Seminario SINAL, novembre 2000

IL CONTROLLO E L'ESPRESSIONE DEI RISULTATI DELLE PROVE MICROBIOLOGICHE

N. Bottazzini (UNICHIM)

1. Premessa

La programmazione delle prove e il controllo dei risultati in campo microbiologico si ritrovano già in studi dei primi decenni del novecento, soprattutto per opera di R. Fisher.
I modelli di distribuzione di probabilità comunemente adottati per le variabili casuali discrete scelte per rappresentare tali risultati sono due : la distribuzione di Poisson e la distribuzione binomiale.
Il modello cosiddetto "normale" o di Gauss viene associato a variabili casuali continue e costituisce il limite a cui tendono gli altri due modelli man mano che il valore numerico della variabile casuale discreta associata ai risultati delle prove aumenta. Per valori sufficientemente alti (per esempio, maggiori di 15 - 20), come si verificano spesso nei conteggi microbiologici, si possono applicare ai risultati i coefficienti di copertura desumibili dal modello "normale" per ottenere l'intervallo di confidenza a diversi livelli di probabilità.

2. I parametri delle distribuzioni di probabilità considerate

Le distribuzioni di probabilità sono definite da funzioni della variabile casuale che dipendono generalmente da due parametri : uno, μ, che individua il centro, o valore atteso, e l'altro, σ o scarto tipo, che costituisce un indice dell'ampiezza.

2.1 I parametri della distribuzione "normale"

Nel caso della distribuzione "normale", si procede alle stime dei parametri μ e σ con le seguenti espressioni:

Stima di μ : $$\bar{x} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} x_i \qquad (1)$$

Stima di σ : $$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \qquad (2)$$

Stima di σ^2: $$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}{n-1} \qquad (3)$$

Il quadrato della stima di σ, s^2, è la stima della varianza. Quest'ultima costituisce un modo equivalente e spesso utile di esprimere quella stessa stima.

2.2 I parametri della distribuzione di Poisson

La distribuzione di Poisson, da questo punto di vista, rappresenta un caso particolare molto interessante. Infatti, la funzione della variabile casuale dipende da un solo parametro. Così, se $\bar{c}$ (per esempio un valore di conteggio) è una stima del centro della distribuzione, cioè del valore atteso μ, tale che :

$$\text{Stima di } \mu = \bar{c} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} c_i \qquad (4)$$

allora l'indice della sua ampiezza, cioè lo scarto tipo, σ, sarà stimato da :

$$\text{Stima di } \sigma = \sqrt{\bar{c}} \qquad (5)$$

Ne deriva subito che la varianza σ^2 sarà stimata da:

$$\text{Stima di } \sigma^2 = \bar{c} \qquad (6)$$

Come si vede, il valore del parametro c è una stima sia del centro sia dell'indice di ampiezza della distribuzione di Poisson.
Nel seguito, si potrà constatare come questa caratteristica permette di esprimere vantaggiosamente i criteri di valutazione dei risultati delle prove microbiologiche che sono modellati su questa distribuzione.

2.3 I parametri della distribuzione binomiale

I parametri della distribuzione binomiale dipendono dal numero n di prove eseguite per ciascuna serie di prove e dalla frequenza $q = b/n$ delle prove b che sviluppano la caratteristica di interesse (ad esempio, presenza/assenza di un dato microrganismo). La stima del centro della distribuzione, o valore atteso μ, è data da:

$$\text{Stima di } \mu = nq \qquad (7)$$

e la stima dell'indice σ dell'ampiezza o scarto tipo è data da :

$$\text{Stima di } \sigma = \sqrt{nq(1-q)} \qquad (8)$$

Ne deriva che la varianza, σ^2, è stimata da:

$$\text{Stima di } \sigma^2 = nq(1-q) \qquad (9)$$

Nel caso frequente in cui q non è noto e il laboratorio ha eseguito m serie di prove composta ciascuna dallo stesso numero n prove, la stima di μ è data dalla espressione:

$$\text{Stima di } \mu: \ \bar{b} = \frac{1}{m}\sum_{i=1}^{m} b_i \tag{7a}$$

dove :

b_i è il numero delle prove della serie i che hanno sviluppato la caratteristica di interesse

Le stime dell'indice dell'ampiezza, scarto tipo, σ, o varianza, σ^2, sono allora date da:

$$\text{Stima di } \sigma = \sqrt{\bar{b}\left(1-\bar{b}/n\right)} \tag{8a}$$

$$\text{Stima di } \sigma^2 = \bar{b}\left(1-\bar{b}/n\right) \tag{9a}$$

dove $\bar{b}$ ha il significato indicato nella formula (7a) ed n è l'uguale numero di prove effettuate in ciascuna delle m serie di prove.

