

$\alpha\beta_{ij}$ effetto dell'interazione dei livelli A_i e B_j ; rappresenta l'effetto simultaneo dei due livelli ed è uguale a $\mu_{ij} - \mu_{i..} - \mu_{.j} + \mu$ (stimabile con $\bar{x}_{ij} - \bar{x}_{i..} - \bar{x}_{.j} + \bar{x}_{...}$);

ϵ_{ijl} residuo (errore) per il soggetto l-mo nella combinazione dei livelli $A_i B_j$ uguale a $x_{ijl} - \mu - \alpha_i - \beta_j - \alpha\beta_{ij}$ (la cui varianza σ_e^2 può essere stimata con la varianza del residuo $x_{ijl} - \bar{x}_{ij} + \bar{x}_{i..} + \bar{x}_{.j} - \bar{x}_{...}$).

Assumiamo che i fattori A e B siano ad effetti fissi, e che comprendano cioè tutti i livelli di interesse per lo sperimentatore.

Da ciò deriva la seguente scomposizione della devianza

$$SS_{Tot} = SS_A + SS_B + SS_{AB} + SS_{Res}$$

In questo caso, il $MS_{Res} = SS_{Res}/df$ è una stima dell'errore sperimentale per valutare la significatività degli altri MS.

2.4.2. Analisi della varianza

Con questo disegno è possibile verificare le seguenti ipotesi:

$H_0 : \mu_{1..} = \mu_{2..}$ le medie dei diversi livelli del fattore A sono uguali

$H_0 : \mu_{.1} = \mu_{.2} = \mu_{.3}$ le medie dei diversi livelli del fattore B sono uguali

$H_0 : \mu_{ij} - \mu_{i'j} - \mu_{ij'} + \mu_{i'j'} = 0$ per tutti i valori degli indici i, i', j e j' , tali che $i \neq i', j \neq j'$; le medie delle diverse interazioni dei livelli di A e di B sono uguali a 0.

ESEMPIO

Consideriamo 2 fattori ognuno con 3 livelli; in particolare, sia A un trattamento con fattore neurotrofico o con i relativi controlli (A_1 = soluzione fisiologica, A_2 = citocromo, A_3 = NGF), e B una *challenge* farmacologica (B_1 = soluzione fisiologica, B_2 = scopolamina 0.8 mg/kg, B_3 = scopolamina 2.0 mg/kg). Abbiamo quindi, complessivamente, 9 combinazioni dei livelli dei fattori. La variabile risposta sia il numero di attraversamenti in un test di attività locomotoria (es. test di *open-field*).

La tabella dei dati risultanti dall'esperimento sia la seguente:

A ₁			A ₂			A ₃		
B ₁	B ₂	B ₃	B ₁	B ₂	B ₃	B ₁	B ₂	B ₃
24	44	38	30	35	26	21	41	42
33	36	29	21	40	27	18	39	52
37	25	28	39	27	36	10	50	53
29	27	47	26	31	46	31	36	49
42	43	48	34	22	45	20	34	64
165	175	190	150	155	180	100	200	260

Per eseguire l'analisi della varianza occorre calcolare le seguenti quantità

$$\text{Termine di correzione} = 1575^2/45 = 55125$$

$$SS_{\text{Tot}} = (24^2 + 33^2 + \dots + 49^2 + 64^2) - 55125 = 5220$$

$$SS_A = (530^2/15 + 485^2/15 + 560^2/15) - 55125 = 190 \quad df = 3-1 = 2$$

$$SS_B = (415^2/15 + 530^2/15 + 630^2/15) - 55125 = 1543.33 \quad df = 3-1 = 2$$

$$SS_{AB} = (165^2/5 + \dots + 260^2/5) - 55315 - 56668.33 + 55125 = 1236.67 \quad df = 2 \cdot 2 = 4$$

$$SS_{\text{Res}} = (24^2 + 33^2 + \dots + 49^2 + 64^2) - (165^2/5 + \dots + 260^2/5) = 2250 \quad df = 3 \cdot 3 \cdot 4 = 36$$

Da esse si ricava la seguente tabella dell'ANOVA:

Fonte di variazione	SS	df	MS	F	p
A	190.0	p-1=2	95.0	[1/4]= 1.52	0.2324
B	1543.3	q-1=2	771.7	[2/4]=12.35	0.0001
AB	1236.7	(p-1)(q-1)=4	309.2	[3/4]= 4.95	0.0028
Residuo	2250.0	pq(n-1)=36	62.5		
Totale	5220.0	npq-1=44			

Come si può vedere, l'effetto principale del fattore A non è statisticamente significativo,

non vi è, cioè, differenza significativa tra l'attività locomotoria dei topi trattati con NGF e quella dei topi trattati con citocromo o con soluzione fisiologica; al contrario, l'effetto principale del fattore B e l'interazione AB sono significativi. Ciò significa che la diversa dose di scopolamina produce differenze significative nell'attività locomotoria, e l'entità di tali differenze dipende dalla somministrazione del fattore neurotrofico. La presenza dell'interazione AB significativa rende meno rilevante l'effetto principale del fattore B, in quanto, come abbiamo detto, l'effetto prodotto dalla diversa dose di scopolamina non è costante, ma varia al variare del fattore neurotrofico somministrato in combinazione con la scopolamina.

2.4.3. Rappresentazione grafica dell'interazione

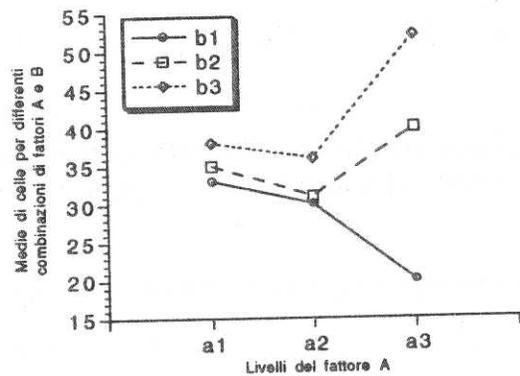
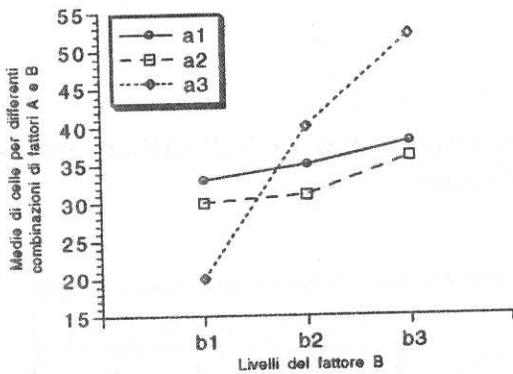
Come abbiamo visto, nel caso di un disegno fattoriale possono essere valutati sia gli effetti principali dei fattori in studio, sia la loro interazione.

