

Corso di formazione
"PROTEZIONE DEGLI ANIMALI UTILIZZATI A FINI SCIENTIFICI"

8 - 15 - 22 Ottobre 2019

Aula Magna, Palazzo della Sapienza, Via Curtatone e Montanara 15, Pisa

Rapporto statistico relativo alla determinazione numerica degli animali previsti nel progetto di ricerca

Marcello Mele

Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari, Agro-ambientali

Centro di Ricerche Agro-ambientali «E. Avanzi»

3R

Compiti dell'organismo preposto al benessere degli animali:

consiglia il personale nell'applicazione del principio della sostituzione, della **riduzione** e del perfezionamento, lo tiene informato sugli sviluppi tecnici e scientifici e promuove l'aggiornamento professionale del personale addetto all'utilizzo degli animali;

La sintesi non tecnica dei progetti contiene: la dimostrazione della conformità ai requisiti di sostituzione, **riduzione** e perfezionamento.

SINTESI NON TECNICA DI CUI ALL'ART. 34, COMMA 1

Applicazione del principio delle «3 R»

Sostituzione

Giustificare la necessità dell'impiego degli animali e perché non possono essere utilizzati metodi alternativi all'impiego degli animali

Riduzione

Giustificare il numero minimo di animali da utilizzare (giustificazione statistica)

Perfezionamento

Giustificare la scelta della specie e del modello/i animale/i da utilizzare in rapporto alla sofferenza indotta e agli obiettivi scientifici del progetto di ricerca

Descrivere le misure che si intendono attuare per ridurre al minimo il danno inflitto agli animali

Allegato VI

SCHEMA PER LA PRESENTAZIONE DI UN PROGETTO DI RICERCA AI SENSI DELL'ARTICOLO 31 DEL DECRETO

Dichiarazioni riferite all'articolo 13, comma 2 del decreto

Riduzione (Massima riduzione del numero di animali utilizzati, compatibile con gli obiettivi del progetto di ricerca)

Metodologia e tecnica dell'esperimento

Considerazioni statistiche (descrivere come è stato determinato il numero di animali necessari per lo studio)

IPSE DIXIT

- Il numero di animali da utilizzare è stato mantenuto il più basso possibile, per ottenere risultati significativi
- Il numero di animali da utilizzare è stato desunto da precedenti lavori
- La determinazione della dimensione campionaria per mezzo del test ANOVA con una potenza di 0,8 e un valore di probabilità alfa di 0,05 ha permesso di stabilire che un numero di 10 animali per gruppo sia appropriato per ottenere differenze significative.
- Una power analysis è stata condotta prendendo in considerazione un large effect size (0.8), $\alpha = 0.05$, $P = 0.80$ e concludendo che l'utilizzo di 5 topi per gruppo sperimentale consente di ottenere differenze statisticamente significative

Esperimento

- “**Ricerca pianificata**”, per rispondere a ipotesi iniziali → inferenza.
- L’esperimento viene condotto in “**ambiente controllato**”, in modo da studiare l’effetto che una o più variabili hanno sulle osservazioni.
- Fasi dell’esperimento:
 - ✓ definizione/“review” del problema
 - ✓ obiettivo → definizione dell’ipotesi
 - ✓ scelta/descrizione del DISEGNO SPERIMENTALE
 - ✓ raccolta dei dati
 - ✓ analisi statistica delle informazioni sperimentali
 - ✓ interpretazione dei risultati
 - ✓ conclusioni in relazione all’ipotesi iniziale

Disegno sperimentale

- Il disegno sperimentale definisce le modalità di raccolta delle informazioni (importanza del campionamento)
- Nel disegno sperimentale, è importante definire:
 - ✓ i trattamenti
 - ✓ la dimensione del/i campione/i
 - ✓ le unità sperimentali
 - ✓ le unità campionarie (osservazioni)
 - ✓ le replicazioni
 - ✓ l'errore sperimentale
- Il modello statistico utilizzato per l'analisi dei dati dipende dall'obiettivo della ricerca e dal disegno sperimentale.

