

ARAŞTIRMA / RESEARCH

Biyoteknolojik Aşıların Geliştirilmesinde Kullanılan Biyoistatistik Analiz Yöntemleri ve Bir Minitab Uygulaması*Biostatistical Analysis Methods Used in the Development of Biotechnological Vaccines and One Minitab Practise*Şengül CAN¹ , Ayşegül AKSOY GÖKMEN² ¹Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Araştırma Girişimcilik ve Yenilikçilik Koordinatörlüğü, Manisa, Türkiye²İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye**Geliş tarihi/Received:** 28.04.2022**Kabul tarihi/Accepted:** 13.09.2022**Sorumlu Yazar/Corresponding Author:**

Ayşegül AKSOY GÖKMEN, Doç. Dr.
İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye.
E-posta: aaksoygokmen@hotmail.com
ORCID: 0000-0001-6407-4592

Şengül CAN, Öğr. Gör. Dr.
ORCID: 0000-0003-4022-0393

Öz

Amaç: Bu çalışmada, biyoteknolojik aşı geliştirmek için kullanılan biyoistatistik analiz yöntemlerinin tanıtılması amaçlanmıştır. Tanıtılan tekniklerden örneklem büyüklüğü belirleme yöntemi kullanılarak örnek olay üzerinden Minitab uygulaması yapılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Araştırma kapsamında öncelikli olarak biyoistatistiğin kullanım amaçları tanıtılmıştır. Aşı geliştirmede kullanılan biyoistatistik teknikler teorik olarak anlatılmıştır. Binom ve stokastik aktarım modelleri ve geliştirilen aşının koruyucu etkilerinin değerlendirilmesi başlıkları dâhilinde analiz yöntemleri detaylandırılmıştır. Teorik altyapısı detaylı biçimde anlatılan tekniklerin istatistik formülleri ve formüllerin açıklamaları belirtilmiştir. Örnek bir senaryo verilerek Minitab paket programında aşı denemesi için gereken örneklem sayısı hesaplanmıştır.

Bulgular: Standart sapma, hata payı, güç ve beklenen ortalama koruyuculuk oranına göre Minitab paket programında örneklem sayısı hesaplanmıştır. %80 koruyuculuk oranı için örneklem sayısı 18, %90 koruyuculuk oranı için örneklem sayısı 30 ve %99 koruyuculuk oranı için örneklem sayısı 58 olarak hesaplanmıştır.

Sonuç: Aşı geliştirme sürecinin farklı aşamaları için farklı istatistik tekniklere ihtiyaç duyulduğu görülmüştür. Aşı geliştirme sürecinde başvuru olan istatistik yöntemler küçük bir örneklemin analiz edilmesinden random olarak gerçekleştirilen saha denemelerine kadar çeşitlenmektedir. Bu nedenle İstatistik bilimi modern teknoloji kullanılarak aşı geliştirme sürecinin vazgeçilmez bir unsuru haline gelmiştir. Bu yöntemlerin başlıcalarının; binom ve stokastik aktarım modelleri, deterministik diferansiyel denklem modelleri ve geliştirilen aşıların koruyucu etkilerinin değerlendirildiği istatistik analizler olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Biyoistatistik, biyoteknoloji, biyoistatistik teknikler.

Abstract

Objective: This study aimed to introduce the biostatistical analysis methods used to develop biotechnological vaccines. A Minitab application was conducted for an example case study using one of the techniques introduced.

Material and Method: In this study, the purposes of utilization of biostatistics were introduced. Biostatistics techniques used in vaccine development were explained theoretically. Analysis methods were detailed under the titles of binomial and stochastic transmission models and the evaluation of the protective effects of the developed vaccine. The statistical formulas of the techniques, and the theoretical background which was explained in detail, and the explanations of the formulas were specified. Also, the number of samples required for the vaccine trial was calculated in the Minitab package program by giving an example scenario.

Results: The sample size was calculated in the Minitab package program according to the standard deviation, error tolerance, power, and expected average protection rate. The sample size was calculated as 18 for a protection rate of 80%, 30 for a protection rate of 90%, and 58 for a protection rate of 99%.