Consideriamo la tabella delle medie relative alle celle derivanti dalla combinazione dei livelli di A e di B:

	A ₁	A ₂	A ₃	
B ₁	33	30	20	$\bar{x}_{1..} = 27.7$
B ₂	35	31	40	$\bar{x}_{2..} = 35.3$
B ₃	38	36	52	$\bar{x}_{3..} = 42.0$
	$\bar{x}_{.1} = 35.3$	$\bar{x}_{.2} = 32.3$	$\bar{x}_{.3} = 37.3$	$\bar{x}_{...} = 35.0$

Vi è interazione tra A e B quando la differenza tra i livelli del fattore A dipende dal livello del fattore B, o, vedendola nell'altra direzione, quando la differenza tra i livelli del fattore B dipende dal livello del fattore A. Da un punto di vista grafico, l'interazione tra A e B fa sì che le linee che congiungono le medie dei diversi trattamenti non siano fra loro parallele.

Dal grafico seguente, si può vedere che, mentre le curve relative ai livelli A₁ e A₂ di A (parte sinistra) sono fra loro approssimativamente parallele, non altrettanto si può dire per la curva relativa ad A₃. Lo stesso si può dire per le curve relative ai livelli B₂ e B₃ di B, che sono approssimativamente parallele, e per la curva relativa a B₁, che risulta invece divergente (parte destra). Ciò conferma graficamente la presenza di interazione fra A e B, risultata dall'ANOVA.



2.5. CONFRONTI ORTOGONALI

Indichiamo con

$$\sum_{i=1}^k a_i \bar{x}_i \quad e \quad \sum_{i=1}^k b_i \bar{x}_i$$

due confronti, cioè combinazioni lineari di \bar{x}_i (dove \bar{x}_i è la risposta media nel gruppo che sperimenta il trattamento i -mo), con

$$\sum_{i=1}^k a_i = 0 \quad e \quad \sum_{i=1}^k b_i = 0$$

Essi si dicono ortogonali se

$$a_1 b_1 + a_2 b_2 + \dots + a_k b_k = \sum_{i=1}^k a_i b_i = 0$$

Consideriamo il seguente disegno fattoriale

$\begin{matrix} & A_1 & & & A_2 & & \\ B_1 & B_2 & B_3 & & B_1 & B_2 & B_3 \end{matrix}$

La devianza (SS) totale può essere scomposta nelle tre componenti A, B, AB utilizzando i CONFRONTI ORTOGONALI, con i seguenti coefficienti:

Confronti	A ₁			A ₂		
	B ₁	B ₂	B ₃	B ₁	B ₂	B ₃
(1) A: A ₁ vs A ₂	-1	-1	-1	+1	+1	+1
(2) B: B ₁ vs (B ₂ +B ₃)	-2	+1	+1	-2	+1	+1
(3) B: B ₂ vs B ₃	0	-1	+1	0	-1	+1
(4) AB: (A ₁ vs A ₂) · [B ₁ vs (B ₂ +B ₃)]	+2	-1	-1	-2	+1	+1
(5) AB: (A ₁ vs A ₂) · (B ₂ vs B ₃)	0	+1	-1	0	-1	+1

Da notare che i coefficienti dell'interazione vengono ottenuti come prodotto dei coefficienti degli effetti principali; in particolare, (4)=(1)·(2) e (5)=(1)·(3).

I df totali (5 nell'esempio) verranno anch'essi ripartiti nelle 3 componenti (A:1, B:1+1=2, AB:1+1=2).

Vi sono vari set di confronti ortogonali che è possibile effettuare quando i df di un effetto sono ≥ 2 (come per B e AB nell'esempio). La scelta dipende dal tipo di livelli del fattore. In ogni caso, la componente complessiva per quel fattore non cambia.

In generale, indicando con a_i il generico coefficiente di un confronto, si ha

$$t = \frac{a_1 \bar{x}_1 + a_2 \bar{x}_2 + \dots + a_k \bar{x}_k}{MS_{Res} \cdot \left[\frac{a_1^2}{n_1} + \frac{a_2^2}{n_2} + \dots + \frac{a_k^2}{n_k} \right]} \sim t_{(N-k)} \text{ di Student}$$

2.6. CONFRONTI MULTIPLI

- a) Servono per prendere decisioni multiple, una per ogni uguaglianza di interesse. Caso più interessante: tutti i confronti a coppie.
- b) NON è necessaria una F overall significativa, per essere protetti.

Facendo più test all'interno di un gruppo di medie $\bar{x}_1, \bar{x}_2, \dots, \bar{x}_k$, la probabilità di avere almeno un risultato significativo per il solo effetto del caso aumenta considerevolmente, a parità di condizioni, all'aumentare di k. Infatti, se α = probabilità di errore di I tipo sul singolo confronto, allora, la probabilità di almeno un errore di I tipo sull'insieme

$$\alpha_E = 1 - \text{prob di nessun errore} = 1 - (1-\alpha) \cdot (1-\alpha) \cdot \dots \cdot (1-\alpha) = 1 - (1-\alpha)^{k(k-1)/2}$$

Se $\alpha = 0.05$, $K = 5$ allora $\alpha_E = 0.40$ dove

α_E = experimentwise (familywise) Type I error probability;

α = pairwise Type I error probability.

Il criterio di protezione più semplice da adottare è la CORREZIONE DI BONFERRONI.

Si esegue ogni singolo confronto considerando significativa la $p < \alpha$ dove

$$\alpha = \alpha_E/q;$$

$$q = n^\circ \text{ di confronti};$$

$$\alpha_E = \text{a scelta (in genere } 0.01 \leq \alpha_E \leq 0.10).$$

Nel seguito del paragrafo, si ometterà per brevità l'indice E dal simbolo α_E della probabilità di errore di I tipo sull'insieme dei confronti, che verrà quindi indicata semplicemente con α .

2.6.1. Un solo fattore a p livelli

- t di Student per campioni indipendenti con la correzione del Bonferroni (buona protezione/scarsa potenza).

