

## 8130. Analisi statistica dei risultati di saggi cronici

Questa nota si propone di fornire solo i criteri guida essenziali per poter effettuare una corretta elaborazione dei risultati. In commercio sono disponibili dei programmi per personal computer che permettono di applicare con relativa facilità gran parte dei metodi di interesse tossicologico, tra i quali anche quelli citati in questa nota. L'esistenza di tali programmi, l'elevato numero dei metodi che andrebbero trattati e la loro relativa complessità, ha fatto sì che, al contrario di quanto fatto in precedenza, l'operazione di darne descrizione dettagliata fosse ritenuta inopportuna. Per contro, la relativa facilità d'uso dei programmi disponibili in commercio non deve fuorviare e si consiglia di avvalersi sempre della collaborazione di un esperto di statistica che possa consigliare sulla scelta dei metodi di analisi più appropriati ai singoli casi sperimentali.

I saggi cronici proposti consentono di esaminare gli effetti a lungo termine di effluenti di scarico o di acque superficiali su parametri quali l'attività riproduttiva, l'accrescimento ed anche la sopravvivenza degli organismi. L'analisi statistica dei risultati ottenuti con questi saggi viene comunemente distinta in base al tipo di risultato da esaminare ed, ovviamente, in base al tipo di informazione che si desidera ottenere.

Nel caso un campione sia stato saggiato solo "tal quale", lo scopo dell'analisi statistica è di confrontare le risposte degli organismi che sono stati esposti a questa unica concentrazione di campione con quelle degli organismi di controllo e di valutare se le eventuali differenze, ad esempio di taglia corporea, siano da considerare significative e quindi imputabili agli inquinanti presenti nel campione stesso. A questo scopo si utilizza generalmente il test  $t$  con il quale è possibile valutare, con un certo grado di probabilità, se, ad esempio, la dimensione media degli animali di controllo sia significativamente diversa da quella dei trattati, e rifiutare pertanto l'ipotesi di differenza nulla ( $H_0$ ). L'applicabilità di questo test richiede che i due campioni posti a confronto provengano da popolazioni normalmente distribuite e soprattutto che le varianze dei due gruppi di osservazioni non siano significativamente differenti.

Nel caso sia stato possibile saggiare più diluizioni di un campione si dovranno analizzare più serie di dati relativamente ad uno od anche più parametri. Queste serie andranno confrontate con la/e serie corrispondenti degli organismi di controllo. Lo scopo è comunemente quello di individuare la massima concentrazione di campione i cui effetti non sono significativi, od anche, quella concentrazione di campione alla quale gli organismi possono essere esposti senza che i valori dei parametri misurati siano statisticamente distinguibili da quelli del gruppo di controllo. Questa concentrazione viene indicata con l'acronimo NOEC e viene solitamente individuata congiuntamente con la minima concentrazione, tra quelle saggate, che è stata capace di effetti significativi (LOEC). La procedura corretta è in questo caso l'analisi della varianza (ANOVA), mentre, al contrario, sarebbe inappropriato applicare ripetutamente il "test"  $t$  alle diverse coppie costituite da uno dei trattamenti e dal controllo. I presupposti per la corretta applicazione di ANOVA sono che i dati siano distribuiti normalmente e che la varianza dei gruppi sia omogenea. La prima condizione viene verificata con il "test" del Chi quadrato o con un "test" alternativo (es. Shapiro-Wilks), mentre la seconda, una volta soddisfatta la condizione di normalità, può essere verificata con il "test" di Bartlett o, parimenti, con test alternativi. Soddisfatte tali premesse, l'applicazione di ANOVA ad un criterio di classificazione, permetterebbe di concludere, in caso affermativo, che le differenze tra le medie dei diversi gruppi sperimentali sono significative. La verifica di variazione significativa tra i gruppi ottenuta mediante ANOVA è tuttavia un risultato generico che poco aggiunge alla caratterizzazione tossicologica del campione. Per ottenere informazioni più specifiche è necessario applicare altri metodi statistici il cui scopo, coerentemente con quanto anticipato, è quello di individuare quali tra le concentrazioni di campione abbiano causato alterazioni si-