Conclusion: It has been observed that different statistical techniques are needed for different stages of the vaccine development process. Statistical methods used in the vaccine development process range from analyzing a small sample to randomly conducted field trials. For this reason, statistics has become an indispensable component of the vaccine development process by using modern technology. Binomial and stochastic transmission models, deterministic differential equation models, and statistical analyzes in which the protective effects of the developed vaccines were evaluated are commonly used among these methods.

Keywords: Biostatistics, biotechnology, biostatistics techniques.

1. Giriş

Aşılar hem insanlar hem de hayvanlarda aktif bağışıklık sistemini uyarak enfeksiyonlara karşı korunmayı mümkün kılan biyolojik maddelerdir. Aktif bağışıklık sistemi için kullanılan aşılar klasik (konvansiyonel) ve biyoteknolojik aşılar olmak üzere ikiye ayrılırlar. Klasik aşılar; günümüzde de etkinliğini sürdüren canlı veya inaktive edilmiş patojenler kullanılarak geliştirilmektedir. Biyoteknolojik aşılar; moleküler teknikler kullanılarak hazırlanan ileri teknoloji ile geliştirilen veya genetik mühendisliği ile geliştirilen aşılardır (1).

Küresel sağlığı korumak için aşılar kritik araçlardır. Farklı viral, bakteriyel vb. patojenlere karşı kullanılan geleneksel aşı teknolojileri; antijenik proteinlerin kodlandığı genetik materyalde meydana gelen varyasyonlar sonucu hızla değişen patojenlere karşı başarılı olamamıştır (2). Biyoteknolojik aşı türleri (1);

1.1. İleri Teknoloji Kullanılarak Hazırlanan Aşılar

- **Sentetik Peptit Aşıları:** Sentetik peptit aşıları bulaşıcı hastalıklar veya kötü huylu tümörlere karşı koruyucu CD-8+ T hücre uyarımını hedefler ve klinik olarak da yaygın bir biçimde kullanılırlar. Bu yöntemde virüs/bakteri/kanser vb. antijeni taklit edilir. Mutasyonlara rağmen yeterli düzeyde koruyuculuk sağlayabilir (3).

- **Antiidiotip Antikor Aşılar:** Belirli bir etkene karşı bir deney hayvanı kullanılarak hazırlanan idiotip antikorların, farklı bir deney hayvanına verilmesi sonucu oluşan antiidiotip antikorların aşılama için kullanılması ve protektif bir bağışıklığa ulaşılmasıdır (1).

- **Subunit Aşılar:** Sentetik peptit ya da rekombinant protein bazı geliştirilen aşılardır. Yüksek oranda antijen içeren doğal yapısı nedeniyle geleneksel aşılar göre pek çok önemli avantajı bulunmaktadır. Bu avantajlar; spesifik antijen seçimi nedeniyle daha güvenli olması, saklanma koşullarına dayanıklı olması, spesifik epitoplara içermesi ve dolayısıyla daha yüksek oranda bağışıklık yanıtının uyarılması sayılabilir (4).

1.2. Genetik Mühendisliği İle Hazırlanan Aşılar

- **Mutant Aşılar:** Mikroorganizmanın genomunda yapay biçimde oluşturulan mutasyonlar sonucu meydana gelmiş ve parental mikroorganizmadan birkaç yönden farklılık gösteren mutantlar aşı olarak kullanılabilir. Oluşturulan mutant suşlar virulans genleri taşımadığı için enfeksiyona yol açmazlar ancak vücutta çoğalabilirler (1).

- **Nükleik Asit Bazlı Aşılar:** Zayıflatılmış aşılar benzer bağışıklık yanıtı oluşturmayı amaçlayan bir aşı geliştirme tekniğidir. Bu yöntemde vücudun bağışıklık tepkisini uyarmak amacıyla, hastalığa ait antijenleri taklit eden proteinlerin üretilmesi için vücuda DNA veya mRNA verilir (5).

