

Chương 3

Một số khái niệm về thiết kế thí nghiệm

Thiết kế thí nghiệm là lập kế hoạch nghiên cứu nhằm tìm ra những vấn đề mới hoặc khẳng định lại hoặc bác bỏ kết quả của những nghiên cứu trước đó. Thông qua thí nghiệm, người nghiên cứu có thể tìm được câu trả lời cho một số vấn đề đặt ra hoặc rút ra được kết luận về một hiện tượng nào đó. Theo một nghĩa hẹp, thí nghiệm được thiết kế trong một môi trường quản lý nhằm nghiên cứu ảnh hưởng của một hay nhiều yếu tố lên các quan sát.

3.1. Phân loại thí nghiệm

Theo bản chất của thí nghiệm, các thí nghiệm có thể chia thành hai loại : 1) thí nghiệm **quan sát**, 2) thí nghiệm **thực nghiệm**. Trong phần thiết kế thí nghiệm của giáo trình này, chúng tôi sẽ tập trung vào các thí nghiệm thực nghiệm.

Trong chăn nuôi, thú y, các thí nghiệm thường tập trung vào 2 lĩnh vực : 1) các nghiên cứu trong thú y về tình hình dịch bệnh và các biện pháp phòng, điều trị bệnh ; 2) các nghiên cứu trong chăn nuôi về dinh dưỡng, năng suất và di truyền ở vật nuôi.

3.1.1. Thí nghiệm quan sát

Trong thí nghiệm **quan sát**, ta chỉ đơn thuần quan sát các động vật thí nghiệm và ghi lại các dữ liệu liên quan đến các tính trạng quan tâm. Chúng ta không tác động để can thiệp vào sự tồn tại của đối tượng quan sát. Trong loại thí nghiệm quan sát, các động vật không thể bố trí một cách ngẫu nhiên về các nghiệm thức.

Điều tra là một trường hợp đặc biệt của thí nghiệm quan sát. Trong điều tra, chúng ta tiến hành kiểm tra toàn bộ hoặc một nhóm động vật để tìm ra các giá trị của những tham số khác nhau trong quần thể. Điều tra có thể là một trong các trường hợp sau :

- 1) Điều tra quần thể - tiến hành kiểm tra tất cả các động vật trong quần thể
- 2) Điều tra mẫu - tiến hành kiểm tra những nhóm động vật đại diện và dựa vào kết quả điều tra ta có thể rút ra kết luận cho cả quần thể.

3.1.2. Thí nghiệm thực nghiệm

Trong thí nghiệm thực nghiệm, chúng ta can thiệp vào nghiên cứu bằng cách áp dụng các công thức thí nghiệm khác nhau lên các nhóm động vật nghiên cứu. Sau đó chúng ta tiến hành quan sát ảnh hưởng của các công thức thí nghiệm lên đối tượng nghiên cứu. Đối với loại thí nghiệm này, các động vật được bố trí một cách ngẫu nhiên đối với các công thức thí nghiệm trong quá trình thiết kế.

3.2. Một số khái niệm trong thiết kế thí nghiệm

3.2.1. Yếu tố thí nghiệm

Yếu tố thí nghiệm là một biến độc lập gồm hàng loạt các phần tử có chung một bản chất mà có thể so sánh trong quá trình thực hiện thí nghiệm. Ví dụ như một giống vật nuôi, kiểu gen Halothane ở lợn, hàm lượng protein trong khẩu phần, thuốc kháng sinh, vắc xin trong phòng và điều trị bệnh,...

Một thí nghiệm có thể có một hoặc nhiều yếu tố thí nghiệm và các yếu tố thí nghiệm này có thể là yếu tố cố định hoặc yếu tố ngẫu nhiên.

3.2.2. Mức

Các phần tử riêng biệt khác nhau trong cùng một yếu tố thí nghiệm được gọi là **mức**. Ví dụ ta có một yếu tố thí nghiệm là kiểu gen Halothane ở lợn thì ta sẽ có 3 phần tử khác nhau tương ứng với 3 kiểu gen (NN, Nn, nn) hay còn được gọi là **3 mức**. Hoặc khi nghiên cứu ảnh hưởng của protein đến sản lượng sữa bò ta có thể nghiên cứu ở 3 mức protein khác nhau. Trong thú y, các nhà nghiên cứu hiệu quả điều trị bệnh của các loại thuốc khác nhau; có thể coi mỗi loại thuốc tương đương với 1 mức.

3.2.3. Nghiệm thức (công thức thí nghiệm)

Một tổ hợp các mức của các nhân tố được gọi là một **nghiệm thức** hay công thức thí nghiệm. Ví dụ nghiên cứu ảnh hưởng của protein ở 3 mức khác nhau đến sản lượng sữa bò, trong trường hợp này ta sẽ có 3 công thức. Ta xét một hoàn cảnh tương tự nhưng có thêm yếu tố thứ 2 là thức ăn tinh ở 2 mức, lúc này sẽ có tất cả 6 công thức thí nghiệm.

3.2.4. Đơn vị thí nghiệm

Đơn vị thực hiện nhỏ nhất ứng với một công thức được gọi là **đơn vị thí nghiệm**. Đơn vị thí nghiệm trong chăn nuôi, thú y thường là từng động vật nhưng đôi khi là một nhóm động vật, ví dụ nghiên cứu tiêu tốn thức ăn đối với một kg tăng trọng, trong thực tế ta không thể theo dõi được lượng thức ăn thu nhận của từng vật nuôi mà ta chỉ biết được số thức ăn thu nhận được của một nhóm gồm nhiều cá thể khác nhau. Tức là từ một nhóm cá thể như vậy ta chỉ có một quan sát duy nhất, đây cũng chính là điều mà các nhà nghiên cứu cần phải chú ý.