VARIANZE OMOGENEE n_i UGUALI

- Tukey HSD Test

La minima differenza significativa per il confronto tra due medie \bar{x}_i e \bar{x}_j è uguale a

$$\text{minima differenza significativa} = q_{\alpha, \nu, k} \cdot \sqrt{\frac{MS_{Res}}{n}}$$

dove

MS_{Res} = Mean Square (varianza) del residuo su cui è costruito il test F per la valutazione dell'effetto;

n = dimensione (cioè, numero di osservazioni) nei gruppi a confronto;

$q_{\alpha, \nu, k}$ = valore della STUDENTIZED RANGE STATISTIC ricavato dalle tavole;

α = probabilità di errore di I Tipo sull'insieme dei confronti ($\alpha = 0.05$ o 0.01);

ν = gradi di libertà dell'errore;

k = numero di gruppi da confrontare tra loro.

La minima differenza significativa è uguale per tutti i confronti. Se la differenza tra due gruppi è maggiore della minima differenza significativa, allora sarà significativa.

VARIANZE OMOGENEE n_i DIVERSI

- Tukey-Cramer Procedure

La minima differenza significativa per il confronto tra \bar{x}_i e \bar{x}_j è uguale a

$$\text{minima differenza significativa} = q_{\alpha, \nu, k} \cdot \sqrt{\frac{MS_{Res} \cdot \left(\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right)}{2}}$$

MS_{Res} = come prima;

n_i, n_j = dimensione dei gruppi i e j a confronto;

$q_{\alpha, \nu, k}, \alpha, \nu, k$ = come prima.

La minima differenza significativa è diversa da confronto a confronto al variare della dimensione dei gruppi. Se la differenza tra i due gruppi considerati è maggiore della minima differenza significativa ad essi relativa, allora sarà significativa.

VARIANZE DISOMOGENEE

- Dunnett's T3 Procedure

La minima differenza significativa per il confronto tra \bar{x}_i e \bar{x}_j è uguale a

$$\text{minima differenza significativa} = \frac{Q}{\sqrt{2}}$$

con

$$Q = \frac{\left[q_{\alpha, \nu_i, k} \cdot \frac{s_i^2}{n_i} + q_{\alpha, \nu_j, k} \cdot \frac{s_j^2}{n_j} \right]}{\sqrt{\frac{s_i^2}{n_i} + \frac{s_j^2}{n_j}}}$$

dove

$q_{\alpha, \nu_i, k}, q_{\alpha, \nu_j, k}$ = come sopra;

$$\nu_i = n_i - 1, \text{ con } n_i \text{ come sopra;}$$

$$\nu_j = n_j - 1, \text{ con } n_j \text{ come sopra;}$$

$$s_i^2, s_j^2 = \text{varianze corrette nei gruppi } i, j.$$

La minima differenza significativa varia al variare della variabilità nei gruppi a confronto. Se la differenza tra i due gruppi considerati è maggiore della minima differenza significativa ad essi relativa, allora sarà significativa.

2.6.2. Disegno fattoriale

I confronti multipli possono essere applicati anche all'interno di una interazione.

ESEMPIO

Consideriamo un fattore A con 2 livelli e un fattore B con 3 livelli.

	B ₁	B ₂	B ₃	
A ₁	\bar{x}_{11}	\bar{x}_{12}	\bar{x}_{13}	$\bar{x}_{1.}$
A ₂	\bar{x}_{21}	\bar{x}_{22}	\bar{x}_{23}	$\bar{x}_{2.}$
	$\bar{x}_{.1}$	$\bar{x}_{.2}$	$\bar{x}_{.3}$	$\bar{x}_{..}$

- 6 gruppi
- NON TUTTI i confronti a coppie hanno un senso (per es. \bar{x}_{11} vs \bar{x}_{23} , poiché, variando sia A sia B, non si sa a quale fattore attribuire l'eventuale differenza)
- Non si può considerare ogni riga (e ogni colonna) come un set di medie a sé

CONFRONTI TRA LIVELLI DI 1 FATTORE ENTRO LIVELLI DI ALTRI FATTORI

Si legge il valore di $q_{\alpha, \nu, k_1, k_2}$ dalle tavole della distribuzione della STUDENTIZED RANGE STATISTIC MULTIVARIATE.

CONFRONTI ENTRO RIGA ED ENTRO COLONNA

- a) Si calcola il numero di confronti di interesse complessivi (m);
- b) Si determina il k' tale che $m \approx k'(k'-1)/2$;
- c) Si prende dalle tavole (univariate) il valore di $q_{\alpha, r, k'}$.

E' importante notare che, quando è significativa l'interazione AB, sono meno importanti i confronti multipli entro gli effetti principali (tra medie marginali) di A e di B.

2.7. STATISTICA NON PARAMETRICA

Condizioni per l'uso di test non parametrici:

- a) gli assunti di normalità e di omoschedasticità non sono rispettati;
- b) presenza di valori limite (*cut-off*) nelle osservazioni.

I dati vengono trasformati in RANGHI:

- a) i dati vengono ordinati dal più piccolo al più grande;
- b) i dati vengono sostituiti con il numero d'ordine della posizione occupata nella scala ordinata.

ESEMPIO

7	13	5	22	6	⇒	5	6	7	13	22	
3	4	1	5	2	⇐	1	2	3	4	5	⇐

Assunto: la distribuzione dei dati è continua nella popolazione, anche se i dati sono misurati secondo una scala discreta.

Conseguenza: non dovremmo avere valori uguali. Se li abbiamo, attribuiamo ad essi il rango medio, e applichiamo appropriate correzioni nel calcolo delle statistiche test.

ESEMPIO

7	13	22	13	6	⇒	6	7	13	13	22	
2	3.5	5	3.5	1	⇐	1	2	3.5	3.5	5	⇐

N.B.: La somma dei ranghi in un gruppo di n osservazioni (con o senza valori uguali) è sempre $n(n+1)/2$.

Ai valori fuori SCALA MASSIMA si attribuisce il rango massimo, ai valori fuori SCALA MINIMA il rango minimo.

