008).

### 1.1.1.2 Costruzione di modelli farmacocinetici

La terapia di solito mira a mantenere una concentrazione del farmaco all'interno di una "finestra terapeutica" che rappresenta l'intervallo di concentrazione che produce l'effetto terapeutico (Craig, 2008). Si noti, però, che non in tutti i casi è chiarito il significato della finestra terapeutica, perché per alcuni farmaci potrebbe essere più importante il valore di picco, oppure potrebbe essere necessario ottenere un particolare profilo di concentrazione (Drlica, e Zhao, 2007). C'è quindi la necessità di rappresentare in maniera meno approssimata i sistemi biologici. Per descrivere sistemi biologici complessi, è necessario elaborare modelli formati da più compartimenti. Si devono definire i compartimenti con un proprio volume e le sostanze che si trovano nel sistema. Si stabiliscono i collegamenti tra i compartimenti e le funzioni che descrivono la cinetica con la quale le sostanze si muovono tra compartimenti. Con questo metodo è possibile rappresentare graficamente i bilanci di materia ed assegnare un significato fisiologico ai compartimenti. Il modello è in generale dipendente dal tempo, ed è composto da variabili di stato, variabili misurabili, variabili controllate e da un set di parametri. Solitamente il farmaco dosato è una variabile controllata, mentre la concentrazione del farmaco nel plasma è una tra le variabili misurate. Gli aspetti dettagliati della costruzione di modelli fisiologici può essere trovata in Cobelli e Carson, (2001), oppure in Rescigno, (2009).

Costruito il modello si deve verificare se esso sia identificabile, ossia che i parametri possano essere stimati correttamente dai dati sperimentali (Asprey e Macchietto, 2000). Spesso i parametri del modello vengono combinati algebricamente per formare parametri secondari, anche detti indici; ad esempio gli indici riportati in precedenza, sono utili per descrivere un modello composto da un solo compartimento. Il valore assunto dagli indici è strettamente legato al modello, perciò il significato degli indici dipende dall'identificabilità del modello stesso. Lo studio dell'identificabilità è un problema che verrà meglio dettagliato nei prossimi capitoli.

Altre volte gli indici impiegati hanno un valore solo empirico perché si riferiscono ad osservazioni ottenute da esperimenti, e forniscono indicazioni semiquantitative; questo

approccio, unicamente sperimentale, non si avvantaggia dell'informazione che è contenuta nel modello e dipende molto dalle condizioni sperimentali stesse.

### 1.1.2 Modellazione Farmacodinamica

Mentre la PK è, in ambito clinico, alla base della scelta dei dosaggi nella terapia, la PD è utilizzata per scegliere un farmaco o per guidare lo sviluppo di nuovi farmaci. L'approccio della PD considera le reazioni che avvengono nel sito d'azione dopo che il farmaco vi è stato trasportato. L'effetto dei farmaci è dato dalla loro interazione con i composti macromolecolari degli organismi viventi; il risultato delle interazioni altera il funzionamento usuale delle strutture biologiche ed innesca una sequenza di cambiamenti tipici provocati dal farmaco. I composti macromolecolari con cui il farmaco interagisce sono detti recettori. I recettori possono essere recettori biochimici presenti sulle membrane cellulari (recettori di ormoni, di fattori di crescita, o di neurotrasmettitori), siti attivi di enzimi, proteine coinvolte nei processi di trasporto o proteine con funzioni strutturali. Altri recettori importanti sono rappresentati dagli acidi nucleici coinvolti nelle terapie farmacologiche che provocano la morte cellulare.

Il farmaco reagendo con il recettore compete con i ligandi biochimici provocando l'alterazione della risposta in maniera positiva o negativa. Può provocare una risposta piena oppure parziale, e viene rispettivamente detto agonista totale o parziale; oppure può annullare la risposta e viene definito antagonista. I recettori non solo sono dei mezzi attraverso i quali l'attività cellulare è regolata, ma sono essi stessi soggetti ad un proprio sistema di regolazione che controlla la loro sintesi e la degradazione.

Seguendo la stessa logica che presiede ai modelli PK, è possibile costruire i modelli PD, per modellare le dinamiche elencate sopra. Tuttavia è più frequente incontrare il formalismo tipico della cinetica chimica che non quello dei modelli compartimentali anche se il principio di conservazione della massa applicato è lo stesso. Anche in questo caso si otterrà un modello dipendente dal tempo composto da variabili di stato, variabili misurabili, variabili controllate e un set di parametri.

Nella PD un modello che si riscontra nella maggior parte delle applicazioni è rappresentato dall'equazione di Hill (1910):

$$E = \frac{E_{\max} \cdot C^H}{C^H + EC_{50}^H} \quad , \quad (1.1)$$

dove  $E$  è l'effetto farmacologico misurato,  $E_{\max}$  è il massimo effetto ottenibile.  $E$  ed  $E_{\max}$  hanno le stesse unità di misura che dipendono dell'effetto descritto, il quale può essere tra i più vari anche se di solito è una concentrazione.  $C$  [ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ] è la concentrazione di farmaco,  $EC_{50}$  [ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ] è la concentrazione alla quale si ottiene metà dall'effetto massimo,  $H$  [-] è l'esponente di sigmoidicità. L'equazione di Hill per valori interi dell'esponente  $H$  descrive

uno schema di reazioni detto di cooperazione positiva e rappresenta un modello che ha significato fisico. Quando l'esponente assume valori frazionari perde il significato fisico; nonostante questo si è comunque dimostrato un modello adatto per rappresentare una grande varietà di fenomeni biochimici. Una spiegazione dettagliata delle applicazioni dell'equazione di Hill viene fornita da Goutellea *et al.* (2006).

### 1.1.3 PK/PD applicata all'individuo e alla popolazione

Si è visto che i modelli PK/PD possono descrivere un singolo sistema. In campo clinico lo studio di un modello per l'individuo è molto importante quando la finestra terapeutica non è molto ampia, oppure quando il farmaco inizia a manifestare le sua proprietà tossiche in prossimità del limite superiore della finestra terapeutica. In questi casi, grazie alla stima dei parametri, si cerca di ottenere in maniera precisa, il compromesso più accettabile tra danno prodotto dal farmaco e l'effetto terapeutico. Inoltre la determinazione dei parametri per l'individuo può essere essenziale quando essi si discostano molto da quelli della popolazione e quindi si deve mettere a punto un dosaggio per il caso specifico. Lo studio condotto sul singolo individuo è utile anche nelle fasi sperimentali iniziali di realizzazione di un nuovo farmaco al fine di discriminare i molti composti che vengono studiati (Zhang *et al.*, 2006). Ad esempio tra le diverse molecole che producono lo stesso effetto (la cui unica differenza può essere un gruppo sostituyente), si ricerca quella con particolari prestazioni (velocità di trasporto attraverso le membrane, solubilità, ecc.) che corrispondo a valori ottimali di parametri, che massimizzano una opportuna funzione obiettivo.

In alcune applicazioni, però, si vuole studiare quali siano le frequenze dei valori che i parametri del modello assumono negli individui di una popolazione al fine di comprendere come le proprietà PK/PD di una molecola cambino all'interno della popolazione. Si devono quindi ottenere i parametri statistici che descrivono la distribuzione (che deve essere nota o deve essere ipotizzata) dei parametri del modello (Hooker *et al.*, 2003). Per applicare un modello farmacocinetico della popolazione è necessario prelevare ripetute misure dagli individui della popolazione (ad esempio la concentrazione di farmaco nel sangue), queste misure, poi, devono essere regredite sul modello statistico che descrive la popolazione. Usualmente i dati ottenuti dalla popolazione sono sparsi (pochi campioni per individuo) e presentano un'alta variabilità tra individui. Servono quindi modelli che riescano a distinguere tra la variabilità propria degli individui dovuta alle diverse caratteristiche biologiche che esistono nella popolazione, e la variabilità causata dagli errori sperimentali e dalla casualità (variabilità residua). Questi modelli sono detti modelli ad "effetti misti" proprio perché riescono a spiegare le diverse componenti della variabilità del modello, e si differenziano dai modelli ad "effetti fissi", ossia quei modelli realizzati sul paziente, la cui unica variabilità è causata dagli errori sperimentali. L'importanza dei modelli PK/PD della popolazione è legata



soprattutto allo sviluppo dei nuovi farmaci, e alle fasi di sperimentazione clinica delle nuove molecole prima che la loro commercializzazione possa essere approvata (Bhattaram *et al.*, 2005). Il processo di sviluppo di nuovi farmaci si avvale di modelli (MBDD, model based drug development, Lalonde *et al.* (2007)) per pianificare le campagne sperimentali in modo da ottimizzarne i costi, ottenere dati misurati più informativi e nel contempo migliorare le comprensioni farmacologiche dei composti sperimentati. I parametri stimati sulla popolazione consentono di stabilire qual è il dosaggio del farmaco che è efficace per la maggior parte della popolazione.

In entrambi i tipi di modello, applicati all'individuo e alla popolazione, è fondamentale la progettazione dell'esperimento per la stima dei parametri (Jonsson e Sheiner, 2002). Si devono fissare i valori delle variabili controllate del modello e i tempi di campionamento in modo che l'informazione ricavabile dalle prove sperimentali sia massima. Sebbene la logica che presiede alle tecniche per la progettazione di esperimenti per l'individuo e per la popolazione siano comuni, la finalità della stima sono diverse: nel caso della popolazione l'interesse è orientato verso la descrizione statistica; nel caso dell'individuo, invece, si progetta ogni singolo esperimento per ottenere parametri accurati, con lo scopo di identificare parametricamente un singolo modello.

L'obiettivo di questa tesi è applicare tecniche di progettazione di esperimenti basate sul modello, per l'identificazione dei parametri del modello di un singolo sistema. Si porteranno degli esempi di progettazione su modelli per lo studio della resistenza batterica agli antibiotici, dove la messa a punto di esperimenti è indispensabile per la corretta descrizione del sistema osservato.

## **1.2 Terapie antimicrobiche**

La PK/PD trovano applicazione nel campo della microbiologia e delle chemioterapie antimicrobiche. I principali composti impiegati nelle terapie antimicrobiche sono gli antibiotici per la loro azione selettiva sui batteri e non sulle cellule dell'organismo infetto. Il loro corretto utilizzo si basa sulla comprensione dell'azione degli antibiotici sulle cinetiche che regolano la crescita e la morte batterica. In questa seconda parte del capitolo verranno esposti quali sono le cinetiche di crescita dei batteri, l'azione degli antibiotici sull'attività dei batteri, la determinazione sperimentale della farmacodinamica degli antibiotici, lo sviluppo della farmaco-resistenza e la sua modellazione.

### **1.2.1 Cinetiche batteriche**

La patogenicità di batteri si deve alla loro capacità di diffondersi nell'organismo e di produrre tossine, incrementando la loro popolazione rapidamente. La comprensione dell'evoluzione

della popolazione batterica è un elemento fondamentale per la modellazione degli effetti degli antibiotici. La riproduzione batterica avviene generalmente per scissione binaria: la cellula madre si sdoppia in cellule identiche. La crescita dei batteri nei terreni di coltura artificiali segue un andamento caratteristico: inizialmente c'è l'adattamento dei batteri al terreno di coltura; in seguito si moltiplicano in modo esponenziale; la crescita, poi, tende a cessare per mancanza del substrato fornito dal terreno di coltura e per l'azione negativa dei cataboliti tossici; la popolazione batterica rimane stabile per un periodo di tempo e poi inizia a diminuire fino all'estinzione. Il ciclo di crescita e morte viene riprodotto in tutte le colture batteriche, ma si estende su scale temporali diverse tipiche del batterio e di alcune condizioni ambientali, variando da un tempo caratteristico di alcune ore a diverse settimane (Lanciotti, 1990).

Poiché la dinamica del fenomeno si ripete in maniera simile per stipti batterici diversi, essa si presta ad essere modellata in maniera generale. In letteratura si trovano alcuni modelli fondamentali, molto diffusi nella descrizione della popolazione batterica; in generale sono composti da un termine di crescita e da uno di decadimento. Poiché spesso si è interessati a coltivare la popolazione nella sua fase di crescita si possono trovare diverse espressioni che forniscono l'andamento sigmoidale descritto dalla curva di crescita. Due modelli di questo tipo impiegati sono l'equazione logistica e l'equazione di Hill già descritta. L'equazione logistica è particolarmente semplice perché contiene solo due parametri per descrivere la carica batterica  $x$  [CFU·mL<sup>-1</sup>]: il parametro  $K$  [hr<sup>-1</sup>], rappresenta la velocità massima di crescita batterica, mentre  $x_{\max}$  [CFU·mL<sup>-1</sup>] stabilisce il livello di saturazione (concentrazione batterica massima). Il modello (1.2) è valido solamente per una popolazione "giovane".

$$\frac{dx}{dt} = K \left( 1 - \frac{x}{x_{\max}} \right) x \quad . \quad (1.2)$$

Un modello più generale descrive la cinetica batterica accoppiando all'equazione sulla carica batterica, un'equazione che descrive il consumo di substrato e la produzione di cataboliti. Il modello per legare la crescita batterica al substrato viene dato dall'equazione di Monod:

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{\max} \frac{S}{K_M + S} x \quad , \quad (1.3)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\mu_{\max} \frac{S}{K_M + S} \frac{x}{Y_{x/S}} \quad , \quad (1.4)$$

Dove  $\mu_{\max}$  [hr<sup>-1</sup>] è la massima velocità di crescita,  $S$  [g·hr<sup>-1</sup>] è la concentrazione di substrato,  $K_M$  [g·hr<sup>-1</sup>] è la costante di Monod pari alla concentrazione di  $S$  alla quale la velocità di crescita ( $dx/dt$ ) è metà di  $\mu_{\max}$ ,  $Y_{x/S}$  [-] è la resa di conversione del substrato in biomassa.

Con l'introduzione di sostanze antibiotiche nel terreno di coltura si induce un cambiamento sul valore dei parametri che descrivevano la naturale cinetica batterica. In letteratura sono proposte relazioni che collegano dose di antibiotico e variazione dei parametri del modello. Gli esempi che si possono incontrare a riguardo, nei vari rami della microbiologia, dalla microbiologia industriale a quella ambientale, sono numerosi ma non hanno un valore generale e dipendono strettamente dal modello all'interno del quale sono inseriti. Anche in questo caso, l'equazione di Hill viene usata frequentemente per descrivere il legame dose risposta.

### 1.2.2 Descrizione dell'azione degli antibiotici

Gli agenti antibatterici sono classificati in base al tipo di azione che esercitano sulla crescita batterica. La classificazione riportata in Goodman e Gilman, (2008) , divide gli antibiotici in sei categorie, in base al meccanismo PD: (1) agenti che inibiscono la formazione della parete cellulare; (2) agenti che aumentano la permeabilità della parete cellulare favorendo la perdita di composti intracellulari; (3) farmaci che distruggono subunità ribosomiali impedendo la sintesi di proteine; (4) agenti che reagiscono con subunità ribosomiali e alterano la sintesi di proteine; (5) farmaci che inibiscono il metabolismo degli acidi nucleici; (6) antimetaboliti che bloccano l'attività di enzimi coinvolti nel metabolismo cellulare. Dall'osservazione di colture batteriche sottoposte all'azione degli antibiotici si distinguono due categorie diverse di antibiotici in base agli effetti prodotti sulla cinetica delle colture batteriche. Alcuni esplicano la loro azione aumentando la velocità di morte della coltura esercitando una azione battericida. Altri diminuiscono la velocità di crescita della carica batterica attraverso un'azione definita batteriostatica. Gli antibiotici battericidi aumentano l'effetto all'aumentare della loro concentrazione. Gli antibiotici batteriostatici invece non aumentano la loro efficacia all'aumentare della concentrazione ma è necessario che la loro concentrazione sia costantemente superiore ad un valore soglia. Da queste osservazioni è nata la necessità di creare degli indici che riflettano il diverso comportamento. La *MBC* (*minimum bactericidal concentration*) è la concentrazione minima che produce la morte completa dei batteri dopo un periodo di tempo fissato. La *MIC* (*minimum inhibitory concentration*) è la concentrazione minima alla quale si osserva l'arresto della crescita batterica.

In base ai valori assunti dagli indici, si può classificare l'azione dell'antibiotico come batteriostatica o battericida. L'antibiotico è detto batteriostatico se l'effetto inibente massimo viene raggiunto per concentrazioni pari a 5 o 6 volte la *MIC* e l'effetto non aumenta ulteriormente all'aumentare della concentrazione; tale tipo di antibiotici divengono efficaci se la loro azione si estende nel tempo perché diminuiscono la velocità di crescita favorendo la morte della popolazione batterica prodotta dal sistema immunitario dell'ospite. Quando la *MBC* non è superiore a tre o quattro volte il valore della *MIC*, l'azione dell'antibiotico è

classificata come battericida.

L'azione dell'antibiotico dipende dalle strategie difensive messe in atto dal batterio. La difesa dall'antibiotico può avvenire sfruttando tre meccanismi: insuccesso dell'antibiotico nel raggiungere il bersaglio; inattivazione dell'agente antibatterico; alterazione del bersaglio. La barriera costituita dalla parete esterna dei batteri Gram-positivi, impedisce la diffusione delle molecole polari verso l'ambiente intracellulare. Piccole molecole polari possono diffondere attraverso i canali formati dalle proteine (porine) presenti sulla parete esterna della cellula. Una ulteriore barriera è costituita dalla membrana cellulare e la cellula può attivare meccanismi che alterano il trasporto della molecola attraverso di essa. Inoltre la cellula possiede sistemi di trasporto attivo, che consentono l'efflusso di sostanze dalla cellula. La resistenza a molti tipi di antibiotici si basa su quest'ultimo meccanismo. L'inattivazione dell'agente antibatterico viene messa in atto grazie alla produzione di particolari enzimi che alterano la molecola di farmaco. E' il caso della produzione della  $\beta$ -lattamasi che reagisce con i  $\beta$ -lattami all'esterno della cellula, inattivandoli. Infine il batterio può alterare il bersaglio rendendo l'antibiotico inefficace, come nel caso della protezione ribosomiale dalle tetracicline e dai macrolidi.

### *1.2.3 Coltura dei batteri*

La coltura in vitro dei batteri avviene secondo due metodi: su substrato liquido oppure gelatinoso. Il substrato liquido, detto brodo di coltura, è indicato per la coltura quantitativa dei campioni e il loro mantenimento; mentre il substrato solido, composto in generale dal brodo di coltura con aggiunta di estratto di alcune alghe rosse, detto gel di agar, è utilizzato più estesamente nei laboratori perché consente di immobilizzare i batteri all'interno del terreno di coltura. La coltura di un particolare ceppo batterico prelevato dal paziente richiede che sia isolato un solo tipo di batterio tra quelli che possono essere presenti all'interno del campione. Si distribuisce il campione sul terreno di coltura solido in modo che le colonie formate si siano originate ciascuna da un singolo batterio. Il terreno può anche essere modificato con l'aggiunta di farmaci che favoriscono la selezione di un solo tipo di batterio. Dopo che si è riusciti a selezionare il batterio studiato si può realizzare la coltura pura inoculando i batteri isolati in un nuovo terreno. La misura della concentrazione batterica nella coltura può essere determinata o per via ottica attraverso misure di torbidità, o attraverso metodi di conta cellulare diretta al microscopio attraverso delle procedure per la determinazione del numero di cellule vive. Le misure di torbidità e la conta diretta sono misure rapide da ottenere ma non riescono a distinguere le cellule vive da quelle morte. La misura delle cellule vive si basa sulla messa a coltura su agar di un campione diluito secondo un opportuno fattore di diluizione, in modo che i batteri distribuiti sulla piastra di agar siano abbastanza lontani tra di loro da originare colonie distinte. Le colonie che si sono accresciute dopo il tempo di

incubazione vengono contaminate; il numero di colonie viene moltiplicato per il fattore di diluizione e si ottiene la concentrazione iniziale di cellule vive. Nella maniera appena descritta si riesce a misurare nel tempo, la concentrazione di cellule vive presenti nella coltura prelevando vari campioni. La conservazione di campioni della popolazione in ogni sua fase può essere ottenuta per varie vie: attraverso processi di crioconservazione, liofilizzazione, o stabilizzazione con agenti chimici.

### 1.2.3.1 Determinazione dell'antibiogramma

La determinazione della risposta dell'agente patogeno all'antibiotico viene descritta, come già detto, con l'uso degli indici *MIC* e *MBC*. Per ricavare gli indici si eseguono dei test di laboratorio che sono facilmente interpretabili. La *MIC* si ricava mettendo a coltura un identico campione batterico puro in diversi terreni formati dallo stesso substrato (ad esempio brodo Muller-Hinton) ma con concentrazioni iniziali di antibiotico crescenti. La *MIC* corrisponde alla concentrazione di antibiotico presente nel terreno avente la concentrazione di antibiotico più bassa in cui non si è sviluppata la popolazione batterica. Il metodo per misurare la *MBC* rileva la minima concentrazione necessaria per provocare la morte dell'intera popolazione batterica. Il test si esegue su piastra di agar dove, nella coltura vengono prodotti piccoli pozzetti nei quali è immesso antibiotico a diverse concentrazioni. Si osserva poi la concentrazione minima che ha provocato la scomparsa della popolazione batterica. Nel caso in cui si vogliono acquisire informazioni relative alla cinetica di sviluppo della popolazione batterica sottoposta all'antibiotico, si effettua lo studio della batteriocidia (*time-kill*). Al termine del test per identificare la *MIC* si misura la concentrazione batterica presente in tutti i campioni, rilevando la capacità della concentrazione iniziale di antibiotico di ridurre la carica batterica inoculata. Le prove cui ci si riferirà in questa tesi sono standardizzate secondo le norme fornite dal NCCLS (2003).

### *1.2.4 Sviluppo della farmaco-resistenza*

La sensibilità ad un antibiotico per il batterio specifico è determinata dalla concentrazione che è necessario impiegare per effettuare la cura. Se la concentrazione è tale da danneggiare anche le cellule dell'organismo allora il batterio viene detto resistente. Può accadere che una popolazione batterica che precedentemente era sensibile all'antibiotico, diventi resistente durante la cura, oppure può accadere che la terapia non riesca a eliminare completamente l'infezione e dopo il periodo di cura l'infezione si manifesti di nuovo. La resistenza ha l'effetto di rendere inefficaci antibiotici che erano usualmente impiegati per contrastare il batterio. Il problema dello sviluppo della resistenza è uno tra i principali problemi della sanità mondiale perché riduce la disponibilità di farmaci per le cure antimicrobiche (World Health

Organization, 2001). La resistenza antibiotica si sviluppa in seguito ad una selezione che è funzione della “pressione antibiotica”, ossia della quantità di farmaco che viene usato nel tempo. Le cause alla base del fenomeno sono dovute a mutazioni genetiche della popolazione sottoposta alla pressione antibiotica, ma sono anche stati evidenziati fenomeni di resistenza in cui non sono coinvolti meccanismi genetici. Nella resistenza spiegata da meccanismi genetici, la resistenza può essere acquisita per mutazione e selezione attraverso un processo verticale che viene trasmesso da una cellula genitore alle cellule figlie, oppure attraverso meccanismi orizzontali che dipendono da elementi genetici mobili come i plasmidi. Il meccanismo basato sulla mutazione e selezione è più lento rispetto a quello orizzontale, e si pensa che sia alla base della resistenza per alcuni tipi di infezione come quello del *M. Tuberculosis*. Altre teorie spiegano lo sviluppo della resistenza in alcune infezioni senza che intervengano fenomeni genetici nella popolazione batterica, ma attribuendo il fenomeno a dinamiche caratteristiche della popolazione. Spiegazioni dei meccanismi della resistenza fenotipica, legata al fenomeno della persistenza, si trovano in Kussel *et al.* (2005) e in Gefen e Balaban (2003).

Data la gravità del problema provocato dallo sviluppo della resistenza batterica, si cercano continuamente nuove tecniche per rilevare e contrastare questo fenomeno. Però a causa della difficoltà nel comprendere esattamente il problema non è ancora stato possibile definire un metodo generale. Tutti questi fattori concorrono ad alimentare la discussione sulle differenze tra resistenza fenotipica agli antibiotici e resistenza genetica. Nel tempo, sono state sviluppate tecniche complementari per affrontare il problema, essenzialmente sono due: una basata su test molecolari, l'altra su test di tipo fenotipico.

#### 1.2.4.1 Test molecolari

Test molecolari sono indicati per la rapida identificazione del tipo di batterio e per determinarne altre proprietà come fattori di virulenza e la resistenza agli antibiotici. Grazie alla rapidità delle analisi effettuate con test molecolari, questi sono utili per test clinici finalizzati alla terapia, ma anche per monitorare la diffusione negli ospedali e nella comunità di particolari fenomeni, come la presenza di batteri farmaco-resistenti. Inoltre rappresentano per la ricerca, uno strumento indispensabile per comprendere i meccanismi che regolano il funzionamento della cellula. I test molecolari offrono un sistema rapido e sensibile per rilevare la presenza di geni che producono determinate caratteristiche nei microorganismi, grazie alla possibilità di rilevare precise sequenze di acidi nucleici del DNA. La presenza di un gene, infatti, molte volte è indicativa della resistenza ad un farmaco. Tuttavia la rilevazione di un gene non predice necessariamente l'inefficacia della terapia perché l'espressione del gene nell'organismo può essere bassa. Infine il test molecolare non è utile se la resistenza è codificata da geni sconosciuti. I test molecolari sono particolarmente efficaci nel caso in cui i test fenotipici richiedano lunghi tempi. È il caso dei batteri caratterizzati da una cinetica di crescita lenta, come ad esempio i batteri che causano la tubercolosi farmaco resistente, oppure

per i microrganismi non coltivabili in vitro. I test molecolari si sono molto sviluppati negli ultimi decenni, grazie alla scoperta e messa a punto di diverse tecniche di rilevazione degli acidi nucleici. In generale le tecniche usate si distinguono in due gruppi principali: quelle basate sull'ibridizzazione, e quelle basate sull'amplificazione. I test molecolari sono economici, e particolarmente pratici perché non richiedono strumentazione di laboratorio complessa, però sono anche altamente specifici e costosi da sviluppare: deve essere realizzato un particolare test per affrontare ogni specifico problema (Fluit *et al.*, 2001).

#### 1.2.4.2 Test fenotipici

Le tecniche tradizionali della microbiologia rimangono indispensabili per studiare gli agenti patogeni. La caratterizzazione attraverso test fenotipici si basa sulle tecniche classiche per descrivere le colture batteriche. Le innovazioni portate a questo approccio derivano dai mezzi messi a punto per effettuare le colture batteriche e dall'applicazione di modelli per descrivere in maniera precisa la sensibilità e la resistenza dei batteri. Lo sforzo che viene fatto in questa direzione consiste nel perfezionare e rendere più informative le tecniche già impiegate. Si è precedentemente detto che la caratterizzazione della risposta al farmaco nei batteri avviene grazie alla misura di *MIC*, *MBC* e *AUC*. Per lo studio della batteriocidia l'uso di questi indici da soli non è sufficiente per caratterizzare il fenomeno della resistenza batterica. Test per lo studio *time-kill* sono relativamente semplici ed economici da effettuare, ma la relazione tra azione battericida o batteriostatica, concentrazione di agente antimicrobico ed andamento della risposta nel tempo non sono caratterizzati in maniera quantitativa. Inoltre spesso viene osservato un fenomeno di ricrescita della popolazione batterica sottoposta all'antibiotico dopo una prima iniziale diminuzione. Sebbene questo sia noto, usualmente non viene tenuto in considerazione nelle analisi, perché negli studi di batteriocidia viene riportato il valore finale della concentrazione di ogni sistema osservato. La ricrescita della popolazione batterica dopo un iniziale periodo di declino è dovuta alla presenza di una, o più, subpopolazioni di batteri più resistenti alla concentrazione di antibiotico che, con il tempo, si sviluppano sostituendo la popolazione sensibile (Lipsitch e Levin, 1997). In questo modo un dosaggio insufficiente di antibiotico porta ad amplificare la popolazione più resistente. La modellazione matematica del fenomeno può favorire la scelta ottimale della terapia antibiotica fornendo lo strumento per stabilire tempi e dosaggio corretti del farmaco (Jumbe *et al.*, 2003).

La descrizione della ricrescita durante lo studio di batteriocidia è stata affrontata secondo varie strategie. In generale si può modellare una popolazione batterica ammettendo che sia funzione di proprietà variabili nel tempo, oppure si può modellare il sistema come insieme di due subpopolazioni che si sviluppano contemporaneamente in competizione tra di loro.

In letteratura si possono trovare diversi modelli che propongono uno dei due approcci.

Ad esempio, nell'articolo di Tam *et al.* (2005a) è stato sviluppato un modello in cui lo sviluppo della resistenza è descritto da un termine variabile che è funzione del tempo e della

concentrazione iniziale:

$$\frac{dN}{dt} = G(N(t)) - K(C(t), N(t), t) \quad , \quad (1.5)$$

$$G(N(t)) = K_g \left[ 1 - \frac{N(t)}{N_{\max}} \right] N(t) \quad , \quad (1.6)$$

$$K(C(t), N(t)) = \left[ \frac{K_k \cdot C(t)^H}{C(t)^H + (\alpha(C(t), t) C_{50k})^H} \right] N(t) \quad , \quad (1.7)$$

$$\alpha = 1 + \beta \left( 1 - e^{-C(t) \cdot \tau} \right) \quad . \quad (1.8)$$

Il modello proposto da [riferimento: ] è formato da un'equazione differenziale (1.5) composta da un termine  $G$  (1.6) che esprime lo sviluppo durante la fase di crescita naturale di una coltura in vitro  $N$  [cfu·mL<sup>-1</sup>] e da un termine  $K$  di scomparsa della popolazione (1.7). Il termine di scomparsa è formato da un coefficiente di  $N$  che utilizza l'equazione di Hill per esprimere il legame tra concentrazione di antibiotico e il suo effetto sulla morte. L'espressione utilizzata contiene un termine dipendente dal tempo (1.8) che riproduce l'amplificazione della popolazione resistente e consente di modellare la ricrescita. Il modello di Tam è stato studiato esclusivamente per descrivere l'andamento della batteriocidia in vitro. La concentrazione di antibiotico indicata come variabile di stato è da considerare come costante. Il significato dei parametri è riportato nella Tabella 1.1:

**Tabella 1.1** Parametri del modello di Tam *et al.* (2005a)

Parametro	Dimensioni	Descrizione
$K_g$	[hr <sup>-1</sup> ]	Velocità massima di crescita
$N_{\max}$	[cfu·mL <sup>-1</sup> ]	Carica batterica massima
$K_k$	[hr <sup>-1</sup> ]	Velocità massima di morte
$C_{50k}$	[mg·L <sup>-1</sup> ]	Concentrazione alla quale si ha metà dell'effetto di $K_k$
$H$	[-]	Costante di sigmoidicità
$\beta$	[-]	Adattamento massimo
$\tau$	[L·mg <sup>-1</sup> ·hr <sup>-1</sup> ]	Fattore della velocità di adattamento

Un'applicazione del modello di Tam *et al.* (2005a) si può trovare anche in Grégoire *et al.* (2010).

L'esempio di un modello che descrive due subpopolazioni viene riportato in un altro articolo di Tam *et al.* (2005b):



$$\frac{dX_1}{dt} = R - \left( \frac{SLC}{V_C} \right) X_1 \quad , \quad (1.9)$$

$$\frac{dN_S}{dt} = (K_{g-S}E - K_{k-S}M)N_S \quad , \quad (1.10)$$

$$\frac{dN_R}{dt} = (K_{g-R}E - K_{k-R}M)N_R \quad , \quad (1.11)$$

$$E = \left[ 1 - \frac{N_R + N_S}{POP_{\max}} \right] \quad , \quad (1.12)$$

$$M = \left[ \frac{(X_1/V_C)^H}{(X_1/V_C)^H + EC_{50}^H} \right] \quad . \quad (1.13)$$

L'equazione (1.9) descrive la variazione dell'antibiotico ( $X_1$  [mg]) nel tempo; l'equazione (1.10) descrive la crescita della subpopolazione sensibile agli antibiotici ( $N_S$  [cfu·mL<sup>-1</sup>]); l'equazione (1.11) descrive la variazione della subpopolazione resistente ( $N_R$  [cfu·mL<sup>-1</sup>]); l'equazione (1.12) è una funzione logistica per limitare lo sviluppo massimo della popolazione batterica; l'equazione (1.13) è una relazione sigmoideale che descrive dose-risposta e viene assunta identica per le due subpopolazioni. In questo modello vengono uniti un modello farmacocinetico (1.9) ed uno farmacodinamico (1.10 -1.13). Nell'equazione (1.9),  $R$  [mg·hr<sup>-1</sup>] è la velocità di infusione dell'antibiotico nel compartimento,  $SLC$  [L·hr<sup>-1</sup>] è la clearance dell'antibiotico,  $V_c$  [L] è il volume del compartimento. I parametri del modello PD sono riportati nella tabella seguente:

**Tabella 1.2.** Parametri del modello di Tam et al. (2005b)

Parametro	Dimensioni	Descrizione
$K_{g-S}$	[hr <sup>-1</sup> ]	Velocità di crescita della popolazione sensibile
$K_{k-S}$	[hr <sup>-1</sup> ]	Velocità di morte della popolazione sensibile
$K_{g-R}$	[hr <sup>-1</sup> ]	Velocità di crescita della popolazione resistente
$K_{k-R}$	[hr <sup>-1</sup> ]	Velocità di morte della popolazione resistente
$POP_{\max}$	[cfu·mL <sup>-1</sup> ]	Carica batterica totale massima
$H$	[-]	Costante di sigmoidicità
$EC_{50}$	[mg·mL <sup>-1</sup> ]	Concentrazione alla quale si ha metà dell'effetto di M

La descrizione fenotipica della resistenza batterica è utile non solo per individuare il fenomeno ma fornisce anche le indicazioni per contrastarlo o limitarlo. Non è detto, infatti, che la presenza di stipti batterici resistenti non possa consentire l'applicazione della cura

tradizionale, anzi è proprio sulla corretta scelta della dose e dei tempi che si basa il successo della terapia. È stato osservato che l'uso di concentrazioni troppo basse favorisce l'amplificazione della popolazione resistente. È emerso che esiste una finestra (Drlica, 2003) che può provocare l'emergere della resistenza, il fenomeno invece non si ha quando la concentrazione è o più bassa, perché la subpopolazione resistente viene limitata dalla popolazione sensibile, o nell'altro caso, quando la concentrazione è più alta perché risulta adeguata per eliminare anche la popolazione più resistente.

### **1.3 Progettazione di esperimenti applicata a sistemi biologici**

Nonostante i vantaggi portati dalla modellazione matematica dei sistemi biologici, la descrizione quantitativa della realtà presenta diverse difficoltà. Per rappresentare correttamente il sistema studiato è necessario produrre dati sperimentali, sviluppare il modello, utilizzare i dati per stimare i parametri e convalidare il modello. Fare uso di dati prodotti da esperimenti non progettati potrebbe non consentire di ricavare l'informazione ricercata, sia a causa delle componenti aleatorie che si manifestano in ogni attività sperimentale sia per il fatto che i dati potrebbero non sondare adeguatamente lo spazio di utilizzo del modello. Sono state sviluppate, quindi, delle tecniche, note come progettazione ottimale degli esperimenti, con lo scopo di minimizzare le risorse necessarie per acquisire la massima informazione possibile sul sistema osservato. Centrale, in ogni progettazione di esperimenti, è l'identificazione del sistema studiato, grazie alla stima accurata dei parametri del modello. Questo problema, detto anche problema di identificazione parametrica, non sempre è risolvibile, a causa della struttura del modello, dei sistemi di misura, della tipologia di esperimenti. Lo studio della struttura del modello al fine di verificare la possibilità di identificare parametricamente il modello fa parte dello studio di identificabilità. La scelta dei sistemi di misura e delle condizioni alle quali sono condotte le prove, appartengono invece, alla progettazione di esperimenti propriamente detta.

Lo scopo di questa Tesi è applicare le tecniche di progettazione degli esperimenti ai modelli biologici descritti in precedenza, mostrare le difficoltà di identificazione parametrica per alcuni modelli e indicare opportune strategie di progettazione per correggere il problema. Nel prossimo capitolo si esporranno le basi teoriche dell'identificabilità dei modelli e della progettazione degli esperimenti.

# Capitolo 2

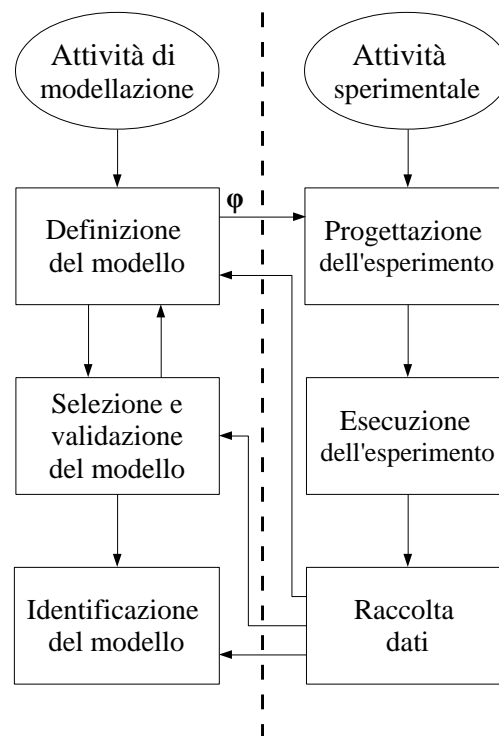
## Progettazione ottimale di esperimenti basata sul modello

La conoscenza di un sistema fisico, chimico, biologico, ecc., avviene attraverso la realizzazione di esperimenti. L'informazione quantitativa che si ottiene dagli esperimenti, sottoforma di misurazioni, ha la necessità di essere rappresentata attraverso strumenti statistici e matematici per verificare in maniera oggettiva le motivazioni che avevano portato a realizzare gli esperimenti stessi (Atkison e Donev, 1992). Nel capitolo precedente si è introdotta l'opportunità di applicare modelli per descrivere i sistemi biologici, e si è mostrata la possibilità di ricondurre la descrizione di sistemi biologici ai parametri dei modelli da cui sono rappresentati. Scegliere i parametri, il modello e le condizioni sperimentali, sono attività strettamente connesse. Tuttavia, può accadere che l'esito degli esperimenti non sia redditizio in termini dell'informazione raccolta. Per prevenire esiti negativi, occorre progettare gli esperimenti per stabilire quali siano le condizioni migliori per acquisire l'informazione sul sistema studiato. L'obiettivo di questo capitolo è illustrare il significato e le basi teoriche della progettazione di esperimenti basata sul modello.