- **Dendritik Hücre Aşıları:** Dendritik hücreler doğuştan gelen ve kazanılmış bağışıklığı birbirine bağlamada anahtar olan bağışıklık sistemimizin antijen sunan hücreleridir. Dendritik hücre aşıları, özellikle CD-8+ T hücrelerini uyarmaya odaklanır. Dendritik hücre aşıları çapraz antijen sunum verimliliği nedeniyle tümörlere ve enfeksiyöz hastalıklara özgü T hücre yanıtını uyarma bakımından oldukça önemlidir (6).

Tarihsel anlamda aşı geliştirme çalışmalarında biyoistatistik, aşı koruyuculuğunun değerlendirilmesinde kullanılmıştır.

British Medical Journal'ın 5 Kasım 1904 sayısında tifoya karşı aşılanmanın sürekli devamının tavsiye edildiği istatistik bir değerlendirme yayımlanmıştır. Bu ilk çalışmada hastalığa karşı koruma ve aşılama oranlarının korelasyonları araştırılmıştır (7). 1915 yılında istatistikçi Binbaşı Greenwood ve Udny Yule, tifo ve koleraya karşı aşılamaların ölüme karşı etkisinin önem derecesini hesaplamak için Pearson-Ki Kare kullanmışlardır (8). 1939 yılında Kendrick ve Eldering büyük bir boğmaca aşısının saha denemesi sonuçlarını değerlendirmişlerdir (9). Benzer şekilde 1954 yılında Salk tarafından çocuk felci aşılarının değerlendirilmesi için istatistik analizleri kullanılmıştır. 20. yüzyıla gelindiğinde ise iki farklı matematiksel alan değişim göstermiştir. Bunlardan biri aşı geliştirme ve diğeri klinik denemelerdeki epidemiyolojik çalışmaların tasarlanmasıdır. Aşı çalışmalarının odağı aşılanmış insanlarla aşılanmamış insanlarda koruyuculuğun değerlendirilmesiyken, 20. yüzyılda salgın teorisinde büyük ilerlemeler görüldü. Bulaşıcı hastalıkların dinamikleri ve müdahalelerinin hem deterministik hem de stokastik modelleri geliştirildi. Özellikle bilgisayar yazılımlarının yardımıyla daha karmaşık modellemeler, aşılanmanın potansiyel dolaylı etkilerinin incelenmesi için salgın teorisinin kullanılması yaygınlaşmıştır. 1990'ların başında influenza aşısı piyasaya sürüldü ve küçük çocuklara aşı yapıldı böylece bebeklerde influenza görülme sıklığı neredeyse yok oldu. İyi tasarlanmış çalışmalar ve istatistik analizlerle etkinin doğru şekilde ölçülmesi bu alanda yapılan istatistik çalışmalara olan ilgiyi de arttırmıştır (10).

Bulaşıcı hastalıkların matematiksel modellemesi epidemiyolojinin temelini oluştururken, hastalığın epidemiyolojik yükünü tahmin etmede de önemli bir rol oynayabilir. Gerçekçi bir model ile bir salgın sırasında enfekte olması veya ölmesi beklenen insan sayısı tahmin edilebilir. Ayrıca salgının zirveye ulaşma zamanı ve zirvede beklenen vaka sayısını tahmin etmek mümkündür. Bu tip hizmetler; yöneticilerin ve sağlık hizmeti sağlayıcıların kaynak planlaması yapması ve önlem alması gibi konularda yardımcı olmaktadır. Devam eden COVID-19 pandemisinde İngiltere ve ABD gibi ülkeler matematiksel modelleri karar verme süreçlerinde kullanmışlardır. Örneğin Imperial College'ın yaptığı Londra matematiksel modeldeki Birleşik Krallık sağlık sisteminin salgın nedeniyle tehlikeye gireceği ve 500.000 ölüm olabileceği tahmini üzerine hükümet katı önlemler almıştır (11).