ESEMPIO

Se abbiamo uno strumento che misura i valori da 0.5 a 3 (es. densità ottiche) ed abbiamo le seguenti misure

1	2	<.5	<.5	>3	⇒	<.5	<.5	1	2	>3
---	---	-----	-----	----	---	-----	-----	---	---	----

si attribuiranno ad esse i seguenti ranghi

3	4	1.5	1.5	5	⇐	1.5	1.5	3	4	5
---	---	-----	-----	---	---	-----	-----	---	---	---

2.7.1. Un solo fattore a p livelli

- Analisi della varianza di Kruskal-Wallis

Si considerino p gruppi di numerosità n_i , $i=1, \dots, p$; per l'applicazione del test di Kruskal-Wallis si procede come segue:

- a) si considerano tutte le unità come appartenenti ad un unico gruppo;
- b) si trasformano le osservazioni in ranghi;
- c) si sommano i ranghi all'interno di ogni gruppo

$$R_i = \sum_{l=1}^{n_i} r_{il}$$

d) si calcola la statistica H

$$H = \frac{12}{N(N-1)} \sum_{i=1}^p \frac{R_i^2}{n_i} - 3(N-1)$$

dove

$$N = n_1 + n_2 + \dots + n_p$$

e) Si confronta il valore di H così calcolato con i valori critici della distribuzione del χ^2 con $(p-1)$ df.

ESEMPIO

Consideriamo un esperimento in cui topi diversi vengono sottoposti a diversi tipi di addestramento, in 15 *trials* per l'apprendimento di un compito di evitamento passivo (pedanina). La variabile risposta sia un indice di errore, funzione del rapporto tra il numero di volte in cui l'animale scende dalla pedanina (prendendo o no lo *shock*) e il tempo totale di permanenza sulla pedanina stessa. Si vuole verificare se il diverso tipo di addestramento influenzi o meno la risposta dell'animale.

Sia la seguente tabella dei dati e dei relativi ranghi:

Addestramento 1		Addestramento 2		Addestramento 3	
Risposta	Rango	Risposta	Rango	Risposta	Rango
0.994	12	0.795	2	0.940	7
0.872	4	0.884	5	0.979	10
0.349	1	0.816	3	0.949	8
		0.981	11	0.890	6
				0.978	9

Calcoliamo le seguenti quantità

$$R_1 = 17$$

$$n_1 = 3$$

$$R_2 = 21$$

$$n_2 = 4$$

$$R_3 = 40$$

$$n_3 = 5$$

$$H = \frac{12}{[12 \cdot (12-1)]} \left[\frac{17^2}{3} + \frac{21^2}{4} + \frac{40^2}{5} \right] - 3 \cdot (12-1) = 14.8712$$

H deve essere confrontato con i valori critici del χ^2 con 2 df ($p < 0.001$).

Si può concludere che il tipo di addestramento influenza significativamente ($p < 0.001$) l'apprendimento del topo.

2.7.2. Un solo fattore a 2 livelli

- Test U di Mann-Whitney

Si considerino due gruppi di numerosità n_1 e n_2 (con $N = n_1 + n_2$). Per l'applicazione del test U di Mann-Whitney si procede come segue:

- si considerano tutte le unità come appartenenti ad un unico gruppo;
- si trasformano le osservazioni in ranghi;
- si sommano i ranghi nel primo (T_1) e nel secondo (T_2) gruppo, con $T_1 + T_2 = N(N+1)/2$;
- si calcola la statistica U

$$U = \min \left[n_1 n_2 + \frac{n_1(n_1+1)}{2} - T_1 ; n_1 n_2 + \frac{n_2(n_2+1)}{2} - T_2 \right] = \min[U_1 ; U_2]$$

- Si confronta il valore di U con i valori critici riportati nelle apposite tavole.

ESEMPIO

Consideriamo un esperimento per valutare l'effetto della scopolamina sull'attività locomotoria. A tale scopo, misuriamo il numero di attraversamenti in un test di *open-field* in due gruppi di topi, trattati con soluzione fisiologica o con scopolamina.

Soluzione fisiologica		Scopolamina	
Risposta	Rango	Risposta	Rango
17	1	39	3
36	2	48	6
40	4	54	7
42	5	55	8
		61	9
		64	10

Calcoliamo le seguenti quantità

$$T_1 = 12$$

$$U_1 = 4 \cdot 6 + 4 \cdot 5/2 - 12 = 22$$

$$U = \min(22; 2) = 2$$

$$T_2 = 43$$

$$U_2 = 4 \cdot 6 + 6 \cdot 7/2 - 43 = 2$$

$$p = 0.0190$$

Da ciò si può concludere che la scopolamina produce un aumento significativo del numero di attraversamenti nel test di *open-field*.

2.7.3. Disegno fattoriale

La statistica H di Kruskal-Wallis per k gruppi (con $(k-1)$ df) può essere scomposta in $(k-1)$ componenti ortogonali, ciascuna distribuita come un χ^2 con 1 df.

$$H = \frac{\psi_1^2}{\text{Var}(\psi_1)} + \frac{\psi_2^2}{\text{Var}(\psi_2)} + \dots + \frac{\psi_{k-1}^2}{\text{Var}(\psi_{k-1})} \sim \chi_{k-1}^2$$

dove

$\psi_1, \psi_2, \dots, \psi_{k-1}$ ortogonali

$$\psi_i = \sum_{l=1}^k a_{il} \bar{R}_l$$

$$\text{Var}(\psi_i) = \frac{N \cdot (N-1)}{12} \sum_{l=1}^k \frac{a_{il}^2}{n_l}$$

$$\sum_{l=1}^k a_{il} = 0$$

In particolare, ciascuna componente

$$Z_i^2 = \frac{\psi_i^2}{\text{Var}(\psi_i)} \sim \chi_1^2$$

La scomposizione ortogonale funziona perfettamente (nel senso che la somma delle singole componenti coincide con il valore complessivo di H) solo nel caso in cui il disegno sia bilanciato, cioè il numero delle unità statistiche nei singoli sottogruppi sia costante.

ESEMPIO

Riprendiamo l'esempio del paragrafo 2.4.2.. La tabella dei ranghi corrispondenti ai dati dell'esempio è la seguente:

A ₁			A ₂			A ₃		
B ₁	B ₂	B ₃	B ₁	B ₂	B ₃	B ₁	B ₂	B ₃
7	36	28	17	23	9.5	4.5	32	33.5
20	25	15.5	4.5	31	12	2	29.5	43
27	8	14	29.5	12	25	1	42	44
15.5	12	39	9.5	18.5	38	18.5	25	41
33.5	35	40	21.5	6	37	3	21.5	45
20.06	23.20	27.30	16.40	18.10	24.30	5.80	30.00	41.30

Per applicare la scomposizione ortogonale del χ^2 si possono utilizzare i seguenti coefficienti