3. Le variabili razionalizzate e l'approssimazione delle altre due distribuzioni a quella "normale"

La trattazione delle caratteristiche di una distribuzione richiede di astrarre dalla particolare variabile casuale in gioco e considerare invece la corrispondente variabile razionalizzata. Nel caso di una distribuzione "normale", di cui sia noto il centro μ e lo scarto tipo σ, l'espressione che permette di effettuare questo passaggio è la seguente :

$$K_p = \frac{|x_i - \mu|}{\sigma} \tag{10}$$

dove :
x_i è il risultato della prova i;
K_p è la variabile razionalizzata con centro 0 e scarto tipo 1. I valori di questa variabile, per diversi livelli di probabilità p, sono riportati in tab. 1.

Se μ e σ devono essere stimati dall'insieme dei risultati, allora l'espressione (10) assume la forma:

$$K_p = \frac{|x_i - \bar{x}|}{s} \tag{11}$$

dove :

$\bar{x}$ ed s sono le stime di μ e σ ricavate dalle formule (1) e (2).

Nel caso che la variabile, casuale e discreta, segua la distribuzione di Poisson, l'espressione (10) assume la forma :

$$K_p = \frac{|c_i - \bar{c}|}{\sqrt{\bar{c}}} \qquad (12)$$

dove :

c_i è il valore del conteggio della prova i e $\bar{c}$, la media dei conteggi, è la stima di μ e σ^2 (vedere la (4) e la (6)).
K_p assume valori in funzione del livello di probabilità p prescelto e tende verso i corrispondenti valori della variabile "normale" (vedere tab. 1) sovrapponendosi ad essi per valori di $\bar{c}$ abbastanza alti ($\bar{c} \geq 15$)

Se la variabile casuale e discreta, segue una distribuzione binomiale, l'espressione (10) assume la forma :

$$K_p = \frac{|b_i - nq|}{\sqrt{nq(1-q)}} \qquad (13)$$

dove:

b_i è il numero delle prove della serie i in cui si sviluppa la caratteristica di interesse, n è il numero delle prove di ciascuna serie e q è la frequenza ipotizzata.
K_p assume valori in funzione del livello di probabilità p prescelto e tende verso i corrispondenti valori della variabile "normale" (vedere tab. 1) sovrapponendosi ad essi per valori di nq abbastanza alti ($nq \geq 5$).

Nel caso frequente in cui q non è noto, l'espressione (10) assume la forma:

$$K_p = \frac{|b_i - \bar{b}|}{\sqrt{\bar{b}(1 - \bar{b}/n)}} \qquad (13a)$$

dove:
b_i e $\bar{b}$ hanno, rispettivamente, il significato indicato in calce alla formula (7a) e quello definito dalla stessa (7a); il significato di K_p è stato chiarito in calce alla formula (13).

4. Criteri di controllo dei risultati

Il laboratorio, dopo aver eseguito un certo numero di prove secondo un dato metodo, deve decidere secondo quale modello di distribuzione devono essere trattati i risultati ottenuti. Questo compito è di solito facilitato dal fatto che nella letteratura dello specifico campo scientifico si trovano ampie indicazioni sul modello da adottare. Ad esempio, per risultati ottenuti da conteggi su capsule di Petri viene universalmente consigliato di utilizzare la distribuzione di Poisson, mentre risultati ricavati da metodi che portano al valore numerico più probabile (MPN) vengono trattate con distribuzioni che si basano su quella binomiale.

Scelto il modello di distribuzione (o meglio, adottato quello usualmente indicato dalla letteratura), il laboratorio, prima di procedere all'utilizzo dei risultati, deve verificare che essi siano realmente congruenti con tale modello.
A questo scopo, è necessario impiegare uno dei criteri di decisione noti nella letteratura statistica come "Goodness of fit test" o "Verifica del grado di accordo con il modello".
I criteri più usati per giudicare la bontà di questo accordo si basano sulla distribuzione della variabile $\chi^2_{p,\nu}$. La tabella 2 ne riporta i valori per diversi livelli di probabilità *p* e per numerosi gradi di libertà ν.