3.2.5. Dữ liệu (số liệu)

Nếu đơn vị thí nghiệm là một cá thể thì sau khi cân, đo ta được một dữ liệu (data) hay một quan sát (observation). Nếu đơn vị là một nhóm gồm nhiều cá thể thì có thể cân, đo chung cho cả nhóm hoặc lấy một số cá thể nhất định trong nhóm để cân, đo sau đó suy ra một dữ liệu chung cho đơn vị thí nghiệm. Các số liệu của các nhóm có thể lưu trữ để đánh giá sai số của đơn vị thí nghiệm.

3.2.6. Khối

Tập hợp các đơn vị thí nghiệm có chung một hay nhiều đặc tính được gọi là **khối**.

3.2.7. Lặp lại

Mỗi công thức, trừ trường hợp đặc biệt, đều được lặp lại một số lần nhất định. Số lần lặp lại thường chọn bằng nhau vì nhìn chung, đối với nhiều mô hình, khi các lần lặp của các công thức bằng nhau có thể đưa ra các công thức tính khá thuận tiện và đơn giản. Nếu số lần lặp

không bằng nhau thì phải sử dụng cách tính theo mô hình hồi quy nhiều biến tổng quát khá phức tạp, kèm theo đó việc kiểm định các giả thiết, đặc biệt việc tính các kỳ vọng của các trung bình bình phương, cũng gặp rất nhiều khó khăn.

Trong thực tế, số lần lặp bằng nhau nhưng trong quá trình thí nghiệm ta ít khi thu thập được đầy đủ dữ liệu vì có một số động vật bị chết hoặc bị loại thải do không đáp ứng được các yêu cầu của thí nghiệm. Số lượng động vật thí nghiệm sống sót đến khi kết thúc thí nghiệm phụ thuộc vào từng loại thí nghiệm và loài vật nuôi khác nhau. Nếu mất ít dữ liệu, có thể tìm cách thay thế dữ liệu bị mất bằng tổ hợp của các dữ liệu còn lại theo một công thức cụ thể, kèm theo sự điều chỉnh của các bậc tự do tương ứng; ngược lại, phải coi như số lần lặp khác nhau và dùng mô hình hồi quy tổng quát.

3.2.8. Nhắc lại

Nhắc lại là làm lại thí nghiệm trong điều kiện tương tự có thể để kết luận đạt mức độ tin cậy.

3.2.9. Nhóm đôi chứng

Là nhóm động vật thí nghiệm được tạo ra trong quá trình bố trí thí nghiệm nhưng được nuôi dưỡng, chăm sóc trong điều kiện bình thường hiện có.

3.3. Các bước tiến hành thí nghiệm

Một thí nghiệm thường được bố trí và có thể mô tả qua các bước sau: 1) Đặt vấn đề, 2) Phát biểu giả thiết, 3) Mô tả thiết kế thí nghiệm, 4) Thực hiện thí nghiệm (thu thập số liệu), 5) Phân tích số liệu thu thập được từ thí nghiệm và 6) Giải thích kết quả liên quan đến giả thiết.

Lập kế hoạch cho một thí nghiệm bắt đầu bằng việc nêu lên những vấn đề cấp thiết; bên cạnh đó là tập hợp các tài liệu liên quan bao gồm cả những nghiên cứu trước đó; tiếp đến là nêu lên hướng giải quyết vấn đề. Sau những vấn đề vừa nêu, mục đích nghiên cứu được xác định. Mục đích nghiên cứu phải rõ ràng bởi vì các bước tiếp theo trong quá trình thiết kế thí nghiệm đều phụ thuộc vào mục đích đặt ra.

Bước tiếp theo là xác định nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu. Thiết kế thí nghiệm phải mô tả số liệu được thu thập như thế nào. Số liệu có thể thu thập từ các nghiên cứu quan sát từ các quá trình tự nhiên hoặc từ các thí nghiệm được bố trí trong môi trường thí nghiệm. Nếu chúng ta biết thông tin nào được thu thập và bằng cách nào sẽ được sử dụng để thu thập các số liệu này, thì việc rút ra kết luận sẽ dễ dàng và hiệu quả hơn rất nhiều. Điều này đúng với cả thí nghiệm quan sát và thí nghiệm thực nghiệm; đồng thời cũng rất quan trọng để phát hiện ra những thông tin bất ngờ dẫn đến những kết luận mới.

Đối với các nhà thống kê, thiết kế thí nghiệm là đặt ra các tiêu chuẩn để sử dụng khi chọn mẫu. Đối với thí nghiệm thực nghiệm việc thiết kế thí nghiệm bao gồm: xác định các nghiệm thức, xác định các đơn vị thí nghiệm, số lần lặp lại, việc bố trí các đơn vị vào các nghiệm thức, các sai số thí nghiệm có thể mắc phải.

Giả thiết thống kê thường đi theo sau giả thiết nghiên cứu. Chấp nhận hay bác bỏ giả thiết thống kê giúp tìm được câu trả lời cho mục đích nghiên cứu. Trong kiểm định giả thiết các nhà thống kê sử dụng mô hình thống kê. Mô hình thống kê theo sau mô hình thí nghiệm thường được giải thích với các công thức toán học.

Thu thập số liệu được thực hiện theo thiết kế mô hình thiết kế thí nghiệm. Phân tích thống kê được tiến hành sau khi thu thập được số liệu bao gồm phân tích, miêu tả và giải thích kết quả.

Mô hình sử dụng trong phân tích được xây dựng dựa trên mục đích và mô hình thí nghiệm. Thông thường cách phân tích số liệu được xác định trước khi thu thập số liệu ; đôi khi lại được xác định sau khi thu thập số liệu nếu người nghiên cứu tìm được một cách tốt hơn để rút ra kết luận hoặc xác định được một khía cạnh mới liên quan đến vấn đề nghiên cứu.