Aşı geliştirmenin farklı aşamaları için farklı türde çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Aşı çalışmalarında kullanılan istatistik yöntemler küçük örneklem analizinden rastgele saha denemelerine, yüzbinlerce katılımcıyla yapılan topluluk denemelerine uzanmaktadır. Aşı geliştirmede ilk aşama aday aşı antijenlerinin aranmasıdır. Oldukça yakın bir dönemde enfeksiyöz ajan ve bağışıklık sisteminin çeşitli kısımlarının bilgisayar modelleri kullanılarak aşı keşfinde tasarımcı yaklaşım geliştirilmiştir (10). Bu çalışmalar için kullanılan istatistik teknikler aşağıda açıklanmış ve Minitab paket programı kullanılarak gerçekleştirilen bir uygulama örneği verilmiştir.

2. Gereç ve Yöntem

Aşağıda sırasıyla binom ve stokastik aktarım modelleri, deterministik diferansiyel denklem modelleri verilerek geliştirilen bir aşının koruyucu etkisinin değerlendirilmesinde kullanılan yöntemlerden Minitab uygulaması ile örneklem sayısının belirlenmesi gerçekleştirilmiştir.

2.1. Binom ve Stokastik Aktarım Modelleri

2.1.1. Zincir Binom Modeli

Bu modelde her fonksiyon önceki fonksiyona göre konumlanarak binom olasılık zincirlerini oluşturur. Bu olasılık zincirleri; belirli iki terimli dizilerin gerçekleşme olasılıklarını verir. Bir zincir yapısı; zincir binomlarıyla temsil edilebilen fiziksel olayların detaylı analizine izin vermektedir. Zincir binom modeli; yaşam tablosunun istatistiksel temelini oluşturur. Ayrıca hane halkı gibi küçük sosyal gruplarda hastalık yayılımının analiz edilebilmesi açısından da önemlidir. Örneğin, Reed-Frost modeli, t zamanındaki yeni enfektiflerin sayısının t – 1 zamanındaki enfektif ve duyarlıların sayısına bağlı olduğu bir zincirleme binom modelidir. Bu model; kızamık, çiçek hastalığı ve grip gibi hastalıkların yayılımındaki epidemiyolojik parametreleri tahmin etmek için kullanılmıştır (12).

2.1.1.1. Reed-Frost Model

Reed-Frost modeli, 1920'lerde Johns Hopkins Üniversitesi'nden Lowell Reed ve Wade Hampton Frost tarafından ortaya konan salgınların matematiksel bir modelidir. Reed-Frost modelinde, enfekte ve duyarlı birey kategorileri arasındaki bulaşma, önceden belirlenmiş model tabanlı bir zaman artışı sırasında yapılan her temastan bulaşma olasılığına bağlıdır. Modelin zaman artışı tipik olarak enfeksiyöz ajanın latent periyoduna eşittir. Reed-Frost modelinin arkasındaki önemli bir varsayım; aynı anda iki veya daha fazla enfekte kişiye maruz kalmanın iki bağımsız binom olayı olarak kabul edilmesidir. Reed-Frost modelinin genel formülü (13):

$$I_{t+T} = S_t \times (1 - q^t)$$

Burada I_{t+T} ; (T) zaman aralığında meydana gelen yeni enfekte olmuş bireylerin sayısıdır. S_t ; t zamanındaki duyarlı bireylerin sayısıdır. q ; enfekte olmuş bir kişiyle temastan dolayı kaçan duyarlı bir enfeksiyon olasılığıdır ($q = 1 - p$, burada p temas olasılığıdır). T; modelin zaman artışını temsil ederken t; mevcut zamandır. Birden fazla enfekte birey olduğunda, t zamanında I^t ile enfekte olmuş kişilerle temastan kaçma olasılığı q^t dir. Her duyarlı bireyin T zaman aralığında enfekte olma olasılığı $1 - q^t$ 'dir. Yeni enfekte olmuş bireylerin sayısı, $1 - q^t$ 'nun popülasyondaki duyarlı bireylerin sayısı ile çarpıldığında elde edilir (13).

2.1.1.2. Greenwood Modeli

Greenwood istatistiği, bir boşluk istatistiğidir ve zaman veya mekândaki olayların kümelenmesini değerlendirmek için kullanılabilir (14). Greenwood istatistiği, 0 ile 1 arasında bir değer aralığına sahip olan karşılaştırmalı bir ölçüdür. Greenwood istatistiği canlı organizmaların kromozomlarında genlerin nasıl ve nereye yerleştirildiğini belirlemek için kullanılmıştır. Bu yönüyle özellikle genlerin hangi işlevi yerine getirdiğine ilişkin olarak, genlerin yerleştirildiği yerlerin kesin bir düzeni olduğunu göstermiştir. Bu yönüyle genetik bilimi açısından oldukça önemlidir.