Per utilizzare la distribuzione di questa variabile, è necessario costruire dai dati sperimentali da controllare una espressione che sia una stima della variabile stessa. La loro accettabilità è data semplicemente dal risultato del confronto tra il valore di tale espressione e quello della variabile, tabulato in corrispondenza del livello di probabilità *p* prefissato e dei gradi di libertà ν definiti in base al numero dei dati sperimentali.
Il modo, suggerito dalla statistica, per ottenere l'espressione suddetta è il seguente :

$$\chi^2_{sp} = \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \mu)^2}{\sigma^2} \le \chi^2_{p,\nu} \qquad (14)$$

dove:

χ^2_{sp} è il valore sperimentale della variabile, χ^2; al numeratore, la sommatoria è data dai quadrati degli scarti dei risultati rispetto al valore atteso, μ; al denominatore, σ^2 è la varianza della distribuzione.

4.1 Controllo dei risultati distribuiti "normalmente"

Nel caso che i risultati siano modellati secondo la distribuzione "normale", l'espressione (14) diventa :

$$\chi^2_{sp} = \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}{\sigma^2} \le \chi^2_{p,\nu} \qquad (15)$$

dove:

$\bar{x}$ è la stima di μ, ricavata dai risultati stessi con la formula (1); σ^2 è il valore della varianza per il metodo di prova in esame usato nelle condizioni e sul tipo di campioni previsti dal metodo stesso e che il laboratorio intende verificare.
Il livello di probabilità *p* considerato è solitamente pari a 0,95, mentre il numero dei gradi di libertà, ν, è pari al numero *n* degli addendi della sommatoria che figura al numeratore meno 1.

Se il criterio espresso dalla formula (15) è soddisfatto, i risultati in esame sono accettabili.

Un caso particolare della espressione (15), che dà origine a un criterio molto usato nella pratica, si ha quando n = 2. Infatti, se x_1 e x_2 sono i due risultati ottenuti, sostituendo nella (15), si ha:

$$\chi^2_{sp} = \frac{(x_1 - x_2)^2}{2\sigma^2} \leq \chi_{p,\nu=1} \tag{15a}$$

Ossia:

$$|x_1 - x_2| \leq \sigma\sqrt{2\chi^2_{p,\nu=1}}$$

Poiché si può dimostrare (confrontare, per verifica, i valori di K_p in tab. 1 con le radici quadrate dei corrispondenti valori di $\chi^2_{p,\nu=1}$ in tab. 2) che:

$$K_p = \sqrt{\chi^2_{p,\nu=1}} \tag{15b}$$

allora si può scrivere l'espressione seguente:

$$|x_1 - x_2| \leq k_p\sigma\sqrt{2} \tag{15c}$$

Oppure:

$$\frac{|x_1 - x_2|}{\sigma\sqrt{2}} \leq k_p \tag{15d}$$

La formula (15c) rappresenta il criterio di accettabilità delle prove in doppio per risultati che sono modellati sulla distribuzione "normale". Infatti, il suo secondo membro è pari al limite di ripetibilità per le stesse prove in doppio.

4.2 Controllo dei risultati che seguono la distribuzione di Poisson

Se i risultati sono, ad esempio, conteggi di UFC (unità formanti colonie) ottenute su capsule di Petri per i quali il modello di distribuzione da adottare è quello di Poisson, allora l'espressione (14), tenendo conto della (4) e della (6), diventa:

$$\chi^2_{sp} = \frac{\sum_{i=1}^{n}(c_i - \bar{c})^2}{\bar{c}} \leq \chi^2_{p,\nu} \tag{16}$$

dove:
c_i è il conteggio della prova i e $\bar{c}$ è la media dei conteggi delle n prove.
Il livello di probabilità p è di solito pari a 0,95 e $\nu = n - 1$

Se il criterio così espresso è soddisfatto, i conteggi sono accettabili.

E' importante notare la differenza tra la (15) e la (16). Per la costruzione di quest'ultima non è necessario tener conto di una varianza nota a priori e posta come obiettivo da verificare. Infatti, la media dei conteggi, $\bar{c}$, è essa stessa una stima della varianza (vedere l'espressione (6)). Ciò rappresenta un grande vantaggio nella valutazione dei risultati di queste prove.
Analogamente a quanto descritto per l'espressione (15), è possibile considerare anche per la (16) il caso particolare n = 2; ossia, continuando con l'esempio, considerare una prova condotta in parallelo su due capsule di Petri. Se i valori dei conteggi sono stati c_1 e c_2, l'espressione (16) diventa:

$$\chi^2_{sp} = \frac{(c_1 - c_2)^2}{2\bar{c}} \leq \chi^2_{p,\nu=1}$$

Ossia:

$$\frac{(c_1 - c_2)^2}{c_1 + c_2} \leq \chi^2_{p,\nu=1} \qquad (16a)$$

Da cui (vedere la formula (15b)):

$$\frac{|c_1 - c_2|}{\sqrt{c_1 + c_2}} \leq k_p \qquad (16b)$$

Oppure:

$$|c_1 - c_2| \leq k_p \sqrt{c_1 + c_2} \qquad (16c)$$

Le espressioni (16a), (16b) e (16c) rappresentano lo stesso criterio di accettabilità molto semplice da verificare per questo tipo di prove e valido quando $\bar{c} \geq 15$ (tener conto del paragrafo 3).

