

Randomiseren kun je leren

Cathalijn HC Leenaars, Daphne Reijnen, Pieter Verbost

Centraal Dierenlaboratorium, Radboudumc, Nijmegen. Cathalijn.Leenars@radboudumc.nl

Belang van randomisatie

Randomiseren is het proces van op willekeurige wijze (dus op basis van toeval) samenstellen van onderzoeksgroepen. We randomiseren om groepen te krijgen die vergelijkbaar zijn in alle aspecten behalve de behandeling die we onderzoeken. Daarmee voorkomen we verschillen tussen de behandelgroepen die de resultaten van de proef kunnen vertekenen (bijvoorbeeld een vals positief resultaat of een groter dan werkelijk effect). Het klinkt niet spannend, maar is erg belangrijk om er voor te zorgen dat de resultaten van een experiment betrouwbaar zijn. Er zijn verschillende manieren om te randomiseren, we kunnen werken met een muntje of dobbelsteen, lootjes trekken uit een hoge hoed, gebruik maken van tabellen met willekeurige nummers, of de indeling in groepen bepalen met een (online) app zoals <https://www.random.org/sequences/>.

In het humane (klinische) onderzoek is randomiseren een vast onderdeel van de proefopzet (1). Omdat er grote verschillen zijn tussen mensen voor heel veel verschillende eigenschappen, is het bijna onmogelijk om overal op te letten en alle eigenschappen goed over de onderzoeksgroepen te verdelen zonder gebruik te maken van een toevalsproces. Een deel van die eigenschappen kan het onderzoek beïnvloeden. Onderzoeken waarin niet gerandomiseerd wordt, laten dan ook vaak een groter effect van een behandeling zien dan onderzoeken waarin dat wel wordt gedaan. Een voorbeeld: in een meta-analyse van 145 studies naar hartinfarcten in mensen werd een effect gezien in 8,8% van de goed uitgevoerde studies, terwijl er een effect werd gezien in 58,1% van de studies waarin niet was gerandomiseerd (2).

In de proefdierkunde wordt er vaak niet of onvoldoende gerandomiseerd. Soms hoor je van onderzoekers dat randomiseren bij proefdieren minder belangrijk zou zijn omdat proefdieren meer op elkaar lijken dan mensen; we werken veel met genetisch vrijwel identieke inteelt dieren en deze dieren zitten vanaf de geboorte bij de leverancier allemaal in dezelfde omgeving. Echter, de dieren zijn nooit helemaal gelijk. Daarbij is het onmogelijk om dezelfde persoon dezelfde handeling gelijktijdig bij twee verschillende dieren uit te laten voeren. Ook bij dieren laten onderzoeken waarin niet gerandomiseerd wordt vaak een groter effect zien dan de studies waarin het wel goed wordt gedaan (3,4). Het argument om niet te randomiseren deugt dus niet. »

Met de nieuwe wetgeving (Wod art 14c; 2010/63/EU, Art 27, 38 lid 3) is er vernieuwde aandacht voor de kwaliteit van dierproeven. Het is een belangrijke taak van de Instantie voor Dierenwelzijn om de kwaliteit van de opzet van dierproeven en daarmee de 3V's te bewaken. Daaronder valt toezien op de juiste wijze van randomiseren. Bij het schrijven van een werkprotocol is het al dan niet randomiseren in veel dierenlaboratoria een specifieke vraag. Omdat het zinvol is om goed te (kunnen) randomiseren is er ook (hernieuwde) aandacht voor het onderwijs; er waren bijvoorbeeld workshops over randomiseren op de Biotechnische Dagen en er is een specifiek college hierover in verschillende cursussen proefdierkunde (artikel 9). Bij het geven van dat college horen we regelmatig dat de onderzoekers ervan uitgaan dat randomisatie door de biotechnici wordt uitgevoerd. Wie het doet is een kwestie van goed afspreken tijdens de behandeling van het werkprotocol, maar het is natuurlijk super handig wanneer je als biotechnicus weet hoe het moet, want de dieren komen bij jou binnen.