Cuối cùng, người nghiên cứu phải có khả năng rút ra kết luận để hoàn thiện mục tiêu nghiên cứu. Kết luận phải rõ ràng và chính xác. Người nghiên cứu phải thảo luận các ứng dụng vào thực tế của nghiên cứu đồng thời nêu ra những khả năng đặt ra trong tương lai liên quan đến vấn đề tương tự.

3.4. Sai số thí nghiệm

Bản chất của vật liệu sinh học là sự biến động. Toàn bộ sự biến động này có thể phân chia thành phần biến động có thể giải thích được và không giải thích được. Mỗi đơn vị thí nghiệm (y_{ij}) có thể được biểu diễn như sau :

$$y_{ij} = \mu_i + e_{ij}$$

Trong đó, μ là giá trị ước tính miêu tả sự ảnh hưởng giải thích được của nhóm thứ i và e_{ij} ảnh hưởng không giải thích được. Vì vậy, các quan sát (y_{ij}) khác nhau nguyên nhân là do ảnh hưởng giải thích được của các nhóm (i) khác nhau và các ảnh hưởng không giải thích được (e_{ij}) khác nhau. Ước tính μ_i được giải thích do ảnh hưởng của nhóm i , nhưng sự khác nhau giữa các đơn vị thí nghiệm trong cùng một nhóm thì không thể giải thích được. Biến động này thường được gọi là sai số thí nghiệm.

Sai số thí nghiệm có thể bao gồm 2 dạng sau đây : sai số ngẫu nhiên và sai số hệ thống. Sai số hệ thống là các ảnh hưởng nhất định làm lệch các giá trị đo được trong một nghiên cứu. Sai số này có thể xuất phát từ sự thiếu đồng nhất trong quá trình thực hiện thí nghiệm, có thể do dụng cụ thí nghiệm không được hiệu chỉnh, do ảnh hưởng của nhiệt độ không ổn định, do thiên lệch trong quá trình sử dụng thiết bị. Nếu sự thiên lệch này được phát hiện thì hiệu chỉnh là biện pháp hiệu quả nhất. Chúng cũng đặc biệt khó giải quyết nếu không phát hiện được vì chúng ảnh hưởng lên các giá trị một cách có hệ thống nhưng không biết theo xu hướng nào.

Sai số ngẫu nhiên xuất hiện do các tác động ngẫu nhiên, không dự đoán được. Chúng tạo ra các biến động không giải thích được. Kỳ vọng của biến động này bằng 0 vì vậy khi có một loạt các quan sát thì các tính toán dựa vào trung bình sẽ không bị thiên lệch về một hướng. Trong sinh học luôn tồn tại sai số ngẫu nhiên ví dụ trong chăn nuôi, các động vật khi đo hay phân tích một chỉ tiêu nào đó, luôn cho các kết quả khác nhau tuy có thể không lớn lắm.

Để giảm được sai số có hệ thống và sự thiên lệch ta xem xét 2 giải pháp sau đây:

- 1) Bố trí động vật vào các nghiệm thức và
- 2) Phương pháp làm mù

3.5. Bố trí động vật vào các nghiệm thức

3.5.1. Sự cần thiết của phân chia ngẫu nhiên

Sự thiên lệch có thể xuất hiện trong quá trình phân chia động vật vào các nghiệm thức. Sự thiên lệch này có thể do yếu tố chủ quan. Ví dụ chúng ta phân chia các động vật vào các nghiệm thức theo sở thích chủ quan (thích nghiệm thức nào thì bố trí các động vật ‘tốt ‘,

không thích thì bố trí động xâu') hoặc có sự khác nhau có hệ thống giữa nhóm đối chứng và nhóm thí nghiệm, lúc đó chúng ta không thể kết luận được sự sai khác sau khi thực hiện thí nghiệm là do ảnh hưởng của nghiệm thức hay do sự khác nhau có hệ thống.

Một phương pháp tiếp cận hay được sử dụng để loại bỏ sự thiên lệch này là bố trí ngẫu nhiên hay còn gọi là ngẫu nhiên hoá các động vật thí nghiệm vào các nghiệm thức. Trong quá trình bố trí chúng ta phân động vật vào các nghiệm thức với các yêu cầu sau :

- a) Tất cả các động vật thí nghiệm đều có cơ hội nhận được một nghiệm thức bất kỳ.
- b) Việc bố trí động vật vào nghiệm thức này không ảnh hưởng đến việc bố trí động vật vào nghiệm thức khác.
- c) Chúng ta không biết trước nghiệm thức mà từng động vật được phân vào.

Ngẫu nhiên hoá có một số ưu điểm sau :

- a) Loại bỏ được sự thiên lệch trong quá trình bố trí động vật thí nghiệm
- b) Tạo được sự giống nhau giữa các nhóm

3.5.2. Các phương pháp phân chia ngẫu nhiên

Tốt nhất là tránh sử dụng các phương pháp cơ học như tung đồng xu hoặc ném con súc sắc để bố trí động vật về các nghiệm thức. Mặc dù các phương pháp này về mặt xác suất vẫn được chấp nhận để tạo ra sự ngẫu nhiên, nhưng nó công kênh và không kiểm tra được. Thông thường, bảng số ngẫu nhiên được sử dụng để phân động vật về với nghiệm thức. Ngoài ra ta có thể sử dụng máy tính để tạo ra các số ngẫu nhiên. Khi thiết kế thí nghiệm, số đơn vị thí nghiệm thường bằng nhau ở các nghiệm thức.

a) Phân chia ngẫu nhiên đơn giản

Đây là cách ngẫu nhiên hoá cơ bản không có sự phân biệt hoặc hạn chế. Ví dụ tiến hành phân 12 động vật thí nghiệm được đánh số từ 1 đến 12 về 2 công thức thí nghiệm (đối chứng - C và thí nghiệm - T). Tiến hành chọn số ngẫu nhiên từ bảng số ngẫu nhiên phân phụ lục. Giả sử ta lấy 10 số có 1 chữ số ở hàng đầu tiên ; như vậy ta sẽ được dãy số ngẫu nhiên sau 813766407765. Nếu số ngẫu nhiên là số chẵn động vật sẽ phân về với C và số lẻ về với T.