Confronti	A ₁			A ₂			A ₃		
	B ₁	B ₂	B ₃	B ₁	B ₂	B ₃	B ₁	B ₂	B ₃
(1) A: A ₁ vs (A ₂ +A ₃)	-2	-2	-2	+1	+1	+1	+1	+1	+1
(2) A: A ₂ vs A ₃	0	0	0	-1	-1	-1	+1	+1	+1
(3) B: B ₁ vs (B ₂ +B ₃)	-2	+1	+1	-2	+1	+1	-2	+1	+1
(4) B: B ₂ vs B ₃	0	-1	+1	0	-1	+1	0	-1	+1
(5) AB: (1) · (3)	+4	-2	-2	-2	+1	+1	-2	+1	+1
(6) AB: (1) · (4)	0	+2	-2	0	-1	+1	0	-1	+1
(7) AB: (2) · (3)	0	0	0	+2	-1	-1	-2	+1	+1
(8) AB: (2) · (4)	0	0	0	0	+1	-1	0	-1	+1

Si calcolano quindi le quantità ψ_i , $\text{Var}(\psi_i)$ e $\psi_i^2/\text{Var}(\psi_i)$, ottenendo la seguente tabella:

Confronti	ψ_i	$\text{Var}(\psi_i)$	$\psi_i^2/\text{Var}(\psi_i)$
-----------	----------	----------------------	-------------------------------

(1)	-5.22	621	0.04
(2)	18.30	207	1.62

$$A: \chi_2^2 = 1.66 \quad p = 0.4360$$

(3)	79.68	621	10.22
(4)	21.60	207	2.25

$$p = 0.0014$$

$$B: \chi_2^2 = 12.47 \quad p = 0.0020$$

(5)	48.54	1242	1.90
(6)	9.30	414	0.21
(7)	50.10	414	6.06
(8)	5.10	138	0.19

$$p = 0.0138$$

$$AB: \chi_4^2 = 8.36 \quad p = 0.0792$$

Come si può vedere dalla tabella sopra riportata, l'effetto principale della *challenge* farmacologica risulta significativo ($p=0.0020$), ed è dovuto ad una differenza ($p=0.0014$) fra gli animali trattati con soluzione fisiologica (B_1) e gli animali trattati con scopolamina a qualunque dosaggio (B_2 e B_3). Quando si consideri invece l'interazione della *challenge* farmacologica con il fattore neurotrofico, si può notare che essa si avvicina alla significatività ($p=0.0792$). In particolare, osservando i singoli confronti, si può vedere che la differenza tra soluzione fisiologica da un lato e scopolamina dall'altro è più evidente negli animali trattati con NGF che negli animali trattati con citocromo ($p=0.0138$).

Se compariamo questi risultati con quelli dell'analisi della varianza parametrica (v. § 2.4.2.), possiamo vedere che essi sono coerenti (effetto principale del fattore B e interazione AB significativi), sebbene con il metodo non parametrico il livello di significatività dell'interazione si riduca ($p=0.0792$ vs $p=0.0028$). Il metodo parametrico è infatti più potente quando gli assunti su cui poggia (di normalità e di omogeneità della varianza) sono rispettati. Occorre tener presente, però, che in caso di violazione di tali assunti il metodo non parametrico è l'unico che si possa correttamente applicare.

2.7.4. Confronti multipli

Il metodo più semplice da utilizzare (anche se piuttosto conservativo) consiste nell'applicare il test di Mann-Whitney su tutti i confronti di interesse, applicando la correzione del Bonferroni per controllare l'aumento della probabilità di errore di I tipo.

3. DISEGNO A BLOCCHI RANDOMIZZATI (Maria Patrizia Carrieri, Maria Puopolo, Flavia Chiarotti)

3.1. DEFINIZIONE

Si definisce disegno a blocchi randomizzati (DBR) un disegno in cui le unità sperimentali siano raggruppate in blocchi, e i trattamenti (livelli di un fattore) siano assegnati casualmente (randomizzati) all'interno di ogni blocco. I blocchi sono formati sotto l'assunto che le unità all'interno di ogni blocco siano più omogenee nella risposta, in assenza di trattamento, che non unità selezionate in modo completamente casuale.

Quando si organizza perciò un Disegno a Blocchi Randomizzati?

Quando nel materiale sottoposto all'esperimento o nelle circostanze dell'esperimento si intraveda una "ripartizione" in classi omogenee (blocchi).

ESEMPI

- a) Quando nel materiale si identificano categorie che possono presentare differenze sistematiche (blocco = nidiata, razza, sesso, peso corporeo ...)
- b) Quando non è possibile, durante il corso dell'esperimento, mantenere costanti le condizioni sperimentali (blocco = giorno di calendario, parte della giornata - mattina o pomeriggio - in cui viene svolto l'esperimento ...)
- c) Quando i dati sono insufficienti ed è necessario ripetere l'esperimento su ulteriori unità (blocco = replicazione)
- d) Quando controllo (placebo) e trattamento sono sperimentati sullo stesso individuo, ad esempio negli esperimenti di tipo prima-dopo o per emiparti (blocco = soggetto)

Condizione necessaria e sufficiente affinché un disegno a blocchi randomizzati sia efficiente è che la VARIABILITÀ TRA BLOCCHI sia SUPERIORE alla VARIABILITÀ ENTRO BLOCCHI (condizione di omogeneità entro blocco).

Se questa condizione non è verificata, è preferibile adottare un disegno completamente randomizzato.

La configurazione di un disegno a blocchi randomizzati può essere rappresentata con il seguente schema:

Blocco	Trattamenti			
I	T ₁	T ₂	T ₃	...
II	T ₃	T ₁
III
IV
V
VI	T ₄

Occorre notare che i trattamenti vengono randomizzati entro ciascun blocco.

In genere si dice che il fattore BLOCCO è un fattore ad EFFETTI CASUALI, mentre il fattore TRATTAMENTO è un fattore ad EFFETTI FISSI. In particolare:

- il FATTORE AD EFFETTI FISSI è un fattore per il quale lo sperimentatore stabilisce sia il numero che il tipo di livelli (tutti i livelli di interesse vengono esaminati; v. pag. 3);
- il FATTORE AD EFFETTI CASUALI è un fattore per il quale lo sperimentatore stabilisce il numero di livelli ma non è in grado di stabilirne il tipo (è costituito da un campione casuale di livelli).

Il modello che ne consegue è un MODELLO AD EFFETTI MISTI.

Riprendiamo il caso di un disegno completamente randomizzato (con gruppi di uguale numerosità n); per tale disegno il modello risultava essere

$$x_{il} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{il} \quad (i=1, \dots, p; l=1, \dots, n)$$

essendo p il numero di trattamenti (livelli del fattore) ed n la numerosità di ciascun gruppo di trattamento.