E' anche interessante notare l'analogia fra le formule (15d) e (16b). Infatti, si distinguono solo per il diverso modo di calcolare lo scarto tipo della differenza indicata al numeratore.

4.3 Controllo dei risultati che seguono la distribuzione binomiale

Poiché spesso non è nota la frequenza q, l'accettabilità dei risultati può essere controllata con il criterio espresso dalla formula che si ottiene sostituendo nella (14) le stime di μ e σ^2 date dalla (7a) e dalla (9a), cioè:

$$\chi^2_{sp} = \frac{\sum_{i=1}^{m} (b_i - \bar{b})^2}{\bar{b}(1 - \bar{b}/n)} \leq \chi^2_{p,\nu} \qquad (17)$$

dove m, n, b_i, e $\bar{b}$ hanno il significato indicato nelle formule (7a), (8a), (9a):
Il livello di probabilità p è di solito pari a 0,95 e $\nu = m - 1$.

4.4 Controllo di risultati ottenuti come combinazione di valori riscontrati a diversi livelli di diluizione del campione

Nel campo delle analisi microbiologiche spesso non è ipotizzabile l'ordine di grandezza numerico del risultato. Si preferisce allora eseguire la prova a diversi livelli di diluizione. Per le prove che portano ai conteggi sulle capsule di Petri, il criterio di omogeneità dei risultati ai diversi livelli viene espresso dalla formula:

$$\chi^2_{sp} = 2 \times \left[\sum_{i=1}^{m} \left(c_i \ln \frac{c_i}{R_i} \right) - \left(\sum_{i=1}^{m} c_i \right) \ln \left(\frac{\sum_{i=1}^{m} c_i}{\sum_{i=1}^{m} R_i} \right) \right] \leq \chi^2_{p,\nu} \qquad (18)$$

dove:

ln è la funzione logaritmo naturale, m è il numero dei livelli di diluizione considerati,
c_i ed R_i sono, rispettivamente, il valore totale dei conteggi e il rapporto di diluizione al livello i.
Il valore della variabile $\chi^2_{p,\nu}$ si trova in tab. 2 per p, di solito pari a 0,95 e $\nu = m - 1$.

Nota: Nel documento ISO/TR 13843 pag. 31 è descritto un programma in BASIC per il calcolo di questa espressione.

Per le prove che portano alla individuazione del numero più probabile di microrganismi (MPN), il criterio per giudicare la omogeneità dei risultati fra i diversi livelli considerati viene espresso dalla seguente formula:

$$\chi^2_{sp} = 2 \times \left\{ \sum_{i=1}^{m} \left[b_i \ln \left(\frac{b_i}{n_i \left(1 - e^{-v_i d} \right)} \right) \right] + \sum_{i=1}^{m} \left[(n_i - b_i) \ln \left(\frac{n_i - b_i}{n_i e^{-v_i d}} \right) \right] \right\} \leq \chi^2_{p,\nu} \qquad (19)$$

dove:

ln, m, p, ν, hanno lo stesso significato indicato in calce alla (18), d è il valore numerico più probabile (MPN) del risultato finale; n_i, b_i e v_i sono, nella diluizione i, rispettivamente, il numero delle prove eseguite, il numero delle prove con esito positivo e il volume del campione impiegato.

Nota : M.A. HURLEY and M.E. Roscoe, in Journal of Applied Bacteriology (1983), 55, 159 - 164, hanno descritto un programma in BASIC per il calcolo di questa espressione e di quelle delle formule (25) e (26).

5. Espressione dei risultati

Dopo aver controllato che i valori numerici ottenuti dalle prove siano accettabili secondo un criterio scelto opportunamente fra quelli espressi dalle formule del paragrafo 4, si passa ad esprimere i risultati definitivi.
A tale scopo, si possono utilizzare le espressioni (11), (12) e (13a), tenendo conto che non si è interessati ad esprimere un singolo risultato ma a sintetizzare l'insieme dei risultati ottenuti attraverso l'individuazione di un intervallo di valori in cui ragionevolmente si colloca il risultato effettivo. Per questo è necessario impiegare la media dei risultati e lo scarto tipo che ad essa compete.
Tenendo conto che, se σ rappresenta lo scarto tipo di una serie di n risultati, allora lo scarto tipo della corrispondente media è data da:

$$\sigma_{media} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \qquad (20)$$

si possono scrivere le espressioni dei risultati riportate nel seguito.