Đơn vị thí nghiệm số	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Số ngẫu nhiên	8	1	3	7	6	6	4	0	7	7	6	5
Công thức	C	T	T	T	C	C	C	C	T	T	C	T

Có thể tiến hành các bước tương tự đối với thí nghiệm có số nghiệm thức nhiều hơn 2. Ví dụ có 3 nghiệm thức A, B và C, chọn các số 1-3, 4-6 và 7-9 tương ứng với các nghiệm thức và bỏ qua số 0. Tương tự như ví dụ trên ta có dãy số ngẫu nhiên 8137664077652 và kết quả thu được CAACBBBCCBBA. Trong trường hợp này, sự ngẫu nhiên đã không được tuân thủ vì có 3A, 5B và 4C. Cách phân chia ngẫu nhiên hạn chế được đưa ra nhằm khắc phục những hạn chế này.

b) Phân chia ngẫu nhiên theo khối

Phân chia ngẫu nhiên đơn giản dựa trên nguyên tắc tất cả các động vật tương đối đồng đều, mỗi động vật đều có cơ hội như nhau khi sắp vào một nghiệm thức. Tuy nhiên điều này không còn đúng khi dung lượng mẫu lớn. Căn cứ vào một tiêu chí lựa chọn cụ thể thí dụ lựa chọn theo lứa, theo tuổi, theo khối lượng, theo hành vi . . . chúng ta sẽ phân chia các động vật thành một số nhóm sao cho các động vật cùng nhóm tương đối đồng đều, sau đó mới chia ngẫu nhiên các động vật trong từng nhóm vào các nghiệm thức. Đây chính là cách *phân chia ngẫu nhiên theo khối*.

Ví dụ 3.1 : Nghiên cứu bệnh viêm khớp ở chó. Tạo ra 3 khối khác nhau tương ứng với 3 nhóm có khối lượng cơ thể **lớn, trung bình và nhỏ**. Như vậy sẽ biết được khối lượng cơ thể của động vật ảnh hưởng đến mức độ mắc bệnh của từng nghiệm thức. Tức là so sánh các nghiệm thức có đề cập đến khối lượng cơ thể.

c) Phân chia ngẫu nhiên hạn chế.

Nhìn chung, ta mong muốn có số đơn vị thí nghiệm bằng nhau ở các nghiệm thức. Kỹ thuật ngẫu nhiên đơn giản đã được sử dụng để đạt được điều này nếu dung lượng mẫu đủ lớn. Tuy nhiên chúng ta có thể gặp sự thiếu cân bằng khi dung lượng mẫu tương đối bé. Điều này đã được minh hoạ ở ví dụ phần *phân chia ngẫu nhiên đơn giản* với sự phân bố 3A, 5B và 4C. Có thể sử dụng kiểu *phân chia ngẫu nhiên hạn chế* để khắc phục những hạn chế này.

Ví dụ có 16 đơn vị thí nghiệm, cần chia về 4 nghiệm thức A, B, C và D. Ta sẽ chọn các số 1-2, 3-4, 5-6, 7-8 tương ứng với các nghiệm thức A, B và C và bỏ qua số 9 và 0. Tương tự ta có dãy số ngẫu nhiên 81376640776529997742 và kết quả DABDCCBDD. Như vậy đến số ngẫu nhiên thứ 9 đã có đủ 4 động vật về với nghiệm thức D. Các số ngẫu nhiên 7- 8 cũng sẽ bỏ qua vì đã đủ số lượng và đã có 1 động vật thí nghiệm về với A, 2 với B và 2 về với C. Tiếp theo ta sẽ có CC, ở số ngẫu nhiên thứ 11 đã đủ 4 đơn vị cho công thức C. Tương tự như vậy chắc chắn số đơn vị thí nghiệm ở các nghiệm thức bằng nhau.

Phân chia ngẫu nhiên theo khối thường được dùng kết hợp với phân chia ngẫu nhiên giới hạn.

d) Phân chia ngẫu nhiên theo nhóm (Cluster)

Thông thường, một động vật thí nghiệm được coi như một đơn vị thí nghiệm. Tuy nhiên trong chăn nuôi và thú y, thì một nhóm động vật cũng được coi như một đơn vị thí nghiệm. Bởi vì thức ăn, thuốc và vắc xin thường được sử dụng cho một nhóm động vật trong cùng một lứa, nuôi trong cùng một chuồng, một bãi hoặc được sử dụng cho cả đàn hay tất cả cá nuôi trong một bể. Trong trường hợp này, ta tiến hành sử dụng kỹ thuật ngẫu nhiên hoá cho cả nhóm động vật thí nghiệm hay còn gọi là *ngẫu nhiên hoá theo nhóm*. Như vậy tất cả động vật trong nhóm sẽ nhận được cùng một nghiệm thức sau đó cần phải tập hợp kết quả trên các nhóm để đánh giá ảnh hưởng của các nghiệm thức. Lưu ý rằng trong kiểu phân chia này một nhóm động vật chỉ được coi như một đơn vị thí nghiệm.

Ví dụ 3.2 : Nghiên cứu tiêu tốn thức ăn trên một kg tăng trọng đối với lợn nuôi vỗ béo. Về lý thuyết có thể tiến hành quan sát lượng thức ăn mà từng con lợn thu nhận hằng ngày ; nhưng về thực tế điều này rất khó thực hiện. Ta chỉ có thể quan sát được lượng thức ăn tiêu tốn trong một ô chuồng có nuôi khoảng 30 – 50 con và từ đây có thể tính được tiêu tốn thức ăn cho 1 kg tăng trọng. Ở đây 1 ô chuồng nuôi 30 -50 con được coi như một đơn vị thí nghiệm. Để có thể nghiên cứu được tiêu tốn thức ăn trên 1kg tăng trọng ta phải tiến hành thí nghiệm trên nhiều ô chuồng và phải bắt thăm ô chuồng nào áp dụng công thức thí nghiệm nào.