### 2.1 Progettazione di esperimenti

La raccolta dei dati sperimentali può impegnare molte risorse; c'è quindi la necessità di pianificare gli esperimenti in maniera sistematica in modo da ottenere la massima informazione dai dati, risparmiando sui costi, sulle risorse umane impiegate, e minimizzando il tempo necessario per eseguire le prove. L'insieme di tecniche sviluppate per realizzare esperimenti in maniera efficace viene denominato progettazione ottimale di esperimenti (DoE, design of experiments). Il DoE nasce da considerazioni statistiche, con lo scopo di valutare, in anticipo, l'affidabilità delle conclusioni che si possono trarre da un esperimento. L'invenzione del DoE è del matematico e statistico Ronald A. Fisher, che sviluppò la tecnica della progettazione fattoriale degli esperimenti (Fisher, 1935). I fattori, sono delle variabili casuali, che possono essere modificate all'interno dell'intervallo di progetto per studiare la risposta del sistema osservato. Nella progettazione fattoriale si cerca, principalmente attraverso l'analisi della varianza, una relazione tra le variabili casuali in ingresso (fattori) e le variabili casuali in uscita del sistema su cui si eseguono gli esperimenti. L'attività di

modellazione procede parallelamente all'attività sperimentale, ed esiste una continua integrazione tra i due processi, come è mostrato nella Figura 2.1.



**Figura 2.1** L'attività di modellazione e l'attività sperimentale si sviluppano parallelamente nell'applicazione delle tecniche DoE, con un continuo scambio tra la parte applicata e quella teorica. La variabile di progetto dell'esperimento è  $\phi$ , e contiene gli elementi che definiscono l'esperimento (Galvanin, 2010).

I dati sperimentali forniscono l'informazione per costruire il modello, selezionare e validare e infine eseguire l'identificazione parametrica del modello stesso. Se il sistema osservato è rappresentato correttamente, allora il modello può fornire le variabili (rappresentate dal vettore  $\phi$ , il cui significato verrà esplicitato nel seguito) per progettare nuovi esperimenti più informativi. Tecniche di DoE vengono applicate solitamente quando l'informazione pregressa sul sistema è nulla, e forniscono delle relazioni semplici tra fattori e risposta del sistema; in genere si trovano funzioni di tipo lineare, parabolico, o più in generale di tipo polinomiale (Box e Wilson, 1951). Lo svantaggio del DoE è dovuto alla necessità di ottenere molti dati per costruire un modello, soprattutto quando i fattori sono molti; inoltre, le relazioni ottenute spesso hanno validità locale e non è possibile determinare l'errore che si commette estrapolando l'uso del modello dai dati ottenuti.

Nei sistemi fisici, diversamente, la conoscenza iniziale non è nulla, in quanto in questi ambiti è usuale indagare i fenomeni fisici, descrivendo i principi primi che li governano. L'approccio deterministico nello studio dei fenomeni, implica che ogni manifestazione rilevata in un sistema sia riconducibile ad un preciso valore delle variabili e dei parametri che lo

caratterizzano. Nella descrizione fisica (anche se meno in sistemi di tipo biologico), viene sviluppata una modellazione matematica del sistema che deve essere validata nella fase sperimentale. Gli esperimenti necessari, possono essere progettati impiegando tecniche DoE; tuttavia la progettazione di esperimenti, per essere ottimale, deve considerare anche l'informazione che è contenuta nel modello. Per questo motivo si parla di MBDoE (Galvanin, 2010), ossia progettazione ottimale di esperimenti basata sul modello (*model based design of experiments*). La rappresentazione dell'applicazione di un MBDoE è simile a quella DoE della Figura 2.1, ma l'impiego dei dati è minore perché si sfrutta fin dall'inizio l'informazione posseduta dal modello. In letteratura si possono trovare esempi di progettazione basata sul modello applicata a vari campi; alcuni esempi nel campo della biologia si trovano in Espie e Macchietto (1989) e più recentemente un esempio applicato alla cinetica chimica è riportato in Atkinson e Bogacka (2002).

L'MBDoE è lo strumento indicato quando si indagano fenomeni dipendenti dal tempo, il cui andamento è formulato da un sistema di equazioni algebrico - differenziali (DAE, *differential algebraic equations*). Il modello  $\mathbf{M}$  può essere rappresentato nella forma vettoriale seguente (Franceschini e Macchietto, 2008b) :

$$\mathbf{M} : \begin{cases} \mathbf{f}(\dot{\mathbf{x}}(t), \mathbf{x}(t), \mathbf{u}(t), \mathbf{w}, \boldsymbol{\theta}, t) = 0 \\ \mathbf{y}(t) = \mathbf{h}(\mathbf{x}(t)) \end{cases} \quad (2.1)$$

dove i termini presenti significano:

- $\mathbf{x}(t)$  sono un set di  $N_x$  variabili di stato, che definiscono lo stato del sistema;
- $\mathbf{u}(t)$  è il vettore dipendente dal tempo, di dimensioni  $N_u$ , contenente le variabili manipolabili, ossia gli ingressi del sistema che possono essere modificati durante gli esperimenti; ogni variabile manipolata viene fatta variare secondo delle funzioni particolari (le più comuni sono funzioni costanti a tratti, e funzioni lineari a tratti);
- $\mathbf{w}$  è il vettore di variabili manipolabili non dipendenti dal tempo, di dimensioni  $N_w$ ; le variabili sono impostate prima dell'esecuzione dell'esperimento e rimangono costanti durante l'esecuzione;
- $\boldsymbol{\theta}$  è il vettore dei parametri contenente  $N_\theta$  elementi, che solitamente sono da stimare; la stima dei parametri viene indicata come  $\hat{\boldsymbol{\theta}}$ ;
- $\mathbf{y}(t)$ , è un vettore di dimensioni  $N_y$ , contenente le uscite del sistema, le risposte stimate del modello vengono invece indicate come  $\hat{\mathbf{y}}(t)$ ;
- $\mathbf{h}()$ , rappresenta il selettore delle uscite del modello, ed è una funzione delle variabili di stato;
- $t$  è il tempo dell'esperimento; e assume tutti i valori compresi tra 0 (inizio dell'esperimento) e  $\tau$  (fine dell'esperimento).

Inoltre, si deve definire quale è lo spazio dell'esperimento, costituito dagli intervalli di realizzabilità, all'interno di ciascuno dei quali è scelta ogni variabile di progetto dell'esperimento. Le variabili di progetto dell'esperimento, ossia tutte le variabili di controllo che possono essere modificate prima e durante l'esperimento e nell'ottimizzazione, sono raccolte nel vettore  $\boldsymbol{\varphi}$ :

$$\boldsymbol{\varphi} = \boldsymbol{\varphi}(\mathbf{u}(t), \mathbf{y}_0, \tau, \mathbf{w}, \mathbf{t}^{sp}) \quad , \quad (2.3)$$

Il vettore  $\mathbf{t}^{sp}$  contiene gli istanti nei quali sono raccolti i dati campionati; è di dimensione  $n_{sp}$  e può variare tra 0 e  $\tau$ , mentre  $\mathbf{y}_0$  è il set di condizioni iniziali delle variabili del modello.

La progettazione MBDoE viene applicata con due principali obiettivi: la scelta tra modelli per descrivere il sistema; oppure l'identificazione parametrica del modello, ossia la stima accurata dei suoi parametri (Chen e Asprey, 2003). La scelta tra modelli, detta anche identificazione del modello, prevede:

- la progettazione MBDoE per ogni modello considerato;
- l'esecuzione degli esperimenti;
- la stima dei parametri;
- test per scegliere il modello che dà risultati migliori.

La stima dei parametri, invece, è finalizzata a rappresentare nella maniera più veritiera il sistema osservato, attraverso la determinazione dei parametri del modello. L'identificazione del modello, deve precedere la stima dei parametri, nel caso in cui non sia già stato scelto.

Sia nell'identificazione del modello, sia nell'identificazione parametrica, deve essere preventivamente studiata l'identificabilità del modello, ossia la possibilità di ottenere l'identificazione parametrica prima dell'esecuzione dell'esperimento. Essa consiste nel trovare una soluzione unica o limitata al problema della stima dei parametri, in presenza di dati sufficienti e non affetti da errore. L'identificabilità è una caratteristica intrinseca del modello e dipende dalla sua formulazione matematica.

Nella trattazione successiva di questo capitolo si concentrerà l'attenzione sul problema dell'identificabilità del modello; poi verranno esposte le basi teoriche della progettazione di esperimenti e della stima dei parametri. Si suppone, in tutta la trattazione successiva, che il sistema reale sia perfettamente rappresentabile attraverso il modello, o detto in un altro modo, che non ci sia alcun *mismatch* tra modello e realtà. Perché sia valida questa ipotesi, è necessario che il sistema sia rappresentabile in maniera deterministica e tutte le variabili di stato del modello possano assumere esattamente gli stessi profili che le quantità rappresentate dalle variabili di stato assumono nella realtà.

## 2.2 Identificabilità

L'identificabilità può essere distinta in identificabilità strutturale, detta anche *a priori*, e in identificabilità locale. L'identificabilità strutturale, ha lo scopo di dimostrare la possibilità di stimare i parametri come proprietà del modello, indipendentemente dai dati misurati e dall'incertezza presente nei dati. L'identificabilità locale viene anch'essa condotta *a priori*, ma per una particolare configurazione del sistema. L'identificabilità strutturale viene studiata principalmente grazie ai metodi analitici, oppure può essere condotta localmente per mezzo di tecniche numeriche.

### 2.2.1 Identificabilità strutturale

L'identificabilità strutturale viene definita per tutti i valori che è possibile assegnare ai set parametrici e per tutti gli ingressi al modello. L'identificabilità strutturale del modello può essere globale (o univoca), locale (o non univoca) oppure può non esistere, (Saccomani *et al.*, 2003).

- Il modello è identificabile strutturalmente in maniera univoca se e solo se, data l'identità:

$$\mathbf{M}(\boldsymbol{\theta}) = \mathbf{M}(\boldsymbol{\theta}^*) \quad , \quad (2.4)$$

questa è vera per un'unica soluzione  $\boldsymbol{\theta} = \boldsymbol{\theta}^*$ .

- Il modello è localmente (o non univocamente) identificabile strutturalmente, se e solo se, esistono più set parametrici  $\boldsymbol{\theta}^*$ , ma in numero finito, per i quali è vera l'uguaglianza precedente (2.4).
- Il modello è non identificabile strutturalmente, se e solo se, per almeno un parametro  $\theta_i$ , la (2.4) è soddisfatta per ogni valore di  $\theta_i$ .

Il modello è *a priori* strutturalmente identificabile globalmente (o univocamente) se tutti i suoi parametri globalmente (o univocamente) sono identificabili; è localmente (o non univocamente) identificabile strutturalmente, se tutti i parametri sono identificabili con almeno un parametro non univocamente identificabile; è non identificabile strutturalmente se almeno un parametro è non identificabile.

Sono stati proposti diversi metodi per provare l'identificabilità strutturale di modelli. Tuttavia, stabilire l'identificabilità strutturale per un modello non lineare è particolarmente difficile e rimane un problema che non può essere trattato in generale. L'identificabilità dei modelli lineari si basa su tecniche che applicano le trasformate di Laplace (Walter e Pronzato, 1996). Per i modelli non lineari invece, i metodi sviluppati si basano sullo sviluppo in serie di potenze (Pohjanpalo, 1978). Possono essere applicate le serie di Taylor al tempo  $t = 0$ , della funzione in uscita, oppure il modello è espanso in serie i cui coefficienti sono calcolati usando le derivate di Lie (Walter e Pronzato, 1996). Altre tecniche si fondano sull'algebra

differenziale (Margaria *et al.*, 2001), queste hanno permesso lo sviluppo di software per l'identificabilità globale di sistemi biologici descritti da funzioni polinomiali o razionali. Tra i software sviluppati si ricorda GLOBI (Audoly *et al.*, 1998), e il software DAISY (Bellu *et al.*, 2007).

### 2.2.2 Identificabilità locale

La limitata applicabilità delle tecniche per testare l'identificabilità strutturale, nonostante la necessità di ottenere comunque informazioni sull'identificabilità del sistema, ha prodotto lo sviluppo di metodi numerici per testare l'identificabilità locale (da non confondere con l'identificabilità locale strutturale). L'identificabilità locale viene determinata in prossimità di un determinato set parametrico. Essa mira a determinare se esistono altri set di parametri nell'intorno dei parametri studiati, che producono la stessa uscita del modello.

Lo studio dell'identificabilità locale si basa sull'analisi di sensitività delle uscite rispetto ai parametri. Il problema dell'identificabilità locale del modello coincide con il problema di stimabilità univoca dei parametri in assenza di errore sperimentale e con un numero sufficiente di punti campionati (la stimabilità è condotta però, in un intorno dei parametri considerati, perché non è strutturale ma locale).

Per introdurre i test di identificabilità locale è necessario introdurre alcune definizioni. Sia  $\theta$  il vettore dei parametri del modello  $\theta = [\theta_1, \theta_2, \dots, \theta_{N_\theta}]$ ; la sensitività dinamica di una uscita  $y_i$  rispetto la parametro  $\theta_j$ , al tempo generico  $t_k$ , è definita dalla matrice  $\mathbf{Q}_i$ , i cui elementi sono:

$$q_{i,kj} = \left. \frac{dy_i}{d\theta_j} \right|_{t_k}, \quad (2.5)$$

di dimensioni  $n_{sp} \times N_\theta$ .

Si possono anche raccogliere le sensitività delle diverse uscite  $y_i$ , in un determinato istante  $t_k$ , e scrivere la matrice  $\mathbf{S}_y$ :

$$s_{y,ij}(t_k) = \left. \frac{dy_i}{d\theta_j} \right|_{t_k}, \quad (2.6)$$

che ha dimensioni  $N_y \times N_\theta$ , dove  $N_y$  è il numero di uscite del modello.

Al fine di studiare la stimabilità di un set di parametri si costruisce la matrice di stimabilità  $\mathbf{P}_E$  (Shawn, 1999):



$$\mathbf{P}_E = \begin{bmatrix} \mathbf{S}_y(t_0) \\ \vdots \\ \mathbf{S}_y(t_{n_{sp}}) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \left. \frac{dy_1}{d\theta_1} \right|_{t_0} & \dots & \left. \frac{dy_1}{d\theta_{N_\theta}} \right|_{t_0} \\ \dots & \ddots & \dots \\ \left. \frac{dy_{n_y}}{d\theta_1} \right|_{t_0} & \dots & \left. \frac{dy_{n_y}}{d\theta_{N_\theta}} \right|_{t_0} \\ \vdots & & \vdots \\ \left. \frac{dy_1}{d\theta_1} \right|_{t_{n_{sp}}} & \dots & \left. \frac{dy_1}{d\theta_{N_\theta}} \right|_{t_{n_{sp}}} \\ \dots & \ddots & \dots \\ \left. \frac{dy_{n_y}}{d\theta_1} \right|_{t_{n_{sp}}} & \dots & \left. \frac{dy_{n_y}}{d\theta_{N_\theta}} \right|_{t_{n_{sp}}} \end{bmatrix}, \quad (2.7)$$

che ha dimensioni  $(n_{sp} \cdot N_y) \times N_\theta$ .

Un test che si può condurre per verificare l'identificabilità locale è la determinazione del rango di  $\mathbf{P}_E$ . Se  $\text{rango}(\mathbf{P}_E) < N_\theta$  allora i coefficienti di sensitività sono linearmente dipendenti e non è possibile stimare tutti i parametri.

Un secondo test, calcola la correlazione tra le colonne di  $\mathbf{P}_E$  (Beck e Arnold 1977). L'indicazioni che si ottengono dal test forniscono anche indicazioni preliminari sulla difficoltà di stimare i parametri.

La correlazione tra le colonne è data da:

$$c_{ij} = \frac{v_{ij}}{\sqrt{v_{ii} \cdot v_{jj}}}, \quad (2.8)$$

dove  $v_{ij}$  è l'elemento corrispondente della matrice di covarianza di  $\mathbf{P}_E$ :

$$v_{ij} = E[(p_{Ei} - \mu_i)(p_{Ej} - \mu_j)] \quad (2.3)$$

$p_{Ei}$  è un elemento della colonna di  $\mathbf{P}_E$ ,  $\mu_i$  è la media degli elementi della colonna  $i$ -esima, ed  $E$  indica il valore atteso.

I parametri che sono localmente identificabili hanno correlazioni con gli altri parametri che variano tra -1 e +1. I parametri che non sono localmente identificabili hanno correlazioni che sono esattamente -1 o +1. In ogni caso esaminato, si deve scegliere opportunamente l'intervallo di tempo massimo tra le  $\mathbf{S}_y(t)$  in modo tale che gli istanti di tempo siano abbastanza ravvicinati da non influenzare il calcolo della correlazione. La perfetta correlazione tra due parametri significa che le variabili misurabili sono influenzate nella stessa maniera (o in maniera opposta), da entrambi i parametri. Quando le correlazioni sono comunque elevate tra parametri, solitamente superiori a 0.99, è possibile, che in fase di stima,

a causa dell'errore presente nei dati e del numero limitato di campionamenti, il sistema diventi non identificabile. Inoltre si deve ricordare che il test sono eseguiti localmente, quindi è possibile che i problemi emersi per particolari condizioni (valori dei parametri, traiettorie, ecc. ) spariscano con condizioni differenti.

Un diverso approccio per studiare l'identificabilità, proposto da Asprey e Macchietto (2002), è basato sull'ottimizzazione. Per avere identificabilità, si deve verificare che rendendo massima la distanza tra due vettori di parametri qualsiasi  $\theta$  e  $\theta^*$ , questa sia arbitrariamente piccola per ottenere lo stesso output del modello. La condizione verificata deve essere valida per tutti gli ingressi che è possibile fornire al modello. Si deve stabilire lo spazio dei parametri  $\Theta$ , la durata dell'esperimento  $\tau$ , lo spazio degli ingressi  $\mathbf{U}$ , e le condizioni iniziali  $\mathbf{y}_0$ ; formalmente si ha identificabilità se:

$$\max_{\theta \in \Theta, \theta^* \in \Theta^*} (\theta - \theta^*)^T \mathbf{W}_\theta (\theta - \theta^*) \leq \varepsilon_\theta \quad , \quad (2.10)$$

e contemporaneamente sono rispettate le seguenti condizioni:

$$\int_0^t (\mathbf{y}(\mathbf{u}(t), \theta) - \mathbf{y}(\mathbf{u}(t), \theta^*))^T \mathbf{W}_y (\mathbf{y}(\mathbf{u}(t), \theta) - \mathbf{y}(\mathbf{u}(t), \theta^*))) dt < \varepsilon_y, \forall \mathbf{u}(t) \in \mathbf{U} \quad , \quad (2.11)$$

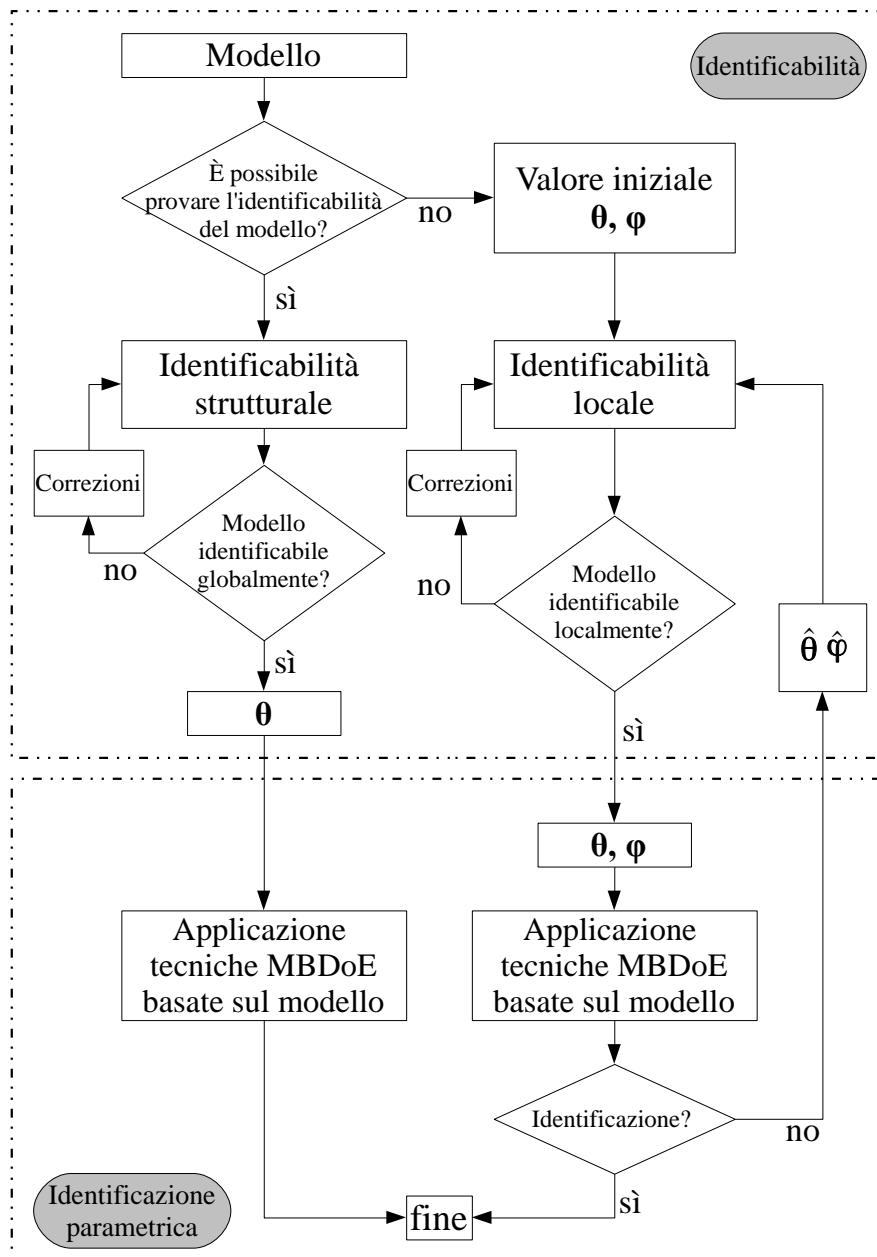
$$\mathbf{f}(\dot{\mathbf{x}}(t), \mathbf{x}(t), \mathbf{u}(t), \mathbf{w}, \theta, t) = 0;$$

dove  $\varepsilon_\theta$  e  $\varepsilon_y$  sono quantità positive piccole a piacere, e  $\mathbf{W}_\theta$ ,  $\mathbf{W}_y$  sono delle matrici dei pesi. Lo studio di identificabilità locale può essere esteso effettuando uno studio *multi-local* (Davidescu e Jørgensen , 2008). Non è propriamente uno studio globale, perché solamente un approccio *a priori* consente di verificare l'identificabilità globale, grazie allo studio analitico del problema. Lo studio può essere eseguito su tutto lo spazio dei parametri attraverso algoritmi numerici, attraverso tecniche di programmazione semi-infinita (Zacovic *et al.* 2003). La prova di identificabilità globale per via numerica richiede comunque uno sforzo computazionale molto. Solamente per alcuni sistemi di piccole dimensioni può essere ottenuto uno studio che sia globale, mentre per sistemi grandi può non essere nemmeno realizzabile.

La verifica di identificabilità globale del modello rappresenta una procedura preliminare che dà informazioni certe per la successiva applicazione del modello. Le tecniche matematiche applicabili non sono tuttavia generali e spesso, soprattutto per i modelli biologici, la complessità del problema cresce esponenzialmente con l'aumentare dei parametri e degli stati del modello. Dall'altro lato l'approccio di tipo numerico, sebbene rappresenti un sistema più generale per risolvere il problema dell'identificabilità, richiede capacità di calcolo molto elevata e non è sempre possibile ottenere una soluzione nel caso di grandi sistemi, a causa del tempo richiesto.

## 2.3 Implementazione MBD<sub>oE</sub>

È opportuno eseguire lo studio dell'identificabilità del modello prima della progettazione MBD<sub>oE</sub>. Lo studio dell'identificabilità è una procedura preliminare che deve essere inclusa in ogni implementazione MBD<sub>oE</sub>.



**Figura 2.2.** La fase di identificazione parametrica (il rettangolo tratteggiato inferiore) è preceduta dallo studio di identificabilità (parte superiore).  $\theta$  è il vettore dei parametri di progetto,  $\hat{\phi}, \hat{\theta}$  sono rispettivamente il vettore ottenuto dalla progettazione, e il vettore dei parametri stimati.

La Figura 2.2 illustra una metodologia generale per l'applicazione di tecniche MBD<sub>oE</sub>: una prima serie di attività ("Identificabilità") contiene lo studio dell'identificabilità; una seconda

procedura (“Identificazione parametrica”) serve per la stima dei parametri. Poiché si è assunto che non ci sia *mismatch* tra modello e realtà, si è omessa una sezione intermedia che contiene la discriminazione del modello.

Nel paragrafo precedente si è visto che l’identificabilità può essere condotta globalmente, oppure localmente.

Se non si riesce ad applicare un metodo per lo studio dell’identificabilità globale del modello esaminato, ci si deve limitare ad uno studio locale. È evidente, dalla stessa Figura 2.2, che provare l’identificabilità globale è un risultato generale e definitivo, mentre testare solo l’identificabilità locale genera un processo di retroazione tra l’identificabilità locale e l’identificazione. Ciò può comportare la necessità di esperimenti più numerosi o l’insuccesso finale della stima dei parametri.

Le strade che si seguono in un caso o nell’altro contengono differenze sostanziali. Nel caso di realizzabilità di uno studio di identificabilità strutturale:

- se si riesce a provare l’identificabilità strutturale del modello, si può passare all’identificazione parametrica, basando la progettazione sulla migliore stima disponibile che si possiede del vettore  $\theta$ . La stima iniziale di  $\theta$  solitamente proviene da dati di letteratura, esperimenti realizzati in precedenza, oppure un valore di tentativo casuale;
- se il modello non è identificabile globalmente bisogna applicare delle correzioni al modello ed eseguire una nuova verifica sull’identificabilità strutturale.

Le correzioni che si possono apportare al modello sono:

- la sua riparametrizzazione, ossia una riformulazione algebrica dei parametri (alcuni esempi sono riportati da Biegler *et al.*, 1986);
- scegliere di fissare uno o più parametri;
- modificare il vettore dell’esperimento, introducendo altre variabili controllate;
- modificare la funzione  $h$  dell’equazione (2.2), introducendo nuove variabili misurate;
- modificare il modello stesso.

Inoltre, nel caso in cui non sia possibile provare l’identificabilità del modello globalmente, può essere necessario ridefinire lo spazio dei parametri con il proseguire dell’attività di progettazione, in modo da eliminare le regioni nello spazio dei parametri nelle quali il modello è non identificabile. Si osserva che modificare il modello significa, rigettare il modello studiato e sceglierne un altro, effettuando un’azione di identificazione del modello.

È importante notare che lo studio strutturale del modello viene condotto per un vettore qualsiasi  $\theta$ , e per tutte le variabili di progetto che è possibile fornire al sistema che costituiscono il vettore  $\phi$ , perciò se viene stabilita l’identificabilità strutturale di un modello, si è dimostrata una proprietà generale valida per qualsiasi esperimento.

Nel caso di *non* realizzabilità di uno studio di identificabilità strutturale:

- si deve scegliere il vettore  $\theta$  secondo gli stessi criteri usati nella situazione precedente;

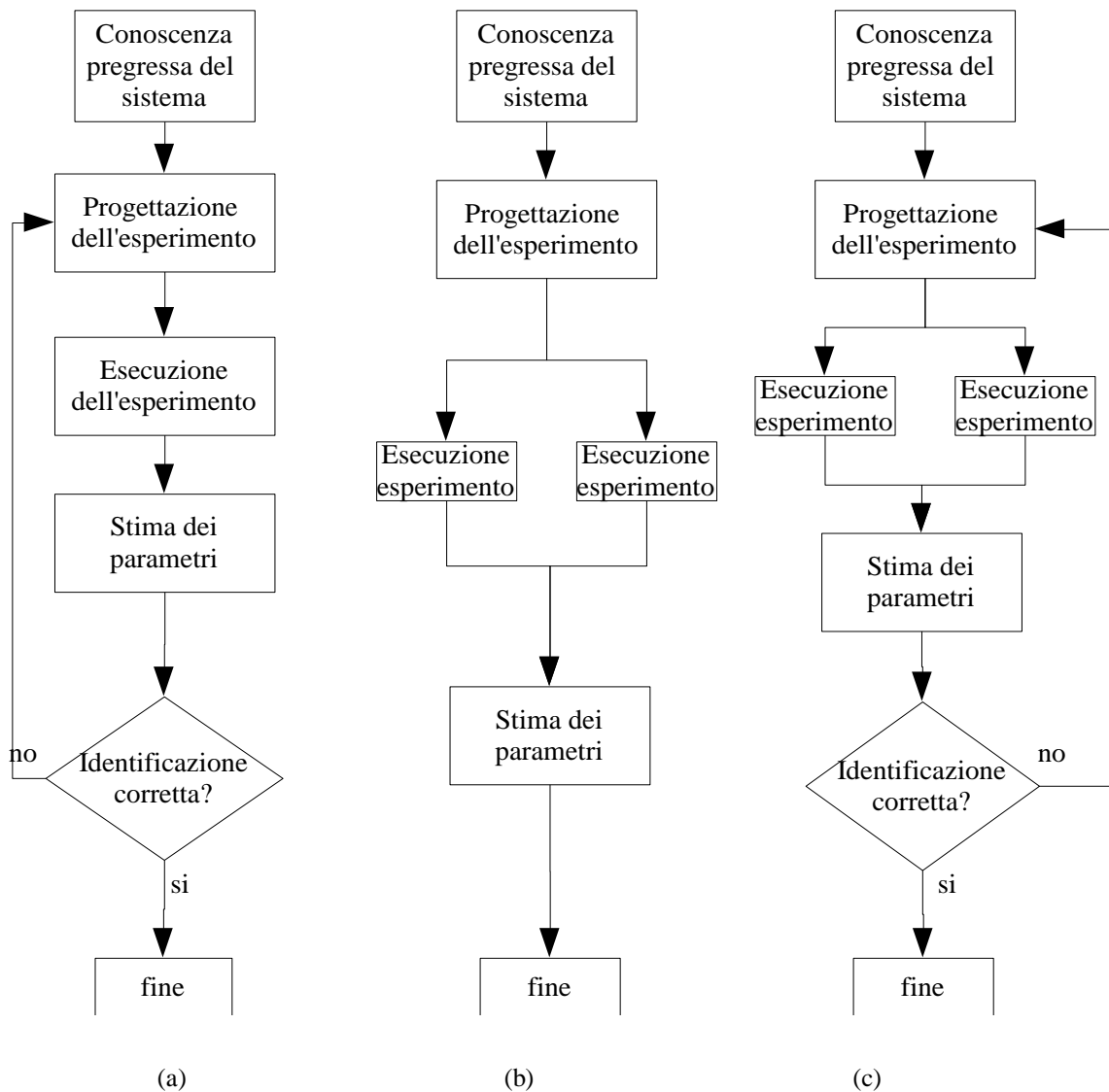
- si deve fornire un vettore dell'esperimento iniziale per  $\varphi$ ;
- si deve applicare una tecnica per l'identificazione locale.

L'identificabilità locale, viene eseguita non solo per un determinato vettore  $\theta$ , ma anche per un particolare vettore  $\varphi$ . In caso di non identificabilità locale, è necessario modificare il vettore  $\varphi$ , per capire se il problema è generato solo da una cattiva scelta della variabili di progetto. Se modificando  $\varphi$  non si arriva ad un risultato positivo, si possono considerare le correzioni suggerite per l'identificazione globale. Quando il risultato dell'identificabilità è positivo allora la progettazione MBDoE viene inizializzata partendo dal vettore  $\varphi$ . L'incertezza che si ha sul vettore  $\theta$ , durante l'identificabilità, può portare alla progettazione di esperimenti con i quali non si riesce a stimare i parametri. Questo è dovuto al fatto che le variabili di progetto vengono calcolate per parametri diversi da quelli reali, ma nell'esperimento le variabili di progetto possono dimostrarsi non adatte a stimolare il sistema nella maniera ottimale per ridurre l'incertezza sui parametri.

Dopo la fase di stima, è opportuno valutare se ripetere la progettazione, nel qual caso bisogna effettuare un nuovo studio di identificabilità locale in prossimità del vettore stimato, e dell'esperimento progettato.

Nella Figura 2.3, vengono dettagliate le tecniche di design ottimale basata sul modello, che nella diagramma della Figura 2.2 seguono alla fase di identificabilità (Galvanin *et al.*, 2007). La procedura delle tecniche identificazione è composta dalla progettazione, dall'esecuzione degli esperimenti e dalla stima, che costituiscono la parte centrale del MBDoE.

La combinazione di questi tre elementi viene usualmente applicata secondo gli schemi della Figura 2.3, rispettivamente detti sequenziale, parallelo e parallelo-sequenziale. La conoscenza progressiva è costituita dal modello impiegato e dalle stime iniziali dei parametri. La scelta di una di queste strategie è motivata da fattori di budget, tempo, accuratezza della stima da ottenere, informazione iniziale disponibile. Il design in sequenza, rappresenta la procedura più nota del MBDoE, e permette di incrementare ad ogni ciclo l'informazione sul sistema prima di effettuare la nuova progettazione. La progettazione in parallelo, accorcia la durata complessiva degli esperimenti, ed è indicata nei settori nei quali le tecniche sperimentali consentono l'esecuzione di numerosi esperimenti contemporaneamente, come ad esempio in microbiologia, grazie all'impiego di array di microreattori. Si può prevedere anche la convenienza di combinare queste due modalità di esecuzione come nel terzo caso (Figura 2.3c); altre modalità saranno invece presentate nel Capitolo 4.



**Figura 2.3.** La realizzazione degli esperimenti viene realizzata secondo gli schemi illustrati. (a) progettazione sequenziale; (b) progettazione in parallelo; (c) progettazione sequenziale-parallela. La scelta di una di queste strategie è motivata dai tipi di esperimenti realizzati, la disponibilità di risorse, l'accuratezza che si vuole ottenere della stima.

## 2.4 Progettazione ottimale basata sul modello

Per i modelli semplici gli esperimenti per identificare i parametri sono facilmente ottimizzabili e possono essere realizzate delle progettazioni robuste. In generale, tuttavia, non vi sono procedure sperimentali già definite ed è necessario progettare gli esperimenti con i quali ottenere l'informazione sul sistema. Le tecniche per scegliere le condizioni sperimentali ottimali e il numero di esperimenti e la loro configurazione sono sviluppate nella progettazione ottimale di esperimenti. In base alle conoscenze disponibili, acquisite in precedenza (ad esempio dalla letteratura), e al tipo di sistema (esistono vincoli che richiedono il rispetto di determinate condizioni operative ad esempio per questioni di sicurezza), si

possono progettare gli esperimenti secondo diversi obiettivi, in modo da realizzare esperimenti che minimizzano l'errore sulla stima, oppure consentono di superare l'incertezza che si ha sulle stime disponibili dei parametri, oppure realizzare una progettazione robusta in caso di *mismatch* tra il modello e il sistema reale. Inoltre, bisogna stabilire le condizioni che determinano la fine di un ciclo di esperimenti, che sono determinate dai seguenti fattori: 1) raggiungimento della precisione della stima dei parametri; 2) raggiungimento dell'accuratezza desiderata del modello; 3) esaurimento delle risorse dedicabili alle prove sperimentali, in termini di denaro, tempo e disponibilità di personale (Galvanin, 2010).

L'efficacia nella progettazione ottimale di esperimenti viene verificata valutando:

- 1) la capacità del modello di regredire i dati sperimentali;
- 2) l'accuratezza della stima dei parametri, ossia la differenza del valore dei parametri stimati rispetto al loro valore vero a cui tendono dopo un numero elevato di prove;
- 3) la precisione dei parametri, ossia l'affidabilità della stima rispetto all'errore presente sulle misure.

Quando si deve indagare un sistema descritto dal tipo di modello (2.1) la progettazione ottimale basata sul modello richiede i seguenti elementi:

- un stima iniziale dei parametri  $\boldsymbol{\theta}$ , e possibilmente informazioni sull'incertezza dei parametri, raccolte nella matrice  $\mathbf{H}_\theta^0$ ;
- stabilire una metrica  $\psi(\cdot)$ , per misurare l'informazione degli esperimenti, scelta in base alla finalità della progettazione stessa;
- definizione delle variabili misurate  $\mathbf{y}_i$ , del loro corrispondente modello dell'errore  $\boldsymbol{\Sigma}_y$ , e i parametri che lo caratterizzano;
- il controllo delle condizioni dell'esperimento, attraverso il vettore dell'esperimento  $\boldsymbol{\phi}$ ;
- stabilire lo spazio all'interno del quale varia l'esperimento.

