

**Attività Seminariale a distanza in materia di  
“PROTEZIONE DEGLI ANIMALI UTILIZZATI A  
FINI SCIENTIFICI”**

**Ottobre - Dicembre 2020**

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

**Giuseppe Conte**

Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali

# Decreto legislativo n. 26 del 4 marzo 2014

**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)

# Come si giustifica la scelta del numero

## Alcuni esempi

- ✓ 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  $\alpha$  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 del problema
  - Scelta/descrizione del DISEGNO SPERIMENTALE
  - Raccolta dati
  - Analisi statistica delle informazioni sperimentali
  - Interpretazione dei risultati
  - Conclusioni in relazione all'ipotesi iniziale

# Disegno sperimentale

- ✓ Il disegno sperimentale definisce le modalità di (importanza del campionamento)
- ✓ Nel disegno sperimentale è importante definire:
  - I trattamenti
  - Dimensione del campione
  - **Le unità sperimentali**
  - 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

Unità sperimentale	Gruppi	Variabile 1	Variabile 2	Variabile 3	Media
Unità 1	Trattamento 1	...	...	...	...
Unità 2	Trattamento 1	...	...	...	...
Unità 3	Trattamento 1	...	...	...	...
Unità 4	Trattamento 2	...	...	...	...
Unità 5	Trattamento 2	...	...	...	...
Unità 6	Trattamento 2	...	...	...	...
Unità 7	Trattamento 3	...	...	...	...
Unità 8	Trattamento 3	...	...	...	...
Unità 9	Trattamento 3	...	...	...	...

Unità sperimentale

Trattamenti

Replicazioni

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

# 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 d'ipotesi

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

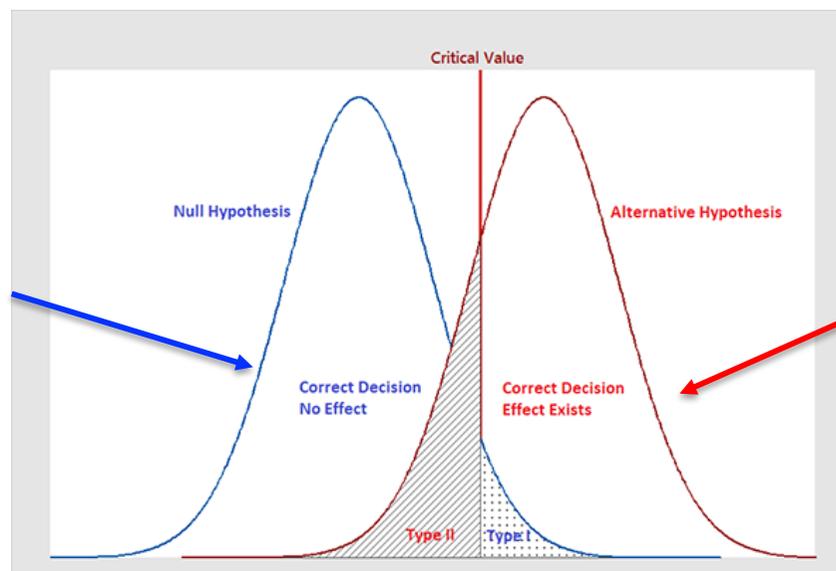
# Test d'ipotesi

- 1 – **Ipotesi nulla ( $H_0$ ):** non ci sono differenze tra le popolazioni
- 2 – **Ipotesi alternativa ( $H_1$ ):** ci sono differenze tra le popolazioni

	$H_0$ vera	$H_0$ falsa
Accetto $H_0$	OK ( $1-\alpha$ )	<b>Errore di tipo II (<math>\beta</math>)</b>
Rifiuto $H_0$	<b>Errore di tipo I (<math>\alpha</math>)</b>	OK ( $1-\beta$ )

Protezione del test

$1-\alpha$



Potenza del test

$1-\beta$

# Numerosità minima campionaria

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:

**Effect size:** indicato con la lettera **d** o **f**, è la differenza attesa fra le medie di due o più dati quantitativi).