3.6. Phương pháp làm mù

Trong phần nêu trên ta đã dùng kỹ thuật bố trí động vật vào các công thức thí nghiệm bằng kỹ thuật ngẫu nhiên hoá để đảm bảo không có sự sai số có hệ thống. Tuy nhiên sự thiên lệch có thể xuất hiện do những định kiến của người trực tiếp thực hiện và người đánh giá. Để đảm bảo trong thí nghiệm không có sự thiên lệch như đã nêu trên ta sử dụng kỹ thuật làm mù. Có 2 kỹ thuật làm mù :

1) Kỹ thuật làm mù đơn và 2) Kỹ thuật làm mù kép.

Kỹ thuật làm mù kép là kỹ thuật mà cả người trực tiếp thực hiện và người và người đánh giá không biết các thông tin về thí nghiệm. Đối với kỹ thuật làm mù đơn, hoặc người trực tiếp thực hiện hoặc người đánh giá không biết các thông tin về thí nghiệm.

Để người trực tiếp thực hiện không thể phân biệt được sự khác nhau giữa nhóm đối chứng và thí nghiệm, có thể sử dụng những vật nộm, vật giả vờ (placebo). Placebo là những vật mà bề ngoài trong giống hệt vật thí nghiệm, chỉ khác nhau về bản chất. Placebo thường được dùng trong các nghiên cứu về thuốc.

3.7. Tăng độ chính xác của ước tính

3.7.1. Lặp lại

Nhìn chung, số lượng đơn vị thí nghiệm càng lớn thì độ chính xác của ước tính càng cao và càng có nhiều cơ hội để phát hiện được ảnh hưởng của nghiệm thức nếu nó tồn tại. Chi tiết về xác định dung lượng mẫu tối ưu được trình bày ở chương 4 và chương 5.

Lặp lại tức là tiến hành thu thập cùng một kiểu số liệu nhiều lần trên cùng một động vật hay cùng một đơn vị thí nghiệm. Bằng cách này ta có thể phân tách được biến động do sinh học gây ra hay do tác động của nghiệm thức.

3.7.2. Kỹ thuật khối

Có thể sử dụng kỹ thuật nhóm đơn vị thí nghiệm như một công cụ hỗ trợ để giảm biến động trong quá trình so sánh. Tạo ra các nhóm động vật (khối) tương đối đồng đều nhau, như vậy sự biến động ngẫu nhiên trong mỗi khối sẽ bé hơn giữa các khối. Tiến hành ngẫu nhiên hoá trong từng khối. Trong quá trình phân tích số liệu, có thể phân tách được sự biến động do nghiệm thức gây ra với biến động do khối gây ra. Với cách tiếp cận theo kỹ thuật khối ta sẽ có một ước tính chính xác hơn.

Đối với kỹ thuật khối có 2 mô hình thiết kế thí nghiệm : 1) khối ngẫu nhiên đầy đủ, khi trong mỗi khối bố trí đầy đủ tất cả các nghiệm thức và 2) khối ngẫu nhiên không đầy đủ, khi trong mỗi khối không có đầy đủ các nghiệm thức.

3.7.3. Kỹ thuật cặp (đôi).

Kỹ thuật cặp được đề cập khi ta xem xét trường hợp chỉ có 2 nghiệm thức (2 nhóm) và 2 nhóm này có mối liên hệ với nhau. Nếu các quan sát trong 2 nhóm tạo thành cặp hoặc một cá thể tham gia ở cả 2 nhóm thì các quan sát ở 2 nhóm phải bằng nhau. Với kỹ thuật cặp, so sánh các nghiệm thức với nhau được thực hiện trong từng cặp. Sự biến động trong từng cặp bao giờ cũng bé hơn giữa các cá thể không cùng cặp, như vậy ước tính sẽ chính xác hơn. Có các kiểu cặp như sau :

- 1) Cặp tự tạo - mỗi động vật tham gia cả 2 công thức thí nghiệm
- 2) Cặp tự nhiên - động vật sinh đôi hoặc nhân bản
- 3) Cặp nhân tạo – tạo ra cặp với các tiêu chí lựa chọn tương đối đồng nhất, ví dụ đồng nhất về tuổi, khối lượng, chỉ tiêu sinh lý, sinh hoá...

3.8. Dung lượng mẫu cần thiết

Cần bao nhiêu động vật thí nghiệm, bao nhiêu khối, bao nhiêu ô lớn, bao nhiêu ô nhỏ? Đây là một câu hỏi thực sự khó. Chúng ta xét một số cách tiếp cận sau:

Số động vật thí nghiệm phải đủ sao cho các đặc tính riêng biệt của từng cá thể không làm ảnh hưởng đến kết quả thí nghiệm. Nếu số động vật trong thí nghiệm quá ít thì độ tin cậy của kết quả thu được từ thí nghiệm sẽ không cao. Ngược lại, nếu số động vật quá nhiều thì có thể gây lãng phí. Để đạt được độ chính xác cao không phải lúc nào cũng cần số lượng động vật thí nghiệm quá lớn. Nếu quá nhiều động vật tham gia thí nghiệm thì có thể gây ra nhiều khó khăn trong quá trình theo dõi từng cá thể, khó khăn khi chúng ta muốn tạo ra các điều kiện đồng nhất của thí nghiệm cho mọi cá thể ví dụ như khi cho động vật ăn ... những khó khăn đó đã làm giảm độ chính xác về mặt kỹ thuật của thí nghiệm.