Nei paragrafi seguenti vengono spiegate le basi teoriche della progettazione e l'impiego degli elementi appena elencati.

#### 2.4.1 Misura dell'informazione di un esperimento

Progettare un esperimento significa modificare il vettore dell'esperimento  $\boldsymbol{\phi}$ , all'interno di vincoli, in maniera da massimizzare una funzione obiettivo. La funzione obiettivo è costituita da una metrica della matrice di informazione di Fisher.

La matrice di Fisher, per la generica uscita del sistema  $y_r$ , è data da:

$$\mathbf{I}_r(\boldsymbol{\theta}) = \left[ E \left( \frac{\partial \ln p(y_r, \boldsymbol{\theta})}{\partial \theta_i} \frac{\partial \ln p(y_r, \boldsymbol{\theta})}{\partial \theta_j} \right) \right]_{i,j=1 \dots N_\theta} = E \left[ \left( \frac{\partial \ln L_r}{\partial \boldsymbol{\theta}} \right)^2 \right] \quad (2.12)$$

La definizione precedente è valida per una generica distribuzione di probabilità della funzione di verosimiglianza  $L_r(\boldsymbol{\theta}) = p(\mathbf{y}, \boldsymbol{\theta})$ .  $L_r(\boldsymbol{\theta})$  è lo stimatore di massima verosimiglianza e rappresenta la probabilità condizionata dei residui dato il vettore dei parametri; i residui sono dati dalla differenza  $y_{r,i} - y_r(t_i, \boldsymbol{\theta})$ , dove  $y_{r,i}$  è al variabile misurata  $r$ -esima al tempo  $t_i$ . Se  $p(\mathbf{y}, \boldsymbol{\theta})$  è una distribuzione di probabilità normale con varianza nota  $\sigma_{r,i}^2$  e media zero,  $L_r(\boldsymbol{\theta})$  diventa:

$$L_r = \prod_{i=1}^{n_{sp}} \frac{1}{\sigma_{r,i} \sqrt{2\pi}} \exp \left[ -\frac{1}{2} \left( \frac{y_{r,i} - y_r(t_i, \boldsymbol{\theta})}{\sigma_{r,i}} \right)^2 \right] \quad (2.13)$$

Quando  $L_r$  ha forma della (2.13), dopo qualche manipolazione algebrica, dal calcolo delle derivate parziali di  $L_r$  rispetto a  $\boldsymbol{\theta}$  si ottiene:

$$\frac{\partial \ln L_r}{\partial \theta_k} = \sum_{i=1}^{n_{sp}} \frac{y_{r,i} - y_r(t_i, \boldsymbol{\theta})}{\sigma_{r,i}^2} \frac{\partial y_r(t_i, \boldsymbol{\theta})}{\partial \theta_k} \quad , \quad (2.14)$$

e l'elemento  $\mathbf{I}_{r,lk}$  della matrice diventa:

$$\begin{aligned} \mathbf{I}_{r,lk} &= E \left\{ \left[ \sum_{i=1}^{n_{sp}} \frac{y_{r,i} - y_r(t_i, \boldsymbol{\theta})}{\sigma_{r,i}^2} \frac{\partial y_r(t_i, \boldsymbol{\theta})}{\partial \theta_k} \right] \cdot \left[ \sum_{i=1}^{n_{sp}} \frac{y_{r,i} - y_r(t_i, \boldsymbol{\theta})}{\sigma_{r,i}^2} \frac{\partial y_r(t_i, \boldsymbol{\theta})}{\partial \theta_l} \right] \right\} = \\ &= \sum_{i=1}^{n_{sp}} \frac{1}{\sigma_{r,i}^4} \frac{\partial y_r(t_i, \boldsymbol{\theta})}{\partial \theta_k} \frac{\partial y_r(t_i, \boldsymbol{\theta})}{\partial \theta_l} E \left[ (y_{r,i} - y_r(t_i, \boldsymbol{\theta}))^2 \right] = \\ &= \sum_{i=1}^{n_{sp}} \frac{1}{\sigma_{r,i}^2} \frac{\partial y_r(t_i, \boldsymbol{\theta})}{\partial \theta_k} \frac{\partial y_r(t_i, \boldsymbol{\theta})}{\partial \theta_l} \quad . \quad (2.15) \end{aligned}$$

Da quest'ultima relazione si nota che la matrice di informazione di Fisher dipende, oltre che dalla varianza, dalle sensitività delle uscite del modello. Massimizzare una funzione obiettivo che dipende dalla matrice di Fisher, significa massimizzare la sensitività rispetto ai parametri delle variabili misurate. La (2.15) può essere riscritta in forma compatta, ricordando la definizione (2.5) della matrice di sensitività dinamica  $\mathbf{Q}_i$ . La descrizione dell'informazione, per tutte le uscite del modello, diventa:

$$\mathbf{H}_\theta(\boldsymbol{\theta}, \varphi) = \sum_{i=1}^{N_y} \sum_{j=1}^{N_y} s_{ij} \mathbf{Q}_i^T \mathbf{Q}_j \quad , \quad (2.16)$$

dove  $s_{ij}$  è il corrispondente elemento dell'inversa della matrice di varianza-covarianza degli errori,  $\boldsymbol{\Sigma}_y$ , sulle variabili misurate:



$$\mathbf{\Sigma}_y = \begin{bmatrix} \sigma_{y_1}^2 & \cdots & \sigma_{y_1 y_{N_y}}^2 \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \sigma_{y_{N_y} y_1}^2 & \cdots & \sigma_{y_{N_y}}^2 \end{bmatrix} . \quad (2.17)$$

Gli elementi di  $\mathbf{\Sigma}_y$  rappresentano la correlazione che può esistere tra errori presenti su variabili misurabili diverse. Nella trattazione seguente si ipotizza che gli elementi esterni alla diagonali siano nulli, ossia che le misure siano completamente indipendenti all'interno dello stesso esperimento, anche se in generale ciò non è vero, specialmente per misure rilevate nello stesso esperimento.

Quando gli esperimenti vengono condotti sequenzialmente, l'informazione calcolata per gli esperimenti già condotti può essere addizionata a quella dell'ultimo dell'esperimento. Se vengono realizzati  $N_{exp}$  esperimenti in successione l'informazione finale sarà data (Galvanin, 2010):

$$\mathbf{H}_\theta(\boldsymbol{\theta}, \varphi) = \sum_{k=1}^{N_{exp}} \sum_{i=1}^{N_y} \sum_{j=1}^{N_y} s_{ij|k} \mathbf{Q}_{i|k}^T \mathbf{Q}_{j|k} + \mathbf{H}_\theta^0 , \quad (2.18)$$

dove il termine  $\mathbf{H}_\theta^0$  rappresenta l'informazione iniziale che si possedeva sui parametri, e usualmente può essere trascurato perché all'inizio dell'attività MBDoe, l'incertezza sul valore vero dei parametri è molto elevata.

Se gli esperimenti vengono condotti in parallelo,  $\mathbf{H}_\theta$  ha una forma simile, ma il sistema di riferimento non sarà più il singolo esperimento, ma sarà il sistema complessivo costituito da tutti gli esperimenti. Le risposte, quindi, non saranno  $N_y$ , ma  $N_y \cdot N_{exp}$ , dove  $N_{exp}$  è il numero di esperimenti in parallelo. Inoltre se in ogni esperimento è misurata una sola variabile, è verosimile che gli errori delle misure raccolte siano tra di loro indipendenti, perciò  $\mathbf{H}_\theta$  vale:

$$\mathbf{H}_\theta(\boldsymbol{\theta}, \varphi) = \sum_{k=1}^{N_{exp} \cdot N_y} s_k \mathbf{Q}_k^T \mathbf{Q}_k + \mathbf{H}_\theta^0 , \quad (2.19)$$

E' frequente incontrare il problema della massimizzazione di una misura di  $\mathbf{H}_\theta$ , posto in maniera equivalente ma opposta, infatti può essere minimizzata una misura dell'inversa della matrice di informazione. Dall'inversa della matrice di informazione si ottiene la matrice di varianza-covarianza dei parametri:

$$\mathbf{V}_\theta = [\mathbf{H}_\theta(\boldsymbol{\theta}, \varphi)]^{-1} . \quad (2.20)$$

Sebbene, dal punto di vista analitico, le due formulazioni del problema di ottimizzazione siano equivalenti, numericamente risulta più stabile la massimizzazione di una metrica della matrice  $\mathbf{H}_\theta$ , come verrà dettagliato in seguito.

### 2.4.2 Criteri di progettazione

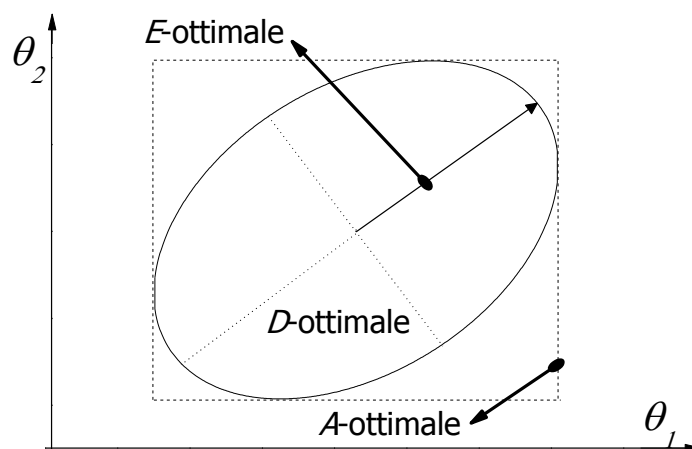
Il problema di progettazione viene formulato nel seguente modo:

$$\varphi = \arg \min[\psi(\mathbf{V}_\theta)] \quad , \quad (2.21)$$

dove  $\psi(\mathbf{V}_\theta)$  è una metrica della matrice  $\mathbf{V}_\theta$ . Bisogna cioè stabilire le condizioni sperimentali per le quali la misura della matrice di varianza-covarianza viene minimizzata. Questo significa ideare esperimenti nei quali la sensitività delle uscite rispetto ai parametri è massimizzata, al fine di migliorare l'informazione ottenibile dagli esperimenti. Possono essere scelti diversi criteri per misurare la varianza-covarianza dei parametri, ciascun metodo evidenzia particolari aspetti. Le misure più comuni sono riassunte dai criteri alfabetici. Essi sono classificati (Atkinson e Donev, 1992) come :

- *D*-ottimale,  $\psi(\mathbf{V}_\theta) = \det(\mathbf{V}_\theta)$ , minimizza il determinante della matrice di varianza-covarianza;
- *E*-ottimale,  $\psi(\mathbf{V}_\theta) = \lambda_1(\mathbf{V}_\theta)$ , minimizza il più grande autovalore della matrice di varianza-covarianza;
- *A*-ottimale,  $\psi(\mathbf{V}_\theta) = tr(\mathbf{V}_\theta)$ , minimizza la traccia della matrice di varianza-covarianza.

La struttura della matrice di varianza è rappresentabile nello spazio dei parametri, come un iperellissoide avente gli assi coincidenti con gli auto valori di  $\mathbf{V}_\theta$ , e volume proporzionale al determinante di  $\mathbf{V}_\theta$ .



**Figura 2.4.** Rappresentazione grafica del significato dei criteri di progettazione. L'iperellissoide viene proiettato sul piano dei parametri  $\theta_2$ ,  $\theta_1$ . Il criterio *E*-ottimale minimizza l'asse maggiore della varianza; il criterio *D*-ottimale minimizza l'area; mentre il criterio *A*-ottimale minimizza la proiezione della varianza lungo le direzioni principali.

Può, quindi, essere data una interpretazione geometrica (Figura 2.4) ai criteri di progettazione. Il criterio  $D$ -ottimale agisce sul volume dell'iperellissoide; il criterio  $E$ -ottimale minimizza l'asse di dimensioni maggiori; il criterio  $A$ -ottimale riduce il perimetro entro cui è inscritto l'iperellissoide.

In termini alternativi si può dire che il criterio agisce sulla varianza generalizzata dei parametri, minimizzandola. Il criterio  $E$ -ottimale riduce la varianza massima, mentre il criterio  $A$ -ottimale riduce la varianza media dei parametri. Il criterio  $D$ -ottimale agisce principalmente sui parametri che danno maggiore sensibilità, lasciando invariati gli altri. Il criterio  $E$ -ottimale considera i parametri con sensibilità minore ma può accrescere l'incertezza sugli altri parametri. Inoltre il criterio  $E$ -ottimale è il più oneroso dal punto di vista computazione perché è necessario ottenere gli autovalori di  $\mathbf{V}_\theta$ . Il criterio  $A$ -ottimale è considerato inaffidabile nel caso in cui i parametri siano fortemente correlati, visto che questo criterio non considera la struttura della varianza, al contrario del criterio  $D$ -ottimale. Esistono altri criteri di ottimizzazione che hanno come obiettivo la minimizzazione della varianza sulle predizioni e non sullo stimatore dei parametri, ma non verranno applicati in questa Tesi perciò se ne tralascia la descrizione.

### 2.4.3 Stima dei parametri

Ottenuti i dati sperimentali, si ha a disposizione un insieme di valori misurati  $y_i$  delle uscite del modello. La procedura di stima deve essere in grado di trovare i parametri per cui il modello interpola bene i dati, e inoltre deve fornire le statistiche sulla stima effettuata. Le due principali tecniche di stima impiegate in questa Tesi sono il metodo dei minimi quadrati pesati (WLS, *weighted least square*), e il metodo della massima verosimiglianza (ML, *maximum likelihood*).

Il metodo WLS minimizza la quantità  $SSWR$ :

$$SSWR = \sum_{i=1}^{n_{sp}} \left( \frac{y_{r,i} - y_r(t_i, \boldsymbol{\theta})}{\sigma_{r,i}} \right)^2, \quad (2.22)$$

che è la somma pesata sulla deviazione standard del quadrato degli scarti ( $SSWR$ , *sum of squares of weighted residuals*). Il valore della deviazione standard deve essere noto. Se gli errori sono distribuiti normalmente e il modello è lineare nei parametri allora la quantità  $SSWR$  ha una distribuzione  $\chi^2$  con gradi di libertà  $\nu = n_{sp} - N_\theta$ . Se il modello non è lineare nei parametri, può comunque essere assunto linearizzabile in prossimità del minimo della funzione  $SSWR(\boldsymbol{\theta})$ , per cui il metodo WLS è ancora valido. L'adeguatezza della regressione può venire testata confrontando il valore della stima di  $\chi^2$  ottenuta dalla  $SSWR$ , con l'intervallo, per un prestabilito valore di confidenza di una distribuzione  $\chi^2$  con gradi di libertà  $\nu$ . Per ottenere il punto di minimo si risolve il problema:

$$\frac{\partial SSWR}{\partial \theta_k} = 0 \quad , \quad (2.23)$$

non è detto che per i sistemi non lineari la soluzione sia unica e il minimo incontrato può essere locale e non globale. La soluzione trovata può essere influenzata dai valori con cui è inizializzato l'algoritmo di ricerca del minimo. Applicando il metodo WLS si può testare l'adeguatezza della regressione del modello ma non si ottengono informazioni statistiche sull'accuratezza dei parametri.

Il metodo della massima verosimiglianza ML, si basa sulla minimizzazione della funzione di massima verosimiglianza  $L_r(\boldsymbol{\theta})$ , introdotta nel paragrafo precedente con l'equazione (2.13). La tecnica ML è un metodo più generale perché permette di definire una funzione da minimizzare che può essere determinata opportunamente, a differenza del metodo LS che utilizza sempre la somma degli scarti. Inoltre la possibilità di scegliere una distribuzione adeguata degli scarti permette di formulare il problema della stima in modo probabilistico. Quando si assume una distribuzione degli scarti normale con media zero e varianza  $\sigma_i$  costante, il metodo ML diventa identico al metodo WLS.  $L_r(\boldsymbol{\theta})$  diventa uguale a  $SSWR$  se ne viene calcolato il logaritmo, a meno di un termine che dipende dalla varianza. Infatti dall'equazione (2.13) si ottiene:

$$-2 \ln(L_r) = \sum_{i=1}^{n_{sp}} \left( \frac{y_{r,i} - y_r(t_i, \boldsymbol{\theta})}{\sigma_{r,i}} \right)^2 + 2 \sum_{i=1}^{n_{sp}} \ln(\sigma_{r,i}) \quad , \quad (2.24)$$

Si osserva che la prima sommatoria del termine di destra della (2.24) è proprio  $SSWR$ .

La sommatoria contenente il logaritmo della deviazione standard della (2.24) è importante quando l'errore del modello è funzione della misura  $\mathbf{y}_i$ .

Il metodo ML permette di calcolare la matrice di varianza-covarianza dei parametri  $\mathbf{V}_\theta$ , la quale rappresenta il limite inferiore a cui la varianza stimata delle misure tende asintoticamente, secondo quanto afferma il teorema di Cramer-Rao. Quando il numero di campioni è molto elevato, la distribuzione degli scarti diventa comunque normale, e la matrice di varianza calcolata dà una buona indicazione dell'accuratezza della stima. L'accuratezza della stima di ciascun parametro può essere verificata con un test  $t$ -student, il valore normalizzato  $t_i$  del parametro  $i$ -esimo vale:

$$t_i = \frac{\hat{\theta}_i}{\sqrt{v_{\theta,ii}}} \quad , \quad (2.25)$$

dove  $v_{\theta,ii}$  è l'elemento corrispondente sulla diagonale della matrice  $\mathbf{V}_\theta$ . Si deve verificare l'ipotesi che il valore atteso del parametro non sia diverso dal valore stimato. L'intervallo di

confidenza a due code, per un limite di fiducia fissato  $(1 - \alpha)$ , e  $\nu = n_{sp} - N_\theta$  gradi di libertà, è dato da:

$$\kappa_i = \bar{t}_i \left( \frac{1 - \alpha}{2}, \nu \right) \sqrt{v_{\theta,ii}} \quad , \quad (2.26)$$

e con  $\bar{t}_i$  si è indicato l'intervallo fiduciario con il quale si testa l'ipotesi formulata. Valori di  $t_i$  superiori al limite di riferimento permettono di accettare la stima ottenuta. L'accuratezza della stima ottenuta di  $\theta$ , è individuata nello spazio dei parametri dalla regione per cui si ha:

$$(\theta - \hat{\theta})^T \mathbf{V}_\theta^{-1} (\theta - \hat{\theta}) \leq \kappa \quad , \quad (2.27)$$

Le statistiche sull'accuratezza della stima risultano essere corrette soltanto se è verificata l'ipotesi di distribuzione normale, altrimenti possono risultare poco affidabili.

Altre indicazioni sull'errore della stima dei parametri si ottengono dalla correlazione della matrice di varianza-covarianza calcolata come in (2.8) sugli elementi di  $\mathbf{V}_\theta$ . Correlazioni molto elevate indicano parametri difficilmente stimabili.

#### 2.4.4 Simulazione *in silico*

La realizzazione degli esperimenti *in silico* viene condotta simulando numericamente il sistema reale, per testare la progettazione dell'esperimento. Si usa un modello deterministico per riprodurre l'andamento vero del sistema, caratterizzato da un set di parametri che si assume sia quello "vero",  $\hat{\theta}$ , e le stesse condizioni sperimentali previste dalla progettazione. Dalle traiettorie descritte  $\hat{\mathbf{y}}(t)$ , nei tempi  $\mathbf{t}^{sp}$ , si ricavano i punti che simulano le misure sperimentali, ai quali va aggiunto una componente casuale che riproduce l'errore. L'errore sulle misure  $\boldsymbol{\eta}$ , si assume che sia distribuito normalmente, con media zero e varianza nota  $\boldsymbol{\Sigma}_y$ , descritta da un modello per la varianza. I campioni misurati  $\mathbf{y}_i$  assumono il valore:

$$\mathbf{y}_i = \hat{\mathbf{y}}(t_i^{sp}) + \boldsymbol{\eta}(\hat{\mathbf{y}}) \quad , \quad (2.28)$$

L'addendo  $\boldsymbol{\eta}(\hat{\mathbf{y}})$  è un valore casuale estratto da una distribuzione normale con media zero e varianza nota  $\boldsymbol{\Sigma}_y$ . La varianza è funzione del valore di  $\hat{\mathbf{y}}$ . Un modello generale della varianza è descritto da:

$$\sigma_{y_i y_j}^2 = \omega_i^2 (\hat{y}_{ij}^2)^{\gamma_i/2} \quad , \quad (2.29)$$

Dove  $\omega_i^2$  è la varianza della  $i$ -esima risposta e  $\gamma_i$  è detto fattore di eteroschedasticità. Solitamente  $\omega_i^2 = 0$  se  $i \neq j$ , per cui gli errori sulle misure non sono correlati. I parametri  $\omega_i^2$ ,  $\gamma_i$  possono assumere diversi valori, secondo il modello dell'errore previsto:

- modello a varianza relativa costante,  $\omega_i^2 \neq 0; \gamma_i = 0$ ;
- modello eteroschedastico della varianza,  $\omega_i^2 \neq 0; \gamma_i \neq 0$ .

$\omega_i^2, \gamma_i$  possono essere noti oppure entrare nella procedura di stima dei parametri, aggiungendo altre incognite al problema dell'identificazione. Esistono anche altre possibilità per descrivere il modello dell'errore sommando i diversi modelli o trovando altre forme analitiche; in seguito si userà anche il modello  $\sigma_{y_i}^2 = \omega_i^2$ , dove non c'è dipendenza dell'errore dal valore assunto dalla variabile misurata. Quest'ultima relazione è una semplificazione del modello a varianza lineare (che dipende dai parametri  $\alpha$  e  $\beta$ ):

$$\sigma_{y_i y_j}^2 = \beta + \alpha(\widehat{y}_{ij}^2) \quad , \quad (2.30)$$

Non si è specificata la forma del modello che genera  $\widehat{\mathbf{y}}(t_{sp,i})$  perché, non essendo noto *a priori* il modello che meglio descrive il sistema, si può scegliere un modello diverso da quello di progetto, per generare i punti sperimentali. In questa Tesi tuttavia, si assume che non ci sia *mismatch* tra realtà e modello.

# Capitolo 3

## Progettazione di esperimenti per lo studio della batteriocidia

In questo capitolo verrà condotto uno studio sul modello per lo studio della batteriocidia proposto da Tam *et al.* (2005a). Dopo aver riportato e discusso i risultati riportati nell'articolo, si verificherà l'identificabilità del modello, e verranno suggerite delle progettazioni realizzando diverse configurazioni di esperimenti.

### 3.1 Esperienze realizzate

Le equazioni (1.5) – (1.8), che costituiscono il modello studiato nel corso di questo capitolo, sono state sviluppate da Tam *et al.* (2005a), per spiegare l'andamento di ricrescita che si osserva nello sviluppo di curve time-kill. Lo scopo dichiarato nell'articolo è trovare una relazione che fornisca informazioni quantitative sulla farmacodinamica degli antibiotici. Il modello è finalizzato a superare l'incertezza fornita dagli indici farmacodinamici impiegati usualmente (*MIC*, *AUC/MIC*, *MBC*, ecc.) e, in particolar modo, mira a legare la crescita batterica nel tempo all'effetto della concentrazione di antibiotico dosata. Nell'articolo si asserisce di avere sviluppato un modello che è in grado di descrivere e predire ragionevolmente l'andamento nel tempo della carica batterica nello studio time-kill.

Le esperienze riportate sono state condotte su una coltura di *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, trattata con antibiotico Meropenem. Inizialmente è stata misurata la *MIC* con il metodo descritto nel §1.2.3 ed è stato preparato l'inoculo (pari a  $10^8$  cfu/mL) da inserire nel terreno di coltura. Gli studi di batteriocidia sono stati condotti in terreno liquido MHB per un periodo di 24 ore, realizzando sei diversi esperimenti durante ciascuno dei quali sono stati prelevati 12 campioni, due in sei diversi istanti. La *MIC* ricavata dalle misure è pari a 1 mg/L. Le concentrazioni iniziali di antibiotico usate nei sei diversi esperimenti sono state di 0, 0.25, 1, 4, 16 e 64 *MIC* e i campionamenti sono avvenuti a 0, 2, 4, 8, 12 e 24 ore. I campioni raccolti sono stati coltivati quantitativamente su Muller-Hinton agar per effettuare la misura delle cellule vitali. Il limite di rilevazione delle cellule vive era di 400 cfu/mL.

La stima dei parametri del modello è stata effettuata impiegando la tecnica di analisi dei modelli della popolazione impiegando il programma NAPG (*non parametric adaptive grid*, Leary *et al.*, 2001).

I risultati delle stime sono riportati nella Tabella 3.1.

**Tabella 3.1.** Stime dei parametri riportate nell'articolo di [riferimento]. La riga ultime due righe riportano media e deviazione standard delle stime dei parametri.

Esperimento	C	$C_{50k}$	$K_g$	$K_k$	H	$N_{max} \cdot 10^9$	$\beta$	$\tau$
N°	[mg/L]	[mg·L <sup>-1</sup> ]	[hr <sup>-1</sup> ]	[hr <sup>-1</sup> ]	[-]	[cfu·mL <sup>-1</sup> ]	[-]	[L·mg <sup>-1</sup> ·hr <sup>-1</sup> ]
1	0	3.53	0.31	4.08	1.48	2.39	6.64	0.011
2	0.25	0.44	0.61	9.6	3.82	9.99	3.79	0.021
3	1	3.53	0.31	4.08	1.48	2.29	6.64	0.011
4	4	0.74	2.31	3.12	1.67	9.99	4.48	0.0069
5	16	2.61	2.85	3.41	7.74	9.99	4.85	0.0051
6	64	2.9	2.58	3.95	0.79	9.99	8.7	0.0014
Media	-	2.29	1.5	4.71	2.83	7.43	5.85	0.0095
$\sigma$ stime	-	1.25	1.1	2.22	2.39	3.64	1.66	0.0063

Dall'osservazione dei risultati della Tabella 3.1 si nota che la stima ottenuta dei parametri del modello non è accurata. Il metodo utilizzato si basa sulla stima dei parametri usando un modello della popolazione. Tuttavia è ragionevole ritenere che tra gli esperimenti *in vitro* la variabilità dei parametri che identificano il modello sia nulla, perché si tratta sempre dello stesso sistema a cui viene applicato il modello. Le diverse prove dovrebbero essere considerate non come esperimenti su sistemi diversi, ma tutte prove eseguite parallelamente sullo stesso sistema. Nella Tabella 3.1 è riportata la media dei parametri e la loro deviazione standard. La cattiva stima ottenuta è da attribuirsi alla scelta di considerare l'esistenza di variabilità dei parametri tra gli esperimenti. In questo caso la stima dei parametri di ogni esperimento non consente di identificare i parametri.

**Tabella 3.2.** Parametri che non è possibile identificare: per ogni esperimento riportato si indicano i parametri con correlazione  $\pm 1$ .

	$C_{50k}$	$K_g$	$K_k$	H	$N_{max} \cdot 10^9$	$\beta$	$\tau$
	[mg·L <sup>-1</sup> ]	[hr <sup>-1</sup> ]	[hr <sup>-1</sup> ]	[-]	[cfu·mL <sup>-1</sup> ]	[-]	[L·mg <sup>-1</sup> ·hr <sup>-1</sup> ]
Esperimento n°1	K <sub>k</sub> , H		H, C <sub>50k</sub>	K <sub>k</sub> , C <sub>50k</sub>		$\tau$	$\beta$
Esperimento n°2	K <sub>k</sub>		C <sub>50k</sub>			$\tau$	$\beta$
Esperimento n°3	K <sub>k</sub>		C <sub>50k</sub>				
Esperimento n°5			K <sub>g</sub>				

Inoltre dallo studio della correlazione delle sensitività dei parametri sugli esperimenti realizzati in Tabella 3.1, si sono trovati esperimenti per i quali la correlazione tra parametri è esattamente +1, o -1 (Tabella 3.2) e per i quali quindi, non è teoricamente possibile ottenere stime accurate.



Nello stesso articolo si afferma che il modello regredisce bene i dati sperimentali, riportando un valore di  $R^2$  (coefficiente di determinazione) elevato. Tuttavia la capacità del modello di descrivere i dati non è una condizione sufficiente per affermare che i parametri sono stimati con sufficiente accuratezza. Secondo i risultati riportati non si può stabilire se il modello ha la capacità di predire il fenomeno della ricrescita batterica.

Per capire se i parametri del modello possono essere identificati esattamente è necessario verificare l'identificabilità del sistema.

### 3.2 Test per l'identificabilità

L'applicazione di tecniche analitiche per determinare l'identificabilità del modello risulta in questo caso troppo complessa. Si deve, dunque, provare l'identificabilità locale applicando tecniche numeriche. Bisogna stabilire i valori di progetto dei parametri e il vettore dell'esperimento per definire l'intorno in cui applicare i test per l'identificabilità. Si è fissato un range in base ai valori della tabella 3.1, all'interno del quale varia il vettore dei parametri. Il valore di progetto dei parametri è stato scelto arbitrariamente all'interno di questo range. Nella Tabella 3.3 sono riportati i valori e il range per ciascun parametro.

**Tabella 3.3.** Valori di progetto dei parametri e il relativo range.

	$C_{50k}$	$K_g$	$K_k$	$H$	$N_{max} \cdot 10^9$	$\beta$	$\tau$
<b>Valori di progetto</b>	0.739	2.310	3.119	1.670	9.00	4.475	0.0069
<b>Min</b>	0.400	0.30	3.00	0.500	2.00	3.00	0.0014
<b>Max</b>	4.00	3.00	10.00	8.00	11.00	9.00	0.021

All'interno dello stesso range viene scelto il vettore dei parametri che rappresenta il loro valore "vero", ossia quello impiegato per la simulazione *in vitro* (Tabella 3.4).

**Tabella 3.4.** Valore "vero" usato per simulare *in vitro* l'esperimento reale.

	$C_{50k}$	$K_g$	$K_k$	$H$	$N_{max} \cdot 10^9$	$\beta$	$\tau$
<b>Valori veri</b>	0.888	1.848	3.744	1.336	7.2	3.58	0.0083
<b>Min</b>	0.4	0.3	3	0.5	2	3	0.0014
<b>Max</b>	4	3	10	8	11	9	0.021

I valori in Tabella 3.4, saranno usati per tutti i test e gli esperimenti contenuti nel capitolo. Per praticità, specialmente nella progettazione di esperimenti, si indicheranno i parametri, normalizzati rispetto al loro valore vero (Tabella 3.5).

**Tabella 3.5.** Valori normalizzati dei parametri. La seconda riga mostra i valori dei parametri usati per realizzare la progettazione degli esperimenti.

	$C_{50k}$	$K_g$	$K_k$	$H$	$N_{max} \cdot 10^9$	$\beta$	$\tau$
<b>Parametri veri normalizzati</b>	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
<b>Parametri di progetto normalizzati</b>	0.833	1.250	0.833	1.25	1.25	1.25	0.833

L'applicazione di test per l'identificabilità è valida per un qualsiasi vettore dell'esperimento. Basta quindi individuare un vettore per il quale l'identificabilità è dimostrabile. Il vettore dell'esperimento iniziale viene fornito come vettore di tentativo per ciascun sistema studiato. I test applicati, sono quelli spiegati nel Capitolo 2; per comodità verrà assegnata una sigla con cui saranno richiamati successivamente:

- $T1$ , test di massimizzazione della distanza tra parametri per lo stesso output del sistema (2.10);
- $T2$ , test sul rango della matrice  $\mathbf{P}_E$  (2.7);
- $T3$ , test di correlazione tra le colonne della matrice  $\mathbf{P}_E$  (2.8).

I vari test sono soddisfatti se vengono rispettate le condizioni descritte nel §2.2.2. Nel test  $T1$ ,  $\mathbf{W}_\theta$  e  $\mathbf{W}_y$  (2.10) sono state scelte come matrici identità. Le distanze tra vettori e uscita del modello sono:

$$(\boldsymbol{\theta} - \boldsymbol{\theta}^*)^T \cdot (\boldsymbol{\theta} - \boldsymbol{\theta}^*) \leq \varepsilon_\theta = 10^{-6};$$

$$\int_0^\tau (\mathbf{y}(\mathbf{u}(t), \boldsymbol{\theta}) - \mathbf{y}(\mathbf{u}(t), \boldsymbol{\theta}^*))^T (\mathbf{y}(\mathbf{u}(t), \boldsymbol{\theta}) - \mathbf{y}(\mathbf{u}(t), \boldsymbol{\theta}^*))) dt < \varepsilon_y = 10^{-12};$$

le costanti  $\varepsilon_\theta$ ,  $\varepsilon_y$  sono state fissate per stabilire le distanze massime accettabili. Oltre ai test per l'identificabilità vengono riportati graficamente i profili delle sensitività dei parametri nel tempo. Le sensitività che dimostrano andamenti paralleli, o simmetrici, o sovrapposti indicano che i parametri sono correlati. Dai grafici è possibile ricavare indicazioni simili a quelle ottenute nel test  $T3$ . Inoltre è possibile visualizzare gli intervalli di tempo durante i quali le sensitività sono massime e dove quindi, conviene effettuare i campionamenti.

La struttura degli esperimenti che verranno progettati e realizzati in seguito è riconducibile a tre schemi principali, perciò, per verificare l'identificabilità è necessario verificare che il modello sia identificabile nei seguenti casi:

- I1.* un esperimento semplice, simile a quelli realizzati da Tam *et al.* (2005a);
- I2.* un esperimento aggiungendo antibiotico durante l'esecuzione;
- I3.* tre esperimenti semplici in parallelo.

Ogni esperimento è caratterizzato da un vettore, il quale però, nello studio di identificabilità, non contiene i tempi di campionamento.

I vettori degli esperimenti sono così definiti:

11.  $\varphi = \varphi(\mathbf{y}_0, \tau, Ca_0)$ ;
12.  $\varphi = \varphi(\mathbf{y}_0, \tau, Ca_0, C(t_1), C(t_2))$ ;
13.  $\varphi = \varphi(\mathbf{y}_0, \tau, Ca_{0,1}, Ca_{0,2}, Ca_{0,3})$ .

Per ogni vettore dell'esperimento,  $\mathbf{y}_0$  è dato dall'inoculo iniziale di batteri nel sistema pari a  $3.03 \cdot 10^7$  cfu/mL;  $\tau$  è pari a 24 ore. Mentre gli altri termini sono caratteristici di ogni esperimento:  $Ca_0$  è la concentrazione iniziale di antibiotico in ogni esperimento, mentre  $C$  è l'antibiotico aggiunto in un istante durante l'esperimento.  $Ca_0$  e  $C$  hanno le dimensioni di una concentrazione [mg/L], ma non rappresentano esattamente la concentrazione nel sistema.  $Ca_0$  e  $C$  indicano la massa di antibiotico che è stata aggiunta rispetto al volume del sistema. Se nel sistema la concentrazione rimane costante, allora  $Ca_0$  e  $C$  sono esattamente la concentrazione di antibiotico in soluzione.

Nei test successivi la sensitività  $i$ -esima dei parametri è indicata come "s<sub>*i*</sub>" secondo l'ordine riportato nella Tabella 3.6.