Greenwood istatistiği; konumsal bir dağılımın tekdüzeligi veya dağılımın ne kadar kümelenmiş olduğunun tespit edilebilmesi için kullanılan bir aralık istatistiğidir. Genel olarak, zaman veya uzaydaki belirli bir olay dizisi için istatistik şu şekilde verilir (15):

$$G(n) = \sum_{i=1}^{n+1} D_i^2$$

D_i olaylar arasındaki aralığı temsil eder ve 0 ile 1 arasında bir sayıdır, öyle ki tüm $D_i = 1$ 'in toplamıdır.

$$G(n) = \frac{\sum_{i=1}^{n+1} X_i^2}{T_n^2}, \quad T_n = \sum_{i=1}^{n+1} X_i$$

ve X, genlerin başlangıç lokusları arasındaki aralığın baz çifti uzunluğunu temsil eder.

2.1.2. Stokastik Modeller

Stokastik model; sistemde yer alan dinamiklerin stokastik ve süresiz olduğunu varsayar. Buna göre; iki değişken arasında kesin olarak değil, olasılıklar dâhilinde gerçekleşen ilişki stokastik ilişki olarak tanımlanmaktadır. Diğer bir ifadeyle; arasında ilişki bulunan iki değişken özünde ortak bir yönelime sahiptir. Ancak söz konusu değişkenler üzerinde, içerisinde buldukları ortak davranışlar dışında farklı etkenler de belirleyici olmaktadır. Bu durumda söz konusu değişkenler arasındaki yaygın yönelimin yanı sıra pek çok etkenin de etkisinin olması, ilişkinin stokastik olarak tanımlanmasına neden olur. Değişkenler arasında olduğu varsayılan ilişkinin öğeleri; ilişki yönü, ilişki derecesi ve ilişkinin fonksiyonel biçimi olarak tanımlanmaktadır. Değişkenler arasındaki ilişkinin yönü; pozitif ve negatiflik ile, ilişkinin derecesi korelasyon katsayısı ile, ilişkinin fonksiyonel biçimi ise regresyon analizi ile ölçülmektedir (16).

2.1.2.1. İlişkinin Yönü ve Derecesi

Aralarında ilişki olduğu düşünülen değişkenler arasında aynı veya zıt yönlü ilişki olarak tanımlanmaktadır. Değişkenlerin birlikte gösterdiği değişim derecesi korelasyon ile ifade edilmektedir. Eğer yalnızca iki değişkenin birlikte değişim derecesi ölçülmek isteniyorsa; basit korelasyon katsayısı hesaplanır ve (r) ile gösterilir. Ancak ikiden fazla sayıda değişkenin birlikte değişim derecesi ölçülmek isteniyorsa çoklu korelasyon katsayısı hesaplanır ve (R) ile gösterilir. -1 ve +1 aralığında değer alabilen korelasyon katsayısı; -1 veya +1'e eşit olduğunda deterministik bir ilişki söz konusudur ve değişkenler arasında mutlak kesinlikle bir ilişki bulunmaktadır. Korelasyon katsayısı -1 ve +1 arasında bir değer aldığı anda; değişkenler arasındaki olasılık içeren stokastik bir ilişki olduğu söylenmektedir. Pozitif değerli korelasyon katsayısı; değişkenler arasında pozitif ilişkiyi gösterirken negatif değerli korelasyon katsayısı ise; değişkenler arasında negatif ilişkiyi göstermektedir (16).

•Korelasyon Katsayısı gözlem değerleri kullanılarak hesaplanacaksa X ve Y ile temsil edilen iki değişken arasındaki korelasyon (16):

$$r = \frac{\sum X_i Y_i - n \bar{X} \bar{Y}}{\sqrt{(\sum X_i^2 - n \bar{X}^2)(\sum Y_i^2 - n \bar{Y}^2)}}$$

Burada \bar{X} : X serisinin ortalaması, \bar{Y} : Y serisinin ortalaması, n: Gözlem sayısını ifade etmektedir.