A questo modello corrispondeva la seguente scomposizione delle devianze (SS) e dei gradi di libertà (df)

$$SS_{Tot} = SS_A + SS_{Res} \quad N-1 = (p-1) + (N-p).$$

$$\text{Per } N = np \text{ si ha} \quad np-1 = (p-1) + (np-p) = (p-1) + p(n-1)$$

Dividendo le devianze per i corrispondenti df, si ottenevano le varianze (MS).

I valori attesi delle varianze risultavano

Fonte di variazione	Valori attesi dei MS
Fattore A	$\sigma_\epsilon^2 + n\sigma_\alpha^2$
Residuo	σ_ϵ^2

Quanto più i trattamenti sono simili, tanto più SS_A tende ad essere piccola.

Ciò comporta che

$$F = \frac{F_A}{F_{Res}}$$

Se $MS_A \approx MS_{Res} \Rightarrow F$ non significativa

3.2. UN SOLO FATTORE A p LIVELLI CON UNA SOLA OSSERVAZIONE PER CELLA

3.2.1. Modello sperimentale e scomposizione della devianza

Nel disegno a blocchi randomizzati con una sola osservazione per cella, ogni valore rilevato sulle unità sperimentali è composto da tutte le fonti di variabilità che lo hanno determinato e che sono:

- effetto medio generale;
- effetto del blocco;
- effetto del trattamento (livello del fattore);
- effetto dell'interazione blocco \times trattamento;
- effetto attribuibile ad altre variabili che non è possibile controllare (per esempio, condizioni ambientali).

Quindi per confrontare le medie nei diversi livelli di un trattamento e valutare perciò l'effetto del trattamento è necessario tener conto di tutte queste fonti di variabilità.

Il modello sperimentale che ne deriva è

$$x_{lh} = \mu + \pi_l + \gamma_h + \pi\gamma_{lh} + \epsilon_{lh} \quad l=1, \dots, n; h=1, \dots, r$$

dove n è il numero di blocchi e r il numero di trattamenti (di livelli del fattore di trattamento in studio).

L'interpretazione del modello è la seguente

μ	media generale (costante);
π_l	effetto (casuale) del livello l -mo del blocco P;
γ_h	effetto del livello h -mo del fattore C, uguale a $\mu_{.h} - \mu$ (costante all'interno di ogni trattamento);
$\pi\gamma_{lh}$	effetto (casuale) dell'interazione dei livelli l -mo di P e h -mo di C;
ϵ_{lh}	residuo associato a x_{lh} , che comprende tutti gli effetti non dovuti ai fattori considerati.

I valori dei parametri μ e γ_h , nonché delle varianze di π_l , $\pi\gamma_{lh}$ e ϵ_{lh} sono sconosciuti, ma possono essere stimati dai dati campionari:

parametro		stima campionaria	
μ	livello di base	$\bar{x}_{..}$	media generale
γ_h	variazione sul livello di base attribuibile al trattamento h -mo	$\bar{x}_{.h} - \bar{x}_{..}$	$\bar{x}_{.h}$ media delle osservazioni nel trattamento h -mo
π_l	variabili casuali indipendenti $\sim N(0, \sigma_P^2)$	$SS_P / [r(n-1)]$	
$\pi\gamma_{lh}$	variabili casuali indipendenti $\sim N(0, \sigma_{CP}^2)$	$SS_{CP} / [(r-1)(n-1)]$	
ϵ_{lh}	variabili casuali indipendenti $\sim N(0, \sigma_e^2)$	non stimabile nel caso di una sola osservazione per cella	

Le assunzioni alla base del modello ad effetti misti nel disegno a blocchi randomizzati sono:

- l'equazione del modello $x_{lh} = \mu + \pi_l + \gamma_h + \pi\gamma_{lh} + \epsilon_{lh}$ ($l=1, \dots, n; h=1, \dots, r$) esprime la somma di tutte le fonti di variazione che influenzano x_{lh} ;
- l'esperimento contiene tutti i livelli di interesse del fattore ad effetti fissi e un campione di livelli del fattore ad effetti casuali;
- i residui ϵ_{lh} debbono soddisfare le stesse assunzioni che valgono nel caso di un disegno completamente randomizzato.

L'ipotesi che si vuole verificare è

$H_0: \gamma_1 = \dots = \gamma_r = 0$ non c'è né aumento né diminuzione rispetto alla media generale in nessuno dei gruppi di osservazioni nei diversi livelli del fattore

ossia

$H_0: \mu_1 = \dots = \mu_r$ il livello medio della risposta non varia al variare del livello del fattore.

Le ipotesi riguardanti l'effetto del blocco o dell'interazione blocco \times trattamento non possono essere verificate con una sola osservazione per cella.

In un disegno così strutturato, con una sola osservazione per cella, si ha quindi la seguente scomposizione delle devianze e dei gradi di libertà

$$SS_{Tot} = SS_P + SS_C + SS_{CP} \quad nr-1 = (n-1) + (r-1) + (n-1)(r-1)$$

Da ciò risulta

$$MS_{Tot} = SS_{Tot}/(nr-1); \quad MS_P = SS_P/(n-1); \quad MS_C = SS_C/(r-1); \quad MS_{CP} = SS_{CP}/[(n-1)(r-1)]$$

3.2.2. Analisi della varianza

Per comprendere quale sia l'appropriato termine d'errore per $MS_C = SS_C/(r-1)$, occorre osservare la tabella dei valori attesi dei MS:

Fonte di variazione	Valori attesi dei MS
Blocco (P)	$\sigma^2_\epsilon + r\sigma^2_\pi$
Fattore (C)	$\sigma^2_\epsilon + \sigma^2_{\gamma\pi} + n\sigma^2_\gamma$
Fattore \times Blocco (CP)	$\sigma^2_\epsilon + \sigma^2_{\gamma\pi}$

Come si può vedere, MS_{CP} è un appropriato termine d'errore per MS_C .

Ne risulta la seguente tabella dell'ANOVA:

Fonte di variazione	df	MS	F
Blocco	n-1	MS_P	
Fattore	r-1	MS_C	MS_C/MS_{CP}
Fattore \times Blocco	(r-1)(n-1)	MS_{CP}	

Quanto più $MS_C \approx MS_{CP}$, tanto più la differenza tra trattamenti rientra nell'errore accidentale.