**Tabella 3.6.** Sensitività e loro dimensioni .

	<b>s<sub>1</sub></b>	<b>s<sub>2</sub></b>	<b>s<sub>3</sub></b>	<b>s<sub>4</sub></b>	<b>s<sub>5</sub></b>	<b>s<sub>6</sub></b>	<b>s<sub>7</sub></b>
<b>definizione</b>	$\frac{\partial N}{\partial C_{50k}}$	$\frac{\partial N}{\partial K_g}$	$\frac{\partial N}{\partial K_k}$	$\frac{\partial N}{\partial H}$	$\frac{\partial N}{\partial N_{\max}}$	$\frac{\partial N}{\partial \beta}$	$\frac{\partial N}{\partial \tau}$
<b>dimensioni</b>	$\left[ \frac{\text{cfu/mL}}{\text{mg/L}} \right]$	$\left[ \frac{\text{cfu/mL}}{1/\text{h}} \right]$	$\left[ \frac{\text{cfu/mL}}{1/\text{h}} \right]$	$\left[ \frac{\text{cfu}}{\text{mL}} \right]$	$\left[ \frac{\text{cfu/mL}}{\text{cfu/mL}} \right]$	$\left[ \frac{\text{cfu}}{\text{mL}} \right]$	$\left[ \frac{\text{cfu/mL}}{\text{mg}/(\text{L} \cdot \text{h})} \right]$

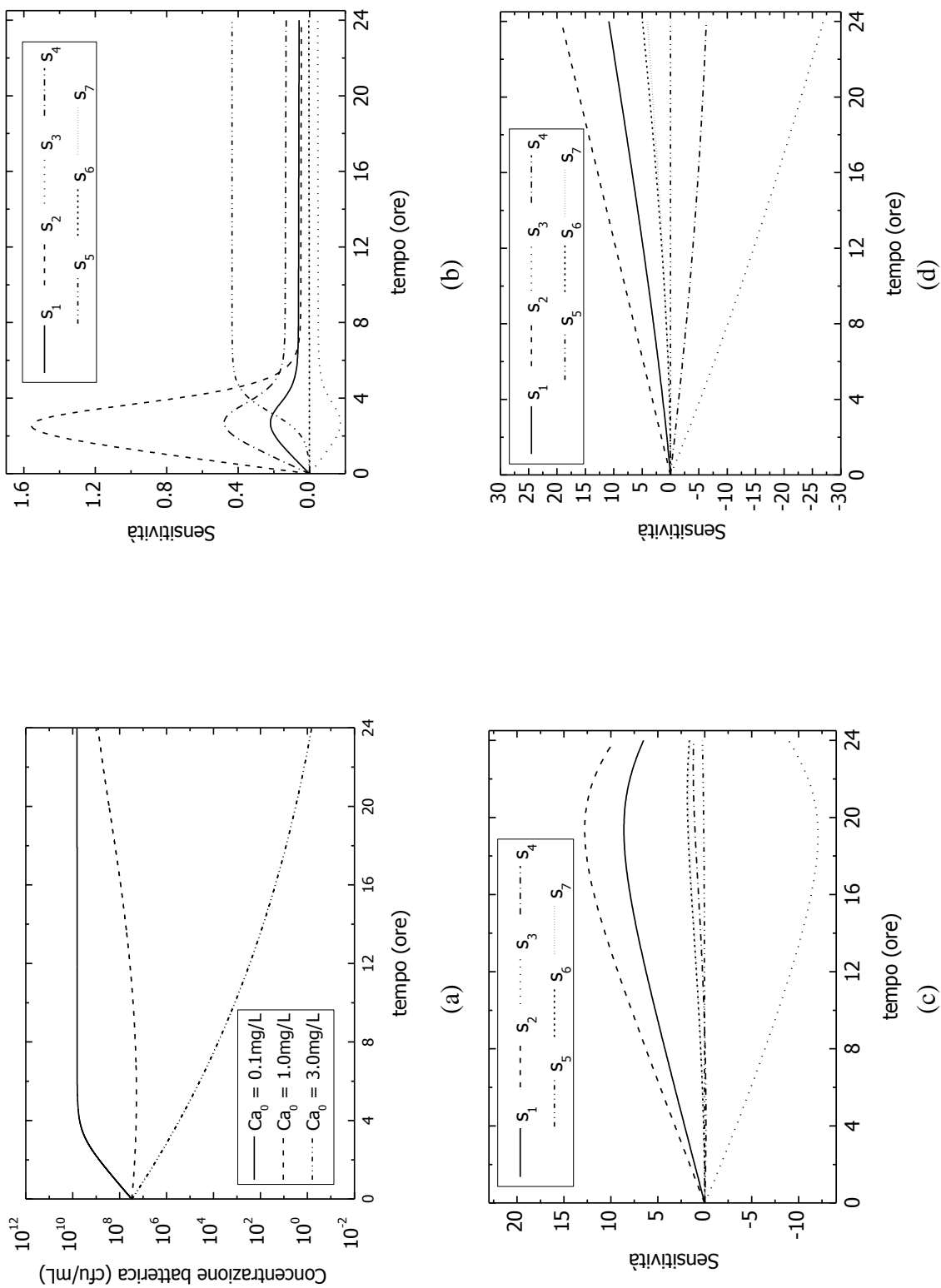
Gli andamenti delle sensitività riportate nei grafici seguenti, sono espressi rispetto alle dimensioni di ciascuna sensitività in modo da essere rappresentati adimensionalmente.

### 3.2.1 Identificabilità del sistema II

Il sistema II corrisponde ad un unico esperimento condotto nella seguente maniera: al tempo di inizio, nel terreno di coltura, MHB (brodo Muller-Hinton), viene dosato l'inoculo batterico e l'antibiotico. Il sistema viene mantenuto alla temperatura di 35°C per 24 ore.

#### 3.2.1.1 Risultati dei test

Non è possibile trovare alcuna concentrazione iniziale per cui il test T1 sia verificato. Anche il test T2 non viene verificato, coerentemente con quanto era già stato osservato nella Tabella 3.2. Tuttavia è importante notare come variano la concentrazione batterica e le sensitività all'aumentare della concentrazione iniziale.



**Figura 3.1.** (a) Profili della concentrazione batterica negli esperimenti realizzati a diverse concentrazioni iniziali di antibiotico. Sensitiv a dinamiche per (b)  $Ca_0=0.1 \text{ mg/L}$ ; (c)  $Ca_0=1.0 \text{ mg/L}$ ; (d)  $Ca_0=3.0 \text{ mg/L}$

Si sono costruiti i profili della concentrazione della carica batterica e delle sensitività in tre diversi casi:  $Ca_0 = 0.1 \text{ mg/L}$ ;  $Ca_0 = 1 \text{ mg/L}$ ;  $Ca_0 = 3 \text{ mg/L}$ . La Figura 3.1a indica tre andamenti caratteristici: a concentrazione più bassa, si ha solo crescita; a concentrazione intermedia si evidenzia il fenomeno della ricrescita; a concentrazione elevata c'è la morte di tutte le cellule.

**Tabella 3.7** Matrice di correlazione tra le colonne di  $\mathbf{P}_E$  per il sistema a  $Ca_0 = 0.1 \text{ mg/L}$ .

	$s_1$	$s_2$	$s_3$	$s_4$	$s_5$	$s_6$	$s_7$
$s_1$	1.0000	0.9996	-0.9993	-0.9996	0.9459	0.8513	0.8551
$s_2$	0.9996	1.0000	-0.9999	<b>-1.0000</b>	0.9539	0.8370	0.8409
$s_3$	-0.9993	-0.9999	<b>1.0000</b>	<b>1.0000</b>	-0.9567	-0.8313	-0.8353
$s_4$	-0.9996	<b>-1.0000</b>	<b>1.0000</b>	1.0000	-0.9546	-0.8354	-0.8394
$s_5$	0.9459	0.9539	-0.9567	-0.9546	1.0000	0.6419	0.6470
$s_6$	0.8513	0.8370	-0.8313	-0.8354	0.6419	1.0000	<b>1.0000</b>
$s_7$	0.8551	0.8409	-0.8353	-0.8394	0.6470	<b>1.0000</b>	1.0000

**Tabella 3.8** Matrice di correlazione tra le colonne di  $\mathbf{P}_E$  per il sistema a  $Ca_0 = 1.0 \text{ mg/L}$ .

	$s_1$	$s_2$	$s_3$	$s_4$	$s_5$	$s_6$	$s_7$
$s_1$	1.0000	<b>1.0000</b>	<b>-1.0000</b>	0.9912	0.9421	0.9977	0.9981
$s_2$	<b>1.0000</b>	1.0000	<b>-1.0000</b>	0.9907	0.9408	0.9975	0.9979
$s_3$	<b>-1.0000</b>	<b>-1.0000</b>	1.0000	-0.9903	-0.9401	-0.9973	-0.9976
$s_4$	0.9912	0.9907	-0.9903	1.0000	0.9767	0.9978	0.9975
$s_5$	0.9421	0.9408	-0.9401	0.9767	1.0000	0.9617	0.9603
$s_6$	0.9977	0.9975	-0.9973	0.9978	0.9617	1.0000	<b>1.0000</b>
$s_7$	0.9981	0.9979	-0.9976	0.9975	0.9603	<b>1.0000</b>	1.0000

**Tabella 3.9** Matrice di correlazione tra le colonne di  $\mathbf{P}_E$  per il sistema a  $Ca_0 = 3.0 \text{ mg/L}$ .

	$s_1$	$s_2$	$s_3$	$s_4$	$s_5$	$s_6$	$s_7$
$s_1$	1.0000	0.5943	<b>-1.0000</b>	0.9997	0.4725	0.1858	0.1872
$s_2$	0.5943	1.0000	-0.5963	0.5802	-0.4266	-0.4421	-0.4423
$s_3$	<b>-1.0000</b>	-0.5963	1.0000	-0.9996	-0.4703	-0.1823	-0.1837
$s_4$	0.9997	0.5802	-0.9996	1.0000	0.4886	0.2104	0.2118
$s_5$	0.4725	-0.4266	-0.4703	0.4886	1.0000	0.7304	0.7321
$s_6$	0.1858	-0.4421	-0.1823	0.2104	0.7304	1.0000	<b>1.0000</b>
$s_7$	0.1872	-0.4423	-0.1837	0.2118	0.7321	<b>1.0000</b>	1.0000

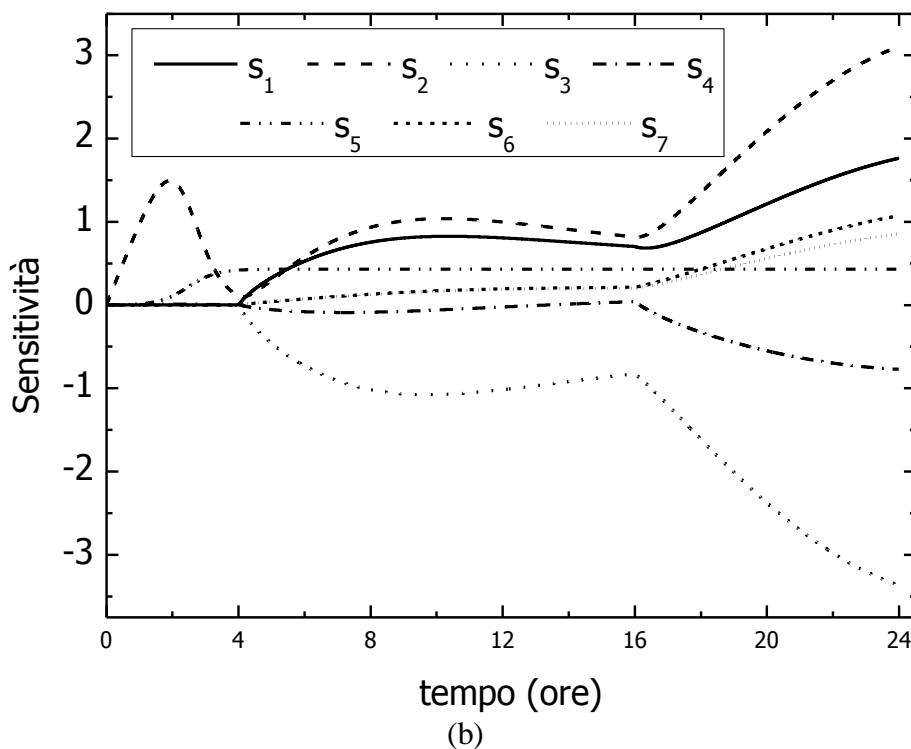
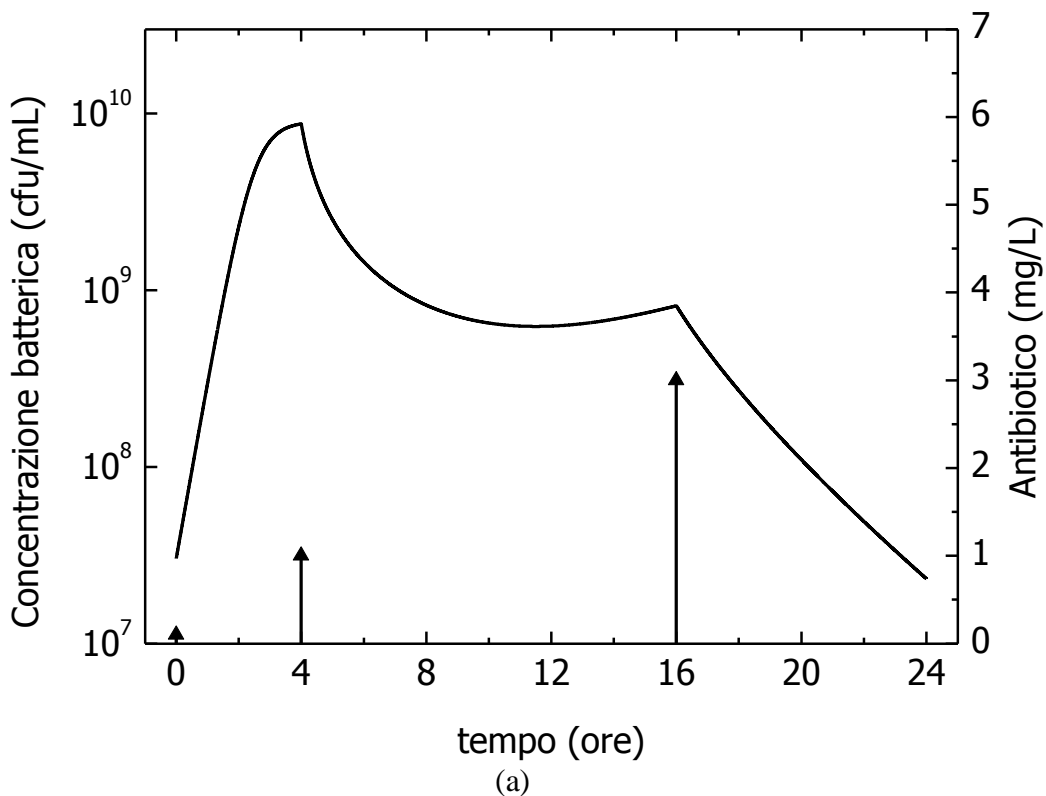
La Figura 3.1b riporta le sensitività dinamiche, per la concentrazione più bassa; la Figura 3.1c rappresenta le sensitività per la concentrazione intermedia; la Figura 3.1d riporta le sensitività per la concentrazione più elevata.

In ogni differente esperimento, alcune sensitività sono più elevate, tuttavia, spesso risultano anche molto correlate con le altre, come emerge dal test  $T2$  i cui risultati sono riportati nelle tabelle 3.7-3.9. In generale si dovrebbero trovare delle condizioni nelle quali si ha la possibilità di ottenere misure con un valore elevato delle sensitività ma allo stesso tempo queste devono essere poco correlate tra di loro. Per il primo esperimento, emerge che  $s_2$  e  $s_5$  sono più significative, ma solo  $s_5$  non è strettamente correlata con tutti gli altri parametri. Anche negli altri casi  $s_5$  è la meno correlata alle altre sensitività, tuttavia il suo valore assoluto è basso, come si nota dai grafici (Figura 3.1c e d). Nel terzo esperimento  $s_2$  non è molto correlata agli altri parametri ed il suo valore è elevato;  $s_6$  e  $s_7$  sono sempre correlati +1 in tutti i casi proposti. Si nota che, benché in ciascun grafico (Figure 3.1 b, c e d), non sia possibile individuare dei punti di campionamento che garantiscano valori elevati di sensitività e scarsa correlazione tra i profili, gli andamenti tra i grafici appaiono notevolmente differenti. Da queste osservazioni preliminari emerge che, benché ciascun esperimento non consenta l'identificazione parametrica del modello, una loro unione potrebbe invece renderla possibile. Inoltre si nota che il modello, in ciascun esperimento, è maggiormente influenzato da un sottoinsieme di parametri diverso.

Nello studio  $I2$  si cerca di stimare i parametri fornendo delle variazioni della concentrazione di antibiotico durante l'esperimento, in modo da realizzare un unico esperimento che riproduca tutti gli andamenti caratteristici; nel caso di  $I3$  ogni profilo caratteristico è riprodotto in un esperimento diverso, assemblando vari esperimenti in parallelo.

### 3.2.2 Identificabilità del sistema $I2$

Il sistema  $I2$  corrisponde ad un unico esperimento condotto nella seguente maniera: al tempo di inizio, nel terreno di coltura MHB (brodo Muller-Hinton), viene dosato l'inoculo batterico e l'antibiotico con concentrazione iniziale  $Ca_0 = 0.1 \text{ mg/L}$ . Dopo 4 ore viene aggiunta un'altra dose di antibiotico in modo da raggiungere una concentrazione dello stesso pari a  $1 \text{ mg/L}$ ; un'ultima dose tale da portare la concentrazione nel sistema a  $3 \text{ mg/L}$ , è aggiunta a 16 ore dall'inizio. Il sistema viene mantenuto alla temperatura di  $35^\circ\text{C}$  durante l'esecuzione per un tempo di 24 ore.



**Figura 3.2** (a) Andamento della concentrazione batterica per l'I2. Le frecce verticali indicano la quantità (asse verticale di destra) di antibiotico aggiunta. (b) Sensitività dinamiche.

### 3.2.2.1 Risultati dei test

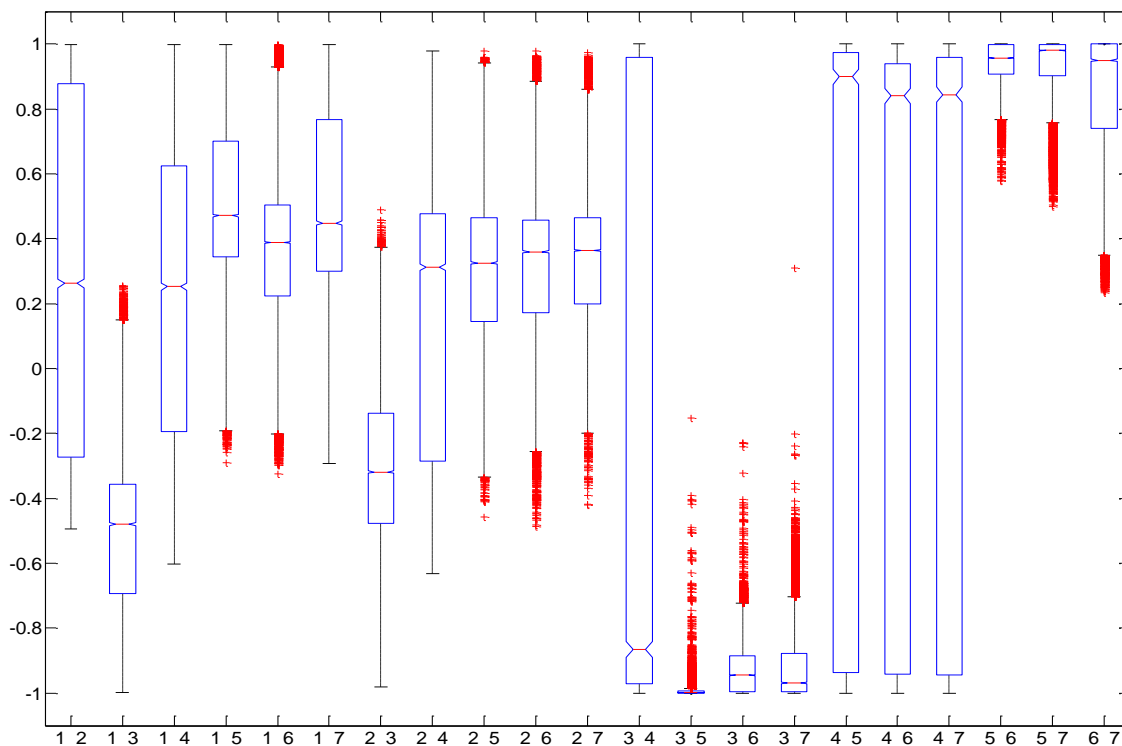
In questo caso tutti i test sono positivi. La distanza massima del test  $T1$  è  $1.9 \cdot 10^{-8}$ , inferiore a  $10^{-6}$ . Nel test  $T2$  si nota che la correlazione di  $s_6$  e  $s_7$  è prossima ad 1, perciò è probabile che non sarà possibile progettare questo esperimento in modo da ottenere una stima accurata dei parametri  $\beta$  e  $\tau$ .

**Tabella 3.10.** Matrice di correlazione tra le colonne di  $\mathbf{P}_E$  per il sistema I2.

	$s_1$	$s_2$	$s_3$	$s_4$	$s_5$	$s_6$	$s_7$
$s_1$	1.0000	0.2226	-0.9314	-0.0048	0.0445	0.6192	0.7154
$s_2$	0.2226	1.0000	-0.1914	0.0767	0.1254	0.2248	0.2438
$s_3$	-0.9314	-0.1914	1.0000	0.3644	0.1383	-0.8145	-0.8667
$s_4$	-0.0048	0.0767	0.3644	1.0000	0.4909	-0.5978	-0.4945
$s_5$	0.0445	0.1254	0.1383	0.4909	1.0000	-0.3520	-0.2978
$s_6$	0.6192	0.2248	-0.8145	-0.5978	-0.3520	1.0000	0.9895
$s_7$	0.7154	0.2438	-0.8667	-0.4945	-0.2978	0.9895	1.0000

È interessante studiare come l'incertezza iniziale che si ha sui parametri influenzi l'identificabilità del sistema. Lo studio precedente è stato condotto in prossimità di un solo particolare vettore dei parametri, in base al quale si fissa il vettore dell'esperimento. Avendo fissato il vettore dell'esperimento, si può estendere la verifica dell'identificabilità a tutto il range dei parametri per capire quanto l'incertezza che si ha sui parametri possa produrre esperimenti che non consentono l'identificazione parametrica del modello. I risultati riportati nella Figura 3.3 mostrano come si distribuisce la correlazione tra parametri per diversi vettori dell'esperimento. I vettori dell'esperimento sono stati creati suddividendo il range di ciascun parametro in intervalli regolari e si è poi calcolata la correlazione tra parametri per tutte le combinazioni possibili dei valori dei parametri. La distribuzione della correlazione per ciascun elemento della matrice di correlazione delle sensitività è rappresentato dal box-plot della Figura 3.3. In ordinata è riportata la correlazione, in ascissa sono riportati gli elementi  $c_{ij}$  della parte triangolare superiore della matrice di correlazione (2.8). In ogni box-plot, il box inferiore è delimitato dal primo quartile e dalla mediana; il box superiore è delimitato dalla mediana dal terzo quartile. I baffi si estendono dal primo quartile e dal terzo per una ampiezza massima pari a 1.5 volte il range interquartile. I punti esterni ai baffi sono contrassegnati con il simbolo "+". La Figura 3.3 è stata ottenuta suddividendo il range di ogni parametro in 3 parti uguali, individuando dunque 4 valori possibili per ogni parametro. Le combinazioni generate sono state  $4^7 = 16384$ . Gli elementi  $c_{ij}$  della matrice di correlazione che sono distribuiti lontano dagli estremi  $\pm 1$  non causano problemi di identificabilità, mentre gli elementi che si trovano principalmente agli estremi indicano la non identificabilità. Si noti come la correlazione tra alcuni parametri sia molto elevata nella maggior parte dei casi.





**Figura 3.3** Box-plot che riporta le distribuzioni degli elementi della matrice di correlazione.

È dunque molto probabile progettare esperimenti, che in fase di stima non consentano di identificare parametricamente il modello, perché gli esperimenti realizzati corrispondono a sistemi non identificabili.

### 3.2.3 Identificabilità del sistema *I3*

Il sistema *I3* è composto da tre esperimenti del tipo del sistema *I1*, che vengono condotti contemporaneamente. Dall'unione degli esperimenti è possibile costruire un sistema per cui i test siano verificati. Il *T1* è soddisfatto, e la distanza è pari a  $2.25 \cdot 10^{-10}$ . Anche il test *T3* è verificato, esso è condotto sulla matrice  $\mathbf{P}_E$ , ed è equivalente al test condotto sulla matrice realizzata dall'unione in colonna delle matrici  $\mathbf{P}_{E,i}$  di ciascuno degli esperimenti studiati nel §3.2.1.1, si ha che:

$$\text{corr}(\mathbf{P}_E) = \text{corr} \left( \begin{bmatrix} \mathbf{P}_{E,1} \\ \mathbf{P}_{E,2} \\ \mathbf{P}_{E,3} \end{bmatrix} \right).$$

Dalla Tabella 3.9 si hanno correlazioni tra  $\beta$  e  $\tau$  praticamente pari a uno, ma il fatto che il test *T1* sia verificato suggerisce che la progettazione possa essere realizzabile. È importante notare che, se la matrice  $\mathbf{P}_E$  è costruita dall'unione di esperimenti che non sono identificabili, la correlazione delle sensitività non è una combinazione lineare delle correlazioni dei singoli

esperimenti, perciò dall'unione di sistemi non identificabili si possono realizzare sistemi i cui parametri sono stimabili.

**Tabella 3.11.** Matrice di correlazione tra le colonne di  $\mathbf{P}_E$  per il sistema I3.

	$s_1$	$s_2$	$s_3$	$s_4$	$s_5$	$s_6$	$s_7$
$s_1$	1.0000	0.9429	-0.9961	0.3197	-0.0183	0.9844	0.9848
$s_2$	0.9429	1.0000	-0.9316	0.3813	-0.0729	0.9084	0.9086
$s_3$	-0.9961	-0.9316	1.0000	-0.2346	0.0985	-0.9940	-0.9944
$s_4$	0.3197	0.3813	-0.2346	1.0000	0.8565	0.1676	0.1679
$s_5$	-0.0183	-0.0729	0.0985	0.8565	1.0000	-0.1546	-0.1539
$s_6$	0.9844	0.9084	-0.9940	0.1676	-0.1546	1.0000	0.9998
$s_7$	0.9848	0.9086	-0.9944	0.1679	-0.1539	0.9998	1.0000

### 3.3 Progettazione di esperimenti per l'identificazione parametrica

Gli esempi di progettazione riportati nel seguito, si sviluppano dai risultati dello studio dell'identificabilità. Gli esperimenti sono stati progettati numericamente, secondo il criterio  $D$ -ottimale, mentre altri criteri di progettazione verranno discussi e applicati nel capitolo successivo. In questo capitolo, invece, l'obiettivo principale è il confronto dei risultati di diverse configurazioni degli esperimenti.

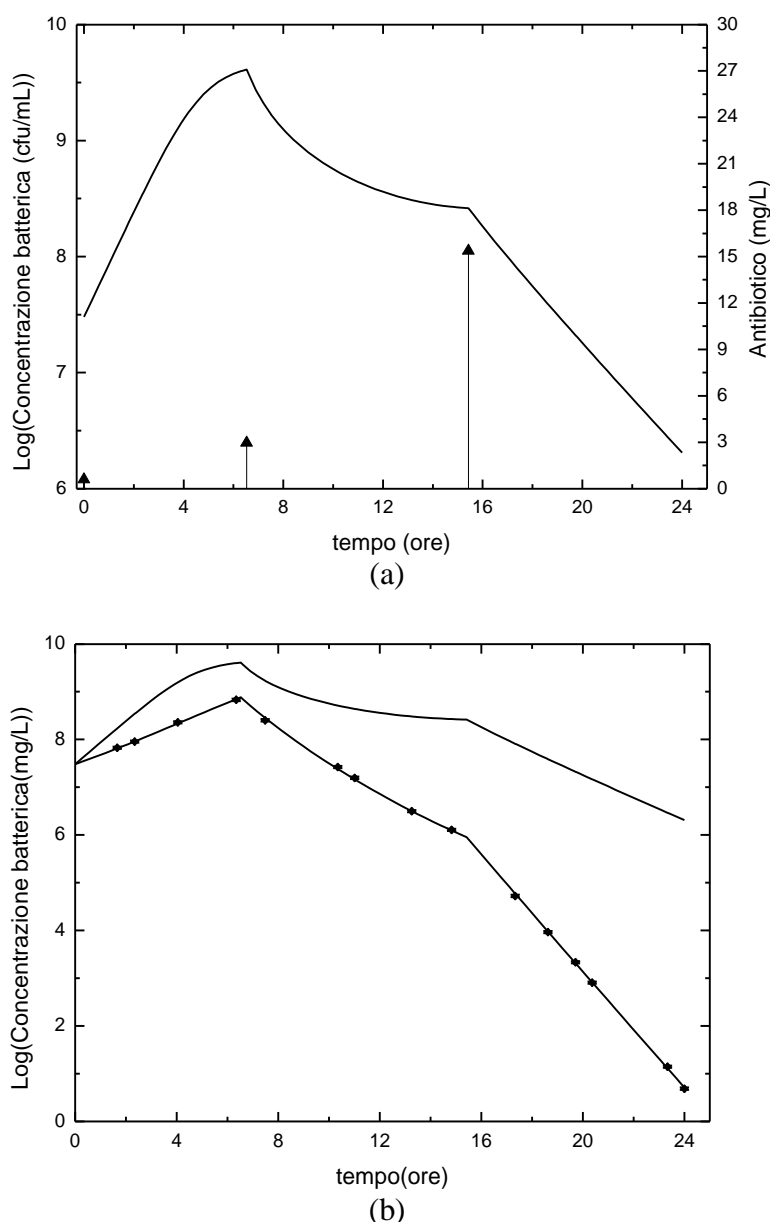
#### 3.3.1 Modello dell'errore

Stabilire correttamente il modello dell'errore sulle misure è di fondamentale importanza nella progettazione degli esperimenti. Tuttavia dalla ricerca condotta in letteratura, non è stato possibile individuare un unico modello dell'errore. Si è scelto l'errore a media zero e varianza relativa costante sulla concentrazione batterica perché la tecnica di misura adottata si basa sulla diluizione. Infatti viene rilevata una concentrazione di una soluzione che è stata diluita proporzionalmente alla sua concentrazione iniziale. L'errore deve essere moltiplicato per la diluizione effettuata che è proporzionale alla concentrazione iniziale. Non si è invece considerato il caso di diluizione multiple che porta l'errore a crescere esponenzialmente con il numero delle diluizioni. Per descrivere l'errore relativo costante, si è scelto il parametro  $\omega$  (2.29) pari al 5%. Poiché nelle progettazioni successive si farà sempre riferimento al logaritmo in base 10 delle misure di concentrazione batterica, l'errore relativo, in scala logaritmica, diventa un errore costante con deviazione standard pari 0.0212. Inoltre si è considerata una soglia di non rilevabilità della concentrazione batterica pari a 500 cfu/mL; valori inferiori sono interpretabili come misure a concentrazione nulla. Si osserva infine, che usare un errore costante è vantaggioso qualora il valore dell'errore non sia noto, perché la matrice di informazione dinamica di Fisher non varia con l'errore, e quindi l'errore non

influisce sulla progettazione dell'esperimento, ma modifica solo le stime dei parametri. In questo modo i risultati ottenuti mettono in luce le proprietà strutturali del modello.

### 3.3.2 Esperimento E1

La progettazione E1 prevede l'ottimizzazione delle condizioni sperimentali che caratterizzano il sistema I2. Il vettore dell'esperimento è lo stesso di I2 al quale però sono aggiunti i punti di campionamento.



**Figura 3.4.** (a) Profilo della concentrazione per l'esperimento E1; le frecce rappresentano la quantità di antibiotico aggiunta rispetto al volume del sistema; (b) differenza tra il profilo progettato e l'andamento stimato della concentrazione.

Il numero di punti campionati è pari a 15, e la distanza minima che intercorre tra due misure è di almeno 5 minuti. La progettazione produce dei profili di concentrazione (Figura 3.4a) che sono simili a quelli studiati per l'identificabilità *I2* (Figura 3.2a), ma presentano una fase di decrescita più accentuata.

Tuttavia durante l'esperimento a causa del *mismatch* tra parametri, la concentrazione assume valori inferiori. La stima è stata condotta rimuovendo i punti non misurabili (ultimi due campionamenti). Nella Tabella 3.12 si riportano i valori di progetto dei parametri, seguiti dal *t*-value con cui si prevede che i parametri siano stimati. Si riportano poi, le stime effettuate e il *t*-value della stima. I risultati della Tabella 3.12 mostrano che sia in fase di progettazione che in fase di stima l'accuratezza delle statistiche è molto bassa, ed è inferiore al valore di riferimento, nonostante ciò, si ottiene una stima dei parametri molto prossima al valore vero.

**Tabella 3.12.** Risultati della progettazione e della stima per *E1*.

	$C_{50k}$ [mg·L <sup>-1</sup> ]	$K_g$ [hr <sup>-1</sup> ]	$K_k$ [hr <sup>-1</sup> ]	$H$ [-]	$N_{max} \cdot 10^9$ [cfu·mL <sup>-1</sup> ]	$\beta$ [-]	$\tau$ [L·mg <sup>-1</sup> ·hr <sup>-1</sup> ]
<b>Valore di progetto</b>	0.83	1.25	0.83	1.25	1.25	1.25	0.83
<b><i>t</i>-value progetto</b>	0.27	0.25	0.31	0.41	0.27	1.19	0.77
<b>Valore stimato</b>	0.90	1.02	1.00	1.13	1.42	1.23	1.06
<b><i>t</i>-value stima</b>	0.16	0.08	0.13	0.13	0.17	0.52	0.35
<i>t</i> -value 95% (progettazione)= 1.86				<i>t</i> -value 95% (stima) = 2.02			

I vantaggi di questo esperimento risiedono nella durata limitata a 24 ore e nell'unica prova da condurre. Sono però diversi, i fattori che rendono questo tipo di esperimento poco conveniente. Sebbene l'esperimento progettato appare in grado di stimare i parametri, la precisione della stima è molto bassa. Inoltre la sua realizzazione richiede l'applicazione di apparati sperimentali che non sono quelli impiegati usualmente in microbiologia, infatti è necessario modificare il terreno di coltura durante l'esperimento con l'aggiunta di antibiotico. Nelle prossime progettazioni si cercherà di ottimizzare l'esecuzione di esperimenti semplici in parallelo, che non richiedono interventi durante l'esecuzione se non per il prelievo dei campioni.

### 3.3.3 Esperimenti *E2*

Gli esperimenti *E2* sono costituiti da tre esperimenti in parallelo della durata di 24 ore. Per ogni esperimento si raccolgono 7 misure, ad intervalli variabili, ma che non siano inferiori a 5 minuti. Nella Figura 3.5 le linee discontinue rappresentano gli esperimenti progettati, mentre le linee continue sono le stime effettuate. Le statistiche della progettazione (Tabella 3.13) prevedono *t*-value molto elevati, indice di elevata precisione della stima. Considerando che l'errore sulle misure è basso, significa che il sistema, costituito da esperimenti in parallelo, è

una configurazione semplice ma in grado di identificare i parametri del modello, se i parametri sono prossimi al valore dei parametri usati per la progettazione. Nella stima però, a causa dell'incertezza sui parametri nella progettazione, l'andamento delle concentrazioni degli esperimenti 2 e 3 diminuisce troppo velocemente, e l'esperimento 2 non evidenzia il fenomeno della ricrescita che invece era presente nella progettazione.

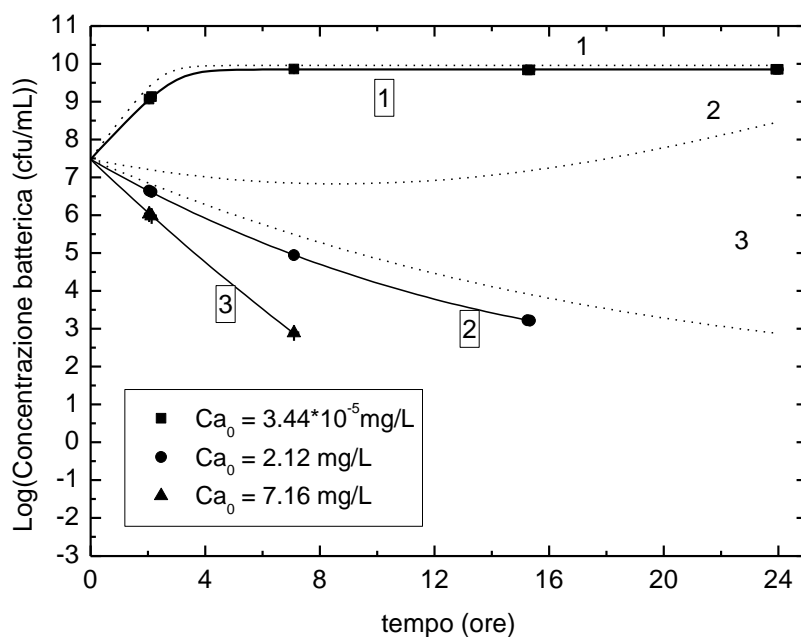
**Tabella 3.13.** Risultati della progettazione e della stima per E2.

	$C_{50k}$ [mg·L <sup>-1</sup> ]	$K_g$ [hr <sup>-1</sup> ]	$K_k$ [hr <sup>-1</sup> ]	$H$ [-]	$N_{max} \cdot 10^9$ [cfu·mL <sup>-1</sup> ]	$\beta$ [-]	$\tau$ [L·mg <sup>-1</sup> ·hr <sup>-1</sup> ]
<b>Valore di progetto</b>	0.8333	1.250	0.833	1.250	1.250	1.250	0.833
<b>t-value progetto</b>	15.96	45.02	43.93	10.72	21.37	6.672	3.48
<b>Valore stimato</b>	1.104	1.001	0.989	1.062	0.976	1.171	0.798
<b>t-value stima</b>	6.751	40.13	19.01	6.633	19.86	0.198*	0.173*
<b>st. dev.</b>	0.065	0.011	0.023	0.127	0.021	2.552	1.993
<i>t</i> -value 95% (progettazione) = 1.7612				<i>t</i> -value 95% (stima) = 1.860			

La differenza notevole tra la precisione di alcuni parametri, ottenuta dalla progettazione e la precisione della stima, può essere ricondotta a diverse cause, tra le quali:

- il numero minore di misure ottenute;
- l'incertezza sui parametri di progetto;
- l'elevata correlazione tra  $\beta$  e  $\tau$  dovuta alla non identificabilità locale del modello.

Tuttavia la correlazione elevata, pari a circa -1, è presente solo tra  $\beta$  e  $\tau$  e perciò consente di stimare in maniera accurata gli altri parametri.