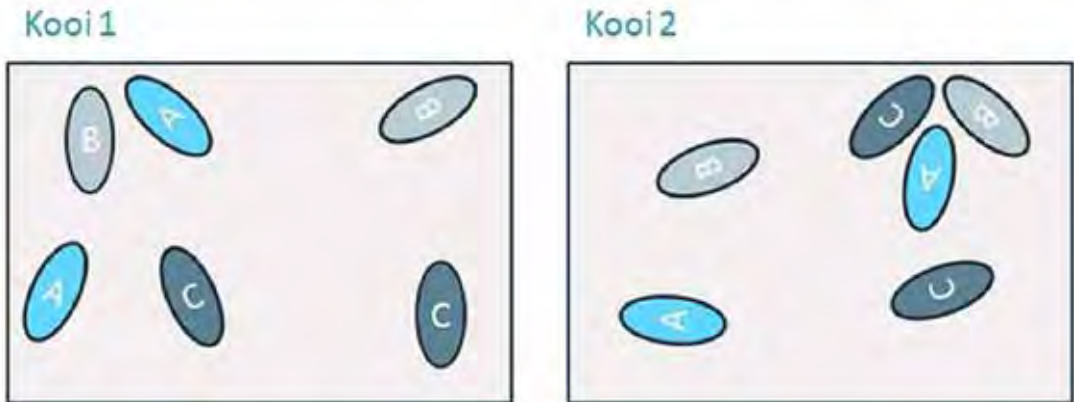
Randomiseren bij indeling van dieren in behandelgroepen

In de meeste gevallen randomiseren we individuele dieren. In sommige gevallen kunnen we beter groepen van dieren (bijvoorbeeld een nest) of delen van een dier (bijvoorbeeld stukken huidoppervlak) randomiseren; dit hangt samen met de meeteenheid die gebruikt wordt voor de statistische analyses.

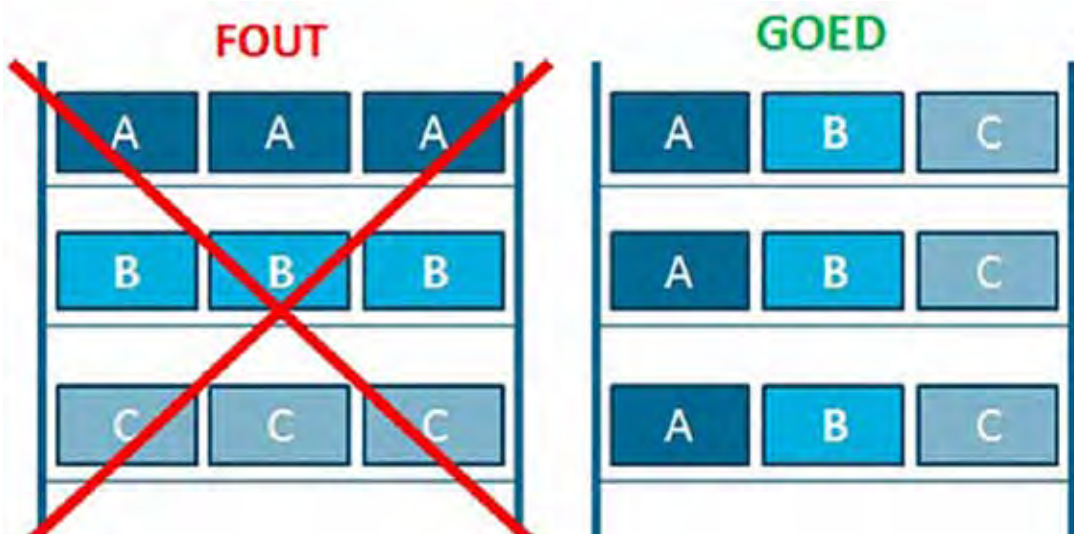
Bij het randomiseren kunnen met name bij kleine aantallen dieren juist door het toevalsproces verschillen tussen de behandelgroepen ontstaan in gewicht, vachtkleur, gedrag, corticosteroonniveau, enzovoorts. Een voorbeeld: de muizen met de grootste tumoren komen toevallig in een behandelgroep en de muizen met de kleinste tumoren in de controlegroep. Als het verschil niet uit maakt voor de proef is dat geen probleem. Maar als we een behandeling tegen de tumoren willen onderzoeken moet de gemiddelde tumorgrootte vergelijkbaar zijn voor de controle- en de behandelde groep.

Als alle dieren over alle groepen verdeeld mogen worden, kun je een eenvoudige randomisatie gebruiken. Hiervoor hoeven de dieren niet altijd vooraf genummerd te zijn; als je de dieren per groep gaat huisvesten kan je de volgorde waarin je ze uitpakt na transport gebruiken voor randomisatie van de groepsindeling, waarbij je een random nummerlijstje gebruikt waarmee bepaald is in welke bak ze geplaatst moeten worden. Als er een factor is (zoals tumorgrootte) die van invloed is op de uitkomsten van het experiment, wil je juist dat de dieren voor deze factor gelijkmatig over de groepen verdeeld zijn en gebruik je een blokrandomisatie. Voor een blokrandomisatie maak je eerst subgroepjes van bijvoorbeeld een bepaald gewicht of tumorgrootte; deze subgroepjes noemen we blokken. Vervolgens randomiseer je de dieren in ieder blok afzonderlijk over de verschillende behandelgroepen, waardoor evenveel dieren uit ieder blok in iedere behandelgroep komen.