Nella ipotesi che il modello da seguire sia la distribuzione "normale", si utilizza la (11) che, considerando la (20), diventa (per n abbastanza grande, ad es. $n \geq 15$:

$$K_p = \frac{|x - \bar{x}|}{s / \sqrt{n}}$$

Da cui si ottiene il risultato x così espresso:

$$x = \bar{x} \pm K_p \left(s / \sqrt{n} \right) \qquad (21)$$

Se il modello da seguire è la distribuzione di Poisson, allora si impiega la (12) che, tenendo conto della (20), diventa (se $\bar{c} \geq 15$):

$$K_p = \frac{|c - \bar{c}|}{\sqrt{\bar{c} / n}}$$

Da cui si ricava il risultato c, così espresso:

$$c = \bar{c} \pm k_p \left(\sqrt{\bar{c} / n} \right) \qquad (22)$$

Quando il modello scelto è la distribuzione binomiale, si utilizza la (13a) che, considerando la (20), diventa:

$$K_p = \frac{|b - \bar{b}|}{\sqrt{\bar{b}\left(1 - \bar{b} / n\right) / n}}$$

Da cui si ricava il risultato b espresso nel modo seguente:

$$b = \bar{b} \pm K_p \sqrt{\bar{b}\left(1 - \bar{b} / n\right) / n} \qquad (23)$$

Nota: Il valore di K_p generalmente utilizzato nelle formule (21), (22), (23) è quello corrispondente a $p = 0,95$. Dalla tab. 1 si ricava che per tale valore di p, $K_p = 1,96$.

Le espressioni dei risultati ottenuti considerando livelli diversi di diluizione sono ovviamente più complesse. Di seguito saranno riportate due formule.

La prima riguarda i risultati ricavati dalla tecnica che usa come rivelatore le capsule di Petri e considera solo due diluizioni contigue. L'espressione è la seguente:

$$c = \left(\sum_{i=1}^{n} c_i + \sum_{j=1}^{m} c_j + 1{,}92 \pm K_p \sqrt{\sum_{i=1}^{n} c_i + \sum^{m} c_j} \right) \times H \qquad (24)$$

dove:

c è il risultato finale, espresso in UFC (unità formanti colonie) per unità di massa o volume del campione.

$\sum_{i=1}^{n} c_i$ è la somma dei conteggi eseguiti sulle n capsule sviluppate sulla prima diluizione considerata;

$\sum_{j=1}^{m} c_j$ è la somma dei conteggi eseguiti sulle m capsule sviluppate sulla seconda diluizione considerata;

1,92 è un valore aggiunto per tener conto della non perfetta approssimazione della distribuzione di Poisson con quella "normale"; naturalmente, questo valore diventa trascurabile al crescere delle due sommatorie;

k_p viene impiegato di solito per p = 0,95 e vale perciò 1,96 (vedere tab. 1);

$H = \frac{1}{\text{v}(n + hm)D}$ essendo v il volume di inoculo applicato a ciascuna capsula, h il rapporto fra i due livelli di diluizione (ad esempio 0,1), D è il fattore di diluizione corrispondente alla prima diluizione considerata.

La seconda formula riguarda i risultati ricavati da prove eseguite con la tecnica che porta al numero più probabile (MPN) di microrganismi presenti nel volume unitario di campione, cioè la densità più probabile d. Dalla formula è impossibile esplicitare direttamente d in funzione delle altre variabili. Infatti, si ha:

$$\sum_{i=1}^{m} \frac{\text{v}_i b_i}{1 - e^{-\text{v}_i d}} = \sum_{i=1}^{m} \text{v}_i n_i \qquad (25)$$

dove:

m è il numero dei livelli di diluizione;
n_i è il numero delle prove condotte al livello i;
b_i è il numero delle prove con esito positivo ottenute al livello i;
v_i è il volume di campione tal quale aggiunto in ciascuna prova del livello i.