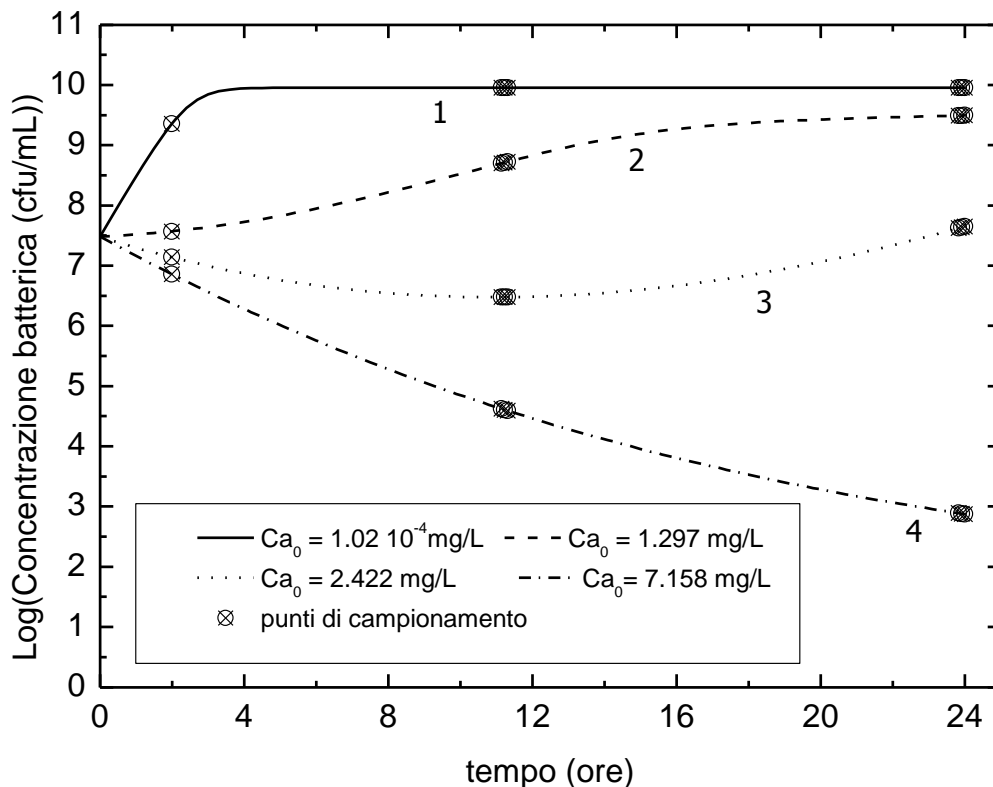


**Figura 3.5.** Andamento previsto degli esperimenti (curve 1, 2 e 3), andamento reale dei tre esperimenti ( curve 1, 2 e 3 ) e punti misurati.

La progettazione *E2* mostra che è possibile risolvere correttamente il problema dell'identificazione parametrica, ma presenta degli svantaggi legati all'incertezza iniziale sui parametri, la quale produce profili di progetto molto diversi da quelli reali. Inoltre l'esperimento reale richiederebbe di effettuare delle misure a concentrazioni troppo basse; le progettazioni degli esperimenti realizzate in questo modo non sono quindi abbastanza robuste. Nella prova che segue, si cerca di rendere la progettazione più robusta aumentando il numero di esperimenti in parallelo.

### 3.3.4 Esperimenti *E3*

La progettazione *E3* è identica alla precedente, se non per l'aggiunta un altro esperimento. I risultati della progettazione sono rappresentati nella Figura 3.5a, e si notano andamenti che descrivono sia la crescita, sia la morte, sia la ricrescita.



**Figura 3.6.** Profili ottenuti dalla progettazione di esperimenti paralleli; i cerchi rappresentano i tempi di campionamento.

Come per il sistema *E2*, dalla progettazione risulta che i parametri del modello sono identificabili poiché la precisione dei parametri stimati è elevata (Tabella 3.14). In questo caso, similmente al precedente, quando si eseguono gli esperimenti si ottengono punti campionati che non sono utilizzabili perché assumono valori troppo bassi e quindi, anche aumentando il numero degli esperimenti i punti da scartare sono molti. La correlazione tra  $\beta$  e  $\tau$  rimane circa pari a -1, e diversamente da quanto previsto nella progettazione non si riesce ad avere sufficiente precisione nella stima di questi parametri. Nonostante ciò, visto che  $\beta$  e  $\tau$

sono poco correlati con gli altri parametri, è possibile avere precisione e accuratezza elevata nella stima di questi altri parametri. Si può affermare che, sebbene il numero di esperimenti e di misure sia aumentato, il modello rimane difficilmente identificabile.

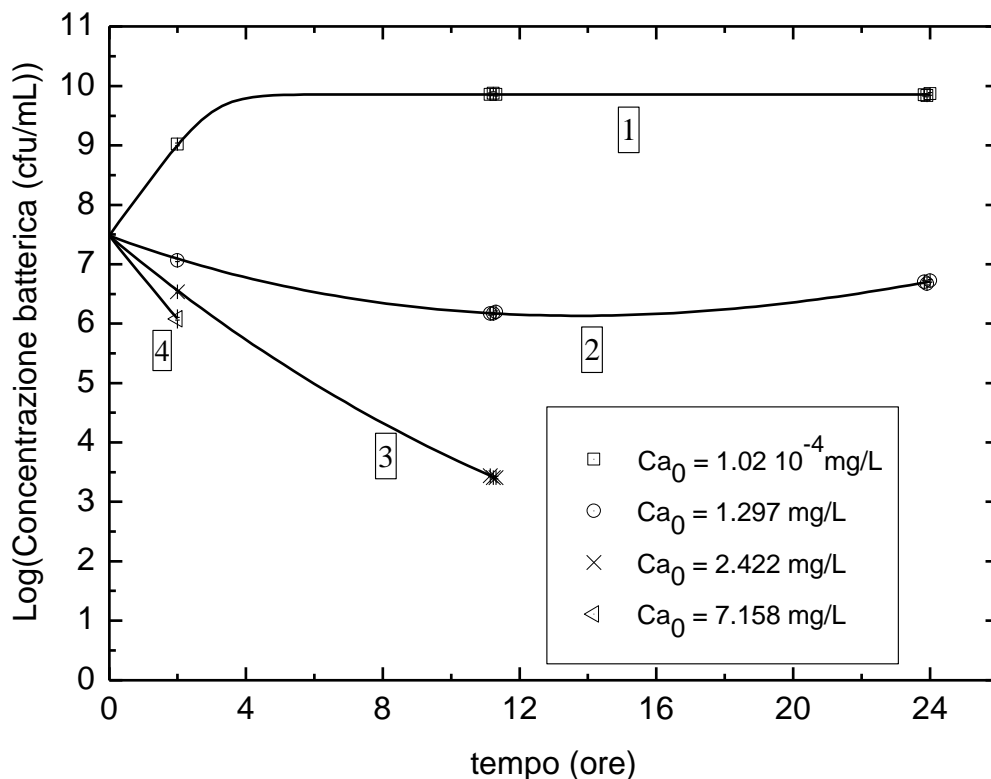


Figura 3.7. Profili ottenuti dalla stima dei parametri e punti campionati.

Dai risultati della progettazione E2 ed E3 si può concludere che la progettazione in parallelo degli esperimenti è adatta per identificare alcuni parametri del modello in maniera semplice; tuttavia la progettazione di esperimenti in parallelo è gravemente penalizzata dall'incertezza iniziale che si ha sui parametri.

Tabella 3.14. Risultati della progettazione.

	$C_{50k}$ [mg·L <sup>-1</sup> ]	$K_g$ [hr <sup>-1</sup> ]	$K_k$ [hr <sup>-1</sup> ]	$H$ [-]	$N_{max} \cdot 10^9$ [cfu·mL <sup>-1</sup> ]	$\beta$ [-]	$\tau$ [L·mg <sup>-1</sup> ·hr <sup>-1</sup> ]
<b>Valore di progetto</b>	0.83	1.25	0.83	1.25	1.25	1.25	0.83
<b>t-value progetto</b>	42.67	35.79	46.39	29.92	28.24	17.34	12.39
<b>Valore stimato</b>	1.000	0.987	0.986	1.020	1.004	1.196	0.811
<b>t-value stima</b>	13.59	29.43	29.84	18.59	20.03	0.254*	0.227*
t-value 95% (progettazione) = 1.721				t-value 95% (stima I) = 1.7612			

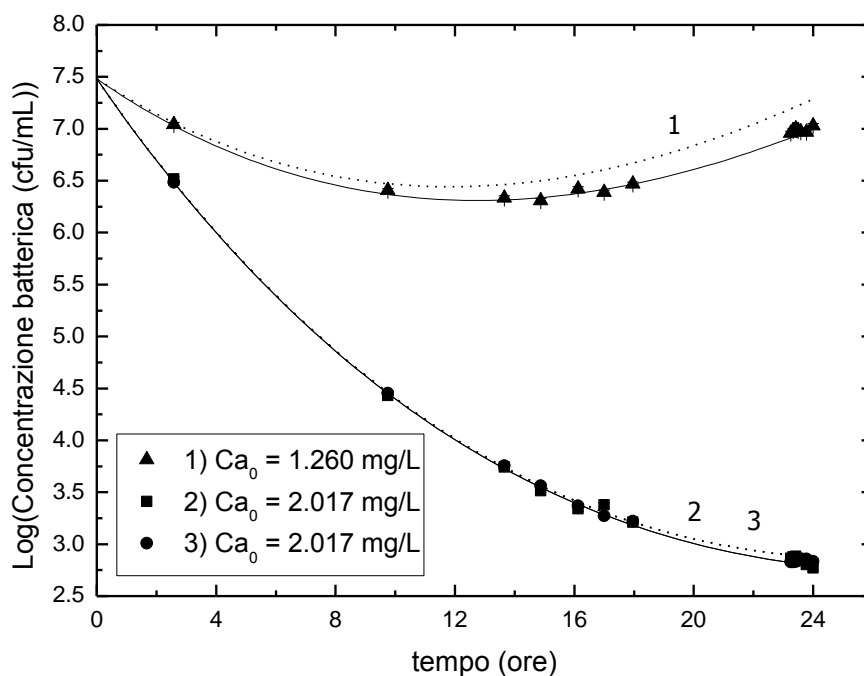
Per ottenere una buona stima dei parametri è sufficiente un numero minimo di esperimenti in parallelo molto informativi, ma l'incertezza del risultato della progettazione costringe ad effettuare un numero elevato per individuare quelli che riproducono i profili ottimali.

Seguendo una progettazione in parallelo si possono sfruttare esperimenti semplici in tempi ridotti, ma si avrà anche uno spreco di risorse, poiché a causa di profili sperimentali diversi da quelli progettati, si ottengono misure che devono essere scartate.

L'ultimo esempio di progettazione applica lo schema parallelo-sequenziale della progettazione, in maniera da migliorare progressivamente la conoscenza dei parametri stimati.

### 3.3.5 Esperimenti E4

Nella progettazione E4 vengono realizzati 3 esperimenti in parallelo secondo il criterio D-ottimale, come in E2. Si utilizza poi la stima ottenuta per eseguire una nuova progettazione simile alla precedente. Infine dopo l'esecuzione degli esperimenti si effettua la stima dei parametri.



**Figura 3.8.** Caso 1: primo set di esperimenti ottenuto effettuando una progettazione D-ottimale. Le linee tratteggiate rappresentano gli andamenti ottenuti dalla progettazione, mentre le linee continue rappresentano la stima. Dalla progettazione si sono ottenuti due esperimenti caratterizzati dallo stesso vettore degli esperimenti.

I risultati del design e della stima dei primi tre esperimenti in parallelo sono identici a quelli di E2. Si sono utilizzati i dati degli esperimenti di E2 e la stima dei parametri per progettare il set successivo di prove costituito da tre esperimenti condotti in parallelo. L'obiettivo del secondo set di esperimenti è quello di identificare tutti i parametri del modello, specialmente  $\beta$  e  $\tau$ . L'attenzione della seconda progettazione però, può essere posta sul miglioramento complessivo della stima di tutti i parametri (primo caso), oppure cercare di identificare solo i parametri per i quali non si erano ottenuti risultati soddisfacenti nella progettazione precedente (secondo caso). In questo secondo caso è possibile effettuare una stima fissando i



parametri che si ritiene siano stati stimati in maniera sufficientemente precisa nella fase precedente. Questo modo di procedere si può ritenere corretto solo se i parametri fissati sono poco correlati rispetto a quelli ancora da stimare.

**Tabella 3.15.** Risultati della progettazione e della stima per E4, primo caso.

	$C_{50k}$ [mg·L <sup>-1</sup> ]	$K_g$ [hr <sup>-1</sup> ]	$K_k$ [hr <sup>-1</sup> ]	$H$ [-]	$N_{max} \cdot 10^9$ [cfu·mL <sup>-1</sup> ]	$\beta$ [-]	$\tau$ [L·mg <sup>-1</sup> ·hr <sup>-1</sup> ]
<b>Valore di progetto</b>	1.104	1.001	0.989	1.062	0.976	1.171	0.7987
<b>t-value progetto</b>	49.37	45.36	68.36	60.06	22.40	2.524	2.210
<b>Valore stimato</b>	0.997	1.012	1.007	0.993	0.976	1.195	0.811
<b>t-value stima</b>	30.25	45.14	63.83	54.72	22.24	0.623*	0.561*
<b>st. dev.</b>	0.016	0.011	0.008	0.009	0.021	0.930	0.703
<i>t</i> -value 95% (progettazione) = 1.769				<i>t</i> -value 95% (stima) = 1.709			

La Tabella 3.15 riporta l'esito dell'attività sperimentale finalizzata al miglioramento della stima di tutti i parametri. Si osserva che la stima è accurata e precisa, tranne per  $\beta$  e  $\tau$ , infatti il valore vero dei parametri è prossimo al valore stimato. Dal confronto con le stime ottenute nel set precedente non si può ritenere che ci sia stato un miglioramento significativo nella stima dei parametri perciò il secondo set di esperimenti risulta superfluo.

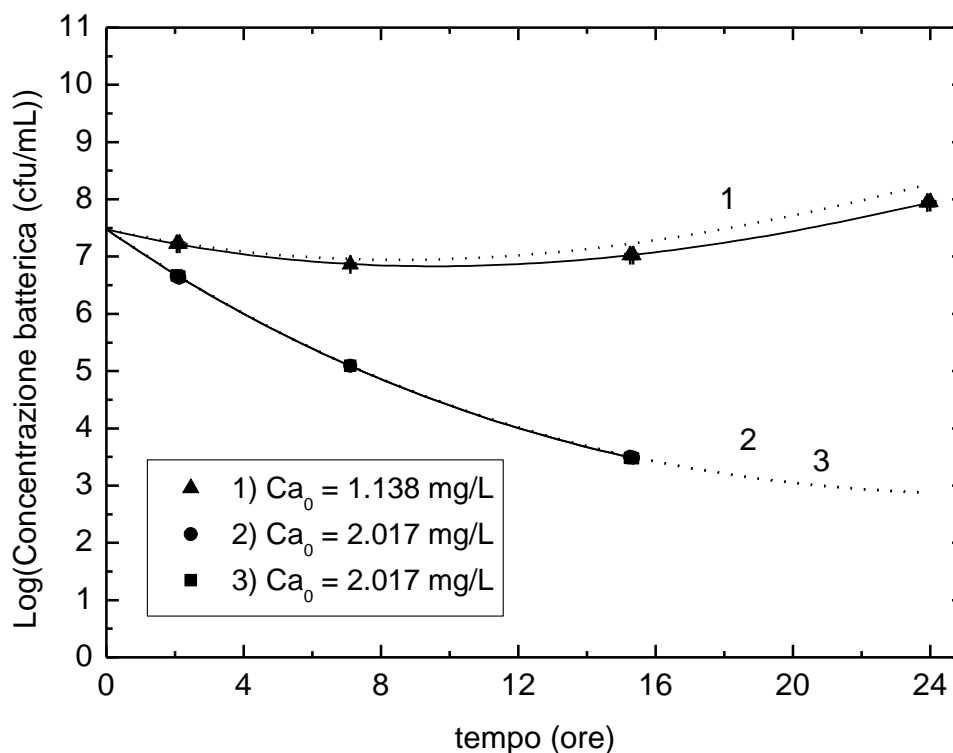
**Tabella 3.16.** Risultati della progettazione e della stima per E4, secondo caso.

	$\beta$ [-]	$\tau$ [L·mg <sup>-1</sup> ·hr <sup>-1</sup> ]
<b>Valore di progetto</b>	1.171	0.797
<b>t-value progetto</b>	5.375	4.885
<b>Valore stimato</b>	1.138	0.817
<b>t-value stima</b>	1.103*	1.03*
<b>st. dev.</b>	0.5039	0.3872
<i>t</i> -value 95% (progettazione) = 1.691		<i>t</i> -value 95% (stima) = 1.701

Nel caso 2 invece, si prevedono ulteriori esperimenti dopo il primo set, al fine studiare se è possibile ottenere una stima migliore solo per  $\beta$  e  $\tau$ . Con la progettazione del secondo caso (Tabella 3.16) sono previsti 3 esperimenti uguali con concentrazione iniziale di antibiotico pari a  $Ca_0 = 2.017$  mg/mL. I profili della progettazione e della stima sono identici ai profili 2 e 3 della Figura 3.7. Dalla progettazione si ottengono indicazioni ottimistiche sulla precisione della stima da effettuare, caratterizzate da un elevato livello di precisione, tuttavia dopo l'esecuzione dell'esperimento si evidenzia una correlazione pari a -1 tra  $\beta$  e  $\tau$  e non si riesce a migliorare significativamente la stima precedente. Nonostante questo, si nota comunque un

aumento di precisione della stima imputabile al maggior numero di misure utilizzato, nello stesso modo in cui migliorava la precisione aumentando il numero di misure campionate tra *E2* ed *E3*.

Si è provato quindi a raddoppiare il numero di campionamenti per verificare se è possibile migliorare ulteriormente la precisione di  $\beta$  e  $\tau$  stimati.



**Figura 3.9.** Le linee tratteggiate rappresentano gli andamenti ottenuti dalla progettazione, mentre le linee continue rappresentano la stima. Sono state usate 14 punti di campionamento. Dalla progettazione si sono ottenuti due esperimenti caratterizzati dallo stesso vettore degli esperimenti.

**Tabella 3.17.** Risultati della progettazione e della stima per *E4* con 14 misure per ogni esperimento.

	$\beta$ [-]	$\tau$ [L·mg <sup>-1</sup> ·hr <sup>-1</sup> ]
<b>Valore di progetto</b>	1.171	0.797
<b>t-value progetto</b>	9.264	8.500
<b>Valore stimato</b>	1.168	0.850
<b>t-value stima</b>	9.783	8.931
<b>st. dev.</b>	0.059	0.047
<i>t</i> -value 95% (progettazione) = 1.673		
<i>t</i> -value 95% (stima) = 1.673		

Aumentando il numero di misure la precisione prevista aumenta (Tabella 3.17) rispetto alla progettazione precedente; si ottiene, inoltre una stima della precisione che è simile a quella di

progetto. L'accuratezza, però, rimane influenzata negativamente dalla correlazione paria  $-1$  tra  $\beta$  e  $\tau$ , ed il valore stimato appare più lontano rispetto all'intervallo di fiducia previsto. Poiché la differenza tra il valore stimato e quello vero è circa tre volte la deviazione standard, la fiducia nell'accettare la stima al 95% dovrebbe essere inferiore al valore di 1.673 (Tabella 3.17). Incrementare il numero di misure può essere utile per migliorare l'accuratezza dei parametri se non sono correlati, mentre non apporta nessun miglioramento per i parametri correlati. Nel caso particolare, la considerazione precedente è giustificata dal fatto che, nonostante la stima non si discosti molto dal valore vero, essa non è significativamente diversa dal valore di progetto. Inoltre si è visto che il risultato della stima per  $\beta$  e  $\tau$  è molto influenzato dal valore di progetto, e gli risulta comunque simile.

### 3.3.6 Conclusioni

La progettazione in parallelo - sequenziale permette di aumentare progressivamente l'accuratezza dei parametri non correlati, fino a raggiungere una stima molto prossima al loro valore vero. Allo stesso tempo i profili di progetto tendono a coincidere con l'andamento reale delle variabili misurate tanto più i parametri usati per la progettazione sono una buona approssimazione dei parametri veri. Se sono presenti parametri correlati, essi non peggiorano la descrizione dei dati da parte del modello, ma non è possibile arrivare ad una loro stima. La stima dei parametri correlati, infatti non tende al valore vero all'aumentare del numero di prove. La progettazione in sequenza non porta alcun miglioramento se i parametri sono esattamente correlati.

Un altro problema della progettazione in parallelo, emerso dagli esempi riportati, è la differenza tra gli andamenti delle variabili misurate negli esperimenti e i profili ottenuti nella progettazione. La MBD<sub>oE</sub> è sviluppata sull'ipotesi che la varianza sui i parametri della progettazione sia nota e il valore usato rappresenti la migliore stima disponibile. In generale tuttavia, si osserva ancora come l'efficacia della progettazione sia influenzata dall'incertezza iniziale. In particolare, è evidente che progettare esperimenti quando i valori stimati dei parametri sono lontani dal valore vero, può determinare l'esecuzione di prove in cui le misure sono prive di significato perché al disotto della sensibilità dello strumento.

Nel prossimo capitolo si cercherà di approfondire il legame della correlazione tra parametri e la loro stima, con l'introduzione di altri criteri di progettazione e si applicheranno tecniche volte a limitare gli effetti negativi dell'incertezza sui parametri di progettazione.



# Capitolo 4

## Confronto tra criteri di progettazione di esperimenti

Si è visto che il successo della progettazione in parallelo dipende principalmente da due aspetti legati tra loro: la realizzazione di esperimenti che esplorino le componenti principali dell'informazione; l'incertezza sui parametri con cui si progettano gli esperimenti. Nel capitolo precedente si era evidenziato il fatto che la capacità di stimare i parametri risiedeva nel riprodurre particolari profili di concentrazione, ma la progettazione non consentiva in molti casi la realizzazione ottimale degli esperimenti a causa dell'incertezza dei parametri.

### 4.1 Progettazione SV-ottimale

In questo capitolo si vuole verificare l'efficacia di un altro criterio di progettazione, il criterio *SV-ottimale* (*singular value optimality*), basato sulla struttura della varianza. Il criterio *SV-ottimale* è stato ideato con lo scopo di esplorare parti diverse dell'informazione sfruttando esperimenti separati. Per le sue caratteristiche è particolarmente indicato per la realizzazione di esperimenti in parallelo, dove ciascun esperimento è pensato per analizzare una parte specifica della varianza.

#### 4.1.1 Criterio SV-ottimale

Lo scopo è progettare esperimenti, da condurre in parallelo, in maniera separata, scegliendo un vettore dell'esperimento per ogni prova distinta, in modo da produrre l'informazione che sia la più diversa possibile dalle altre. Per progettare un esperimento si analizza la parte della varianza che è ortogonale rispetto alle altre parti. In termini matematici significa dividere la matrice di informazione  $\mathbf{V}_\theta$  (oppure la matrice di varianza-covarianza  $\mathbf{H}_\theta$ ) nelle sue componenti principali, espresse dagli autovalori e dagli autovettori. Gli autovalori e gli autovettori vengono indicati nella seguente maniera:

$$\mathbf{V}_\theta = \mathbf{P} \cdot \mathbf{A} \cdot \mathbf{P}^T \quad a_1 > a_2 > \dots > a_{N_\theta} \quad (4.1)$$

dove  $a_i$  sono gli elementi diagonali della matrice diagonale  $\mathbf{A}$ , e corrispondono agli autovalori di  $\mathbf{V}_\theta$ , mentre  $\mathbf{P}$  è la matrice le cui colonne (i vettori  $\mathbf{p}_i$ ) contengono gli autovettori che identificano le direzioni principali; inoltre di ricorda che:

$$\mathbf{H}_\theta = \mathbf{P} \cdot \mathbf{A}^{-1} \cdot \mathbf{P}^T \quad . \quad (4.2)$$

Gli autovalori di  $\mathbf{H}_\theta$  sono il reciproco degli autovalori di  $\mathbf{V}_\theta$  e vengono indicati con la lettera greca  $\lambda_i$ .

Nella progettazione *SV*-ottimale il problema di ottimizzazione è suddiviso in molteplici problemi distinti di ottimizzazione, uno per ogni autovalore,  $a_i$  della matrice di varianza-covarianza:

$$\min_{\varphi_k} \psi_k(\mathbf{V}_\theta) \quad k = 1, \dots, N_{exp} \leq N_\theta \quad (4.3)$$

dove la misura  $k$ -esima  $\psi_k$  è definita come:

$$\psi_k = a_k(\mathbf{V}_\theta) \quad k = 1, \dots, N_{exp} \leq N_\theta \quad a_1 > a_2 > \dots > a_{N_{exp}} \quad (4.4)$$

Detto in altri termini, la scrittura precedente significa ottimizzare in parallelo i maggiori  $N_{exp}$  autovalori, risolvendo per ciascuno un problema di progettazione ottimale separato, di dimensioni minori al problema complessivo poiché la progettazione è applicata ad un solo esperimento alla volta. Il massimo numero di esperimenti che è possibile progettare è pari al numero degli autovalori  $N_\theta$ . La progettazione *SV*-ottimale permette di ridurre il volume dell'ellissoide che descrive la struttura della varianza dei parametri, in maniera selettiva per ogni esperimento. Tuttavia, la lunghezza degli assi (uguali alla radice quadrata del corrispondente autovalore della matrice  $\mathbf{V}_\theta$ ) dipende anche dalla matrice di varianza-covarianza  $\Sigma_y$ : valori elevati degli elementi della matrice (ossia misure molto rumorose) amplificano la differenza tra autovalori. Se  $\Sigma_y$  è costante durante l'esperimento, però, essa non influenza le direzioni principali, e perciò non ha effetto sulla correlazione tra parametri, questo aspetto verrà chiarito negli esempi portati in seguito. Si noti che, se la progettazione viene realizzata secondo il criterio *SV*-ottimale, la matrice di informazione (che corrisponde al reciproco della matrice di varianza covarianza) descritta dall'equazione (2.18) si semplifica, diventando:

$$\mathbf{H}_\theta(\boldsymbol{\theta}, \varphi) = \sum_{i=1}^{n_{resp}} \sum_{j=1}^{n_{resp}} s_{ij} \mathbf{Q}_i^T \mathbf{Q}_j + \mathbf{H}_\theta^0 \quad (4.5)$$

perché la matrice di informazione viene calcolata per ogni singolo esperimento. Il vantaggio che deriva dalla progettazione *SV*-ottimale è la possibilità di risolvere problemi di

ottimizzazione più piccoli, ciascuno della dimensione di  $\boldsymbol{\varphi}$  invece di risolvere un unico problema di dimensione  $N_{exp} \cdot N_{\varphi}$ . Un altro vantaggio potenziale risiede nel fatto che non si progettano gli esperimenti per massimizzare il contenuto di informazione dell'intero set, ma ogni esperimento è realizzato per massimizzare un componente specifico dell'informazione. Uno svantaggio evidente della progettazione *SV*-ottimale, invece, risiede nel numero di esperimenti che è possibile progettare in parallelo, che non può superare il numero dei parametri. Nonostante ciò, se l'apparecchiatura sperimentale prevede più unità sperimentali di quelle progettabili, è possibile combinare il criterio *SV*-ottimale con altri tipi di progettazione.

#### 4.1.2 Implementazione del criterio *SV*-ottimale

L'implementazione numerica del criterio *SV*-ottimale richiede che vengano calcolati gli autovalori della matrice di varianza - covarianza  $\mathbf{V}_{\theta}$ . Per ragioni numeriche, la matrice  $\mathbf{V}_{\theta}$  può risultare difficile o impossibile da ottenere perché contiene elementi che possono tendere ad infinito. Dal punto di vista sperimentale, questo comportamento è giustificato dal fatto che, come si è già ripetuto più volte, alcune configurazioni sperimentali non consentono di stimare i parametri: informazione nulla sui parametri significa variabilità infinita dell'errore della stima. Risulta sempre possibile invece, determinare la matrice di informazione, perché i suoi termini sono limitati.

L'unico caso in cui gli elementi della matrice di informazione non sono limitati si presenta quando alcuni termini della diagonale della matrice  $\boldsymbol{\Sigma}_y$  sono nulli. Questo può accadere, ad esempio, quando si applica un modello dell'errore proporzionale alla variabile misurata, nel quale l'errore si annulla quando la variabile misurata si annulla. Per evitare di incorrere in questa situazione basta modificare opportunamente il modello dell'errore in modo da non ottenere mai una varianza dell'errore nulla. Nel capitolo corrente, però,  $\boldsymbol{\Sigma}_y$  è costante e quindi non influisce sul risultato della progettazione né tantomeno sugli elementi di  $\boldsymbol{\varphi}$ . Infatti l'errore sulle misure è un termine costante che moltiplica tutti gli elementi della varianza e può anche non essere considerato durante la progettazione.

L'impossibilità di calcolare la matrice  $\mathbf{V}_{\theta}$  è motivata dal fatto che la matrice di informazione  $\mathbf{H}_{\theta}$  può non essere invertibile. L'applicazione della progettazione *SV*-ottimale è stata implementata risolvendo il problema equivalente all'equazione (4.5), posto nei termini seguenti:

$$\max_{\varphi_k} \psi_k(\mathbf{H}_{\theta}) \quad k = 1, \dots, N_{exp} \leq N_{\theta} \quad (4.6)$$

dove in questo caso si fa riferimento agli autovalori della matrice di informazione di Fisher,

$$\psi_k = \lambda_k(\mathbf{H}_{\theta}) \quad k = 1, \dots, N_{exp} \leq N_{\theta} \quad \lambda_1 > \lambda_2 > \dots > \lambda_{N_{exp}} \quad (4.7)$$

Il problema posto (4.5) è lo stesso della (4.6) perché gli autovalori di  $\mathbf{V}_\theta$  sono uguali al reciproco degli autovalori di  $\mathbf{H}_\theta$ .

Altre difficoltà dal punto di vista numerico si incontrano nel calcolo degli autovalori e ancor più nella determinazione delle direzioni principali. Si devono prendere in considerazione due aspetti nell'accettare i risultati della decomposizione della matrice di informazione:

- il numero di condizionamento spettrale della matrice  $\mathbf{H}_\theta$ ;
- il valore assoluto degli autovalori minori;

Il numero di condizionamento spettrale è definito come il rapporto di un autovalore con l'autovalore massimo. Il quadrato del numero di condizionamento è confrontabile con la precisione di macchina, si devono quindi considerare attendibili gli autovalori il cui numero di condizionamento al quadrato è superiore alla precisione di macchina. Il numero di condizionamento è indicativo della precisione con cui sono calcolati i valori degli autovalori. Inoltre, anche il valore assoluto deve essere significativamente diverso dallo zero del calcolatore.

Il calcolo degli autovettori non è rilevante nell'applicazione della progettazione *SV*-ottimale, ma come si vedrà in seguito fornisce indicazioni utili sul risultato della progettazione. Calcolare gli autovettori è più difficile rispetto all'ottenere i soli autovalori, perché, soprattutto quando il numero di condizionamento di un autovalore è elevato, il problema della determinazione del relativo autovettore risulta essere un problema malcondizionato. Una piccola variazione degli autovalori minori può modificare radicalmente l'orientazione delle direzioni principali. Si possono considerare attendibili solo gli autovettori relativi agli autovalori maggiori, mentre per le direzioni rimanenti si può scegliere una qualsiasi base ortogonale normalizzata.

Nell'implementazione del problema della decomposizione della matrice di informazione si è applicato l'algoritmo di Jacobi, in quanto risulta il più preciso nel calcolo degli autovalori e fornisce anche la base delle direzioni principali, evitando i problemi dovuti alla diagonalizzazione della matrice che sono intrinseci ai metodi di Gauss e QR. Tuttavia il metodo delle rotazioni di Jacobi richiede un costo computazionale maggiore, il quale però diventa trascurabile nel problema complessivo di ottimizzazione, e non è molto peggiorativo rispetto alle altre tecniche in quanto le dimensioni della matrice di informazione sono limitate ( $\text{rango}(\mathbf{H}_\theta) < 10$ ).

Riuscire a calcolare solo alcuni autovalori non inficia la progettazione *SV*-ottimale che rispetto alla progettazione *D*-ottimale non dipende da tutti gli autovalori ma solo da alcuni. In questo modo è possibile progettare alcuni esperimenti anche se la matrice di informazione risulta singolare, basta limitare la progettazione agli autovalori che non sono nulli.

Gli autovettori, invece forniscono una spiegazione alla presenza di correlazione nella stima tra parametri e sulla possibilità di stima accurata di parametri anche se la matrice di informazione risulta singolare. Nel caso in cui si individuino le condizioni per le quali si ottengono



parametri non correlati allora è possibile stimare un sottoinsieme di parametri in maniera esatta. Questi aspetti verranno messi in luce nei successivi esempi di progettazione.

## 4.2 Applicazione della progettazione SV-ottimale

La progettazione SV-ottimale degli esperimenti in parallelo viene realizzata secondo le stesse condizioni sperimentali e lo stesso modello dell'errore assunti per gli esperimenti  $E2$ ,  $E3$ ,  $E4$  del capitolo precedente. La progettazione SV-ottimale viene applicata a tutti gli autovalori che non siano nulli. Negli esempi che seguono si realizzano due set di esperimenti composti ciascuno da quattro esperimenti in parallelo, in numero pari agli autovalori che sono diversi da zero. La prima progettazione presentata,  $E5$ , viene usata per produrre gli esperimenti che sono poi impiegati per progettare il secondo set di prove  $E6$ .

Ogni esperimento viene progettato separatamente. L'applicazione della progettazione SV-ottimale basata su un autovalore non considera l'effetto che il vettore dell'esperimento produce sugli altri autovalori, perciò il risultato della progettazione di un singolo esperimento non garantisce che la varianza dei parametri diminuisca complessivamente. Si può osservare questo effetto dal valore assunto dagli autovalori di una progettazione SV-ottimale: riuscire a massimizzare l'autovalore più grande penalizza l'informazione lungo le altre direzioni. Questo potrebbe determinare della stime dei parametri che sono molto correlate e affette da un'elevata incertezza. I risultati migliori si ottengono riuscendo a massimizzare gli autovalori minori, perciò sarebbe opportuno riuscire a progettare l'esperimento che abbia come funzione obiettivo l'autovalore minore; in questo modo si realizza un a progettazione di tipo  $E$ -ottimale. Tuttavia, poiché nel criterio SV-ottimale si effettuano progettazioni indipendenti, non è sempre verificato che un singolo esperimento consenta l'identificazione del modello. Questo fatto non impedisce di progettare comunque gli esperimenti, perché non è certo che il sistema costituito dall'insieme degli esperimenti in parallelo non sia identificabile. Si devono considerare perciò le progettazioni SV-ottimale che consentono di ottenere un valore della funzione obiettivo che sia significativo. Le radici quadrate degli autovalori pesano l'informazione sui parametri che è contenuta, nell'intorno dei parametri di progetto, lungo le direzioni associate a ciascun autovalore.

Negli esperimenti proposti nel capitolo, viene applicata una progettazione SV-ottimale, e si è scelto di considerare non nulli gli autovalori superiori al valore di  $10^{-8}$  e il cui rapporto con l'autovalore maggiore sia inferiore a  $10^{-8}$ . Gli autovalori adatti sono stati scelti dopo avere effettuato la progettazione su tutti gli autovalori poiché la progettazione SV-ottimale di ogni esperimento è indipendente dalle altre. Sono risultati diversi da zero almeno i primi quattro autovalori della matrice di informazione, per ogni tentativo di progettazione SV-ottimale. I primi quattro autovalori indicano quindi, le componenti nello spazio dei parametri che contengono l'informazione maggiore, mentre gli altri autovalori indicano che l'informazione

lungo le corrispondenti direzioni è nulla o della stessa grandezza del rumore presente sulle misure.

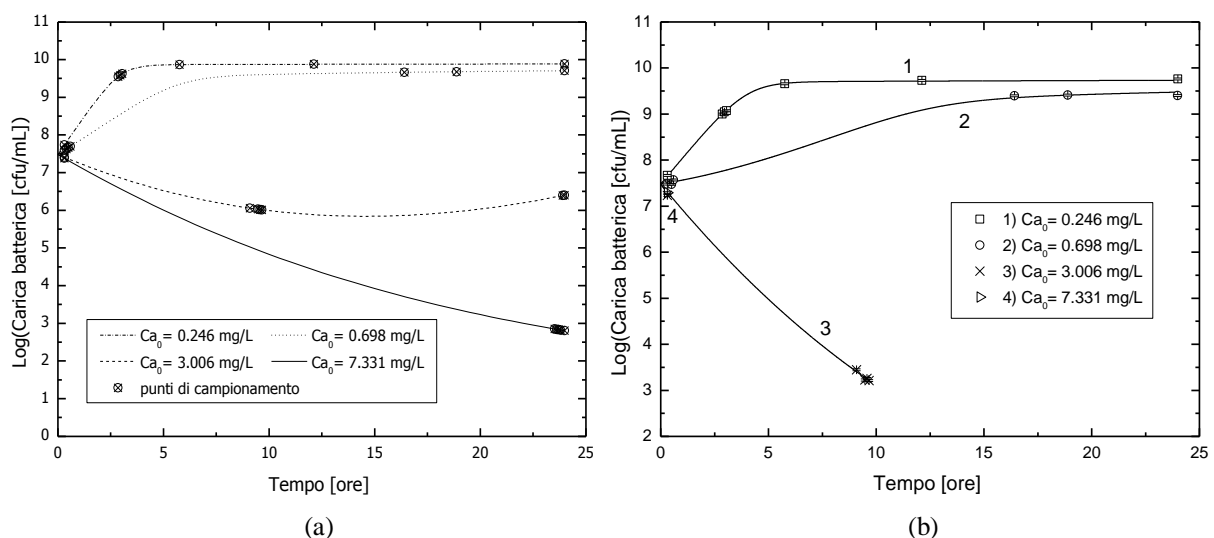
### 4.2.1 Esperimenti E5

In ogni progettazione si considera la matrice di informazione ottenibile da un singolo esperimento nel quale si varia la concentrazione iniziale e si prelevano sette campioni. Si è condotta la progettazione su ciascuno dei primi quattro autovalori della matrice di informazione. Ogni vettore dell'esperimento, che si ottenuto come soluzione del problema (4.6) per i quattro esperimenti distinti, è riportato nella Tabella 4.1.