Unità sperimentale

- Unità di base (es. individuo, animale, pianta) a cui viene somministrato un trattamento.
- Le unità sperimentali devono essere **“indipendenti”** una dall'altra.
- L'effetto del trattamento viene rilevato su una “unità campionaria”, che può coincidere con l'unità sperimentale o costituirne una parte.
- **“Replicazioni”** = unità sperimentali trattate allo stesso modo.
- **“Ripetizioni”** = misure ripetute effettuate sulla stessa unità sperimentale.

Unità sperimentale

Campioni	Gruppi	Misura 1	Misura 2	Misura 3	Media
Campione 1	Trattamento 1
Campione 2	Trattamento 1
Campione 3	Trattamento 1
Campione 4	Trattamento 2
Campione 5	Trattamento 2
Campione 6	Trattamento 2
Campione 7	Trattamento 3
Campione 8	Trattamento 3
Campione 9	Trattamento 3

Unità sperimentale

Trattamenti

Repliche

Ripetizioni

Unità sperimentale

Disegno sperimentale

20 gabbie

4 animali per gabbia

4 trattamenti

5 gabbie per trattamento

Attenzione:

Per misure fatte individualmente $n = 80$

Per misure fatte su gabbia $n = 20$

Nel primo caso l'unità sperimentale è l'animale

Nel secondo caso l'unità sperimentale è la gabbia

Test di ipotesi

- 1 – formulazione di H_0 *ipotesi nulla*
- 2 – formulazione di H_1 *ipotesi alternativa*
- 3 – scelta del livello di significatività α (β)
- 4 – sviluppo del *test*
- 5 – risposta all'ipotesi di partenza *nuove conoscenze?*

Test di ipotesi

Formulazione di H_0

L'**ipotesi nulla** è le medie delle variabili delle due popolazioni sono uguali

Errore di tipo I (α): Probabilità di commettere un errore rifiutando H_0 quando H_0 è vera.

$1-\alpha$ = livello di protezione del test. Più è alta la differenza e più conservativo è il test.

Errore di tipo II (β): Probabilità di commettere un errore non rifiutando H_0 quando H_0 è falsa (accetto l'ipotesi alternativa, le due popolazioni sono diverse).

$1-\beta$ = potenza del test. Più è alto il valore della potenza e maggiore è la possibilità del test di identificare come corretta l'ipotesi alternativa quando questa è effettivamente vera

P-value: È il livello di probabilità, rappresentato da α , con cui si commette un errore rifiutando H_0

$\alpha = 0,05$

$P \leq 0,05$;

$\alpha = 0,01$

$P \leq 0,01$;

$\alpha = 0,001$

$P \leq 0,001$

Numerosità minima campionaria (n)

La numerosità minima campionaria si può determinare con un'analisi di potenza.

Va fatta preliminarmente all'esecuzione dell'esperimento

E' utile per determinare il numero di animali necessari per ottenere un risultato statisticamente significativo, evitando di sacrificare animali inutilmente (né troppi né troppo pochi).

I parametri necessari sono i seguenti:

Effect size: indicato con la lettera d o f , è la differenza attesa fra le medie di due o più (dati quantitativi) o la differenze tra la proporzione di eventi (dati qualitativi). La ricerca dovrebbe fissare in anticipo qual è la differenza che si ritiene «biologicamente»

significativa, ricordandosi che H_0 , per definizione, prevede che la differenza sia zero.

Quando si hanno più variabili con unità di misura differenti, conviene utilizzare la differenza standardizzata, dividendo il valore di d per quello delle deviazione standard. In questa maniera si otterrà un numero puro.

Effect size

Una misura comune dell'effect size è il cosiddetto effect size di Cohen:

$$d = (m_1 - m_2) / \sigma$$

Dove m_1 e m_2 sono le medie della variabile nelle due popolazioni a confronto e σ la deviazione standard della variabile.

Se $d=1$, vuol dire che le medie differiscono di una deviazione standard, per $d=0.5$, per metà deviazione standard e così via.