**Deviazione standard:** 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:** I due valori più utilizzati sono 0,05 e 0,01

**Potenza del test:** I due valori più utilizzati sono 0,80 e 0,90

# Effect size

Una misura dell'Effect size e il *coefficiente di Cohen*:

$$d = \frac{m1 - m2}{\sigma}$$

dove  $m1$  e  $m2$  sono le medie della variabile nelle due popolazioni e  $\sigma$  è 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.*

Effect size	d
piccolo	0,20
medio	0,50
grande	0,80



Cohen ritiene che differenze tra medie inferiori al 20% della deviazione standard sarebbero da considerarsi irrilevanti, anche se potenzialmente significative

# Numerosità minima campionaria

Il numero minimo di unità sperimentali si calcola con la seguente formula:

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

Valore della variabile standardizzata per la probabilità di commettere l'errore di tipo I:

- per  $\alpha = 0,05 \rightarrow 1,96$
- per  $\alpha = 0,01 \rightarrow 2,57$
- per  $\alpha = 0,001 \rightarrow 3,29$

Differenza stimata

Varianza

Valore della variabile standardizzata per la probabilità di commettere l'errore di tipo II:

- per  $(1-\beta) = 0,75 \rightarrow 0,675$
- per  $(1-\beta) = 0,80 \rightarrow 0,842$
- per  $(1-\beta) = 0,85 \rightarrow 1,037$
- per  $(1-\beta) = 0,90 \rightarrow 1,282$
- per  $(1-\beta) = 0,95 \rightarrow 1,645$

$$d = \frac{m1 - m2}{\sigma}$$

$$n \geq \frac{(Z_{\frac{\alpha}{2}} + Z_{\beta})^2}{d^2} 2$$

# Numerosità minima campionaria

**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%, bisogna aumentare conseguentemente il numero di animali necessario. Quindi questo aggiustamento va fatto dopo il calcolo della numerosità campionaria, utilizzando la seguente formula:

$$\text{Dimensione campionaria corretta} = \frac{\text{Dimensione campionaria}}{\left[1 - \left(\frac{\%perdita}{100}\right)\right]}$$

# 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).

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

Type I (Alpha) Error		Type II (Beta) Error	
<i>p</i> (probability)	<i>Z</i> $\alpha$	<i>p</i>	<i>Z</i> $\beta$
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

## Esempio

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

$$n \geq \frac{(1,96 + 0,842)^2}{(170 - 130)^2} 2(25)^2$$

$$n \geq \frac{(2,802)^2}{1600} 1250 = 6.1$$

Considerando una perdita del 10%



$$n \text{ corretta} = \frac{6}{[1-(0,10)]} = 6,7 \sim 7$$

**Il ricercatore avrà bisogno di 7 animali per gruppo !!!!!!!!**



## Esempio

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

$$n \geq \frac{(2,57 + 1,282)^2}{(170 - 130)^2} 2(25)^2$$

Type I (Alpha) Error		Type II (Beta) Error	
<i>p</i> (probability)	Z $\alpha$	<i>p</i>	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

$$n \geq \frac{(3,852)^2}{1600} 1250 = 11,6$$

Considerando una perdita del 10%

$$n \text{ corretta} = \frac{12}{[1-(0,10)]} = 13,3 \sim 13$$

**Il ricercatore avrà bisogno di 13 animali per gruppo !!!!!!!!**

**NB = Abbassando i valori di  $\alpha$  e  $\beta$  la numerosità si è raddoppiata**

# Esempio

E se avessimo una deviazione standard maggiore?

$$\sigma = 50$$

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

$$n \geq \frac{(1,96 + 0,842)^2}{(170 - 130)^2} 2(50)^2$$

$$n \geq \frac{(3,852)^2}{1600} 5000 = 24,5$$

Considerando una perdita del 10%

$$n \text{ corretta} = \frac{25}{[1-(0,10)]} = 27,7 \sim 28$$

**Il ricercatore avrà bisogno di 28 animali per gruppo !!!!!!!!!!!**

**NB = Il raddoppio della deviazione standard aumenta di 4 volte il numero di animali**



# Non perdiamo di vista il modello statistico

Test statistico: ANOVA a una via

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

**Analysis:** A priori: Compute required sample size

**Input:** Effect size  $f = 0.8$   
 $\alpha$  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 = 32

# Non perdiamo di vista il modello statistico

Test statistico: ANOVA misure ripetute

**F tests - ANOVA: Repeated measures, within factors**

**Analysis:** A priori: Compute required sample size

**Input:** Effect size  $f = 0.8$   
 $\alpha$  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”

# Conclusioni

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.