**Tabella 4.1.** Vettore dell'esperimento  $\phi$  per ciascuna progettazione.

	$Ca_0$	$t_1$	$t_2$	$t_3$	$t_4$	$t_5$	$t_6$	$t_7$
<b>Progettazione su <math>\lambda_1</math></b>	7.331	0.31	23.52	23.62	23.72	23.81	23.91	24.00
<b>Progettazione su <math>\lambda_2</math></b>	3.006	0.31	9.09	9.48	9.57	9.67	23.91	24.00
<b>Progettazione su <math>\lambda_3</math></b>	0.698	0.31	0.41	0.50	0.60	16.42	18.89	24.00
<b>Progettazione su <math>\lambda_4</math></b>	0.246	0.31	2.86	2.96	3.05	5.76	12.12	24.00

Come nella progettazione  $D$ -ottimale, eseguita nel capitolo precedente, si nota che dalla progettazione di esperimenti distinti, la concentrazione iniziale di antibiotico è distribuita su tutto il range ammissibile per avere delle misure di carica batterica rilevabile (per il valore attuale dei parametri varia tra 0 e 7.33 mg/L).



**Figura 4.1.** (a) Risultati delle progettazioni SV-ottimali; (b) risultati della successiva esecuzione delle prove e stima. I risultati della stima sono riportati in Tabella 4.8.

Dagli andamenti della concentrazione batterica (Figura 4.1a), si evidenziano i tre andamenti caratteristici individuati dal modello. Questo fatto può indicare che la progettazione SV-

ottimale riesce a separare il contributo di parametri diversi in esperimenti distinti. L'analisi delle componenti degli autovettori  $\mathbf{P}$  supporta la validità dell'affermazione precedente.

Nella tabelle 4.2-4.5 sono riportati il quadrato degli elementi di ogni autovettore; gli autovettori sono relativi all'autovalore degli esperimenti descritti nella Tabella 4.1.

**Tabella 4.2.** Progettazione su  $\lambda_1$ : autovettori e autovalori.  
 $Ca_0 = 7.3 \text{ mg/L}$

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
$C_{50k}$	0.020	0.363	0.066	0.006	0.185	0.361	0.000
$K_g$	0.388	0.007	0.046	0.013	0.514	0.032	0.000
$K_k$	0.554	0.126	0.007	0.016	0.277	0.021	0.000
$H$	0.026	0.155	0.573	0.218	0.000	0.026	0.002
$N_{max}$	0.000	0.000	0.001	0.004	0.000	0.000	0.995
$\beta$	0.009	0.278	0.150	0.011	0.003	0.550	0.001
$\tau$	0.004	0.072	0.158	0.733	0.022	0.010	0.002
$\lambda$	8.76E+03	1.50E-02	3.39E-04	1.30E-09	4.37E-12	4.49E-13	3.06E-13

**Tabella 4.3.** Progettazione su  $\lambda_2$ : autovettori e autovalori.  
 $Ca_0 = 3.0 \text{ mg/L}$

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
$C_{50k}$	0.054	0.321	0.016	0.056	0.145	0.052	0.357
$K_g$	0.417	0.014	0.056	0.188	0.246	0.074	0.004
$K_k$	0.480	0.176	0.004	0.174	0.119	0.047	0.000
$H$	0.031	0.006	0.882	0.023	0.000	0.019	0.040
$N_{max}$	0.000	0.000	0.001	0.060	0.064	0.795	0.080
$\beta$	0.011	0.300	0.015	0.009	0.151	0.008	0.507
$\tau$	0.008	0.183	0.027	0.490	0.275	0.005	0.012
$\lambda$	3.59E+03	1.04E+01	3.87E-04	9.06E-07	1.55E-08	8.37E-11	2.41E-14

**Tabella 4.4.** Progettazione su  $\lambda_3$ : autovettori e autovalori.  
 $Ca_0 = 0.69 \text{ mg/L}$

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
$C_{50k}$	0.242	0.005	0.065	0.230	0.016	0.433	0.009
$K_g$	0.372	0.259	0.211	0.091	0.060	0.003	0.004
$K_k$	0.247	0.006	0.270	0.002	0.053	0.420	0.000
$H$	0.017	0.060	0.288	0.000	0.628	0.006	0.000
$N_{max}$	0.107	0.590	0.002	0.231	0.062	0.004	0.004
$\beta$	0.008	0.042	0.101	0.156	0.117	0.083	0.494
$\tau$	0.007	0.038	0.062	0.290	0.063	0.052	0.488
$\lambda$	3.23E+00	3.66E-01	7.75E-04	1.02E-06	6.23E-10	3.27E-13	3.90E-15

**Tabella 4.5.** Progettazione su  $\lambda_4$ : autovettori e autovalori.  
 $Ca_0 = 0.24 \text{ mg/L}$

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
$C_{50k}$	0.075	0.017	0.305	0.015	0.509	0.044	0.034
$K_g$	0.764	0.091	0.079	0.063	0.001	0.002	0.000
$K_k$	0.037	0.008	0.208	0.055	0.405	0.286	0.000
$H$	0.094	0.029	0.025	0.339	0.017	0.473	0.023
$N_{max}$	0.029	0.854	0.050	0.064	0.001	0.002	0.000
$\beta$	0.000	0.001	0.171	0.232	0.000	0.024	0.573
$\tau$	0.000	0.000	0.162	0.232	0.066	0.168	0.370
$\lambda$	8.25E+00	5.48E-01	3.79E-04	2.31E-06	2.37E-08	1.77E-10	5.39E-16

Dall'osservazione delle tabelle riportate sopra si possono notare alcune caratteristiche del sistema esaminato:

- 1)  $N_{max}$  a concentrazioni massime di antibiotico non è determinabile, infatti nella Tabella 4.2 è contenuto nello spazio con autovalori nulli; a concentrazioni basse (Tabella 4.5) invece il secondo autovettore è proiettato lungo  $N_{max}$ ;
- 2) a concentrazioni basse (Tabella 4.5) i primi due autovettori appartengono quasi interamente al piano individuato dai parametri  $K_g$  ed  $N_{max}$  e quindi la loro stima è indipendente dal valore assunto dagli altri parametri (celle evidenziate);

- 3)  $K_g$  e  $K_k$  sono i parametri del modello che si riescono a determinare con maggiore facilità perché contengono la maggiore informazione, si può notare dall'autovalore  $\mathbf{p}_1$  della Tabella 4.2 e della Tabella 4.3 (celle evidenziate);
- 4) dalla Tabella 4.3 (cella evidenziata) anche l'informazione di  $H$  risulta molto indipendente dagli altri parametri;
- 5) gli altri parametri appartengono alle direzioni che contengono minore informazione e il cui effetto si manifesta maggiormente alle concentrazioni intermedie e basse.

Per il motivo evidenziato nel punto 2) gli esperimenti che hanno concentrazione bassa di antibiotico consentono di stimare accuratamente i parametri  $K_g$  e  $N_{max}$  che risultano poco correlati con i rimanenti parametri. Osservando l'orientamento degli autovettori per la progettazione su  $\lambda_2$ , si nota che l'informazione lungo la direzione principale giace sul piano formato da  $K_g$  e  $K_k$ , ma l'informazione mancante relativa a questi due parametri non è completamente accessibile lungo le altre direzioni perché gli autovalori corrispondenti sono nulli. Nelle altre progettazioni, nelle quali gli autovettori sono proiettati lungo tutte le direzioni dei parametri, non appare che l'informazione sia orientata preferenzialmente lungo alcune direzioni principali. In particolare  $\beta$  e  $\tau$  appaiono difficilmente stimabili perché mantengono sempre componenti significative lungo le direzioni ad informazione quasi nulla. La possibilità di sfruttare vantaggiosamente l'analisi sulle direzioni principali verranno approfondite nel §4.4.1.

Dalle tabelle 4.2-4.5 si osserva che non sarebbe possibile applicare il criterio  $D$ -ottimale ad esperimenti singoli, perché sono presenti, in tutti e quattro i casi esaminati, autovalori praticamente nulli. Ricorrendo alla progettazione  $SV$ -ottimale si possono risolvere alcuni problemi dipendenti dagli autovalori principali, in modo tale da scegliere le condizioni sperimentali e i punti di campionamento in maniera da eseguire esperimenti che siano informativi. Non c'è tuttavia, una giustificazione sulla possibilità che gli esperimenti progettati separatamente consentano una buona stima dei parametri in seguito alla loro unione; la verifica della precisione della progettazione deve essere eseguita successivamente alla progettazione stessa. Quando si progettano esperimenti separati e si massimizza un autovalore ciò non garantisce che l'informazione sia incrementata anche lungo le altre direzioni lungo cui l'informazione si estende. È interessante notare che:

- a) nella progettazione corrispondente al primo autovalore si ottiene un valore della funzione obiettivo più elevato che negli altri casi, a scapito dell'informazione contenuta nelle altre direzioni. Ciò penalizza la capacità di stimare con un esperimento solo un numero elevato di parametri (in questo caso sono tre, avendo fissato una soglia a  $10^{-8}$ );
- b) nel caso delle progettazioni basate sugli autovalori tre e quattro, gli autovalori non nulli sono in numero maggiore rispetto alle progettazioni precedenti, ciò consente di poter stimare un maggior numero di parametri;

- c) gli esperimenti che consentono di diminuire maggiormente l'incertezza sono quelli effettuati sugli autovalori minori, anche se non si ottiene l'informazione massima lungo le altre direzioni.

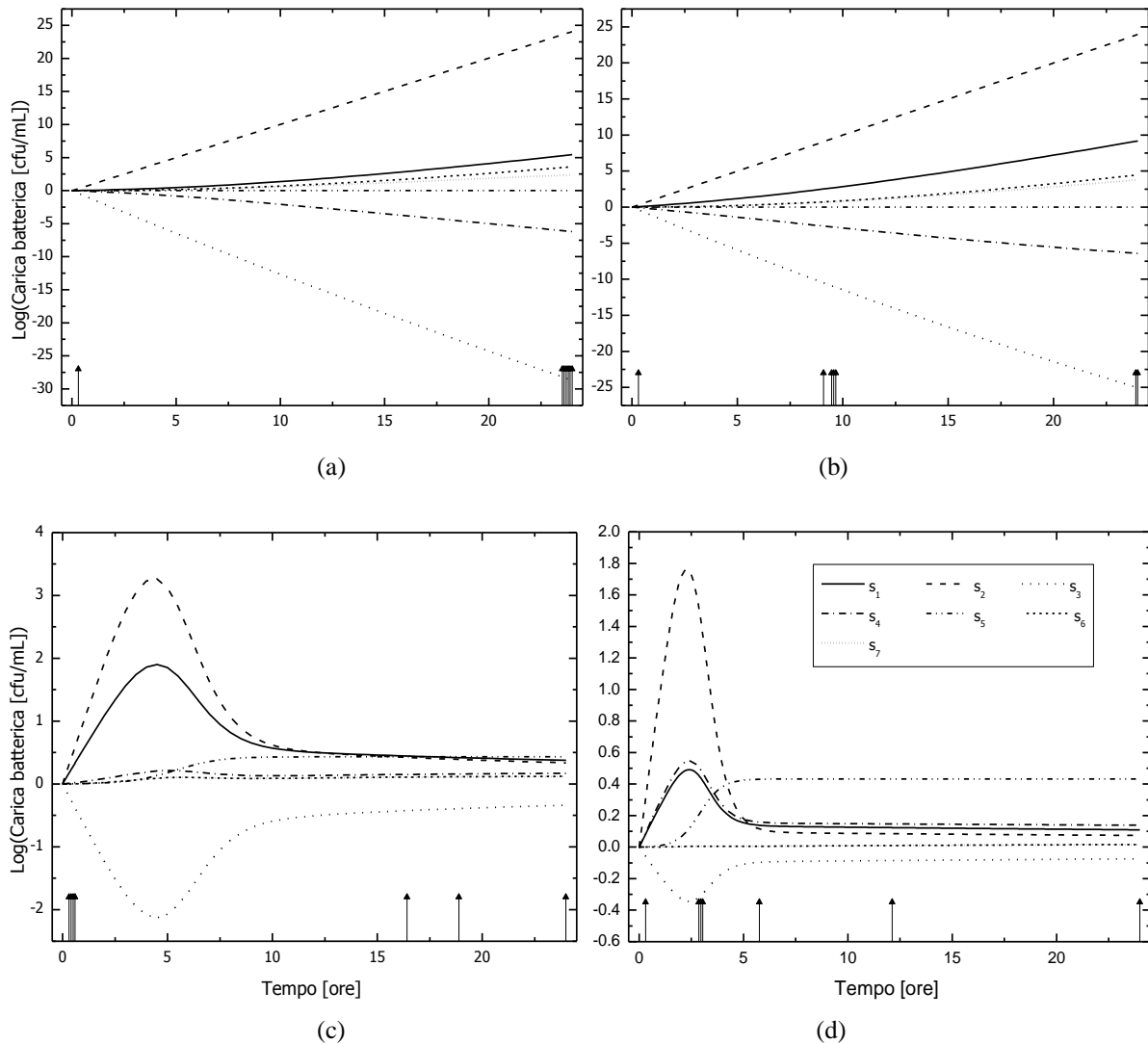
Da queste osservazione si capisce come una progettazione *D*-ottimale, oppure anche *E*-ottimale, tenderebbe ad aumentare l'incertezza su parametri facilmente stimabili per garantire una certa informazione dell'esperimento anche sui parametri difficilmente stimabili. La progettazione *SV*-ottimale sembra quindi dare prestazioni migliore nella progettazione in parallelo, almeno in alcuni casi, anche se il risultato della progettazione deve essere verificato a posteriori dalla somma delle matrici  $\mathbf{H}_\theta$  di ogni esperimento.

Altre osservazioni che distinguono la progettazione *SV*-ottimale con la *D*-ottimale possono essere condotte sui profili delle sensitività (Figura 4.2). Le sensitività indicate in figura si riferiscono all'ordine della Tabella 4.6.

**Tabella 4.6.** *Sensitività e loro dimensioni nel modello di Tam et al. (2005).*

	$s_1$	$s_2$	$s_3$	$s_4$	$s_5$	$s_6$	$s_7$
<b>definizione</b>	$\frac{\partial N}{\partial C_{50k}}$	$\frac{\partial N}{\partial K_g}$	$\frac{\partial N}{\partial K_k}$	$\frac{\partial N}{\partial H}$	$\frac{\partial N}{\partial N_{\max}}$	$\frac{\partial N}{\partial \beta}$	$\frac{\partial N}{\partial \tau}$
<b>dimensioni</b>	$\left[ \begin{array}{c} \text{cfu/mL} \\ \text{mg/L} \end{array} \right]$	$\left[ \begin{array}{c} \text{cfu/mL} \\ 1/\text{h} \end{array} \right]$	$\left[ \begin{array}{c} \text{cfu/mL} \\ 1/\text{h} \end{array} \right]$	$\left[ \begin{array}{c} \text{cfu} \\ \text{mL} \end{array} \right]$	$\left[ \begin{array}{c} \text{cfu/mL} \\ \text{cfu/mL} \end{array} \right]$	$\left[ \begin{array}{c} \text{cfu} \\ \text{mL} \end{array} \right]$	$\left[ \begin{array}{c} \text{cfu/mL} \\ \text{mg}/(\text{L} \cdot \text{h}) \end{array} \right]$

Solitamente nella progettazione *D*-ottimale le variabili manipolabili vengono scelte per generare sensitività che presentano andamenti diversi, aumentando il numero di picchi e generando profili che sono poco simmetrici. Questo avviene perché, nella progettazione *D*-ottimale, la matrice di informazione non può essere singolare e, si dimostra, che la matrice di informazione diventa singolare quando gli andamenti delle sensitività sono molto correlati. Gli andamenti correlati producono profili simmetrici o sovrapposti. I tempi di campionamento, solitamente, vengono individuati in corrispondenza dei picchi formati dalle sensitività. Nella progettazione *SV*-ottimale l'andamento delle sensitività non è particolarmente esplicativo dei risultati della progettazione. Infatti, è già stato detto, che le matrici di informazione prodotte da ogni singolo esperimento non devono necessariamente non essere singolari. Nell'esempio *E5* si possono individuare dei punti di campionamento in prossimità dei massimi della sensitività nella Figura 4.2a corrispondente alla progettazione eseguita sul primo autovalore, e nella Figura 4.2d corrispondente alla progettazione eseguita sul quarto autovalore.



**Figura 4.2** Profili delle sensitività ottenute dalle progettazioni E5 su: (a) l'autovalore  $\lambda_1$ , (b) l'autovalore  $\lambda_2$ , (c) l'autovalore  $\lambda_3$ , (d) l'autovalore  $\lambda_4$ . Le frecce verticali indicano i tempi di campionamento.

Eseguita ogni singola progettazione, se ne devono valutare le prestazioni. L'informazione derivante dall'unione di quattro esperimenti è data dalla somma delle matrici di informazioni ricavate per ogni singolo esperimento. Poiché massimizzare un autovalore significa anche rendere l'elemento diagonale corrispondente della matrice di informazione più significativo rispetto agli elementi extra-diagonali, l'operazione condotta su ogni matrice permette che la loro somma produca una matrice di informazione di tutto il sistema, che è migliore perché gli elementi sulla diagonale prevalgono, anche se questo non è assicurato. Gli elementi sulla diagonale risultano sicuramente maggiori, perché sono somma di quantità sempre positive, mentre gli elementi extra-diagonali diminuiscono se sono la somma di elementi di segno opposto.

Gli autovalori calcolati sulla nuova matrice di informazione, costituita della somma di quelle ottenute sui singoli esperimenti presenta tutti gli autovalori significativamente diversi da zero,

come riportato nella Tabella 4.7, e il numero di condizionamento spettrale è accettabile ( $\sim 4 \cdot 10^5$ ). Il valore del determinante risulta molto positivo, ed è inoltre migliore della funzione obiettivo ottenuta nell'esperimento *E3* in cui si applicava il criterio *D*-ottimale.

**Tabella 4.7.** Autovalori della matrice di informazione ottenuta dalla somma delle matrici di informazione delle singole progettazioni SV-ottimali, e valore del determinante pari al prodotto degli autovalori.

	<b>p<sub>1</sub></b>	<b>p<sub>2</sub></b>	<b>p<sub>3</sub></b>	<b>p<sub>4</sub></b>	<b>p<sub>5</sub></b>	<b>p<sub>6</sub></b>	<b>p<sub>7</sub></b>
$\lambda$	8502.2	1084.6	78.553	21.873	4.9489	0.8870	0.0210
<b>determinante</b>	1.463E+09						

La progettazione *D*-ottimale forniva una funzione obiettivo pari a  $2.85E+07$  che risulta inferiore rispetto a quella della progettazione attuale.

La matrice di informazione fornisce una valutazione della precisione della stima dei parametri nel punto di progetto (Tabella 4.8). Si nota che la fiducia (*t*-value) sull'accettazione dei parametri è superiore al limite del 95%, tranne per  $\beta$  e  $\tau$ . Dall'esecuzione degli esperimenti si ottengono otto punti di campionamento in meno perché le concentrazioni ottenute sono al disotto della soglia di rilevabilità.

**Tabella 4.8.** Progettazione *E5* e risultati della stima.

	<b>C<sub>50k</sub></b> [mg·L <sup>-1</sup> ]	<b>K<sub>g</sub></b> [hr <sup>-1</sup> ]	<b>K<sub>k</sub></b> [hr <sup>-1</sup> ]	<b>H</b> [-]	<b>N<sub>max</sub>·10<sup>9</sup></b> [cfu·mL <sup>-1</sup> ]	<b>β</b> [-]	<b>τ</b> [L·mg <sup>-1</sup> ·hr <sup>-1</sup> ]
<b>Valore di progetto</b>	0.833	1.250	0.833	1.250	1.250	1.250	0.833
<b>t-value progetto</b>	3.077	6.792	3.460	2.676	4.590	1.285*	0.516*
<b>Valore stimato</b>	0.861	0.967	0.922	1.176	0.949	1.432	0.965
<b>t-value stima</b>	6.801	5.306	4.551	3.104	5.551	0.136*	0.126*
<b>st. dev.</b>	0.059	0.084	0.094	0.175	0.079	4.885	3.551
<i>t</i> -value 95% (progettazione) = 1.721				<i>t</i> -value 95% (stima) = 1.771			

I profili di progetto sono notevolmente differenti da quelli prodotti nelle prove (Figura 4.1b). È perciò coerente, la significativa variazione della fiducia dei parametri stimati rispetto a quelli progettati. L'accuratezza è molto elevata per tutti i parametri tranne, come era previsto per  $\beta$  e  $\tau$  i quali rimangono sempre molto correlati. Nonostante il numero minore di misure la stima produce dei risultati che sono al disopra delle attese. La bassa incertezza che è presente nei parametri meglio stimati potrebbe essere sufficiente per arrestare la procedura di progettazione a questo set iniziale di esperimenti. La progettazione *SV*, già a questo primo stadio, si dimostra avere caratteristiche simili alla progettazione *D*-ottimale, con il vantaggio della facilità di soluzione del problema di progettazione. L'incapacità di stimare correttamente

$\beta$  e  $\tau$  è imputabile, come era emerso anche negli altri esempi, alla correlazione che esiste tra i due parametri, ed è una caratteristica particolare del modello.

### 4.2.2 Esperimenti E6

Il secondo set di esperimenti viene aggiunto per riuscire ad ricavare la massima informazione per la stima dei parametri che non si erano ottenuti con sufficiente precisione nella fase precedente (ossia  $\beta$  e  $\tau$ ) e migliorare l'accuratezza degli altri. La procedura di progettazione è identica a quella già descritta nei paragrafi precedenti. Si è scelto di realizzare la progettazione SV-ottimale su tutti gli autovalori significativi. Le differenze principali rispetto alla progettazione precedente risiedono nel fatto di progettare con parametri, la cui informazione posseduta è ormai notevole. Inoltre, i valori dei parametri sono abbastanza distanti dal punto di progettazione precedente. Si prevede perciò di ottenere degli andamenti delle sensitività poco somiglianti a quelli della progettazione E5. Tuttavia, ci si aspetta di avere una minima differenza tra gli andamenti sperimentali e quelli di progetto perché, come si è visto, i parametri di progetto riescono a descrivere bene i dati.

La progettazione SV-ottimale viene applicata anche in questo caso ai primi quattro autovalori, poiché gli altri sono al disotto della soglia fissata di  $10^{-8}$ .

La progettazione avviene come in E5, ma l'informazione risulta condizionata dai risultati acquisiti in precedenza. Alla matrice di informazione calcolata nel nuovo punto di partenza (set stimato di parametri), si deve sommare l'informazione ottenuta dalla stima dei parametri. I risultati della progettazione E6 sono riportati in Tabella 4.9.

**Tabella 4.9.** Vettore dell'esperimento  $\phi$  per ciascuna progettazione.

	$Ca_0$	$t_1^{sp}$	$t_2^{sp}$	$t_3^{sp}$	$t_4^{sp}$	$t_5^{sp}$	$t_6^{sp}$	$t_7^{sp}$
<b>Progettazione su <math>\lambda_1</math></b>	2.000	0.3	20.48	21.61	23.58	23.76	23.85	24.00
<b>Progettazione su <math>\lambda_2</math></b>	1.213	0.3	14.49	14.58	14.66	23.76	23.84	24.00
<b>Progettazione su <math>\lambda_3</math></b>	2.121	0.3	15.47	23.13	23.22	23.62	23.85	24.00
<b>Progettazione su <math>\lambda_4</math></b>	1.422	0.3	8.1643	8.5813	23.66	23.76	23.85	24.00

Si osserva che la progettazione prevede di eseguire esperimenti che non esprimono il profilo sempre crescente. Questo è motivato dal fatto che l'andamento crescente è legato a parametri ( $K_g, N_{max}$ ) la cui incertezza è molto bassa già dopo la prima stima, e perciò nella progettazione si cerca di migliorare la stima dei parametri con incertezza maggiore (legata soprattutto a  $H, \beta$  e  $\tau$ ). L'effetto dell'informazione pregressa è ben chiaro nella Tabella 4.10, dove si nota che la progettazione del nuovo esperimento basato su ciascun autovalore, apporta un miglioramento relativamente piccolo sul contributo della stima precedente. Infatti, la variazione relativa degli



autovalori più piccoli è molto modesta e rimane determinante il peso della progettazione precedente.

**Tabella 4.10.** Autovalori ottenuti da ogni diversa progettazione di E6.

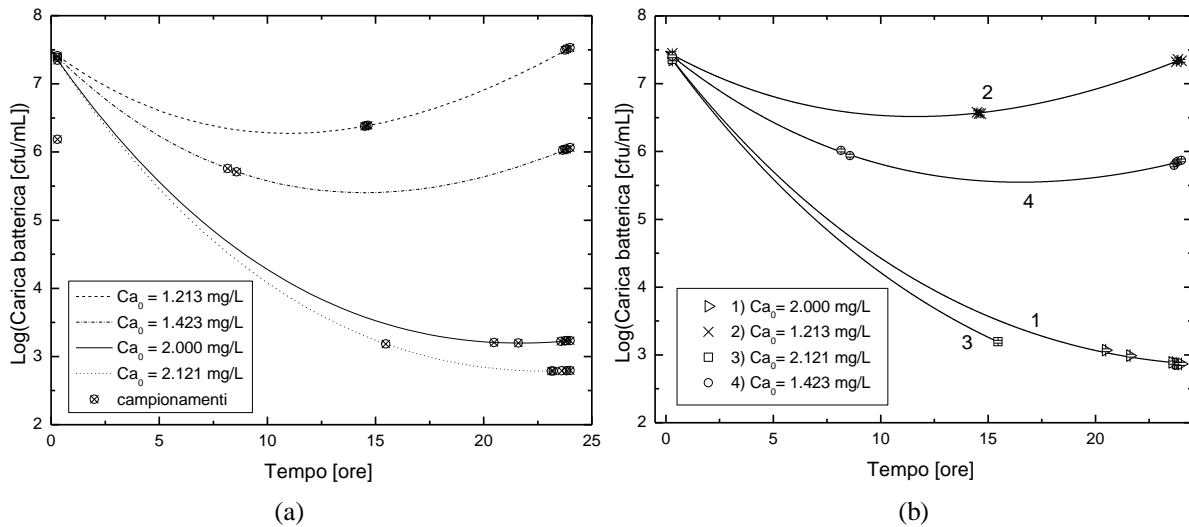
	$\lambda_1$	$\lambda_2$	$\lambda_3$	$\lambda_4$	$\lambda_5$	$\lambda_6$	$\lambda_7$
<b>Progettazione su <math>\lambda_1</math></b>	10520	1003	99.752	20.812	4.2455	0.5961	0.0239
<b>Progettazione su <math>\lambda_2</math></b>	8021.4	1119.9	69.137	21.501	4.6985	0.8972	0.0209
<b>Progettazione su <math>\lambda_3</math></b>	10414	952.83	101.91	20.899	4.5479	0.6802	0.0290
<b>Progettazione su <math>\lambda_4</math></b>	8502.2	1084.6	78.553	21.873	4.9489	0.8870	0.0210

Gli assi di massima varianza sono modificati in misura minore nella seconda progettazione, mettendo in luce limiti di identificabilità del modello in prossimità del valore vero assunto dai parametri. Dalla somma degli esperimenti in parallelo si evidenzia una progettazione, comunque realizzabile in cui il determinante ha un valore maggiore della precedente progettazione e gli autovalori stessi sono maggiori (Tabella 4.11). Anche il numero di condizionamento della matrice è accettabile, sebbene elevato ( $\sim 10^7$ ). Il miglioramento più importante è quello relativo al sesto autovalore, la varianza lungo la sua direzione diminuisce di circa 5 volte rispetto alla progettazione precedente.

**Tabella 4.11.** Autovalori della matrice di informazione ottenuta dalla somma delle matrici di informazione delle singole progettazioni SV-ottimali, e valore del determinante pari al prodotto degli autovalori.

	$\lambda_1$	$\lambda_2$	$\lambda_3$	$\lambda_4$	$\lambda_5$	$\lambda_6$	$\lambda_7$
$\lambda$	248432	12674	1245.2	409.62	25.839	18.344	0.0274
<b>determinante</b>	2.0878E+16						

Si può valutare l'efficacia della progettazione dalla precisione della stima riportata in Tabella 4.12. La precisione della stima risulta insufficiente con una fiducia del 95% solo per  $\beta$  e  $\tau$  anche se  $\beta$  ha una varianza che viene considerevolmente ridotta rispetto alla stima precedente. Inoltre, si trova che la correlazione tra  $\beta$  e  $\tau$  sebbene quasi unitaria non risulta essere esattamente pari a 1.



**Figura 4.3.** (a) Risultati delle progettazioni SV-ottimali; (b) risultati della successiva esecuzione delle prove e stima dei parametri.

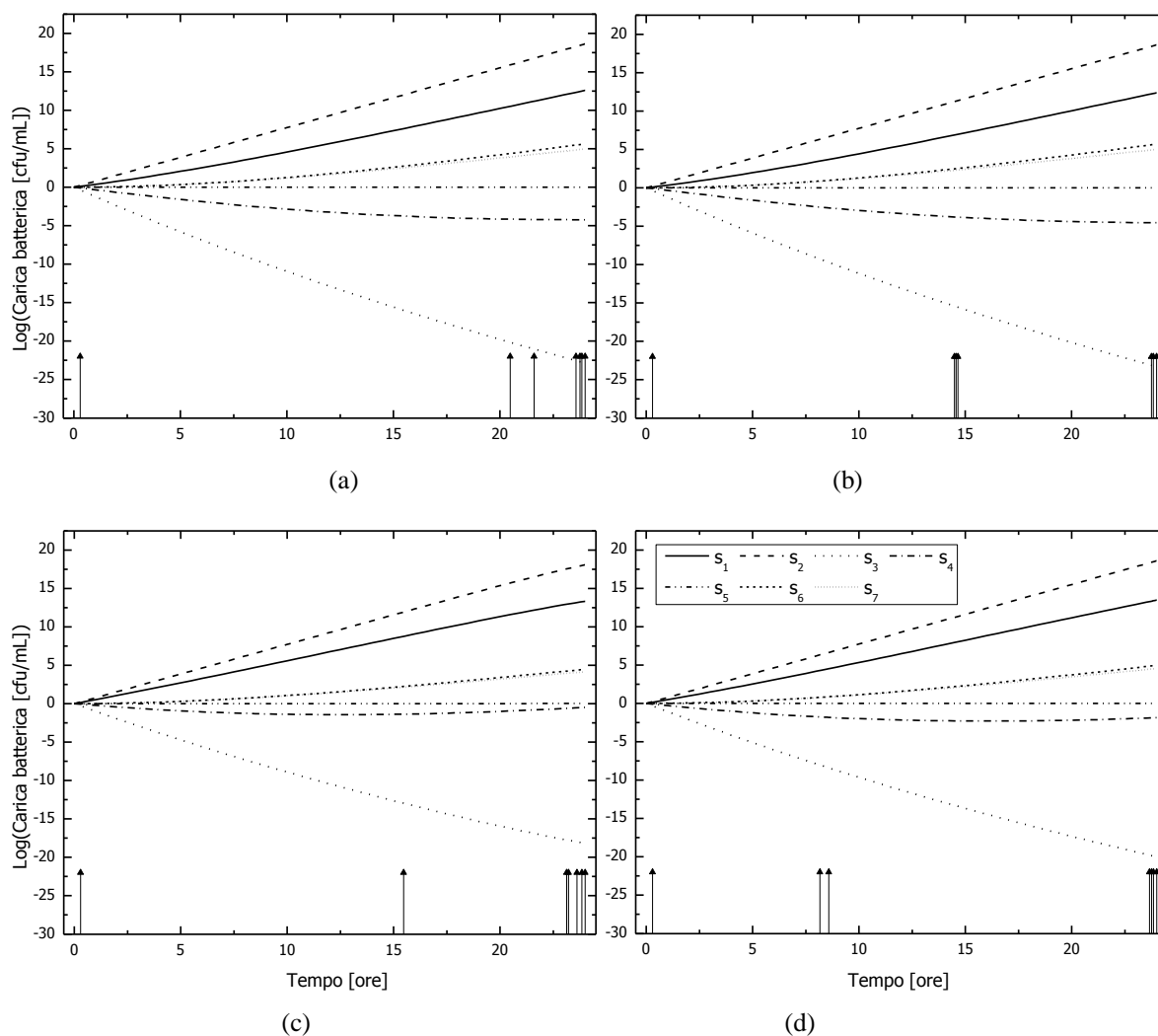
Dopo l'esecuzione delle prove si ottengono 24 punti di campionamento perché quattro misure dell'esperimento relativo all'autovalore 3 devono essere scartate perché troppo basse.

**Tabella 4.12.** Progettazione E6 e risultati della stima.

	$C_{50k}$ [mg·L <sup>-1</sup> ]	$K_g$ [hr <sup>-1</sup> ]	$K_k$ [hr <sup>-1</sup> ]	$H$ [-]	$N_{max} \cdot 10^9$ [cfu·mL <sup>-1</sup> ]	$\beta$ [-]	$\tau$ [L·mg <sup>-1</sup> ·hr <sup>-1</sup> ]
<b>Valore di progetto</b>	0.861	0.967	0.922	1.176	0.949	1.432	0.965
<b>t-value progetto</b>	11.0198	10.276	9.439	7.426	11.678	1.620*	0.910*
<b>Valore stimato</b>	0.999	0.976	0.974	1.031	1.027	1.189	0.818
<b>t-value stima</b>	36.77	18.78	20.00	15.87	15.99	1.731	1.474*
<b>st. dev.</b>	0.013	0.027	0.024	0.032	0.032	0.338	0.274
<i>t</i> -value 95% (progettazione) = 1.683				<i>t</i> -value 95% (stima) = 1.688			

La stima dei parametri migliora molto l'accuratezza, e le stime si discostano pochissimo dal valore vero. Inoltre anche la deviazione standard sui primi cinque parametri molto bassa sui primi cinque parametri, consente di attribuire una elevata fiducia nell'accettare i parametri. Solo  $\tau$  rimane affetto da un errore rilevante, e da elevata correlazione. Le sensibilità riportate rispetto ai relativi parametri (Figura 4.4), mettono in luce la ricerca dell'informazione per i parametri maggiormente affetti da incertezza. Prevalgono gli andamenti che massimizzano l'informazione per i parametri che evidenziano il loro peso alle concentrazioni più basse. Sebbene i grafici sembrano a prima vista molto simili, si osserva che la variazione di forma maggiore del profilo è quella di  $s_4$  che è la sensibilità relativa al parametro  $H$ . Le sensibilità espresse dai parametri  $\beta$  e  $\tau$  ( $s_6$ ,  $s_7$ ) sono difficilmente separabili e procedono quasi sempre sovrapposte e non è possibile notare un miglioramento dei loro profili rispetto alla

progettazione precedente, ma si constata che in questa progettazione assumono un valore significativo (rispetto agli altri profili) in tutti e quattro gli esperimenti.



**Figura 4.4** Profili delle sensitività ottenute dalle progettazioni E6 su: (a) l'autovalore  $\lambda_1$ , (b) l'autovalore  $\lambda_2$ , (c) l'autovalore  $\lambda_3$ , (d) l'autovalore  $\lambda_4$ . Le frecce alla base di ogni grafico indicano i punti di campionamento.

Poiché non è possibile nella progettazione modificare le sensitività, si cercano di ottenere maggiori punti di campionamento proprio dove è più difficile stimare i parametri.

Vista l'elevata accuratezza e precisione raggiunta con questo secondo set di esperimenti, e considerati i risultati qui riportati e quelli ottenuti con il design *D*-ottimale si può concludere che non è possibile incrementare ulteriormente l'accuratezza della stima dei parametri a causa dei limiti strutturali del modello impiegato, realizzando due set di esperimenti in parallelo sequenzialmente.

### 4.3 Sviluppi del criterio SV-ottimale

La progettazione di esperimenti, in generale, ha evidenziato alcuni aspetti problematici che rendono inefficaci le progettazioni tradizionali (*D*-ottimale, *E*-ottimale, *A*-ottimale), facendo nascere la necessità di superare specifici problemi adottando criteri di progettazione differenti, oppure nel discriminare in maniera più precisa tra i diversi criteri di progettazione.

Le maggiori incognite che si incontrano nella progettazione di esperimenti possono essere riassunte nei seguenti punti:

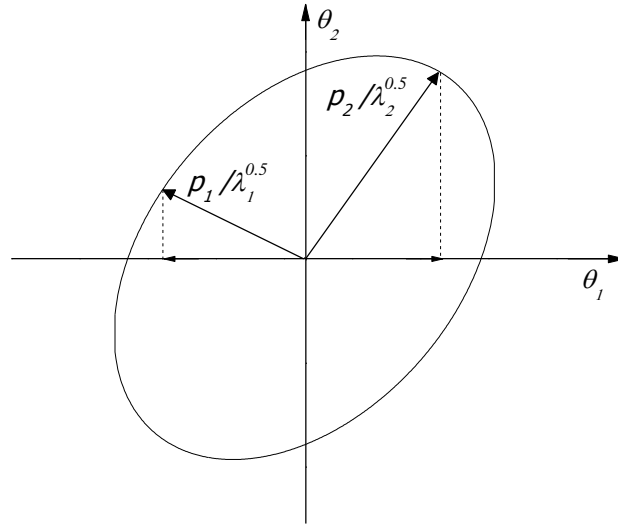
- scelta del criterio più opportuno per eseguire la progettazione;
- calcolo della matrice di varianza-covarianza dei parametri  $\mathbf{V}_\theta$ , che può essere singolare, o diventare singolare durante la progettazione;
- necessità di progettare per migliorare la stima di alcuni parametri, piuttosto che altri.