Afbeelding 1: Ideale situatie; huisvesting van drie behandelgroepen (A, B en C) gemengd in alle kooien.



Afbeelding 2: Plaatsing van de kooien met één behandelgroep (A, B of C) per kooi volgens een Latijns vierkant.

Huisvesting

Idealiter heb je per kooi dieren van meerdere experimentele groepen, en hoef je niet over de plaatsing van de kooien na te denken (afb. 1). Echter, dit is niet altijd mogelijk, bijvoorbeeld als er risico is op contaminatie (proeven met pathogenen) of als er iets wordt toegediend via het voer of water. Als dieren per experimentele groep gehuisvest moeten worden, moeten de kooien eerlijk verdeeld worden over de stellingen. Dit kan op twee manieren worden gedaan. De eerste is met randomisatie. Een goed alternatief is plaatsing van de kooien volgens een Latijns vierkant. Het Latijns vierkant lijkt op een sudoku; de kooien staan in een blok over de stellingen verdeeld, waarbij alle behandelgroepen één keer in iedere rij en één keer in iedere kolom staan (afb. 2). Het nadeel van een Latijns vierkant is dat het voorspelbaar is; je kan raden welke kooien bij dezelfde behandelgroep horen. Als je de proef goed geblindeerd (geblindeerd wil zeggen dat de onderzoekers die de behandeling geven en de uitkomst meten niet weten welke behandeling een dier heeft gehad) uit kan voeren, kun je meestal beter randomiseren. >>

Meetvolgorde

Naast groepsindeling en huisvesting zijn er nog andere factoren die de uitkomst van de proef kunnen beïnvloeden. Denk hierbij bijvoorbeeld aan de volgorde en het tijdstip van behandelen en meten, en aan (onbewuste) beïnvloeding door de onderzoekers en biotechnici als ze weten in welke groep ieder dier zit als de proef niet geblindeerd wordt uitgevoerd. Als de behandeling en metingen niet (vrijwel) gelijktijdig kunnen worden uitgevoerd moet ook hierbij randomisatie worden toegepast voor het verkrijgen van betrouwbare resultaten. Een alternatief voor bijvoorbeeld de metingen kan zijn dat de eerste helft op volgorde (van dier 1 tot en met 8) wordt gedaan, en de tweede helft in omgekeerde volgorde (van dier 16 tot 9). Dit noemen we uitbalanceren. Ook voor het uitbalanceren geldt dat je dit van tevoren goed bedacht en vastgelegd moet hebben en het volgens plan uitvoert.

Alternatieven bij kleine groepsgrootte

Zoals eerder vermeld kunnen bij het randomiseren met name bij kleine aantallen dieren (/nesten / organen / ...) per groep verschillen tussen de groepen ontstaan. In het Engels noemt men dit randomisation failure. Met blokrandomisatie kunnen we dit voorkomen voor een enkel kenmerk (bijvoorbeeld tumorgrootte). Als we randomisation failure voor meerdere kenmerken tegelijk (bijvoorbeeld tumorgrootte EN lichaamsgewicht) willen voorkomen, is het bij kleine groepen soms handiger om een alternatieve methode te gebruiken om de groepen in te delen. We kunnen denken aan een groepsindeling gebaseerd op een Latijns vierkant of uitbalanceren. Bij deze alternatieven is het moeilijker om je proef goed geblindeerd uit te voeren, omdat je kan raden welke dieren samen in een behandelgroep zitten. Als de proef om een of andere reden niet geblindeerd uitgevoerd kan worden kunnen deze alternatieven in samenspraak met een statisticus worden overwogen.

Conclusie

Randomiseren bij de groepsindeling, de huisvesting en de meetvolgorde zijn erg belangrijk voor de betrouwbaarheid van de resultaten van een dierproef. Randomiseren is niet moeilijk, en kan op verschillende manieren worden uitgevoerd. Goede alternatieve methoden van indelen kunnen worden toegepast als de proef niet geblindeerd kan worden uitgevoerd.

Referenties

1. Schulz KF, Grimes DA (2002) *Generation of allocation sequences in randomised trials: chance, not choice*. Lancet 359(9305): 515-519
2. Chalmers TC, Celano P, Sacks HS, Smith H Jr. (1983) *Bias in treatment assignment in controlled clinical trials*. The New England Journal of Medicine 309(22): 1358-1361
3. Bebarta V, Luyten D, Heard K. (2003) *Emergency medicine animal research: does use of randomization and blinding affect the results?* Academic Emergency Medicine 10(6): 684-687
4. Macleod MR, van der Worp HB, Sena ES, Howells DW, Dirnagl U, Donnan GA (2008) *Evidence for the efficacy of NXY-059 in experimental focal cerebral ischaemia is confounded by study quality*. Stroke 39(10): 2824-2829