Per la espressione del risultato finale si preferisce passare attraverso ln$d$ (logaritmo naturale di d) poiché la sua distribuzione è più vicina a quella "normale". Perciò, come indice dell'ampiezza di distribuzione di ln$d$ si utilizza $\sigma_{\ln d}$ la cui stima è data dall'espressione:

$$s_{\ln d} = \frac{1}{d\sqrt{\sum_{i=1}^{m} \frac{v_i^2 n_i}{e^{v_i d} - 1}}} \tag{26}$$

dove d, v_i, n_i, m hanno lo stesso significato indicato in calce alla (25) ed e è la base dei logaritmi naturali.
Per il calcolo di d e di ln$d$ secondo le (25) e (26) si veda la nota in calce alla formula(19).
Se campioni liquidi (ad es. acque) vengono esaminate senza diluizioni o con un'unica diluizione, allora d e $s_{\ln d}$ possono essere calcolati con le seguenti formule, più semplici delle (25) e (26):

$$d = -\frac{1}{v}\ln\left(\frac{n-b}{n}\right) \tag{27}$$

$$s_{\ln d} = \frac{1}{dv}\sqrt{\frac{b}{n(n-b)}} \tag{28}$$

dove n è il numero di prove effettuate, ciascuna sul volume v di campione e b è il numero di prove con esito positivo.

Dai valori di ln$d$ e $s_{\ln d}$, il risultato finale viene espresso nel seguente modo:

$$\ln(MPN) = \ln d \pm k_p s_{\ln d} \tag{29}$$

dove k_p = 1,96 per p = 0,95 (vedere tab. 1).

Dai logaritmi si risale poi ai valori numerici corrispondenti.

Bibliografia

1. Ian F. Blake: An Introduction to Applied Probability. John Wiley and Sons.

2. ISO 7218 (2nd edition, 1996): Microbiology of food and animal feeding stuffs - General rules for microbiological examinations.

3. ISO/TR 13843 (first edition 2000): Water quality - Guidance on validation of microbiological methods.

4. M. A. Hurley and M. E. Roscoe: Automated statistical analysis of microbial enumeration by dilution series, Journal of Applied Bacteriology (1983) **55**, 159-164

ESEMPI

Esempio 1. Controllo ed espressione di risultati modellati sulla distribuzione normale.

Sono stati ottenuti nelle stesse condizioni i seguenti risultati:

71 - 75 - 72 - 77 - 80 - 75 - 76 - 74 - 78 - 72 - 70 - 76 - 75 - 74 - 73

Lo scarto tipo, già noto in precedenza per queste prove è: σ = 2,42. Sono accettabili i risultati?

Dai valori dei risultati si calcolano le espressioni:

$$\bar{x} = 74{,}53 \text{ e } \sum_{i=1}^{15}(x_i - \bar{x})^2 = 101{,}73$$

Applicando il criterio espresso dalla (15) e osservando in tab. 2 che: $\chi^2_{p=0,95;\nu=14} = 23{,}68$, si può scrivere:

$$\chi^2_{sp} = \frac{101{,}73}{(2{,}42)^2} = 17{,}37 \langle 23{,}68 = \chi^2_{p=0,95;\nu=14}$$

I risultati sono accettabili.
Il risultato finale viene espresso secondo la formula (21) osservando che in tab. 1 k_p = 1,96 per p = 0,95. Si ha:

$$x = 74{,}53 \pm 1{,}96\left(2{,}42/\sqrt{15}\right) = 74{,}53 \pm 0{,}62 \approx 74{,}5 \pm 0{,}6$$

Esempi 2. Controllo ed espressione di risultati modellati sulla distribuzione di Poisson

Esempio 2.1. Sono state inoculate in parallelo 6 capsule di Petri. I valori dei conteggi sono stati i seguenti:

90 - 105 - 82 - 110 - 96 - 117

Sono accettabili questi conteggi?
Dai valori dei conteggi si calcolano:

$$\bar{c} = 100 \quad \text{e} \quad \sum_{i=1}^{6}(c_i - \bar{c})^2 = 854$$

Applicando il criterio espresso dalla formula (16) e osservando che in tab. 2, $\chi_{p=0,95;\nu=5} = 11{,}07$ si può scrivere:

$$\chi^2_{sp} = \frac{854}{100} = 8{,}54 < 11{,}07 = \chi^2_{p=0,95;\nu=5}$$

I conteggi sono accettabili.
Il risultato finale, espresso secondo la formula (22), è il seguente:

$$c = 100 \pm 1{,}96\sqrt{100/6} = 100 \pm 8$$

Esempio 2.2 Sono state inoculate in parallelo due capsule di Petri. I valori dei conteggi effettuati sono stati i seguenti: 84 e 110. Sono essi accettabili?