Inoltre, nel caso di progettazione di esperimenti in parallelo diventa importante:

- la determinazione del numero di esperimenti da progettare contemporaneamente;
- ridurre le dimensioni del problema di progettazione, ossia riuscire a scomporre il sistema in un numero separato di esperimenti che diano l'informazione specifica di alcuni parametri.

Il criterio di progettazione *SV*-ottimale è stato introdotto con l'obiettivo di scomporre l'informazione lungo le sue componenti principali al fine progettare esperimenti che contengano un numero minore di variabili di progetto. Tuttavia, dagli esempi riportati si è visto che una progettazione *SV*-ottimale con esperimenti in parallelo non garantisce che ciascun esperimento sia informativo in tutte le direzioni, ciononostante si è anche constatato che l'unione delle progettazioni separate può dare esito a un sistema di esperimenti informativi e sufficienti per la corretta stima dei parametri. Inoltre, la progettazione *SV*-ottimale consente di progettare anche se la matrice di informazione non è invertibile perché è mal condizionata, ma è possibile risolvere il problema degli autovalori almeno per un numero significativo di essi. Un altro aspetto che non viene considerato nella progettazione *SV*-ottimale è la realizzazione di esperimenti che non correlino i parametri tra di loro, perché in ogni ottimizzazione separata si agisce sempre lungo la direzione dell'autovalore scelto. Dall'osservazione della direzione delle componenti principali si possono ricavare importanti caratteristiche del sistema, al fine di individuare la correlazione tra parametri ed eventualmente la capacità di scomporre il sistema in un sottoinsieme più piccolo di esperimenti i cui parametri non sono correlati.

Zhang e Edgar (2008) hanno proposto un approccio basato sulla struttura della varianza che generalizza il numero di autovalori che viene impiegato nella progettazione e le direzioni lungo le quali sono proiettate le direzioni principali della varianza.



**Figura 4.5.** *Rappresentazione della varianza per un sistema a due parametri. Le direzioni principali vengono proiettare lungo l'asse che descrive l'incertezza sul parametro  $\theta_1$ .*

Nel Capitolo 2 si era fornita una rappresentazione grafica della varianza, e qui viene ripresa per illustrare il significato del nuovo criterio di progettazione, definito come *P*-ottimale. In un sistema caratterizzato da due parametri la cui varianza è rappresentata dalla Figura 4.5, si sceglie di considerare solo la parte di varianza che appartiene a specifici parametri. A tale scopo, nell'esempio, la funzione obiettivo è costruita considerando solo le proiezioni delle direzioni principali della varianza lungo  $\theta_1$ . Il problema di progettazione si risolve adottando una delle due forme equivalenti della funzione obiettivo riportate nell'equazione (4.8):

$$\min \left( \frac{p_1(1)^2}{\lambda_1} \cdot \frac{p_2(1)^2}{\lambda_2} \right) = \max \left( \lambda_1 p_1(1)^{-2} \cdot \lambda_2 p_2(1)^{-2} \right) \quad (4.8)$$

In generale la funzione obiettivo,  $F_{ob}$ , per il criterio *P*-ottimale si può esprimere come:

$$F_{ob} = \min_{\varphi} \left( \prod_{i=N_{\theta}-l+1}^{N_{\theta}} \left( \frac{1}{\lambda_i} \sum_j p_{ij}^2 \right) \right) \quad (4.9)$$

dove l'indice  $i$  indica gli autovalori e  $i$  corrispettivi autovettori, mentre  $j$  corrisponde alle componenti degli autovettori che si desiderano inserire nella funzione obiettivo. Con  $l$  si fissano il numero di autovalori che si ritengono utili per la progettazione.

Scegliendo opportunamente  $i$  e  $j$ , ci si può ricondurre a particolari progettazioni già descritte:

- *D*-ottimale con  $i = 1, \dots, N_{\theta}$  e  $j = 1, \dots, N_{\theta}$ ;
- *E*-ottimale con  $i = N_{\theta}$  e  $j = 1, \dots, N_{\theta}$ ;
- *SV*-ottimale con  $i$  qualsiasi, e  $j = 1, \dots, N_{\theta}$ ;

La scelta dei valori da assegnare a  $i$  e  $j$  avviene dall'osservazione dell'entità degli autovalori e dall'orientamento della varianza. Si consiglia di considerare nella progettazione un numero di

autovalori tale che la varianza cumulata percentuale (*CVP*), definita come segue (4.10), sia superiore ad una soglia prefissata, ad esempio il 90%:

$$CVP(k) = \frac{\left( \sum_{j=1}^k \frac{1}{\lambda_j} \right)}{\left( \sum_{j=1}^m \frac{1}{\lambda_j} \right)} \quad (4.10)$$

Le direzioni su cui proiettare la varianza, invece, possono essere scelte basandosi sulla capacità di stimare i parametri, ed è un'operazione che viene applicata iterativamente. Si cerca di concentrare la progettazione pesando maggiormente le direzioni che appartengono ai parametri più incerti.

Zhang e Edgar (2008) mettono in luce gli aspetti positivi del criterio *P*-ottimale. I principali vantaggi sono riassunti nei seguenti punti:

- viene ridotta la dimensione del problema di progettazione, focalizzando lo scopo della progettazione sulla stima di alcuni parametri;
- il criterio *P*-ottimale è una generalizzazione di altri criteri usualmente impiegati;
- viene stabilita una regola per scegliere gli autovalori nei problemi nei quali  $\mathbf{H}_\theta$  è malcondizionata;
- l'osservazione degli autovettori fornisce utili indizi per capire la stima di quali parametri può essere migliorata;
- è un criterio adatto alla progettazione in parallelo di esperimenti.

#### 4.3.1 Effetto della correlazione

È da evidenziare la possibilità di applicare il criterio *P*-ottimale con finalità di progettare esperimenti nei quali i parametri sono non correlati. Nell'articolo di Franceschini e Macchietto (2008) si propongono dei criteri di progettazione per realizzare progettazioni non correlate.

La correlazione nella stima dei parametri è un fenomeno che ha aspetti ambivalenti. Infatti da un lato, quando non è molto elevata (correlazioni degli elementi della matrice di informazione minori di 0.9 non impediscono la stima corretta dei parametri), è positiva perché consente di legare il miglioramento della stima di un parametro a quelle di uno, o più, parametri diversi. Può quindi capitare che la stima di un parametro venga migliorata grazie alla precisione raggiunta dalla stima di un parametro a cui è correlato. Dall'altro lato, tuttavia, può avvenire l'opposto, ossia che non si riesca a determinare con accuratezza un parametro che è correlato ad un altro parametro affetto da un'incertezza molto elevata.

Esiste poi il caso estremo quando la correlazione è prossima a +1 o -1, e non è possibile distinguere l'effetto dei due parametri correlati. Si può esprimere un parametro un funzione dell'altro, oppure fissare ad un valore costante uno dei due. Si può mostrare che la correlazione degli elementi della matrice di informazione sono funzione dell'orientamento degli autovettori:

$$c_{ik} = \frac{\sum_{j=1}^{N_\theta} \lambda_j p_{ij} p_{kj}}{\sqrt{\left(\sum_{j=1}^{N_\theta} \lambda_j p_{ij}^2\right) \left(\sum_{j=1}^{N_\theta} \lambda_j p_{kj}^2\right)}} ; \tag{4.11}$$

dove i simboli sono quelli definiti in precedenza. La correlazione viene spiegata alla luce dell'orientamento della varianza. L'aspetto ambivalente della correlazione emerge chiaramente nella disposizione delle componenti principali della seconda progettazione. Si sono ottenuti i seguenti autovettori, relativi agli autovalori riportati in Tabella 4.11 (Tabella 4.13).

**Tabella 4.13** Autovettori della matrice di informazione del sistema formato dall'unione dei quattro esperimenti di E6.

	<b>p1</b>	<b>p2</b>	<b>p3</b>	<b>p4</b>	<b>p5</b>	<b>p6</b>	<b>p7</b>
<b>C<sub>50k</sub></b>	0.11	0.40	0.06	0.04	0.38	0.02	0.00
<b>K<sub>g</sub></b>	0.32	0.04	0.38	0.00	0.13	0.12	0.00
<b>K<sub>k</sub></b>	0.52	0.16	0.03	0.07	0.02	0.20	0.00
<b>H</b>	0.02	0.23	0.16	0.02	0.00	0.56	0.00
<b>N<sub>max</sub></b>	0.00	0.09	0.07	0.76	0.03	0.06	0.00
<b>β</b>	0.02	0.05	0.29	0.06	0.39	0.01	0.19
<b>τ</b>	0.01	0.04	0.01	0.05	0.05	0.03	0.81

Si vede che la stima su  $\beta$  viene migliorata perché  $\beta$  condivide l'informazione (componenti su  $\beta$  dei vettori  $\mathbf{p}_2$ ,  $\mathbf{p}_3$ ,  $\mathbf{p}_4$  e  $\mathbf{p}_5$ ) con parametri che sono stimati con una bassa incertezza. Al contrario,  $\tau$  è correlato principalmente con  $\beta$  (componenti di  $\mathbf{p}_7$ ) di cui si ottiene una stima incerta. Inoltre si è visto che non è possibile separare le sensitività di  $\tau$  e  $\beta$ , perciò un miglioramento della stima di  $\tau$  può "passare" solo attraverso  $\beta$ .

Un altro aspetto dello studio della correlazione è quello di poter scomporre l'esperimento in sottoinsiemi di parametri che siano indipendenti perché perfettamente scorrelati. Nella progettazione in parallelo di esperimenti, in particolare nell'applicazione del criterio SV-ottimale, si è visto che la direzione associata ad ogni autovalore condiziona la capacità di realizzare esperimenti che siano indipendenti, ossia ottenere una matrice di informazione che

sia la più diagonale possibile. Se da un lato la correlazione tra parametri rappresenta un limite nella identificabilità parametrica di una sistema, la possibilità di massimizzare un sottoinsieme di autovalori a scapito di altri, consente di stimare accuratamente i parametri che contengono le componenti maggiori degli autovettori relativi agli autovalori diversi da zero. Perciò progettare esperimenti per massimizzare l'informazione lungo direzioni che non dipendono da parametri i cui autovalori sono nulli, permette comunque di stimare in maniera accurata un sottoinsieme di parametri. Massimizzare ogni singolo autovalore (progettazione *SV*-ottimale) può evidenziare l'esistenza di un numero limitato di direzioni principali della varianza che sono orientate lungo alcune direzioni principali e perciò determinare degli esperimenti che consentono di identificare correttamente, non tutto il modello, ma almeno una parte di esso.

La progettazione *P*-ottimale permette di ricercare esplicitamente esperimenti non correlati. Se si considerano solo alcune componenti degli autovettori, una opportuna rotazione della matrice di varianza, durante la progettazione, può annullare le componenti scelte, rendendo non correlati i parametri, a cui appartengono le componenti. Se da un lato questo è vantaggioso perché consente di progettare in maniera più flessibile, sotto altri aspetti può produrre una progettazione non robusta numericamente, e non minimizzare correttamente la varianza dei parametri. Infatti quando si riesce ad orientare l'incertezza sui parametri lungo una o più direzioni principali, in modo tale che un autovalore non abbia componenti condivisi con altri parametri, la funzione obiettivo si annulla per qualsiasi valore della varianza che può anche aumentare nelle altre direzioni.

Poiché l'informazione è additiva, se si progetta solo in parallelo, è meglio applicare il criterio *P*-ottimale considerando tutte le componenti degli autovettori, oppure applicare il criterio *SV*-ottimale. Infatti non c'è alcun interesse ad ottenere esperimenti che siano non correlati in una progettazione parallela, in quanto le matrici di informazione dei singoli esperimenti devono poi essere sommate. È meglio adottare una strategia che miri a fornire la massima informazione ottenibile. Il criterio *P*-ottimale può essere utilmente impiegato nella progettazione in sequenza per avvicinarsi nella maniera più rapida possibile al valore vero dei parametri, grazie alla stima precisa di alcuni parametri ad ogni iterazione della procedura sperimentale.

#### **4.4 Strategie di progettazione degli esperimenti**

Uno dei principali limiti della progettazione ottimale di esperimenti presentata in questa tesi, e una delle assunzioni che viene correntemente adottata nell'applicazione del DoE, è legato all'ipotesi di progettare con parametri che sono accurati, ossia il cui valore è già prossimo al valore vero. Nella pratica, questa ipotesi è nella maggior parte dei casi falsa, soprattutto quando si inizia a studiare un sistema non noto, di cui non si dispone di molti dati e



l'informazione iniziale sui parametri è pressoché nulla. Si trova spesso, una notevole differenza tra i risultati previsti nella progettazione e i risultati sperimentali, anche assumendo che:

- non ci sia mismatch tra il modello e la rappresentazione matematica corretta del sistema esaminato;
- il modello impiegato sia identificabile parametricamente.

Si può affermare in maniera qualitativa che, l'efficacia della progettazione è influenzata dalla distanza dei parametri di progetto dal valore vero, dalla precisione delle stime iniziali dei parametri con cui si progetta, dalla struttura matematica del modello che, in funzione del valore stesso dei parametri, rende alcuni parametri più difficilmente stimabili rispetto agli altri. Per superare l'inefficacia della progettazione si può scegliere di effettuare una progettazione che sia robusta, cioè realizzare una progettazione che sia un buon compromesso tra l'informazione che si prevede di ottenere e la probabilità di ottenere questa informazione. Alternativamente si può applicare una progettazione ottimale in sequenza, in maniera tale da avvicinarsi al valore vero dei parametri correggendo ad ogni iterazione la previsione dei risultati della progettazione grazie all'aumento dell'accuratezza dei parametri. Di seguito viene approfondito con degli esempi, quest'ultimo metodo di progettare esperimenti.

#### 4.4.1 Struttura degli esperimenti

La struttura con cui eseguire gli esperimenti, ossia la successione di esperimenti, la possibilità di eseguirne più d'uno ad ogni iterazione della procedura di stima e il numero complessivo di esperimenti eseguibili, costituisce un ulteriore insieme di variabili sulle quali si può agire nella progettazione degli esperimenti. Gli schemi di progettazioni che è possibile realizzare sono quelli riportati nella Figura 2.3. La struttura dell'esperimento,  $\mathbf{T}$ , può essere definita come in Galvanin *et al.* (2007), nel seguente modo:

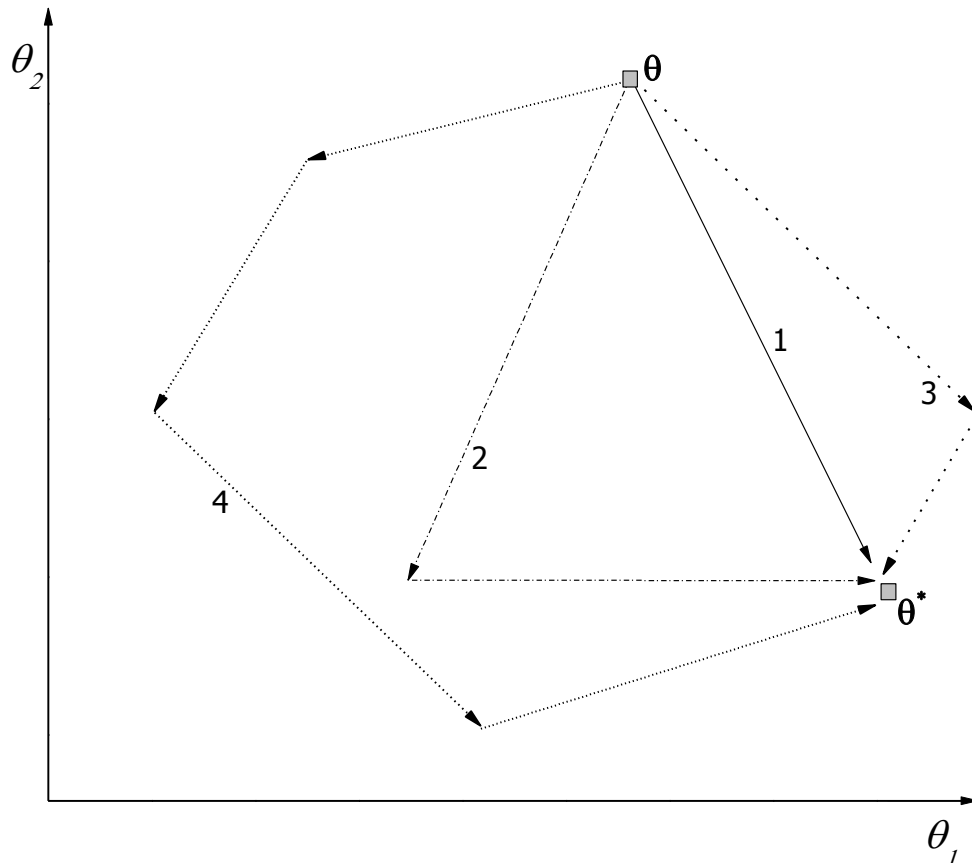
$$\mathbf{T} = \{N, N_R, \mathbf{C}\} ; \quad (4.12)$$

dove  $N$  è il numero totale di esperimenti eseguibili (in uno schema solo sequenziale costituisce il numero massimo di iterazioni possibili),  $N_R$  è il numero di esperimenti che è possibile condurre in parallelo ad ogni iterazione (determinato dal numero di apparecchiature disponibili),  $\mathbf{C}$  è un vettore che ha la dimensione pari al numero di iterazioni da eseguire e ogni suo elemento indica il numero di esperimenti da eseguire ad ogni iterazione. Ad esempio si potrebbe disporre di due reattori in cui condurre gli esperimenti ( $N_R = 2$ ), e la possibilità di eseguire solo 3 prove ( $N = 3$ ) e in questo caso  $\mathbf{C}$  potrebbe valere  $\mathbf{C} = [2, 1]$ ,  $\mathbf{C}$  corrisponde cioè all'esecuzione di due esperimenti in parallelo seguiti da un successivo esperimento.

Progettando anche la struttura dell'esperimento, il problema di ottimizzazione diventa molto più esteso poiché non ci si limita al solo problema di massimizzare l'informazione ottenibile, ma si devono anche determinare il valore di variabili che rappresentano la struttura della campagna sperimentale. Inoltre la progettazione potrebbe avere non solo l'obiettivo di massimizzare l'informazione, ma potrebbe comprendere una ottimizzazione multiobiettivo, in cui si definiscono gli elementi della struttura  $\mathbf{T}$ . La progettazione di esperimenti in parallelo/sequenza può anche essere vista come la necessità di determinare  $\mathbf{C}$  sotto alcuni vincoli, costituiti ad esempio, da  $N$ ,  $N_R$ , oppure il tempo massimo a disposizione per condurre gli esperimenti. In generale questo tipo di problemi può essere risolto attraverso algoritmi di tipo *mixed-integer nonlinear programming* (MINLP). La necessità di risolvere questo tipo di problemi applicati alla progettazione di esperimenti è stata avanzata da Galvanin *et al.* (2007) ed è un problema che non ha ancora trovato una applicazione sistematica nel campo della progettazione ottimale di esperimenti.

Un altro aspetto fondamentale della progettazione ottimale degli esperimenti estesa alla struttura è legato al criterio di progettazione. Infatti, a causa del valore di progettazione diverso dal valore finale e dalla difficoltà di stimare alcuni parametri (imputabile principalmente alla correlazione che esiste tra la varianza dei parametri), la convergenza della stima dei parametri al valore vero può seguire traiettorie diverse adottando un criterio rispetto ad un altro. La scelta di un criterio influisce sulla struttura e determina il diverso uso delle risorse disponibili per condurre le prove sperimentali. La Figura 4.6 riporta il risultato di 5 ipotetiche progettazioni differenti; le frecce indicano i valori dei parametri stimati e partono nel punto in cui si effettua la progettazione e terminano nel punto individuato dalla stima. Il risultato vero è contrassegnato da  $\theta^*$ . Per ogni caso rappresentato,  $\mathbf{C}$  non è noto e non si conoscono in quale maniera siano state ottenute le stime. Si possono però esprimere le considerazioni seguenti:

1. la traiettoria 1 rappresenta una progettazione che consente di stimare i parametri con uno o più esperimenti condotti contemporaneamente;
2. la traiettoria 2 mostra che è possibile stimare correttamente  $\theta_2$  già con la prima stima, mentre l'informazione su  $\theta_1$  non è completa per stimarlo correttamente;
3. nel caso 3 l'avvicinamento al valore vero avviene migliorando la stima di entrambi i parametri;
4. la traiettoria 4 rappresenta una sequenza di progettazioni poco efficaci in cui si raggiunge il valore vero attraverso molte iterazioni.



**Figura 4.6.** Nella figura sono riportate delle traiettorie particolari: il caso 1 rappresenta una traiettoria ottimale; il caso 2 rappresenta delle progettazioni in cui i parametri vengono stimati in successione in maniera indipendente; il caso 3 agisce su tutti i parametri ad ogni iterazione; il caso 4 riporta una progettazione poco robusta.

Se le traiettorie della Figura 4.6 fossero state ottenute impiegando le stesse risorse in termini di apparecchiature, campioni prelevati e tempo impiegato (trascuando altri fattori come ad esempio la disponibilità di personale), si potrebbe concludere che gli esperimenti sono equivalenti. Se invece fossero state impiegate le stesse risorse ad ogni iterazione degli esperimenti, il caso 1 sarebbe il migliore mentre 2 e 3 si potrebbero considerare uguali. Tra 2 e 3 cambiano però i risultati della progettazione, infatti la progettazione 2 presenta caratteristiche scorrelanti che separano la varianza tra i due parametri essendo in grado di stimare accuratamente con una iterazione  $\theta_2$ , e  $\theta_1$  nella successiva indipendentemente da  $\theta_2$ . Nella progettazione applicata a 3, invece, si agisce contemporaneamente sulla varianza di tutti i parametri. Un vantaggio della progettazione effettuata nel caso 2, è attribuibile alla possibilità di applicare la procedura di iterazione degli esperimenti al massimo un numero di volte pari ai parametri da stimare (se tutti i parametri sono stimabili indipendentemente). Un altro vantaggio, di interesse maggiore, è legato al fatto che si può stimare accuratamente ad ogni iterazione solo un sottoinsieme di parametri, indipendentemente dall'incertezza che si possiede su tutti i parametri. Si devono, tuttavia, ottenere risultati della sperimentazione che rispecchiano quelli di progetto, altrimenti, anche scegliendo una strategia di progettazione

basata su progettazione scorrelanti, non si ha alcuna garanzia di minimizzare la varianza in maniera ortogonale ad ogni iterazione. Il caso 2 potrebbe essere ricondotto ad una progettazione *SV*-ottimale oppure *P*-ottimale poiché si è visto che questi criteri di progettazione consentono di scegliere esperimenti i cui parametri non sono correlati.

Si consideri di dover stimare i parametri del modello di Tam *et al.* (2005a), realizzando esperimenti simili a quelli in *E2 - E6*. Si hanno a disposizione due reattori dove condurre le prove e la possibilità di ripetere la procedura tutte le volte necessarie. La struttura degli esperimenti è definita solo da  $N_R = 2$  mentre gli altri elementi sono fissabili a piacere. Nel seguito del capitolo si confrontano i risultati delle stime applicando i criteri *D*-ottimale e *SV*-ottimale per esperimenti effettuati con errore basso sulle misure ed errore più elevato. Vengono presentati i seguenti casi:

- *SVLow*, progettazioni *SV*-ottimale con errore basso,  $\mathbf{C} = [2,2]$ ;
- *DLow*, progettazioni *D*-ottimale con errore basso,  $\mathbf{C} = [2,2,2]$ ;
- *SVDHigh*, 2 progettazioni *SV*-ottimale in parallelo seguite da 2 progettazione *D*-ottimale in parallelo con errore elevato;
- *DHigh*, progettazioni *D*-ottimali con errore elevato,  $\mathbf{C} = [2,2,2,2]$ .

#### 4.4.2 Progettazioni effettuate con errore basso

Le progettazioni seguenti vengono realizzate assumendo un errore basso sulle misure, pari al valore  $\sigma = 0.021$ . In questo modo viene messa in luce la possibilità di stimare i parametri nonostante la scarsa identificabilità di alcuni parametri del modello, inoltre, assumendo un errore basso, le assunzioni statistiche sulla varianza dei parametri risultano vere.

##### 4.4.2.1 Progettazioni *SV*-ottimale *SVLow*

Si sceglie di applicare il criterio *SV*-ottimale, e si procede come in *E5* progettando su ciascun valore della matrice  $\mathbf{H}_\theta$ . Dai risultati della progettazione *E5* si era osservato che la progettazione poteva essere condotta solo su i primi 4 autovalori, e si ottenevano perciò 4 progettazioni realizzabili. In questo caso però, ci si deve limitare alla scelta di due esperimenti tra i quattro che risultano fattibili. Si vuole scegliere gli esperimenti in modo da prevedere la stima accurata di alcuni parametri nel numero di iterazioni più breve possibile. A tale fine si individuano gli esperimenti in cui sono presenti insiemi di parametri che sono non correlati tra di loro e la cui informazione è “accessibile”, ossia le componenti delle direzioni a maggiore informazione appartengono quasi interamente a questi raggruppamenti di parametri. Riprendendo le osservazioni condotte nel §4.2.1 relative alle tabelle 4.2 - 4.5, si vede che l’esperimento ottenuto dalla progettazione su  $\lambda_4$  (Tabella 4.5) possiede l’informazione lungo  $\mathbf{p}_1$  e  $\mathbf{p}_2$  quasi interamente suddivisa tra  $K_g$  e  $N_{max}$ . Dalla progettazione ci si attende dunque, che sia possibile ottenere una buona stima di  $K_g$  e  $N_{max}$  con l’esperimento su  $\lambda_4$

indipendentemente dal valore assunto dagli altri parametri. Per scegliere il secondo esperimento, si nota che, sia nella Tabella 4.2 sia nella Tabella 4.3, la direzione principale è proiettata su  $K_g$  e  $K_k$ . Ritenendo di acquisire una buona stima di  $K_g$ , è possibile di conseguenza stimare accuratamente anche  $K_k$  (assumendo vera l'ipotesi di progettare in prossimità del valore vero dei parametri e che la matrice  $\mathbf{H}_\theta$  rappresenti correttamente la varianza dei parametri). Infine, tra l'esperimento su  $\lambda_1$  e  $\lambda_2$ , è più conveniente scegliere quello su  $\lambda_2$  perché la direzione  $\mathbf{p}_3$  è molto allineata alla direzione principale del parametro  $H$  e permette di ottenere una stima di  $H$  poco influenzata dagli altri parametri. Da questo esperimento ci si attende una stima accurata di  $K_g$  e  $N_{max}$  e in parte anche di  $H$  e  $K_k$ ; la precisione della stima dovrà essere valutata *a posteriori*.

Dalla stima degli esperimenti effettuati si ottengono i risultati riportati in Tabella 4.14.

**Tabella 4.14.** Prima progettazione e risultati della stima per gli esperimenti SVLow.

	$C_{50k}$ [mg·L <sup>-1</sup> ]	$K_g$ [hr <sup>-1</sup> ]	$K_k$ [hr <sup>-1</sup> ]	$H$ [-]	$N_{max} \cdot 10^9$ [cfu·mL <sup>-1</sup> ]	$\beta$ [-]	$\tau$ [L·mg <sup>-1</sup> ·hr <sup>-1</sup> ]
<b>Valore di progetto</b>	0.833	1.250	0.833	1.250	1.250	1.250	0.833
<b>Valore stimato</b>	0.668	1.049	0.895	1.171	1.004	1.174	0.782
<b>t-value stima</b>	0.067*	0.028*	0.033*	0.02*	0.028*	0.0053*	0.004*
<b>st. dev.</b>	3.90	15.00	10.00	23.00	14.00	86.00	76.00
t-value 95% (stima) = 2.015							

Coerentemente con le attese della progettazione  $K_g$  e  $N_{max}$  vengono stimati accuratamente, meno  $H$  e  $K_k$ , probabilmente a causa della minore informazione raccolta dagli esperimenti. La precisione (deviazione standard) risulta invece inadeguata per trarre conclusioni sulla validità della stima.

**Tabella 4.15.** Vettore dell'esperimento  $\phi$  per ciascuna progettazione.

	$Ca_0$	$t_1^{sp}$	$t_2^{sp}$	$t_3^{sp}$	$t_4^{sp}$	$t_5^{sp}$	$t_6^{sp}$	$t_7^{sp}$
<b>Progettazione su <math>\lambda_1</math></b>	1.551	0.30	5.45	10.75	16.01	20.87	23.87	24.00
<b>Progettazione su <math>\lambda_2</math></b>	0.895	0.30	23.44	23.61	23.70	23.80	23.89	24.00
<b>Progettazione su <math>\lambda_3</math></b>	1.551	0.30	8.16	8.28	8.38	8.56	18.77	24.00
<b>Progettazione su <math>\lambda_4</math></b>	1.358	0.30	10.10	10.30	10.47	10.66	10.88	24.00

Il secondo set di esperimenti viene progettato sui primi quattro autovalori, i quali risultano essere numericamente significativi. I risultati delle progettazioni sono riportati in Tabella 4.15.

La scelta degli esperimenti da realizzare, tra quelli ottenuti, viene effettuata grazie all'analisi degli autovettori riportati nelle tabelle 4.16-4.19. In questa seconda progettazione non compaiono esperimenti in cui si trovano raggruppamenti di parametri non correlati tra loro. Come nel caso *E6* la progettazione risente dei risultati degli esperimenti precedenti e perciò si ottengono prove a concentrazioni di antibiotico più elevate, poiché a queste concentrazioni l'influenza dei parametri  $K_g$  e  $N_{max}$  sul modello è meno importante. Si sceglie di eseguire gli esperimenti relativi a  $\lambda_1$  e  $\lambda_3$  poiché l'informazione degli autovalori più piccoli è maggiore ed inoltre, le componenti dei parametri che non sono ancora stati stimati accuratamente lungo le direzioni a minore varianza sono leggermente maggiori che negli altri due casi. Nelle tabelle 4.16-4.19 sono contenuti gli autovettori ottenuti per le matrici di informazione del secondo set di progettazioni.

**Tabella 4.16.** Progettazione su  $\lambda_1$ : autovettori e autovalori.  
 $Ca_0 = 1.6 \text{ mg/L}$

	p1	p2	p3	p4	p5	p6	p7
$C_{50k}$	0.064	0.626	0.036	0.116	0.048	0.087	0.022
$K_g$	0.317	0.088	0.214	0.024	0.116	0.213	0.028
$K_k$	0.570	0.230	0.001	0.000	0.050	0.134	0.016
$H$	0.036	0.020	0.460	0.179	0.028	0.252	0.025
$N_{max}$	0.000	0.000	0.011	0.006	0.759	0.202	0.023
$\beta$	0.007	0.016	0.162	0.439	0.000	0.038	0.337
$\tau$	0.006	0.019	0.116	0.236	0.000	0.073	0.550
$\lambda$	7.80E+03	4.76E+01	7.09E+00	3.09E+00	5.75E-01	5.90E-02	4.39E-04

**Tabella 4.17.** Progettazione su  $\lambda_2$ : autovettori e autovalori.  
 $Ca_0 = 0.9 \text{ mg/L}$

	p1	p2	p3	p4	p5	p6	p7
$C_{50k}$	0.107	0.503	0.117	0.247	0.022	0.001	0.003
$K_g$	0.363	0.078	0.109	0.196	0.097	0.153	0.005
$K_k$	0.501	0.254	0.007	0.047	0.046	0.140	0.003
$H$	0.015	0.161	0.324	0.043	0.038	0.413	0.005
$N_{max}$	0.000	0.000	0.007	0.036	0.791	0.162	0.004
$\beta$	0.007	0.001	0.263	0.306	0.003	0.037	0.382
$\tau$	0.006	0.003	0.173	0.124	0.002	0.094	0.598
$\lambda$	8.45E+03	2.16E+02	5.97E+00	1.22E+00	5.76E-01	3.34E-03	3.87E-05

**Tabella 4.18.** Progettazione su  $\lambda_3$ : autovettori e autovalori.  
 $Ca_0 = 1.6 \text{ mg/L}$

	p1	p2	p3	p4	p5	p6	p7
$C_{50k}$	0.056	0.617	0.033	0.128	0.048	0.094	0.025
$K_g$	0.310	0.108	0.188	0.035	0.115	0.211	0.033
$K_k$	0.585	0.217	0.000	0.000	0.049	0.130	0.018
$H$	0.037	0.026	0.390	0.254	0.027	0.236	0.030
$N_{max}$	0.000	0.000	0.009	0.006	0.760	0.198	0.026
$\beta$	0.006	0.015	0.224	0.368	0.000	0.053	0.333
$\tau$	0.005	0.017	0.156	0.209	0.000	0.077	0.535
$\lambda$	6.19E+03	3.49E+01	7.11E+00	4.01E+00	5.75E-01	6.17E-02	3.43E-04

**Tabella 4.19.** Progettazione su  $\lambda_4$ : autovettori e autovalori.  
 $Ca_0 = 1.4 \text{ mg/L}$

	p1	p2	p3	p4	p5	p6	p7
$C_{50k}$	0.059	0.631	0.037	0.120	0.047	0.090	0.016
$K_g$	0.314	0.111	0.138	0.073	0.118	0.222	0.024
$K_k$	0.580	0.215	0.000	0.001	0.051	0.138	0.014
$H$	0.036	0.035	0.284	0.349	0.029	0.243	0.024
$N_{max}$	0.000	0.000	0.007	0.008	0.756	0.210	0.020
$\beta$	0.006	0.003	0.317	0.281	0.000	0.040	0.353
$\tau$	0.005	0.005	0.216	0.168	0.000	0.058	0.549
$\lambda$	5.93E+03	4.45E+01	6.83E+00	4.84E+00	5.76E-01	8.90E-02	7.06E-05

L'esito della stima è mostrato in Tabella 4.20. La precisione per i primi 5 parametri sembra essere coerente con l'accuratezza raggiunta.

**Tabella 4.20.** Seconda progettazione e risultati della stima per gli esperimenti SVLow.

	$C_{50k}$ [mg·L <sup>-1</sup> ]	$K_g$ [hr <sup>-1</sup> ]	$K_k$ [hr <sup>-1</sup> ]	$H$ [-]	$N_{max} \cdot 10^9$ [cfu·mL <sup>-1</sup> ]	$\beta$ [-]	$\tau$ [L·mg <sup>-1</sup> ·hr <sup>-1</sup> ]
<b>Valore di progetto</b>	0.668	1.049	0.895	1.171	1.004	1.174	0.782
<b>Valore stimato</b>	1.031	0.961	0.972	1.039	0.993	1.084	0.870
<b>t-value stima</b>	20.0	12.0	12.0	9.1	8.5	0.67*	0.57*
<b>st. dev.</b>	0.025	0.037	0.037	0.055	0.053	0.770	0.720
<i>t</i> -value 95% (stima) = 1.729							

Le stime risultano essere molto prossime al valore vero dei parametri nella maggior parte dei casi (tranne  $\tau$ ).

#### 4.4.2.2 Progettazioni *D*-ottimale *D*Low

La stima ottenuta attraverso un MBDoe basato sul criterio *D*-ottimale non necessita di particolari considerazioni riguardo alla sua implementazione. I risultati sono raccolti nella tabelle 4.21 e 4.22 relative alla prima ed alla seconda fase di stima.

**Tabella 4.21.** Prima progettazione e risultati della stima per gli esperimenti *D*Low.

	$C_{50k}$ [mg·L <sup>-1</sup> ]	$K_g$ [hr <sup>-1</sup> ]	$K_k$ [hr <sup>-1</sup> ]	$H$ [-]	$N_{max} \cdot 10^9$ [cfu·mL <sup>-1</sup> ]	$\beta$ [-]	$\tau$ [L·mg <sup>-1</sup> ·hr <sup>-1</sup> ]
<b>Valore di progetto</b>	0.833	1.250	0.833	1.250	1.250	1.250	0.833
<b>Valore stimato</b>	0.809	1.122	0.994	1.457	0.969	1.055	0.725
<b>t-value stima</b>	~0	~0	~0	~0	~0	~0	~0
<b>st. dev.</b>	-	-	-	-	-	-	-
<i>t</i> -value 95% (stima) = 2.015							

**Tabella 4.22.** Seconda progettazione e risultati della stima per gli esperimenti *D*Low.

	$C_{50k}$ [mg·L <sup>-1</sup> ]	$K_g$ [hr <sup>-1</sup> ]	$K_k$ [hr <sup>-1</sup> ]	$H$ [-]	$N_{max} \cdot 10^9$ [cfu·mL <sup>-1</sup> ]	$\beta$ [-]	$\tau$ [L·mg <sup>-1</sup> ·hr <sup>-1</sup> ]
<b>Valore di progetto</b>	0.809	1.122	0.994	1.457	0.969	1.055	0.725
<b>Valore stimato</b>	1.00	1.02	1.02	0.96	1.00	0.37	3.0*
<b>t-value stima</b>	14	28	19	8	25	5	-
<b>st. dev.</b>	0.03	0.02	0.03	0.06	0.02	0.04	-
<i>t</i> -value 95% (stima) = 1.745							

I risultati della prima stima sono insufficienti a causa del numero di misure che è necessario scartare da uno dei due esperimenti condotti in parallelo; nonostante ciò il valore attribuito ad alcuni parametri appare una buona approssimazione del valore vero anche se può essere considerata una casualità perché la varianza sui parametri è molto elevata. Dopo la seconda progettazione, invece, si riesce a stimare in maniera precisa ed accurata tutti i parametri tranne  $\beta$  e  $\tau$ .

**Tabella 4.23.** Terza progettazione e risultati della stima per gli esperimenti SVLow. Questi risultati confermano localmente l'identificabilità parametrica del modello e mostrano l'efficacia della progettazione in sequenza.