Come abbiamo detto, nel caso di una sola osservazione per cella, non è possibile stimare la varianza entro cella, cioè non è possibile stimare un appropriato termine d'errore per il Blocco né per l'interazione Fattore \times Blocco. Non è quindi possibile valutare né l'effetto del Blocco, né l'effetto dell'interazione Fattore \times Blocco.

MS_{CP} rappresenta la varianza residua dopo che sono state eliminate le differenze tra livelli del fattore C e tra blocchi P.

ESEMPIO

Consideriamo un esperimento che preveda la somministrazione di tre diversi trattamenti (salina, anfetamina a dose bassa e anfetamina a dose alta) a 18 piccoli di topo, appartenenti a 6 diverse nidiate (tre piccoli per ogni nidiate). La variabile risposta sia il numero di attraversamenti in un test di *open-field* in un intervallo di tempo prefissato. Sia la seguente tabella dei dati:

Blocco (Nidiata)	Fattore C			Totale
	Salina	Anfetam 1	Anfetam 2	
I	60	82	94	236
II	44	48	67	159
III	28	32	45	105
IV	59	75	70	204
V	45	50	50	145
VI	52	80	82	214
Totale	288	367	408	1063

Per eseguire l'analisi della varianza occorre calcolare le seguenti quantità:

$$\text{Termine di correzione} = (1063)^2/18 = 62776$$

$$SS_{\text{Tot}} = (60^2 + 44^2 + \dots + 50^2 + 82^2) - 62776 = 68581 - 62776 = 5805$$

$$SS_C = (288^2 + 367^2 + 408^2)/6 - 62776 = 64016 - 62776 = 1240 \quad df = 2$$

$$SS_P = (236^2 + \dots + 214^2)/3 - 62776 = 66813 - 62776 = 4037 \quad df = 5$$

$$SS_{\text{Res}} = SS_{\text{CP}} = 68581 - 64016 - 66813 + 62776 = 528 \quad df = 10$$

Ne risulta la seguente tabella dell'ANOVA:

Fonte di variazione	SS	df	MS	F	p
Blocco P	4037	5	807		
Fattore C	1240	2	620	620/53 = 11.7	0.0049
Residuo (CP)	528	10	53		

Come si può vedere dalla tabella, vi è una differenza statisticamente significativa

($p < 0.005$) tra le medie nei diversi gruppi di trattamento. Il trattamento in studio, cioè, ha un effetto significativo sul numero di attraversamenti nel test di *open-field*.

3.2.3. Assunti per l'applicazione del test F

Nel disegno a blocchi randomizzati, oltre agli assunti di NORMALITÀ e di OMOSCHEDASTICITÀ (di cui si è già parlato a proposito dei disegni completamente randomizzati) deve essere anche verificato l'assunto di SFERICITÀ. Tale assunto sostituisce l'ipotesi di indipendenza tra le osservazioni, che viene a cadere per la presenza di correlazione tra le misure effettuate sulla stessa unità statistica (misure ripetute) o su unità statistiche appartenenti a uno stesso blocco (ad esempio, piccoli di una stessa nidiata).

Condizione necessaria e sufficiente affinché il rapporto MS_C/MS_{CP} sia effettivamente distribuito come una F con $(r-1)$ e $(r-1)(n-1)$ df, sotto l'ipotesi nulla di assenza di effetto del fattore C, è che valga la condizione di CIRCOLARITÀ, che si esprime come:

$$C^* \Sigma C^* = \lambda I \quad \text{dove}$$

- C^* = matrice dei coefficienti ortonormali che rappresentano H_0 ;
- Σ = matrice di varianze e covarianze;
- $\lambda > 0$ (costante);
- I = matrice identità.

La matrice dei coefficienti ortonormali viene costruita con riferimento all'ipotesi nulla H_0 che si vuole verificare.

ESEMPIO

Consideriamo un esperimento in cui piccoli di topo appartenenti a una stessa nidiata vengano sottoposti, a quattro differenti età, ad un test di piastra calda, per verificare se la sensibilità al dolore vari al variare dell'età del soggetto. Supponiamo di non poter sottoporre uno stesso topo al test per più di una volta (per la presenza di effetti legati allo stress, all'abituazione ecc.), e che si debbano quindi usare topi diversi (ma il più possibile simili fra loro per l'appartenenza alla stessa nidiata) alle diverse età.

L'ipotesi nulla complessiva

$$H_0: \mu_{.1} = \mu_{.2} = \mu_{.3} = \mu_{.4}$$

deve essere riformulata sulla base di confronti ortogonali. Trattandosi di verificare l'effetto dell'età, si possono scegliere ad esempio i tre confronti, fra loro ortogonali, che permettono di evidenziare la componente lineare, quadratica e cubica nell'analisi dell'andamento (*trend analysis*). Si può, cioè, riformulare H_0 nel modo seguente:

$$H_0 : \begin{cases} -3 \mu_1 - 1 \mu_2 + 1 \mu_3 + 3 \mu_4 = 0 & \text{componente lineare} = 0 \\ +1 \mu_1 - 1 \mu_2 - 1 \mu_3 + 1 \mu_4 = 0 & \text{componente quadratica} = 0 \\ -1 \mu_1 + 3 \mu_2 - 3 \mu_3 + 1 \mu_4 = 0 & \text{componente cubica} = 0 \end{cases}$$

A tale formulazione corrispondono

$$C' = \begin{bmatrix} -3 & -1 & +1 & +3 \\ +1 & -1 & -1 & +1 \\ -1 & +3 & -3 & +1 \end{bmatrix} \quad \mu = \begin{bmatrix} \mu_1 \\ \mu_2 \\ \mu_3 \\ \mu_4 \end{bmatrix} \quad O = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}$$

Usando la notazione matriciale, le ipotesi possono essere scritte sotto forma di

$$C' \cdot \mu = \underline{O}$$

La forma ortonormale della matrice C' si ottiene normalizzando i vettori riga

$$C'' = \begin{bmatrix} -0.67 & -0.22 & +0.22 & +0.67 \\ +0.50 & -0.50 & -0.50 & +0.50 \\ -0.22 & +0.67 & -0.67 & +0.22 \end{bmatrix}$$

Il risultato di questa procedura non è comunque influenzato dalla particolare matrice ortonormale scelta per verificare l'ipotesi nulla.

Se la condizione di circolarità non vale, la F è distorta positivamente.

Per correggere questa distorsione, occorre utilizzare come valore critico quello ricavato dalla distribuzione F con un numero ridotto di gradi di libertà.