Secondo Cohen $d=0.2$ corrisponde a un piccolo effect size; $d=0.5$, medio e $d=0.8$ grande. Quindi Cohen ritiene che differenze tra medie inferiori al 20% della deviazione standard sarebbero da considerarsi irrilevanti, anche se potenzialmente significative.

Numerosità minima campionaria (n)

Deviazione standard: parametro necessario solo per le variabili quantitative, si può ottenere da dati di letteratura, oppure attraverso l'applicazione di studi pilota mirati a raccogliere dati preliminari sulle variabili oggetto di studio.

Errore di tipo I: è fissato in maniera convenzionale e dipende anche da quanto vuole essere conservativo il test. Più è basso e maggiore è il livello di protezione. I due valori più utilizzati sono 0.05 e 0.01 (la probabilità di commettere un errore dichiarando che esiste una differenza).

Potenza del test: è funzione dell'errore di tipo II, essendo data da $1-b$. I due valori più utilizzati sono 0.8 e 0.9 (la probabilità di trovare una differenza significativa se in effetti una differenza tra le medie è reale e non dovuta al caso)

Numerosità minima campionaria (n)

Test statistico: dipende dalla complessità del test (t student, chi-quadro, ANOVA, MANOVA, ANOVA a misure ripetute) e se è a una o due code (direzione attesa dell'effetto, in aumento e in diminuzione o solo uno dei due). Cambia la formula.

Riduzione attesa in funzione della perdita di animali: il ricercatore deve prevedere, sulla base dell'esperienza e della letteratura, la perdita di animali attesa prima della fine dell'esperimento. Se la percentuale di perdita fosse del 10%, è necessario aumentare conseguentemente il numero di animali necessario. Quindi questo aggiustamento va fatto dopo il calcolo della numerosità campionaria, utilizzando la seguente formula:

Dimensione campionaria corretta= dimensione campionari/ (1- [% perdita/100])

Numerosità minima campionaria (n)

- Il numero minimo di replicazioni da utilizzare in un esperimento si può calcolare utilizzando le seguenti informazioni:
 - ✓ varianza stimata (es. da esperimenti precedenti) della variabile studiata
 - ✓ minima differenza di interesse/importanza pratica da evidenziare (es. tra 2 medie) e che si vuole significativa
 - ✓ la potenza del test $(1-\beta)$
 - ✓ il livello di significatività (α)
 - ✓ il tipo di test statistico
- Per il calcolo del numero di animali (n) in un test di confronto fra medie si può utilizzare la seguente regola:

$$n \geq \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2}{\delta^2} 2\sigma^2$$

valore della variabile normale standardizzata con probabilità α di commettere un errore del 1° tipo

differenza desiderata

varianza

valore della variabile normale standardizzata con probabilità β di commettere un errore del 2° tipo

Esempio

Supponiamo di voler valutare l'effetto di una sostanza x che ha effetto ipotensivo su un gruppo di ratti ipertesi. Si supponga che la media della pressione dei ratti ipertesi sia 170mmHG e che l'effetto della sostanza sia biologicamente significativo se la pressione scende a 130 mmHG. La deviazione standard della variabile pressione arteriosa è 25 mmHG (da letteratura).

La formula da applicare per un test statistico a due code per medie non appaiate sarà la seguente:

$$n \geq \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2}{\delta^2} 2\sigma^2$$

$Z_{\alpha/2} = 1.96$ per $\alpha = 0.05$;

$Z_{\beta} = 0.842$ per $1-\beta = 0.8$ (valori tabulati)

Type I (Alpha) Error		Type II (Beta) Error	
p (probability)	Z_{α}	p	Z_{β}
0.05	1.96	0.05 (95% power)	1.64
0.01	2.57	0.10 (90% power)	1.282
0.001	3.29	0.15 (85% power)	1.037
		0.20 (80% power)	0.842
		0.25 (75% power)	0.675

Esempio

$$2\sigma^2 = 2(25)^2$$
$$\delta^2 = (170-130)^2$$

$$n \geq 2\sigma^2 (1.96+0.842)^2/\delta^2$$

$$n \geq 2(25)^2 (1.96+0.842)^2/(40)^2$$

$$n \geq 1250 (2.802)^2/1600 = 6.1$$

Il ricercatore avrà bisogno di 6 animali per gruppo. Considerando una perdita del 10%, il valore corretto sarà $6/(1-0.1) = 6.7 \sim 7$