gnificative del parametro in esame. Un test comunemente utilizzato a questo scopo è quello di Dunnett, poichè confronta ogni gruppo di organismi con il controllo. Tuttavia esistono vari metodi alternativi o complementari come, ad esempio, il "test" di Bonferroni, che è da preferire nel caso i gruppi abbiano un diverso numero di repliche, oppure il "test" di Williams, che è specifico per analizzare le risposte a concentrazioni crescenti di tossici, o il "test" di Tukey che è preferibile qualora si sia interessati a confrontare tutti i gruppi tra loro, non potendo presupporre, come in taluni studi di campo, che vi siano relazioni evidenti tra i diversi trattamenti. In generale è preferibile escludere da questi confronti i dati relativi ai trattamenti che hanno causato elevate mortalità.

Se i dati non rispettassero la condizione di normalità o di omogeneità della varianza può essere risolutivo trasformarne i valori nei rispettivi logaritmo, radice quadra o arcoseno e risottoporli ai test statistici menzionati. Una valida alternativa è rappresentata, tuttavia, dall'impiego di metodi statistici di tipo non parametrico che non sono condizionati, nella loro applicazione, dalla distribuzione dei dati, e possono pertanto essere utilizzati senza alcuna trasformazione dei dati medesimi. I test proponibili in tal senso sono, ad esempio, il metodo di Steel, analogo non parametrico del metodo di Dunnett, quello di Wilcoxon e il metodo di Kruskal-Wallis, che a sua volta dovrebbe essere utilizzato in sostituzione del "test" di Tukey.

Se sono stati osservati dei decessi tra gli organismi esposti al campione è possibile confrontare la mortalità degli organismi trattati con quella degli organismi di controllo e, compatibilmente con i criteri di validità del saggio, stabilire se il campione saggiato sia responsabile di effetti letali significativi. A tal fine si applica il "test" di Fisher che permette di verificare, come spesso nei test statistici, un'ipotesi nulla e cioè che la percentuale di organismi sopravvissuti nei gruppi posti a confronto non differisca significativamente. Si possono utilizzare anche altri metodi tra i quali, ancora, il "test" di Dunnett, previa tuttavia la necessaria trasformazione delle percentuali di sopravvivenza nei corrispondenti valori di arcoseno. Se i dati lo permettono e vi è interesse ad esprimere la tossicità come concentrazione letale per una percentuale definita di organismi ( $LC_{50}$ ,  $LC_{20}$ , ecc.), si applicheranno gli stessi metodi (es. "probit") già descritti per i saggi di tossicità acuta.

E da segnalare, infine, il crescente interesse per la possibilità di esprimere anche la tossicità subletale di un campione in termini di concentrazione capace di effetti definiti. In altre parole è interessante poter stimare quale concentrazione di campione possa inibire l'accrescimento o la riproduzione, ad esempio, del 20% rispetto al valore di controllo ( $EC_{20}$ ). Se per i dati di mortalità, tipicamente qualitativi, l'uso di metodi destinati a questo tipo di stime è ampiamente consolidato (es. "probit"), per i dati di tipo continuo quali, ad esempio, il numero di neonati prodotti o la lunghezza corporea, l'analisi dei risultati termina generalmente con l'individuazione della NOEC e della LOEC e con il calcolo del "chronic value", noto in precedenza, ma meno correttamente, come massima concentrazione accettabile (MATC).

Questo tipo di risultati è dipendente dalla sequenza di concentrazioni saggiate, dal rapporto di diluizione prescelto, dalla variabilità dei risultati e quindi dalla qualità del lavoro sperimentale, ed inoltre, non è possibile associarvi stime di precisione o limiti fiduciali. Al contrario, esprimere la tossicità cronica come  $EC_{20}$ , o qualsiasi altra concentrazione di efficacia definita, permetterebbe di superare questi limiti ed offrirebbe alcuni innegabili vantaggi. Per esprimere la tossicità in questo modo, è necessario individuare la relazione esistente tra le concentrazioni di campione e le risposte del parametro indagato e ciò è possibile applicando dei metodi di regressione che sono solitamente parametrici ma, con opportuni aggiustamenti, è possibile usare anche procedure non parametriche. L'equazione di una curva logaritmica ha spesso dimostrato di poter descrivere in modo adeguato l'andamento delle risposte subletali (lunghezza, peso, riproduzione, ecc.) al crescere della concentrazione.