	$C_{50k}$ [mg·L <sup>-1</sup> ]	$K_g$ [hr <sup>-1</sup> ]	$K_k$ [hr <sup>-1</sup> ]	$H$ [-]	$N_{max} \cdot 10^9$ [cfu·mL <sup>-1</sup> ]	$\beta$ [-]	$\tau$ [L·mg <sup>-1</sup> ·hr <sup>-1</sup> ]
<b>Valore di progetto</b>	1.00	1.02	1.02	0.96	1.00	0.37	3.06
<b>Valore stimato</b>	0.992	1.013	1.008	0.997	0.991	0.948	1.069
<b>t-value stima</b>	36	40	50	41	38	3.3	2.7
<b>st. dev.</b>	0.013	0.013	0.0099	0.012	0.013	0.14	0.2
t-value 95% (stima) = 1.698							

La Tabella 4.23 riporta una ulteriore fase di stima, dopo la quale si evidenzia la possibilità di stimare accuratamente e in maniera precisa tutti i parametri. Con l'ultima serie di esperimenti si ha la conferma che il modello è localmente identificabile, e che la progettazione in sequenza è più efficiente in termini di apparecchiature e mezzi rispetto alla progettazione in parallelo, anche se richiede più tempo.

#### 4.4.3 Progettazioni effettuate con errore elevato

Le progettazioni seguenti vengono realizzate assumendo un errore sulle misure più elevato, pari al valore  $\sigma = 0.079$ . L'errore più elevato indebolisce le ipotesi sui quali si basa l'MBDoE. Quando l'errore aumenta la correlazioni tra parametri può non essere più individuabile localmente da un iperellissoide. Infatti, se l'errore sulle misure è piccolo, la matrice di informazione rappresenta bene l'incertezza dei parametri. All'aumentare dell'errore sulle misure, invece, l'errore dei parametri non viene più descritto correttamente dalla matrice di informazione, perché l'errore sulle misure si ripercuote in maniera non lineare sull'incertezza dei parametri.

##### 4.4.3.1 Progettazione SV-ottimale/D-ottimale SVDHigh

La progettazione non viene modificata dalla presenza di errore più elevato rispetto agli esperimenti ottenuti in E5. Questo avviene poiché la variabile misurata è una sola e perciò



l'effetto dell'errore sulla matrice di informazione si manifesta nella stessa misura aumentando la varianza dell'errore per tutti i parametri ma non influisce sulla correlazione tra parametri. Dall'esecuzione degli esperimenti ci si aspetta una stima meno precisa rispetto al caso precedente ma altrettanto accurata. Dalla Tabella 4.24 si nota che la stima dei parametri risulta del tutto confrontabile con la progettazione *SVLow* e i risultati attendibili sono quelli relativi ai parametri  $K_g$  e  $N_{max}$ .

**Tabella 4.24.** Prima progettazione (SV-ottimale) e risultati della stima per gli esperimenti SVDHigh.

	$C_{50k}$ [mg·L <sup>-1</sup> ]	$K_g$ [hr <sup>-1</sup> ]	$K_k$ [hr <sup>-1</sup> ]	$H$ [-]	$N_{max} \cdot 10^9$ [cfu·mL <sup>-1</sup> ]	$\beta$ [-]	$\tau$ [L·mg <sup>-1</sup> ·hr <sup>-1</sup> ]
<b>Valore di progetto</b>	0.833	1.250	0.833	1.250	1.250	1.250	0.833
<b>Valore stimato</b>	0.651	1.044	0.895	1.147	1.029	1.179	0.786
<b>t-value stima</b>	0.014*	0.006*	0.007*	0.004*	0.006*	0.001*	0.001*
<b>st. dev.</b>	17	61	43	90	61	3.30E+02	2.90E+02
t-value 95% (stima) = 2.132							

Vista la somiglianza della progettazione con i risultati del *SVLow*, ci si attende di ottenere un esito analogo anche per il secondo MBDoE basato sul criterio SV-ottimale. In questa fase alcuni parametri sono già stati stimati accuratamente e non è possibile individuare esperimenti appropriati per la stima dei rimanenti parametri. Poiché con il secondo MBDoE si vorrebbe ottenere una confidenza accettabile della stima, è necessario progettare per diminuire complessivamente la varianza di tutti i parametri. Si sceglie perciò di completare la stima applicando una progettazione D-ottimale, la quale (si è visto dal confronto tra *SVLow* e *DLow*) sembra essere equivalente in questa fase alla progettazione SV-ottimale. Nella Tabella 4.25 si riporta l'esito dell'ultima stima.

**Tabella 4.25.** Seconda progettazione (D-ottimale) e risultati della stima per gli esperimenti SVDHigh.

	$C_{50k}$ [mg·L <sup>-1</sup> ]	$K_g$ [hr <sup>-1</sup> ]	$K_k$ [hr <sup>-1</sup> ]	$H$ [-]	$N_{max} \cdot 10^9$ [cfu·mL <sup>-1</sup> ]	$\beta$ [-]	$\tau$ [L·mg <sup>-1</sup> ·hr <sup>-1</sup> ]
<b>Valore di progetto</b>	0.651	1.044	0.895	1.147	1.029	1.179	0.786
<b>Valore stimato</b>	1.070	1.017	1.047	0.968	1.036	1.088	0.790
<b>t-value stima</b>	5.1	4.9	4.7	3.4	3.2	0.15*	0.13*
<b>st. dev.</b>	0.099	0.098	0.11	0.13	0.15	3.4	2.8
t-value 95% (stima) = 1.740							

Si evidenzia che vengono raggiunti risultati accurati con indicazioni sulla precisione della stima attendibili.

#### 4.4.3.2 Progettazione *D*-ottimale *DHigh*

La progettazione *D*-ottimale con errore elevato presenta gli stessi limiti del caso *DLow* per ciò che concerne il primo set di esperimenti. Le stime successive sono rese meno accurate dalla presenza di errore più elevato.

**Tabella 4.26.** *Progettazione e risultati della stima per gli esperimenti DHigh. Vengono eseguite quattro progettazioni e relative stime in sequenza. Ogni progettazione viene eseguita sul vettore dei parametri stimato nell'esperimento che lo precede. Nella prima prova l'incertezza sui parametri non è calcolabile perché le misure sono insufficienti per identificare il sistema.*

		$C_{50k}$ [mg·L <sup>-1</sup> ]	$K_g$ [hr <sup>-1</sup> ]	$K_k$ [hr <sup>-1</sup> ]	$H$ [-]	$N_{max} \cdot 10^9$ [cfu·mL <sup>-1</sup> ]	$\beta$ [-]	$\tau$ [L·mg <sup>-1</sup> ·hr <sup>-1</sup> ]
	<b>Valore di progetto</b>	0.833	1.250	0.833	1.250	1.250	1.250	0.833
<i>t</i> -value 95% 2.012	<b>Valore stimato</b>	0.812	1.137	1.014	1.656	1.280	0.722	0.484
	<b><i>t</i>-value stima</b>	~0	~0	~0	~0	~0	~0	~0
	<b>st. dev.</b>	-	-	-	-	-	-	-
<i>t</i> -value 95% 1.761	<b>Valore stimato</b>	0.963	1.081	1.072	0.945	0.906	1.282	0.855
	<b><i>t</i>-value stima</b>	5.50	8.50	12.00	6.30	6.50	0.14*	0.13*
	<b>st. dev.</b>	0.082	0.06	0.043	0.07	0.065	4.2	3.1
<i>t</i> -value 95% 1.705	<b>Valore stimato</b>	0.998	1.016	1.020	0.975	0.897	1.190	0.858
	<b><i>t</i>-value stima</b>	8.60	8.90	12.00	11.00	7.70	0.61*	0.53*
	<b>st. dev.</b>	0.056	0.055	0.04	0.043	0.057	0.95	0.79
<i>t</i> -value 95% 1.686	<b>Valore stimato</b>	1.018	1.000	1.017	0.970	0.994	1.175	0.866
	<b><i>t</i>-value stima</b>	9.8	13	15	13	10	0.8*	0.68*
	<b>st. dev.</b>	0.051	0.039	0.033	0.038	0.049	0.73	0.63

Dalla Tabella 4.26 si osserva che per alcuni parametri la stima è fuorviante (i.e.  $N_{max}$ ) e non consente di progredire in maniera rapida verso il valore vero dei parametri. Si procede a progettare in sequenza fintantoché non viene raggiunta un'accuratezza di tutti i parametri confrontabile con la progettazione precedente.

#### 4.4.4 Confronto tra la progettazioni presentate

Il confronto tra le diverse progettazioni deve essere fatto sia in termini di accuratezza sia in termini di precisione. Negli esempi del capitolo si è visto che, l'indicazione della deviazione standard, la quale misura l'errore con cui un parametro viene stimato, è legata al concetto di precisione della stima, ma non sempre è un buon indice dell'accuratezza della stima. Infatti non è detto che la varianza possa essere bene approssimata dalla matrice  $\mathbf{H}_\theta$ , soprattutto

quando l'errore delle misure inizia ad essere considerevole. Inoltre non si riesce a misurare l'effetto di come si ripercuotono sulle progettazioni successive gli errori di stima dei parametri durante la sequenza di progettazione.

Galvanin (2010) ha introdotto l'uso di due indici euristici per caratterizzare l'efficienza di una progettazione in termini di accuratezza e precisione. Per la precisione si fa riferimento all'indice  $I_\pi$ :

$$I_\pi = \sqrt{\sum_{i=1}^{N_\theta} \left( \frac{\sigma_{\theta_i}}{\theta_i} \right)^2} \quad ; \quad (4.13)$$

che è un indice di accuratezza globale che considera l'errore relativo delle stime di tutti i parametri; mentre per valutare la precisione si usa  $I_\alpha$ :

$$I_\alpha = \sqrt{\sum_{i=1}^{N_\theta} \left( \frac{\hat{\theta}_i - \theta_i}{\theta_i} \right)^2} \quad ; \quad (4.14)$$

dove  $\sigma_{\theta_i}$  è la deviazione standard delle stime dei parametri. Quando la stima è accurata e precisa i due indici tendono al valore zero. Ovviamente l'indice sull'accuratezza nella pratica non può essere calcolato perché il valore vero è incognito, e qui viene usato solo per testare l'efficienza dei due metodi di progettazione.

L'efficienza delle progettazioni precedenti, misurata dai due indici  $I_\pi$  e  $I_\alpha$ , viene riportata nella Tabella 4.27:

**Tabella 4.27.** Vengono riportati gli indici che caratterizzano l'efficienza degli esperimenti presenti nel Capitolo. Le righe riportano i valori di  $I_\pi$  e  $I_\alpha$  ottenuti nella sequenza di stima dei parametri. La riga 0 indica l'accuratezza dei parametri di progetto iniziali.

	<i>SVLow</i>		<i>DLow</i>		<i>SVDHigh</i>		<i>DHigh</i>	
	$I_\alpha$	$I_\pi$	$I_\alpha$	$I_\pi$	$I_\alpha$	$I_\pi$	$I_\alpha$	$I_\pi$
<b>0</b>	0.578	-	0.578	-	0.578	-	0.578	-
<b>1</b>	0.480	119.0	0.583	-	0.485	458.0	0.951	-
<b>2</b>	0.170	1.059	2.155	0.131	0.257	4.413	0.355	5.221
	0.070**	0.096**	0.046**	0.077**	0.118**	0.266**	0.158**	0.146**
<b>3</b>			0.089	0.246			0.261	1.240
<b>4</b>							0.224	0.969

\*\*) Indici calcolati senza includere i parametri  $\beta$  e  $\tau$ .

In generale, dalla Tabella 4.27 si nota che precisione e accuratezza tendono ad assumere lo stesso valore quando si è in prossimità del valore vero dei parametri e il numero di misure

impiegato è notevole. Nel calcolo degli indici, inoltre, una parte significativa dell'errore è portata dai parametri  $\beta$  e  $\tau$ , proprio perché il loro errore di stima risulta essere molto correlato. Il confronto tra gli esperimenti *SV*-ottimali e quelli *D*-ottimali evidenzia che, se l'errore è basso, le due tecniche di progettazione si possono considerare equivalenti in base all'efficienza della progettazione. La differenza che si riscontra tra *SV**Low* e *D**Low* nelle stime di  $\beta$  e  $\tau$  (cfr. Tabella 4.20 e Tabella 4.22) è giustificabile in base alla correlazione pari a circa -1, perciò nel caso *D**Low* il basso valore attribuito a  $\beta$  viene compensato da  $\tau$ . Quando l'errore è più elevato le prestazioni della progettazione *SVD**High* risultano nettamente migliori. L'aspettativa di riuscire a stimare un sottoinsieme di parametri indipendentemente dal valore attribuito ai rimanenti viene soddisfatta. Con il primo set di esperimenti si riesce ad individuare accuratamente  $K_g$  e  $N_{max}$  e ciò permette di progettare in maniera mirata la seconda progettazione. Nel caso *D**High* la traiettoria descritta nella stima dei parametri appare più casuale, e rimane distante dal valore vero a causa dell'errore su  $N_{max}$  (Tabella 4.26).

#### 4.4.5 Conclusioni

Il criterio *SV*-ottimale si è dimostrato efficiente, almeno quanto il *D*-ottimale, per effettuare sequenze di esperimenti in parallelo. Inoltre, in particolari casi, è possibile individuare una strategia, basata sull'analisi degli autovettori della matrice di informazione, che permette di stimare un sottoinsieme di parametri in maniera accurata. Il vantaggio portato da questa tecnica consiste nel diminuire il numero di iterazioni nella sequenza di stima per ottenere valori accurati dei parametri. La procedura della progettazione che sfrutta il criterio *SV*-ottimale è riassumibile nei seguenti punti:

1. progettare un esperimento per ciascun autovalore della matrice di informazione;
2. realizzare tutti gli esperimenti che sono informativi per il massimo numero di direzioni (o al massimo scegliere  $N_R$  esperimenti), includendo gli esperimenti per i quali si prevede di ottenere stime non correlate tra gruppi di parametri;
3. scegliere l'approccio sperimentale (*SV*-ottimale oppure *D*-ottimale) in base alle nuove informazioni acquisite.

Il punto tre indica l'opportunità di proseguire le fasi successive della progettazione applicando il criterio *SV*-ottimale oppure *D*-ottimale. La scelta del criterio *SV*-ottimale è adatta se, anche nel nuovo punto di progettazione, emerge la possibilità di realizzare esperimenti i cui parametri sono non correlati. Inoltre è consigliabile progettare secondo un criterio *SV*-ottimale se la matrice  $\mathbf{H}_\theta$  ha determinante nullo.

I limiti principali della procedura presentata risiedono nella difficoltà di implementare in modo automatico il criterio *SV*-ottimale e la scelta degli esperimenti. Inoltre, dalle esperienze riportate, appare che le statistiche sulla precisione dei parametri non siano adeguate nel valutare l'accuratezza delle stime dei parametri.

# Conclusioni

L'applicazione di tecniche di MBD<sub>o</sub>E al modello proposto da Tam *et al.* (2005a) per la descrizione delle prove di batteriocidia ha evidenziato alcuni limiti strutturali del modello, principalmente legati all'identificabilità. Non si è riusciti a dimostrare analiticamente l'identificabilità del modello *a priori* a causa della non linearità del modello nei parametri. Esistono degli strumenti software sviluppati per testare l'identificabilità, ma possono essere applicati solamente ai modelli lineari e razionali. Si osserva che, se non vi fosse un termine non lineare nei parametri, sicuramente il modello sarebbe non identificabile. La presenza di non linearità porta a ritenere, alla luce dei test numerici condotti, che il modello sia identificabile. Si è riusciti, infatti, ad ottenere test di identificabilità locale positivi, tuttavia si è anche evidenziata la difficoltà di ottenere delle stime perché sono presenti due parametri affetti da elevata correlazione.

Si sono pertanto realizzate diverse progettazioni di esperimenti allo scopo di verificare l'identificabilità del modello. Si è visto che i parametri del modello possono essere stimati solamente dalla realizzazione di più esperimenti in parallelo. I risultati migliori, dove le stime sono accurate e precise, si ottengono dalla ripetizione in sequenza di set di esperimenti condotti in parallelo. La progettazione in parallelo agisce a favore dell'identificabilità del sistema, diminuendo la correlazione tra parametri; la ripetizione delle prove in sequenza, invece, rende le stime più accurate perché consente di progettare con un'incertezza sui parametri sempre minore. La combinazione di esperimenti in sequenza ed in parallelo definisce la *struttura* della campagna sperimentale. Si è indagato come il criterio di progettazione influisce sulla struttura degli esperimenti. In particolare sono stati confrontati i risultati della progettazione *D*-ottimale paragonati alla progettazione *SV*-ottimale. Risulta che il criterio *SV*-ottimale dà prestazioni equivalenti con quelle ottenibili usando il criterio *D*-ottimale. Il criterio *SV*-ottimale presenta inoltre, la possibilità di condurre considerazioni sull'orientamento della varianza dei parametri, individuando le direzioni principali e la correlazione tra parametri. Permette di scegliere quali esperimenti sono da condurre in parallelo al fine di eseguire stime di sottoinsiemi di parametri che non siano correlati. Si è notato che questo modo di procedere, consente di ottenere, in meno iterazioni della procedura di stima, valori accurati per i parametri del modello. In generale, si osserva che l'analisi delle direzioni principali della varianza, è molto utile al fine di capire (i) per quali parametri, l'informazione ricavabile da ogni singolo esperimento, è rilevante; (ii) per comprendere per quali parametri l'informazione è insufficiente e (iii) per studiare l'effetto della correlazione tra parametri. Riuscire a progettare esperimenti i cui parametri (o almeno alcuni raggruppamenti di parametri) sono non correlati, consente di ottenere una progettazione più efficiente. Queste

osservazioni sono state confermate da simulazioni di esperimenti condotti secondo i due criteri di progettazione *SV*-ottimale e *D*-ottimale, dimostrando che la traiettoria seguita per avvicinarsi al valore vero dei parametri, può essere opportunamente orientata utilizzando il criterio *SV*-ottimale.

Gli sviluppi futuri di questo lavoro possono evolvere verso l'aspetto applicativo della progettazione ottimale di esperimenti sulla batteriocidia, oppure verso il miglioramento delle tecniche stesse di progettazione degli esperimenti. Le applicazioni sulla modellazione delle prove di batteriocidia riguardano sia il miglioramento del modello di Tam *et al.* (2005), i.e., riparametrizzando il modello in modo da ridurre la correlazione tra parametri, sia nello studio di altri modelli, alcuni dei quali sono stati presentati nel Capitolo 1. Si necessita, inoltre, di una migliore comprensione e dell'implementazione sistematica della progettazione della struttura dell'intera campagna sperimentale, anche ricorrendo alla soluzione di problemi di ottimizzazione di tipo MINLP.

# Nomenclatura

## Simboli generici

$a_i$	=	autovalore $i$ -esimo della matrice $\mathbf{V}_\theta$ (-)
$AUC$	=	area under curve ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$ )
$B$	=	bolo (mg)
$C_m$	=	concentrazione media ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
$C(t)$	=	concentrazione batterica ( $\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
$C_{50k}$	=	concentrazione a cui si ha metà dell'effetto massimo $K_k$ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
$Ca_0$	=	concentrazione iniziale di antibiotico ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
$c_{ij}$	=	elemento delle matrici di correlazione (-)
$CL$	=	clearance ( $\text{L}\cdot\text{hr}^{-1}$ )
$C_{ss}$	=	concentrazione a stato stazionario ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
$D$	=	dose ( $\text{mg}\cdot\text{hr}^{-1}$ )
$E$	=	effetto misurato ( $\cdot$ )
$E[\cdot]$	=	valore atteso ( $\cdot$ )
$EC_{50}$	=	concentrazione a cui si ha metà dell'effetto massimo $E$ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
$E_{\max}$	=	effetto massimo ( $\cdot$ )
$F$	=	biodisponibilità (-)
$F_{ob}$	=	funzione obiettivo (-)
$H$	=	costante di sigmoidicità (-)
$I_\alpha$	=	indice di accuratezza globale (-)
$I_\pi$	=	indice di precisione globale (-)
$K$	=	velocità massima di crescita ( $\text{hr}^{-1}$ )
$K_g$	=	velocità massima di crescita ( $\text{hr}^{-1}$ )
$K_k$	=	velocità massima di morte ( $\text{hr}^{-1}$ )
$K_M$	=	costante di Monod ( $\text{g}\cdot\text{hr}^{-1}$ )
$L_r$	=	funzione di massima verosimiglianza (-)
$MBC$	=	concentrazione minima battericida ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
$MIC$	=	concentrazione minima inibente ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
$N$	=	carica batterica ( $\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
$N_{exp}$	=	numero di esperimenti realizzati
$N_{max}$	=	concentrazione batterica massima ( $\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
$N_R$	=	numero di esperimenti in parallelo realizzati ad ogni iterazione (-)
$N_R$	=	crescita popolazione resistente ( $\text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
$N_S$	=	crescita popolazione sensibile ( $\text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

$n_{sp}$	=	numero di campionamenti (-)
$N_u$	=	numero delle variabili manipolabili dinamiche del modello (-)
$N_w$	=	numero delle variabili manipolabili non dinamiche del modello (-)
$N_y$	=	numero delle uscite del modello (-)
$N_\theta$	=	numero dei parametri del modello (-)
$p(y_r, \theta)$	=	probabilità condizionata delle misure delle uscite del modello (-)
$POP_{max}$	=	concentrazione batterica massima (CFU·mL <sup>-1</sup> )
$r$	=	rimozione (mg·hr <sup>-1</sup> )
$R$	=	velocità di infusione (mg·hr <sup>-1</sup> )
$S$	=	concentrazione di substrato (g·hr <sup>-1</sup> )
$s_{ij}$	=	elemento dell'inversa della matrice $\Sigma_y$ (-)
$SLC$	=	clearance dell'antibiotico (L·hr <sup>-1</sup> )
$t$	=	tempo (hr)
$t_{1/2}$	=	tempo di emivita (hr)
$\bar{t}_i$	=	$t$ -value di riferimento (-)
$t_i$	=	$t$ -value calcolato per il parametro $i$ -esimo (-)
$V$	=	volume di distribuzione (L)
$V_c$	=	volume del compartimento (L)
$v_{ij}$	=	elemento delle matrice di varianza-covarianza (-)
$v_{\theta,ij}$	=	elemento della matrice di varianza-covarianza dei parametri (-)
$y_{r,i}$	=	misura campionata all'istante $i$ -esimo dell'uscita $r$ -esima (·)
$Y_{x/S}$	=	resa si conversione (-)

### Simboli greci

$\alpha$	=	costante del modello di errore lineare (-)
$\beta$	=	adattamento massimo (-)
$\beta$	=	costante del modello di errore lineare (-)
$\gamma_i$	=	fattore di eteroschedasticità (-)
$\varepsilon_y$	=	tolleranza su $y$
$\varepsilon_\theta$	=	tolleranza su $\theta$
$\lambda_i$	=	autovalore $i$ -esimo (·)
$\mu_i$	=	media degli elementi delle colonne di $\mathbf{P}_E$ (-)
$\mu_{max}$	=	velocità massima di crescita (hr <sup>-1</sup> )
$\nu$	=	gradi di libertà (-)
$\sigma_{ij}^2$	=	varianza campionaria dell'uscita $i$ -esima all'istante $j$ -esimo (·)
$\tau$	=	durata dell'esperimento (hr)
$\tau$	=	fattore della velocità di adattamento (hr <sup>-1</sup> )
$\chi^2$	=	distribuzione chi quadro (-)



- $\psi(\cdot)$  = metrica di una matrice (-)  
 $\omega_i$  = deviazione standard della risposta  $i$ -esima (-)

### Matrici

- A** = matrice diagonale degli autovalori della varianza  $\mathbf{V}_\theta$  ( $N_\theta \times N_\theta$ )  
**C** = vettore della struttura della campagna sperimentale ( $\cdot$ )  
**h**( $\cdot$ ) = vettore selettore delle uscite del sistema ( $\cdot$ )  
**H** $_\theta$  = matrice di informazione di Fisher ( $N_\theta \times N_\theta$ )  
**H** $_\theta^0$  = matrice dell'informazione di Fisher disponibile ( $N_\theta \times N_\theta$ )  
**M** = modello nello spazio degli stati (*state-space model*) ( $\cdot$ )  
**P** = matrice degli autovettori di **H** $_\theta$  ( $N_\theta \times N_\theta$ )  
**P** $_E$  = matrice delle sensitività dinamiche ( $n_{sp} \cdot N_y \times N_\theta$ )  
**p** $_i$  = autovettore  $i$ -esimo ( $N_\theta \times 1$ )  
**Q** $_i$  = matrice delle sensitività dinamiche ( $n_{sp} \times N_\theta$ )  
**S** $_y(t)$  = matrice delle sensitività ( $N_y \times N_\theta$ )  
**T** = vettore della topologia della campagna sperimentale ( $\cdot$ )  
**t** $^{sp}$  = vettore dei tempi di campionamento ( $n_{sp} \times 1$ )  
**u**( $t$ ) = vettore delle variabili manipolabili dinamiche ( $N_u \times 1$ )  
**V** $_\theta$  = matrice di varianza-covarianza dei parametri ( $N_\theta \times N_\theta$ )  
**w** = vettore delle variabili manipolabili non dinamiche ( $N_w \times 1$ )  
**W** $_y$  = matrice di pesi ( $N_\theta \times N_\theta$ )  
**x**( $t$ ) = vettore delle variabili di stato ( $\cdot$ )  
**y**( $t$ ) = vettore delle uscite del sistema ( $N_y \times 1$ )  
**y** $_0$  = vettore delle condizioni iniziali delle variabili di stato ( $\cdot$ )  
 $\hat{\mathbf{y}}$  = traiettorie del modello che descrivono esattamente il sistema esaminato ( $N_y \times 1$ )  
 $\boldsymbol{\eta}$  = vettore degli errori delle misure ( $N_y \times 1$ )  
 $\boldsymbol{\theta}$  = vettore dei parametri di progetto ( $N_\theta \times 1$ )  
 $\boldsymbol{\theta}^*$  = vettore dei parametri di progetto ( $N_\theta \times 1$ )  
 $\hat{\boldsymbol{\theta}}$  = parametri del modello che descrivono esattamente il sistema esaminato ( $N_\theta \times 1$ )  
 $\hat{\boldsymbol{\theta}}$  = vettore dei parametri stimati ( $N_\theta \times 1$ )  
 $\boldsymbol{\kappa}$  = limite di confidenza ( $N_\theta \times 1$ )  
 $\boldsymbol{\Sigma}_y$  = matrice della varianza delle variabili misurate ( $N_\theta \times N_\theta$ )  
 $\boldsymbol{\varphi}$  = vettore dell'esperimento ( $\cdot$ )

### Acronimi

- CFU = unità formanti colonie (*colonies forming units*)  
CVP = varianza cumulata percentuale  
DAE = equazione differenziale algebrica (*differential algebraic equation*)

---

DoE	=	progettazione ottimale di esperimenti ( <i>optimal design of experiments</i> )
LS	=	minimi quadrati ( <i>least squares</i> )
MBD <sub>oE</sub>	=	progettazione ottimale di esperimenti basata sul modello ( <i>model based design of experiments</i> )
MINLP	=	<i>mixed-integer nonlinear programming</i>
ML	=	massima verosimiglianza ( <i>maximum likelihood</i> )
NCCLS	=	National National Committee for Clinical Laboratory Standards
PD	=	farmacodinamica ( <i>pharmacodynamics</i> )
PK	=	farmacocinetica ( <i>pharmacokinetics</i> )
SSWR	=	somma del quadrato degli scarti ( <i>sum of square weighted residuals</i> )
st.dev.	=	deviazione standard
WHO	=	Organizzazione mondiale della sanità ( <i>World Health Organization</i> )
WLS	=	minimi quadrati pesati ( <i>weighted least squares</i> )

# Riferimenti bibliografici

- Asprey, S. P. e S. Macchietto (2000). Statistical tools for optimal dynamic model building, *Computers Chem. Eng.*, **24**, 1261-1267.
- Atkinson, A. C. e B. Bogacka (2002). Compound and other optimum designs for systems of nonlinear differential equations arising in chemical kinetics. *Chemometr. Intell. Lab. Sys.*, **61**, 17-33.
- Atkinson, A. C. e A. N. Donev (1992). *Optimum experiment designs*. Oxford University Press, Oxford (U.K.).
- Audoly, S., L. D'Angiò, M. P. Saccomani e C. Cobelli (1998). Global Identifiability of Linear Compartmental Models-A Computer Algebra Algorithm. *IEEE T. Bio-Med. Eng.*, **45**, 36-47.
- Back, J. V. e K. J. Arnold (1977). *Parameter Estimation in Engineering and Science*. Wiley, New York (U.S.A.).
- Bard, Y. (1974). *Nonlinear parameter estimation*. Academic Press. New York (U.S.A.).
- Bellomo, N., N. K. Li e P. K. Maini (2008). On the Foundation of Cancer Modelling: Selected Topics, Speculations, and Perspectives. *Math. Models Methods Appl. Sci.*, **18**, 593-646.
- Bellu, G., M. P. Saccomani, S. Audoly e L. D'Angiò (2007). DAISY: A new software tool to test global identifiability of biological and physiological systems. *Comput. Meth. Prog. Bio.*, **88**, 52-61.
- Bhattaram, V. A., B. P. Booth, R. P. Ramchandani, B. N. Beasley, Y. Wang, V. Tandon, J. Z. Duan, R. K. Baweja, P. J. Marroum, R. S. Uppoor, N. A. Rahman, C. G. Sahajwalla, J. R. Powell, M. U. Mehta e J. V. S. Gobburu (2005). Impact of Pharmacometrics on Drug Approval and Labeling Decisions: A Survey of 42 New Drug Applications. *The AAPS J.*, **7**, 503-5011.
- Biegler, L. T., J. J. Damiano e G. E. Blau (1986). Nonlinear Parameter Estimation: a Case Study Comparison. *AIChE J.*, **32**, 29-45,
- Box, G. E. P. e K. B. Wilson (1951). On the experimental attainment of optimum condition. *J. Roy. Statist. Soc.*, **13**, 1-38.
- Carson, E. e C. Cobelli (2001). An introduction to modelling methodology. In: *Modelling methodology for physiology and medicine* (Academic Press), San Diego, CA (U.S.A.).
- Chen, B. H. e S. P. Asprey (2003). On the Design of Optimally Informative Dynamic Experiments for Model Discrimination in Multiresponse Nonlinear Situations. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **42**, 1379-1390
- Craig, W. A. (1998). Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Parameters: Rationale for Antibacterial Dosing of Mice and Men. *Clin. Infect. Dis.*, **26**, 1-12.

- Davidescu, F. P. e S. B. Jørgensen (2008). Structural parameter identifiability analysis for dynamic reaction networks. *Chem. Eng. Sci.*, **63**, 4754- 4762.
- Drlica, K. (2003). The mutant selection window and antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.*, **52**, 11-17.
- Drlica, K. e Zhao, X. (2007). Mutant Selection Window Hypothesis Updated. *Clin. Infect. Dis.*, **44**, 681-688.
- Espie, D. e S. Macchietto (1989). The Optimal Design of Dynamic Experiments. *AIChE J.*, **35**, 223-229.
- Fisher, R. A. (1935). *The design of the experiments*. Oliver & Boyd, Edinburgh (U.K.).
- Fluit, A. C., M. R. Visser e F. J. Schmitz (2001). Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews* , **14**, 836-871.
- Franceschini, G. e S. Macchietto (2008a). Novel anti-correlation criteria for model-based experiment design: algorithm and application. *AIChE J.*, **54**, 1009-1024.
- Franceschini, G. e S. Macchietto (2008b). Model-based Design of Experiments for Parameter Precision: State of the Art. *Chem. Eng. Sci.*, **63**, 4846-4872.
- Galvanin, F., S. Macchietto e F. Bezzo (2007). Model-based design of parallel experiments. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **46**, 871-882.
- Galvanin, F. (2010). *Optimal model-based design of experiment in dynamic systems: novel techniques and unconventional applications*. Ph. D. Thesis, DIPIC, Università di Padova.
- Gefen, O. e N. Q. Balaban (2009). The importance of being persistent: heterogeneity of bacterial populations under antibiotic stress. *FEMS Microbiol. Rev.*, **33**, 704-717.
- Goodman, L. S. e Gilman A. (2008). *Manual of Pharmacology and Therapeutics*. McGraw–Hill Book Co., New York (U.S.A.).
- Goutellea, S., M. Maurinc, F. Rougier, X. Barbaut, L. Bourguignona, M. Ducher e P. Maire (2008). The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modeling. *Fundam. Clin. Pharm.*, **22**, 633-648.
- Grégoire, N., S. Raherison, C. Grignon, E. Comets, M. Marliat, M. C. Ploy e W. Couet (2010). Semimechanistic Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Model with Adaptation Development for Time–Kill Experiments of Ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Ch.*, **54**, 2379-2384.
- Hill, A. V. (1910). The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J. Physiol.*, **40**, 4-7.
- Hooker, A. C., M. Foracchia, M. G. Dodds e P. Vicini (2003). An evaluation of population D-optimal design via pharmacokinetic simulation. *Ann. Biomed. Eng.*, **31**, 98-111.
- Jonsson, E. N. e L. B. Sheiner (2002). More efficient clinical trials through use of scientific model–based statistical tests. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **72**, 603-614.

- Jumbe, N., A. Louie, R. Leary, W. Liu, M. R. Deziel, V. H. Tam, R. Bachhawat, C. Freeman, J. B. Kahn, K. Bush, M. N. Dudley, M. H. Miller e G. L. Drusano (2003). Application of a mathematical model to prevent in vivo amplification of antibiotic-resistant bacterial populations during therapy. *J. Clin. Invest.*, **112**, 275-285.
- Kussel, E., R. Kishony, N. Q. Balaban e S. Leibler (2005). Bacterial persistence: a model of survival in changing environments. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Genetics*, **169**, 1807-1814.
- Lalonde, R. L., K. G. Kowalski, M. M. Hutmacher, W. Ewy, D. J. Nichols, P. A. Milligan, B.W. Corrigan, P. A. Lockwood, S. A. Marshall, L. J. Benincosa, T. G. Tensfeldt, K. Parivar, M. Amantea, P. Glue, H. Koideand e R. Miller (2007). Model-based drug development. *Clin. Pharm. Ther.*, **82**, 21-32.
- Lanciotti, E. (1993). *Elementi di Microbiologia Clinica*. Casa Editrice Ambrosiana, Milano.
- Leary, R., R. Jelliffe, Schumitzky e M. Van Guilder (2001). An adaptive grid non-parametric approach to pharmacokinetic and dynamic (PK/PD) population models. In: 14<sup>th</sup> IEEE Symposium on computer-Based Medical Systems, Bethesda, MD (U.S.A.).
- Lipsitch, M. e B. R. Levin (1997). The population dynamics of antimicrobial chemotherapy. *Antimicrob. Agents Chemoter.*, **41**, 363-373.
- Saccomani, M. P., S. Audoly e L. D'Angiò (2003). Parameter identifiability of nonlinear systems: the role of initial conditions. *Automatica*, **39**, 619-632.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (2003). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically—Sixth Edition M7–A6 NCCLS*, Villanova, PA (U.S.A.).
- Pohjanpalo, H. (1978). System Identifiability Based on the Power Series Expansion of the Solution. *Math. BioSci.*, **41**, 21-33
- Rescigno, A. (2009). Compartmental analysis and its manifold applications to pharmacokinetics. *AAPS PharmaSci*, **12**, 61-72
- Rescigno, A. (2004). On the use of pharmacokinetic models. *Phys. Med. Biol.*, **49**, 4657-4676.
- Shaw, B. M. (1999). *Statistical issue in kinetic modelling of gas-phase ethylene copolymerisation*. Ph.D. Thesis, Queen's University, Canada.
- Tam, V. H., A. N. Schilling e M. Nikolaou (2005a). Modelling time-kill studies to discern the pharmacodynamics of meropenem. *J. Antimicrob. Chemother.*, **55**, 699-706.
- Tam, V. H., A. Louie, M. R. Deziel, W. Liu, R. Leary e G. L. Drusano (2005b). Bacterial–Population Responses to Drug– Selective Pressure: Examination of Garenoxacin's Effect on *Pseudomonas aeruginosa*. *JID*, **192**, 420-428.
- Walter, E. e L. Pronzato (1996). On the identifiability and distinguishability of nonlinear parametric models. *Math. Comput. Simulat.*, **42**, 125-134.
- World Health Organization Department of Communicable Disease Surveillance and Response (2001). *WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance*.

- Zakovic, S., B. Rustema e S.P. Asprey (2003). A parallel algorithm for semi-infinite programming. *Comput. Stat. Dat. An.*, **44**, 377-390.
- Zhang, L., V. Sinha, S. T. Forgue, S. Callies, L. Ni, R. Peck e S. R. B. Allerheiligen (2006). Model-Based Drug Development: The Road to Quantitative Pharmacology. *J. Pharmacokinet. Phar.*, **33**, 369-393.
- Zhang, Y. e T. F. Edgar (2008). PCA Combined Model-Based Design of Experiments (DOE) Criteria for Differential and Algebraic System Parameter Estimation. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **47**, 7772-7783.

# Ringraziamenti

Ringrazio le persone che hanno contribuito direttamente allo svolgimento di questa Tesi: il Dr. Federico Galvanin, il Prof. Fabrizio Bezzo e il Prof. Massimiliano Barolo.

Ringrazio le altre persone che ho incontrato al CAPE-Lab durante il periodo di tesi.

Ringrazio la mia famiglia: i miei genitori e i miei fratelli.