Esempio

Type I (Alpha) Error		Type II (Beta) Error	
p (probability)	$Z\alpha$	p	$Z\beta$
0.05	1.96	0.05 (95% power)	1.64
0.01	2.57	0.10 (90% power)	1.282
0.001	3.29	0.15 (85% power)	1.037
		0.20 (80% power)	0.842
		0.25 (75% power)	0.675

$$n \geq 2\sigma^2 (2.57+1.282)^2/\delta^2$$



$$n \geq 2(25)^2 (2.57+1.282)^2/(40)^2$$



$$n \geq 1250 (3.852)^2/1600 = 11.6$$

Il ricercatore avrà bisogno di 12 animali per gruppo. Considerando una perdita del 10%, il valore corretto sarà $12/(1-0.1) = 13.3 \sim 13$

Valori inferiori di α e β portano a un aumento di circa 2 volte del numero di animali

Esempio

$$2\sigma^2 = 2(50)^2$$
$$\delta^2 = (170-130)^2$$

$$n \geq 2\sigma^2 (1.96+0.842)^2/\delta^2$$

$$n \geq 2(50)^2 (1.96+0.842)^2/(40)^2$$

$$n \geq 5000 (2.802)^2/1600 = 24.5$$

Il ricercatore avrà bisogno di 25 animali per gruppo. Considerando una perdita del 10%, il valore corretto sarà $25/(1-0.1) = 27.77 \sim 28$

Il raddoppio della deviazione standard comporta un aumento di 4 volte del numero di animali

Numerosità minima campionaria (n)

Test statistico: ANOVA a una via

F tests - ANOVA: Fixed effects, omnibus, one-way

Analysis: A priori: Compute required sample size

Input: Effect size $f = 0.8$
 α err prob = 0.05
Power ($1-\beta$ err prob) = 0.8
Number of groups = 4

Output: Critical F = 3.0983912
Numerator df = 3
Denominator df = 20
Total sample size = 24

Numerosità minima campionaria (n)

Test statistico: ANOVA misure ripetute

F tests - ANOVA: Repeated measures, within factors

Analysis:

A priori: Compute required sample size

Input:

Effect size $f = 0.8$

α err prob = 0.05

Power ($1-\beta$ err prob) = 0.8

Number of groups = 4

Number of measurements = 4

Output:

Critical F = 3.4902948

Numerator df = 3

Denominator df = 12

Total sample size = 8

Alcuni consigli

Per impostare/scegliere un disegno sperimentale utile/efficiente:

- ✓ tenere in considerazione tutte le possibili fonti di variabilità del fenomeno oggetto di studio
- ✓ avere a disposizione sufficienti unità sperimentali per avere un “adeguato” errore sperimentale
- ✓ calcolare il numero minimo di replicazioni da utilizzare nell’esperimento
- ✓ Misure ripetute hanno effetti anche sulla potenza del test e sulla numerosità campionaria

Controllare l'errore sperimentale

- Attribuzione casuale dei “trattamenti” alle “unità sperimentali” → esperimento non distorto.
- Campioni estratti casualmente dalla popolazione → “rappresentatività” delle unità sperimentali/campione.
- Aumento delle repliche.
- Raggruppamento delle unità sperimentali sulla base di altri fattori di variabilità oltre i trattamenti (blocchi) → attribuzione casuale dei “trattamenti” ai “blocchi”

In definitiva, la dimensione campionaria aumenta:

- Quando l'effect size è basso (ad esempio comparando due farmaci piuttosto che un farmaco e il placebo)
- Quando la potenza del test è elevata (0.9 piuttosto che 0.8)
- Minore è il valore della significatività (0.01 piuttosto che 0.05)
- Quando la variabilità delle misure è alta per difficoltà nelle misure, presenza di disturbi ecc. In questo caso l'uso delle misure ripetute riduce notevolmente la numerosità campionaria.