Dung lượng mẫu cần thiết còn phụ thuộc vào chất lượng của động vật tham gia thí nghiệm. Động vật tham gia thí nghiệm có độ đồng đều cao thì số lượng giảm xuống và ngược lại. Độ tuổi của vật nuôi cũng đóng vai trò quan trọng trong quá trình chọn dung lượng mẫu. Động vật càng non thì số lượng cần phải tăng lên và ngược lại, bởi vì đối với loại động vật này mức độ biến động rất lớn (cả về mặt sinh lý và ngoại hình). Ngoài ra, dung lượng mẫu còn phụ thuộc vào từng loại vật nuôi; mỗi loại vật nuôi có những đặc điểm riêng vì vậy trong quá trình thiết kế thí nghiệm cũng phải chú ý đến yếu tố này. Cuối cùng, kết quả mong đợi của thí nghiệm (sự chênh lệch giữa các công thức thí nghiệm) cũng ảnh hưởng rất nhiều đến dung lượng mẫu.

Có thể phác sơ qua các yếu tố ảnh hưởng đến dung lượng mẫu như sau:

Yếu tố ảnh hưởng	Dung lượng mẫu		
	ít	nhiều	
Biến động trong đàn	ít	nhiều	
Đối tượng nghiên cứu	đại gia súc	gia cầm	
Giai đoạn nghiên cứu	đầu	cuối	
Loại đề tài	thức ăn	giống	phòng bệnh
Phương tiện	bằng tay		có máy móc
Nhân lực và vật lực	hạn chế		nhiều

Trên đây là các tiêu chí để làm cơ sở quyết định chọn dung lượng mẫu. Bên cạnh đó, để xác định được số lượng động vật thí nghiệm cần thiết có thể dựa phải dựa vào các tiêu chí sau :

3.8.1. Số nghiệm thức

Cách tiếp cận thứ nhất để xác định được dung lượng mẫu cần thiết đó là dựa vào :

- 1) Số nghiệm thức (a)
- 2) Mức độ đồng đều của tính trạng cần nghiên cứu (σ^2)
- 3) Sai lầm loại I (α)
- 4) Sai lầm loại II (β) hoặc độ mạnh (lực lượng) của phép thử ($1 - \beta$)
- 5) Chênh lệch bé nhất giữa 2 giá trị trung bình bất kỳ để phát hiện sự sai khác nếu có (d)

Đối với trường hợp ước tính một giá trị trung bình

Dung lượng mẫu cần thiết để giá trị trung bình cộng ước tính khác μ không quá d khi có phân phối chuẩn $N(\mu, \sigma^2)$ và mức tin cậy $P = 1 - \alpha$ dựa vào công thức sau :

$$n \geq \frac{(z_{1-\alpha/2})^2 \times \sigma^2}{d^2}$$

Ví dụ 3.3: Cần quan sát bao nhiêu bò sữa để ước tính được năng suất trong chu kỳ tiết sữa 305 ngày với mức độ tin cậy 95% nằm trong khoảng ± 75 kg so với giá trị thực của quần thể. Biết rằng sản lượng sữa có phân bố chuẩn $\sigma = 500$ kg.

Cần thiết: $n \geq \frac{(z_{1-\alpha/2})^2 \times \sigma^2}{d^2} = \frac{1,96^2 \times 500^2}{75^2} = 170,74$

Như vậy cần ít nhất 171 bò sữa để thỏa mãn điều kiện bài toán.

Đối với trường hợp ước tính một tỷ lệ

Dung lượng mẫu cần thiết để tỷ lệ ước tính \hat{p} khác không quá d so với tỷ lệ thực π . Nếu biết tỷ lệ hiện hành p (prevalance) và kiểm định ở mức tin cậy $P = 1 - \alpha$ dựa vào công thức sau :

$$n \geq \frac{(z_{1-\alpha/2})^2 \times p(1-p)}{d^2}$$

Lưu ý: Tỷ lệ hiện hành p có thể tìm được thông qua các tài liệu, các nghiên cứu trước hoặc xuất phát từ kinh nghiệm và sự hiểu biết của người nghiên cứu. Nếu khi tiến hành thí nghiệm không có thông tin về tỷ lệ lưu hành, ta sẽ chọn $p = 0,5$. Khi đó

$$n \geq \frac{(z_{1-\alpha/2})^2}{4d^2}$$

Ví dụ 3.4: Cần dung lượng mẫu bao nhiêu để xác định tỷ lệ hiện nhiễm một loại vi khuẩn trên thân thịt lợn ở một lò mổ với ước tính chênh lệch không quá 5%. Biết rằng tỷ lệ hiện hành $p = 0,2$ và kiểm định ở mức tin cậy 95%.

Cần thiết $n \geq \frac{(z_{1-\alpha/2})^2 \times p(1-p)}{d^2} = \frac{1,96^2 \times 0,2 \times (1-0,2)}{0,05^2} = 245,86$

Như vậy cần khảo sát ít nhất 246 thân thịt.

Đối với trường hợp so sánh 2 giá trị trung bình

Dung lượng mẫu cần thiết (đối với mỗi nghiệm thức) để phát hiện được sự sai khác nếu chênh lệch giữa 2 giá trị trung bình là d , sai lầm loại I và loại II ở mức tương ứng là α và β . Giả sử số liệu có phân bố chuẩn. Phương sai của tính trạng nghiên cứu là σ^2 .

$$n \geq \frac{(z_{1-\alpha/2} + z_{1-\beta})^2}{d^2} 2\sigma^2$$

Ví dụ 3.5: Muốn thiết kế một thí nghiệm để so sánh sản lượng sữa của dê Bách Thảo ở 2 công thức thí nghiệm với yêu cầu $\alpha = 0,05$; $\beta = 0,2$; chênh lệch mong đợi 30 kg sữa biết $\sigma = 50$ kg.

$$\text{Cần thiết } n \geq \frac{(z_{1-\alpha/2} + z_{1-\beta})^2}{d^2} 2\sigma^2 = \frac{(1,96 + 0,84)^2}{30^2} 2(50)^2 \approx 43,55$$

Như vậy cần ít nhất 44 dê cho mỗi công thức thí nghiệm.