I df debbono essere ridotti di un fattore pari a θ che varia tra $1/(r-1)$ (valore minimo) e 1 (caso in cui valga la circolarità).

Solitamente θ è ignoto; alcuni autori lo stimano dalla matrice di varianze e covarianze (Huynh-Feldt), anche se la stima è distorta.

Il test di sfericità fornisce indicazioni circa la possibilità che la F risulti distorta positivamente (questo test tende ad essere facilmente significativo). Il test di sfericità non è però potente con numerosità campionarie piccole. Con numerosità campionarie elevate, il test tende a essere significativo anche quando l'effetto della violazione

dell'assunto di circolarità sull'analisi della varianza sia trascurabile. In ogni caso, tale test è molto sensibile agli *outliers*.

Quando la F risulta distorta positivamente, si può procedere in questo modo:

- 1) Si calcola la F e si confronta con il valore critico della F (F_*) con $(r-1)$ e $(r-1)(n-1)$ df.

Se $F \leq F_*$ la F non è significativa
 Se $F > F_*$ passare al caso 2)

- 2) Si stima θ (conservative F, Geisser-Greenhouse; Caso più estremo: $\theta = 1/(r-1)$)

Si confronta F con il valore critico per $(r-1)\theta$ e $(r-1)(n-1)\theta$ df (cioè 1 e $(n-1)$ df)

Se $F \leq F_c$ passare al caso 3)
 Se $F > F_c$ esiste una differenza significativa

- 3) Si stima θ (adjusted F, Huynh-Feldt). Quindi si confronta il valore di F con il valore critico per $(r-1)\theta$ e $(r-1)(n-1)\theta$ df.

Se $F \leq F_a$ la F non è significativa
 Se $F > F_a$ esiste una differenza significativa

In conclusione

Se $F \leq F_* \leq F_a \leq F_c$ La F non è significativa

Se $F > F_c \geq F_a \geq F_*$ oppure, a maggior ragione,
 Se $F > F_c \geq F_a \geq F_*$ La F è significativa

3.3. UN SOLO FATTORE A 2 LIVELLI

3.3.1. Test t di Student per gruppi appaiati

Supponiamo di voler analizzare un disegno sperimentale, che preveda la rilevazione di una variabile risposta su n blocchi indipendenti, ciascuno sottoposto a due diversi trattamenti. In questa situazione si può applicare il test t di Student per campioni appaiati, il cui risultato coincide con quello dell'analisi della varianza per blocchi

randomizzati mostrata in precedenza.

Sia n la numerosità dei blocchi sottoposti ai trattamenti C_1 e C_2 , rispettivamente. Siano inoltre d_i le differenze tra le osservazioni sotto C_1 e sotto C_2 , e \bar{d} la media di tali differenze.

Siano l'ipotesi nulla e l'ipotesi alternativa

$$H_0: \delta = 0$$

$$H_1: \delta \neq 0$$

Per applicare il test t di Student, si costruisce la statistica del test

$$t = \frac{\bar{d}}{\sqrt{\frac{s^2}{n}}} = \frac{\bar{d}}{\frac{s}{\sqrt{n}}} \sim t_{n-1}$$

Si noti che

$$t_{n-1}^2 = F_{1,n-1}$$

ESEMPIO

Consideriamo il caso di 2 soli livelli del fattore ad effetti fissi, ad esempio una situazione in cui la variabile risposta (latenza al *licking* della zampa anteriore in un esperimento condotto su topi con la piastra calda a 52°) venga rilevata prima e dopo un periodo di isolamento di 5 settimane. I dati sono riportati nella tabella a pagina seguente.

Abbiamo

$$\bar{d} = \frac{32}{8} = 4$$

$$s = \sqrt{\frac{3^2 + 1^2 + \dots + 13^2 - \frac{32^2}{8}}{7}} = 4.31$$

$$t = \frac{\bar{d}}{\sqrt{\frac{s^2}{n}}} = \frac{4}{\frac{4.31}{\sqrt{8}}} = 2.62 \sim t_7 \quad p = 0.034$$

Dal risultato del test si deduce che la condizione di isolamento per 5 settimane produce un aumento significativo nella latenza al *licking* della zampa anteriore nel test di piastra calda a 52°.

Blocco (Topo)	Fattore		Differenza	Totale
	Prima	Dopo	Dopo-Prima	
I	17	20	3	37
II	6	7	1	13
III	10	9	-1	19
IV	14	18	4	32
V	5	10	5	15
VI	7	8	1	15
VII	11	17	6	28
VIII	18	31	13	49
Totale	88	120	32	208

Lo stesso disegno, come abbiamo detto, può essere analizzato con l'analisi della varianza per blocchi randomizzati, ottenendo:

$$\text{Termine di correzione} = 208^2/16 = 2704$$

$$SS_{\text{Tot}} = (17^2 + 6^2 + \dots + 17^2 + 31^2) - 2704 = 3408 - 2704 = 704$$

$$SS_C = (88^2 + 120^2)/8 - 2704 = 2768 - 2704 = 64 \quad \text{df} = 2-1 = 1$$

$$SS_P = (37^2 + 13^2 + \dots + 49^2)/2 - 2704 = 3279 - 2704 = 575 \quad \text{df} = 8-1 = 7$$

$$SS_{CP} = 3408 - 2768 - 3279 + 2704 = 65 \quad \text{df} = 1 \cdot 7 = 7$$

Ne risulta la seguente tabella dell'ANOVA:

Fonte di variazione	SS	df	MS	F	p
Blocco P	575	7	82.00		
Fattore C	64	1	64.00	6.89	0.034
Fattore \times Blocco	65	7	9.29		

Come si può notare, il valore della $F_{1,n-1}$ df è identico al valore di t_{n-1} elevato al quadrato; è, cioè, $2.62^2 = 6.89$.

3.3.2. Assunti per l'applicazione del test t

Per la corretta applicazione del test t di Student debbono essere rispettati gli assunti di NORMALITÀ della distribuzione delle differenze d_i e di INDIPENDENZA tra i blocchi (coppie di unità statistiche).

3.4. UN SOLO FATTORE A p LIVELLI CON PIÙ DI UNA OSSERVAZIONE PER CELLA

Nel disegno a blocchi randomizzati con più osservazioni per cella, il modello diventa:

$$x_{lhm} = \mu + \pi_l + \gamma_h + \pi\gamma_{lh} + \zeta_{m(lh)} + \epsilon_{lhm} \quad l=1,\dots,n; h=1,\dots,r; m=1,\dots,s$$