•Korelasyon Katsayısının ortalamalar kullanılarak hesaplanacaksa (16):

$$r = \frac{\sum (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum (X_i - \bar{X})^2 \sum (Y_i - \bar{Y})^2}}$$

Burada $(X_i - \bar{X})$: X değişkeninde aritmetik ortalamadan sapmalar, $(Y_i - \bar{Y})$: Y değişkeninde aritmetik ortalamadan sapmaları göstermektedir.

2.1.2.2. İlişkinin Fonksiyonel Biçimi

Regresyon analizi ile rastgele bir değişken ile bu değişken üzerinde etkisi olduğu tahmin edilen değişkenler arasındaki ilişki matematiksel olarak ifade edilmektedir. Bu analizde bağımlı ve bağımsız değişken ayrımı oldukça önemlidir çünkü modelde değişkenler arasındaki neden-sonuç ilişkisi araştırılmaktadır. Doğrusal regresyon denklemi (16):

$$\hat{Y}_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + \varepsilon$$

β_0 : Bağımlı değişken üzerinde, bağımsız değişken dışında etkili olan diğer tüm değişkenlerin etkisini göstermektedir.

β_1 : Bağımsız değişken ve bağımlı değişken arasındaki ilişkiyi kuran parametredir.

ε : Hata Payı

2.1.3. Deterministik Diferansiyel Denklem Modelleri

Bulaşıcı hastalıkların ilk matematiksel modeli 1766 yılında Daniel Bernoulli tarafından yayımlanmıştır. Hamer ise 1906 yılında salgınların tekrarını incelemek için kesikli bir zaman modeli tasarlayarak analiz yapmıştır. Bu çalışmaların devamında 1927 yılında A.G. McKendrick ve W.O. Kermack tarafından bulaşıcı hastalıkların yayılmasını tahminleyen ilk matematiksel modeli geliştirilmiştir. Kermack-McKendrick modeli; kapalı bir topluluk içerisinde zaman içerisinde salgın bir hastalığın yayılımını açıklamaya çalışan deterministik bir modeldir (17).

2.1.3.1. SIR Modeli

Kapalı bir çevrede, doğal yolla ölümlerin görülmediği ancak enfeksiyon ajanının anlık olarak ve hastalığın yalnızca insandan insana bulaştığı bir popülasyon içerisinde bulaşıcı hastalığın evreleri basit diferansiyel denklemlerle modellenmiştir. SIR modelinde bulaşıcı hastalığa maruz kalan bireyler üç gruba ayrılmaktadır (17):

• İlk grup; henüz hastalığa yakalanmamış ancak hastalığa karşı bağımsızlığı bulunmaması nedeniyle hastalığa duyarlı (Susceptible Individual) bireylerden meydana gelmektedir. Hastalığa duyarlı bireyler için (17):

$$\frac{dS}{dt} - \beta SI \quad (\text{Enfekte olma oranı } -IS\beta / TP)$$

• İkinci grup; hastalığa sahip ve hastalığı bulaştırabilen bulaştırıcı (Infectious) bireylerden oluşmaktadır. Bulaştırıcı bireyler için (17):

$$\frac{dI}{dt} - \beta SI \quad (\text{İyileşme Oranı } I\gamma)$$

• Üçüncü grupta ise; hastalığa karşı bağımsızlık kazanıp iyileşen ve/veya hayatını kaybeden bireylerden (Removed) oluşmaktadır. Hastalığı sona eren bireyler için (17):

$$\frac{dR}{dt} - yI$$

Burada; β : Etkin Temas Oranı, TP: Toplam popülasyon, γ : Ortalama İyileşme Hızı

2.1.3.2. SIS Modeli

Popülasyonu oluşturan bireylerin bağımsızlık kazanmaması nedeniyle, iyileştiklerinde tekrar hastalığa duyarlı bireyler haline gelecekleri modeldir (17):