Si applica direttamente il criterio (16a) o il criterio (16b). Nel primo caso, osservando che in tab. 2 $\chi_{p=0,95;\nu=1} = 3{,}84$, si può scrivere :

$$\chi^2_{sp} = \frac{(84-110)^2}{84+110} = \frac{676}{194} = 3{,}48 < 3{,}84 = \chi^2_{p=0,95;\nu=1}$$

Nel secondo caso, osservando che in tab. 1 k_p = 1,96 per p = 0,95, si ha:

$$\frac{|84-110|}{\sqrt{84+110}} = 1{,}87 < 1{,}96 = K_{p=0,95}$$

Con entrambi i criteri (che sono equivalenti) si conclude che i due conteggi sono accettabili. Il risultato finale, espresso secondo la formula (22), è il seguente:

$$c = \frac{84+110}{2} \pm 1{,}96\sqrt{\left(\frac{84+110}{2}\right)/2} = 97 \pm 13{,}6 \approx 97 \pm 14$$

Esempio 3 Controllo ed espressione dei risultati modellati sulla distribuzione binomiale

Un test microbiologico di presenza/assenza viene eseguito 10 volte e la serie reiterata 5 volte. Il numero delle prove con esito positivo per le 5 serie sono state: 3 - 5 - 2 - 6 - 1. Sono compatibili fra loro questi valori?

Il valore medio è: $\bar{b} = 3{,}4$ n =10 m = 5. Quindi: $\bar{b}/n = 0{,}34$ e si calcola l'espressione: $\sum_{i=1}^{5}(b_i - \bar{b})^2 = 17{,}2$ Applicando il criterio espresso dalla (17) e osservando che in tab. 2 $\chi^2_{p=0,95;\nu=4} = 9{,}49$, si ottiene:

$$\chi^2_{sp} = \frac{17{,}2}{3{,}4(1-0{,}34)} = 7{,}66 < 9{,}49 = \chi^2_{p=0,95;\nu=4}$$

I valori sono accettabili e il risultato finale, espresso secondo la (23), è il seguente:

$$b = 3{,}4 \pm 1{,}96\sqrt{3{,}4(1-0{,}34)/10} = 3{,}4 \pm 0{,}9 \approx 3 \pm 1$$

Esempio 4. Controllo ed espressione dei risultati ottenuti come combinazione di valori riscontrati a diversi livelli di diluizione del campione

Esempio 4.1. La prova è stata eseguita inoculando 1 ml di campione (v = 1) in ciascuna capsula di Petri ($\Phi = 9\,cm$), due in parallelo per ogni livello di diluizione (rapporto di diluizione 10 fra un livello e il successivo). Sono state selezionate la seconda e la terza diluizione (D = 10^{-2}), poiché solo a questi due livelli i conteggi non erano esterni all'intervallo 15 < c < 300 consigliato (vedere bibliografia 2) con questa tecnica di rivelazione. I valori dei conteggi ottenuti sono:

2° diluizione	230	270
3° diluizione	16	25

Sono fra loro compatibili e quindi accettabili questi conteggi?

Si devono eseguire due verifiche.

a) Bisogna verificare se sono compatibili i valori dei conteggi allo stesso livello di diluizione. Ciò si controlla facilmente applicando ad es. il criterio di formula (16a) e osservando che in tab. 2 $\chi^2_{p=0,95;\nu=1} = 3{,}84$. Si ottiene:

$$\chi^2_{sp} = \frac{(230-270)^2}{230+270} = 3{,}20 < 3{,}84 = \chi^2_{p=0,95;\nu=1}$$

$$\chi^2_{sp} = \frac{(16-25)^2}{16+25} = 1{,}98 < 3{,}84 = \chi^2_{p=0,95;\nu=1}$$

I conteggi allo stesso livello di diluizione sono fra loro compatibili.

b) Bisogna verificare la compatibilità dei conteggi ai due diversi livelli di diluizione considerati. Ciò si controlla applicando il criterio espresso dalla formula (18) in cui m = 2 e osservando che in tab. 2 $\chi^2_{p=0,95;\nu=1} = 3{,}84$. Si ricava così:

$$\chi^2_{sp} = 2\times\left[\left(500\ln\frac{500}{10} + 41\ln\frac{41}{1}\right) - (500+41)\ln\frac{500+41}{10+1}\right] = 1{,}58 \langle 3{,}84 = \chi^2_{p=0,95;\nu=1}$$

I conteggi fra i diversi livelli di diluizione sono fra loro compatibili e quindi sono accettabili.