Đối với trường hợp so sánh hai tỷ lệ

Với các tiền cứu (Cohort studies), dung lượng mẫu cần thiết để so sánh 2 tỷ lệ là:

$$n_1 \geq \frac{1}{4} \frac{(z_{1-\alpha/2} \sqrt{(r+1)\bar{p}q} + z_{1-\beta} \sqrt{rp_1q_1 + p_1q_1})^2}{r(p_1 - p_2)^2} \times \left(1 + \sqrt{1 + \frac{2(r+1)}{\left(\frac{(z_{1-\alpha/2} \sqrt{(r+1)\bar{p}q} + z_{1-\beta} \sqrt{rp_1q_1 + p_1q_1})^2}{r(p_1 - p_2)^2} \right)^2}} \right)^2$$

Trong đó:

n_1 = dung lượng mẫu tối thiểu cần thiết cho nhóm thứ nhất (không phơi nhiễm)

n_2 = dung lượng mẫu tối thiểu cần thiết cho nhóm thứ hai (có phơi nhiễm)

$r = n_1 / n_2$

p_1 = tỷ lệ mắc bệnh hiện hành ở quần thể thứ 1

p_2 = tỷ lệ mắc bệnh dự đoán ở quần thể thứ 2

$\bar{p} = \frac{p_1 + rp_2}{r+1}$; $\bar{q} = 1 - \bar{p}$; $q = 1 - p$

$Z_{(1-\alpha/2)}$ = Giá trị z ở mức tương ứng $1-\alpha/2$ (α – xác suất mắc sai lầm loại I)

$Z_{(1-\beta)}$ = Giá trị z ở mức tương ứng $1-\beta$ (β – xác suất mắc sai lầm loại II)

Ví dụ 3.6: Một tiến cứu được tiến hành để nghiên cứu tỷ lệ tổn thương núm vú ở bò sữa giữa hệ thống vắt sữa tự động (A) và hệ thống bình tay (B). Thời gian nghiên cứu được tiến hành trong 12 tháng với dự đoán tỷ lệ tổn thương ở hệ thống B là 34,5% ($p_1 = 0,345$); $\alpha = 0,05$; $\beta = 0,20$; $n_1 = n_2$. Biết rằng tỷ lệ tổn thương ở hệ thống vắt sữa tự động là 15% ($p_2 = 0,15$). Hãy tính dung lượng mẫu cần thiết đối với một nhóm để thoả mãn điều kiện bài toán.

Cần thiết

$$n_1 \geq \frac{1}{4} \frac{\left(1,96\sqrt{2 \times 0,2475 \times 0,7525} + 0,84\sqrt{2 \times 0,345 \times 0,655}\right)^2}{(0,345 - 0,15)^2} \times \left(1 + \sqrt{1 + \frac{4}{\left(\frac{\left(1,96\sqrt{2 \times 0,2475 \times 0,7525} + 0,84\sqrt{2 \times 0,345 \times 0,655}\right)^2}{(0,345 - 0,15)^2}\right)^2} |0,345 - 0,15|}\right)^2 = 84,82$$

Như vậy cần ít nhất 85 bò sữa cho một nhóm.

Trường hợp so sánh nhiều giá trị trung bình

Nếu ảnh hưởng của nghiệm thức rất ít, muốn phát hiện được sự ảnh hưởng này đòi hỏi dung lượng mẫu lớn. Bên cạnh đó các giá trị sai lầm loại I và độ mạnh của phép thử tương ứng là α và $1 - \beta$ cũng ảnh hưởng rất nhiều đến dung lượng mẫu cần thiết.

Dung lượng mẫu cần thiết đối với mỗi nghiệm thức (n) để phát hiện sự sai khác nếu có khi chênh lệch bé nhất giữa 2 giá trị trung bình bất kỳ là d , số nghiệm thức là a và phương sai của tính trạng nghiên cứu là σ^2 được dựa trên công thức dưới đây:

$$\phi^2 = \frac{nd^2}{2a\sigma^2}$$

Tham số ϕ^2 sẽ được đề cập chi tiết ở chương 4. Ở đây ta sẽ sử dụng đường cong cho sẵn ở phần phụ lục để tìm dung lượng mẫu cần thiết.

Ví dụ 3.7: Nghiên cứu tăng trọng / ngày (gram) của lợn nuôi vỗ béo đến 5 tháng tuổi ở 3 công thức thí nghiệm. Hãy xác định dung lượng mẫu (n) cần thiết để phát hiện sự sai khác giữa các nghiệm thức nếu có. Biết rằng sự chênh lệch giữa 2 giá trị trung bình lúc kết thúc thí nghiệm là 40gram, tăng trọng có phân bố chuẩn với phương sai $\sigma^2 = 480$.