Si può, allora, esprimere il risultato finale con la formula (24) in cui n = m = 2 osservando che in tab. 1 k_p =1,96 per p = 0,95. Si ha:

$$c = \frac{(230+270)+(16+25)+1{,}92 \pm 1{,}96\sqrt{(230+270)+(16+25)}}{1(2+0{,}1\times 2)\times 10^{-2}}$$

$$c = 24678 \pm 2072 \approx (2{,}5 \pm 0{,}2)\times 10^4$$

Esempio 4.2 E' stata condotta una prova per stabilire il numero più probabile (MPN) di microrganismi in un campione effettuando 7 diverse serie di diluizioni. Il dettaglio della prova è di seguito riportato

Livelli,m	1	2	3	4	5	6	7
vol. camp. (v_i, ml)	0,25	0,025	0,005	0,0005	0,001	0,0001	0,00001
n_i, prove per liv.	10	10	8	10	12	12	12
b_i, prove positive per liv.	10	10	8	5	7	2	0

Sono omogenei tra loro i risultati riportati nell'ultima riga?

Applicando il criterio di accettabilità espresso dalla formula (19) (per l'impiego pratico di questa formula vedere la nota in calce alla formula stessa) e osservando che in tab. 2 $\chi^2_{p=0,95;\nu=6} = 12{,}59$, si ottiene:

$$\chi^2_{sp} = 1{,}37 < 12{,}59 = \chi^2_{p=0,95;\nu=6}$$

Si può concludere che i risultati ai diversi livelli sono fra loro omogenei. Si passa perciò al calcolo del numero più probabile dei microrganismi per unità di volume di campione con la formula (25) (per l'impiego pratico di questa formula vedere nota sopra citata). Si ottiene:

$d = 1115{,}63$ da cui: $\ln d = 7{,}01717$

Lo scarto tipo di ln*d* si calcola applicando la formula (26) e si ottiene:

$$s_{\ln d} = 0{,}26929$$

Il risultato sotto forma logaritmica si esprime seguendo la (29) e osservando che in tab. 1 $k_p = 1{,}96$ per $p = 0{,}95$. Si ottiene così:

$$\ln(MPN) = 7{,}01717 \pm 1{,}96 \times 0{,}26929 = 7{,}01717 \pm 0{,}52781$$

Passando da logaritmi ai numeri, si ha:

$$658 < \text{MPN} < 1891 \quad \text{ossia: MPN} = (0{,}7 \div 1{,}9) \times 10^3$$

Esempio 5. Calcolo ed espressione dei risultati delle prove MPN eseguite ad un solo livello di diluizione

2 ml di acqua sono stati posti in ciascuno di di 50 pozzetti e fatti sviluppare opportunamente. 14 pozzetti si sono riscontrati positivi. Calcolare il valore di MPN.

Seguendo le formule (27), (28) e (29) e tenendo conto che in tab. 1 $k_p = 1{,}96$ per $p=0{,}95$ si ha:

$$d = -\frac{1}{2}\ln\left(\frac{50-14}{50}\right) = 0{,}164 \text{ microrganismi /ml e } \ln d = -1{,}80635$$

$$s_{\ln d} = \frac{1}{0{,}164 \times 2}\sqrt{\frac{14}{50(50-14)}} = 0{,}26846$$

$$\ln(MPN) = -1{,}80635 \pm 1{,}96 \times 0{,}26846 = -1{,}80635 \pm 0{,}52619$$

Passando dai logaritmi ai numeri e riferendo il risultato a un volume di 100 ml, si ha:

$$9{,}7 < \text{MPN} < 27{,}8 \text{ e arrotondando: } 10 < \text{MPN} < 28$$

Tabella 1 - Distribuzione della probabilità, p, per la variabile normale razionalizzata, k_p

p	K_p
0,500	0,674
0,600	0,842
0,700	1,036
0,800	1,282
0,900	1,645
0,950	1,960
0,9900	2,576
0,99730	3,000

Tabella 2 - Distribuzione della probabilità, p, per la variabile χ^2

ν	$\chi^2{}_{p=0,95}$	$\chi^2{}_{p=0,99}$
1	3,841	6,635
2	5,991	9,210
3	7,815	11,345
4	9,488	13,277
5	11,071	15,086
6	12,592	16,812
7	14,067	18,475
8	15,507	20,090
9	16,919	21,666
10	18,307	23,209
11	19,675	24,725
12	21,026	26,217
13	22,362	27,688
14	23,685	29,141
15	24,996	30,578
16	26,296	32,000
17	27,587	33,409
18	28,869	34,805
19	30,144	36,191
20	31,410	37,566