Sử dụng công thức nêu trên cùng với các đường cong ở phần phụ lục ta có thể tìm ra dung lượng mẫu cần thiết ở các mức chính xác tương ứng:

Nếu $\alpha = 0,05$; $1-\beta = 0,80 \rightarrow n = 7$;

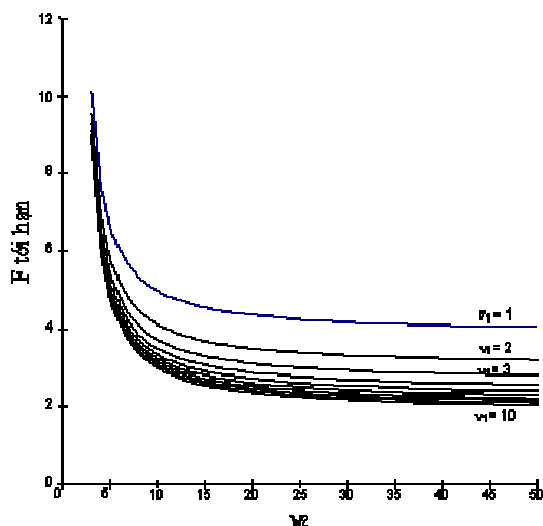
Nếu $\alpha = 0,05$; $1-\beta = 0,90 \rightarrow n = 9$

Nếu $\alpha = 0,01$; $1-\beta = 0,80 \rightarrow n = 10$;

Nếu $\alpha = 0,01$; $1-\beta = 0,90 \rightarrow n = 12$

3.8.2. Bậc tự do của sai số ngẫu nhiên

Giả sử so sánh hai hoặc nhiều nghiệm thức với nhau ta mong muốn bậc tự do của sai số ngẫu nhiên ≥ 20 bởi vì với bậc tự do của sai số ngẫu nhiên bé giá trị tới hạn của F rất lớn nhưng nó sẽ giảm rất nhanh khi bậc tự do này tăng lên. Khi bậc tự do sai số ngẫu nhiên lớn hơn 20 thì giá trị F giảm rất ít. Trong đồ thị dưới đây, v_1 và v_2 tương ứng với bậc tự do của nghiệm thức và bậc tự do của sai số ngẫu nhiên sẽ minh hoạ điều này.



Đồ thị : Giá trị tới hạn của phân phối F với bậc tự do v_1 , v_2 và $\alpha = 0,05$

Sử dụng quy tắc bậc tự do tối thiểu để tính dung lượng mẫu cần thiết cho các ví dụ sau :

Ví dụ 3.8: Thiết kế thí nghiệm kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với số nghiệm thức $a = 5$. Cần bao nhiêu đơn vị thí nghiệm cho một nghiệm thức ?

Bậc tự do của sai số ngẫu nhiên $df = (r - 1) \times a$

Ta cần có $(r - 1) \times a \geq 20$, như vậy $r \geq 5$. Cần ít nhất 5 đơn vị thí nghiệm

Ví dụ 3.9: Thiết kế thí nghiệm kiểu khối ngẫu nhiên đầy đủ với số nghiệm thức $a = 5$. Cần bao nhiêu khối (b) ?

Bậc tự do của sai số ngẫu nhiên $df = (b - 1) \times (a - 1)$

Ta cần có $(b - 1) \times 4 \geq 20$, như vậy $b \geq 6$. Vì vậy cần ít nhất 6 khối

Điều này chứng tỏ rằng khi dung lượng mẫu tăng lên sẽ cho ta có kết luận chính xác hơn. Tuy nhiên, đồ thị trên cho ta thấy khi bậc tự do của sai số ngẫu nhiên lớn hơn 40 thì giá trị F có thay đổi không đáng kể.

Ngoài các cách tiếp cận nêu trên, các nhà nghiên cứu cũng đưa ra các nguyên tắc khác nhau để dựa vào nó mà có thể tìm ra dung lượng mẫu phù hợp:

Trong nghiên cứu về đại gia súc, Preston (1995) cho rằng số động vật trong một công thức thí nghiệm không được ít hơn 3 và bậc tự do của sai số ngẫu nhiên ít nhất là 15.

Trong các nghiên cứu về đại gia súc và lợn, Ovesiannhicov (1976) khuyến cáo số động vật trong một nghiệm thức ít nhất là 6 và thuận lợi hơn nếu con số này là 12.

3.9. Bài tập

3.9.1

Giả sử anh (chị) muốn ước tính tăng trọng trung bình ngày của lợn nuôi vỗ béo giết thịt từ 60 đến 180 ngày tuổi. Từ việc tổng quan tài liệu, anh (chị) tìm được độ lệch chuẩn của tính trạng này là 200 gram/ngày. Với khoảng tin cậy 95% và giá trị ước tính nằm trong khoảng ± 50 gram/ngày so với giá trị thực của quần thể, hãy tính dung lượng mẫu cần thiết

3.9.2

Một thí nghiệm được tiến hành nhằm nghiên cứu ảnh hưởng của việc bổ sung đồng đến tăng trọng của lợn. Chọn ra 20 lợn thí nghiệm giống Yorkshire ở 80 ngày tuổi (bắt đầu thí nghiệm) đồng đều và chia về 2 công thức thí nghiệm (đôi chứng và thí nghiệm) hoàn toàn ngẫu nhiên. Khối lượng (kg) ở 210 ngày tuổi (kết thúc thí nghiệm) của 20 lợn nêu trên thu được như sau:

Đôi chứng	120	125	130	131	120	115	121	135	115	128
Thí nghiệm	135	131	140	135	130	125	139	119	121	134

Theo phân loại, đây là loại thí nghiệm nào? Cho biết yếu tố và số công thức thí nghiệm. Nếu anh (chị) là người thiết kế thí nghiệm này, số động vật cần thiết là bao nhiêu.

3.9.3

Bệnh East Coast Fever (ECF) gây ra tỷ lệ chết ở vật nuôi là 50%. Sử dụng một loại vắc xin với mong muốn có thể bảo vệ được 95% vật nuôi. Với mức độ tin cậy là 95% và độ mạnh của phép thử là 90%, hãy xác định dung lượng mẫu cần thiết.

3.9.4

Tính số lượng cá thí nghiệm cần thiết cho mỗi bể để có thể phát hiện ra hiệu quả của việc dùng vắc xin. Giả sử rằng tỷ lệ cá nhiễm bệnh trong trường hợp sử dụng vắc xin và không sử dụng vắc xin tương ứng là 10 và 30%, mức độ tin cậy là 0,95 và độ mạnh của phép thử là 0,80.