• Geçici bağımsızlığa sahip bireylerde (17):

$$\frac{dM}{dt} = B_1 - \mu_M M - \delta M$$

Burada; M: Geçici bağımsızlığı olan bebek sayısı, B_1 : Geçici bağımsızlığa sahip yenidoğan sayısı, F: Geçici bağımsızlık ortalama süresi, δ : Geçici bağımsızlık sonlanma hızı, μ_M : Doğal ölüm oranı (M)

• Hastalığa duyarlı bireylerde (17):

$$\frac{dS}{dt} = B_2 - \mu_S S + \delta M - \beta S(1 + C) + \theta R$$

Burada; S: Hastalığa duyarlı birey sayısı, B_2 : Geçici bağışıklığı olmayan yenidoğan bireyler, β : Etkin temas sayısı, μ_s : Doğal ölüm oranı (S)

• Hastalığa maruz kalmış bireylerde (17):

$$\frac{dE}{dt} = -\mu_E E + \beta S(I + C) - \varepsilon E - E\psi_E$$

Burada; E: Hastalığa maruz kalan birey sayısı, L: Belirti göstermeme süresi, ε : Belirti göstermeme ortalama hızı, μ_E : Doğal ölüm oranı (E), ψ_E : Taşıyıcı oranı, C: Taşıyıcı

• Bulaştırıcı bireylerde (17):

$$\frac{dI}{dt} = -\mu_I I - \mu_x I - I\psi_2 + \varepsilon E - \gamma I$$

Burada; I: Bulaştırıcı, t: Hastalık nedeniyle yaşamını kaybedenlerin oranı, D: İyileşme süresinin ortalaması, γ : İyileşme hızı, μ_I : Doğal yollarla gerçekleşen ölüm, μ_x : Hastalık kaynaklı gerçekleşen ölüm oranı,

• İyileşmiş bireylerde (17):

$$\frac{dR}{dt} = -\mu_R R - \theta R + \gamma I$$

Burada; R: Bağışıklık kazanmış ve iyileşmiş birey sayısı, μ_R : Doğal nedenlerle yaşanan ölümler (R), θ : İyileşme durumundaki bağışıklığın ortalama bitiş hızı

2.2. Geliştirilen Aşının Koruyucu Etkilerinin Değerlendirilmesi

Aşılanan bireylerdeki aşı koruyuculuğunun değerlendirilmesi geçtiğimiz yüzyılda aşı çalışmalarının odak noktasını oluşturmuştur. Genel anlamda enfeksiyonun önlenmesinden çok hastalığı iyileştirme yeteneği araştırılmıştır. Vaka tespiti genellikle bir dizi semptom sergileyen kişilerden meydana gelen popülasyonda şüpheli vaka saptanarak yapılmaktadır. Şüpheli görülen vakalar daha sonra ilgilenilen bulaşıcı ajanın biyolojik doğrulaması için test edilmektedir. Enfeksiyon duyarlılığı için aşı etkinliği VE_s ve hastalığa duyarlılık için aşı etkinliği VE_{sp} olarak tanımlanmaktadır (10).

2.2.1. VE_s Tahmin Edilmesi

Aşı etkinliği ölçütleri enfeksiyona maruz kalma koşuluna bağlı olmayan farklı düzeyler için (II, III ve IV) tanımlanmaktadır (10):

$$VE_{s,CI}(T) = 1 - \frac{\text{aşıl原因 enfeksiyon vakaları/riskli kişiler}}{\text{aşılanmamış enfeksiyon vakaları/riskli kişiler}} = 1 - \frac{CI_1(T)}{CI_0(T)}$$

Insidans oranlarına dayalı seviye II parametreleri; $VE_{s,IR}$ ve $VE_{s,\lambda}$ tehlike oranlarına dayalı enfeksiyon süreleri hakkında bilgi gerekmektedir (10):

$$VE = \frac{\text{aşıl原因 vakalar/kişi-zaman}}{\text{aşılanmamış vakalar/kişi-zaman}} = 1 - \frac{CR_1(T)}{IR_0(T)} S_{IR}$$

$$VE_{s,\lambda}(t) = 1 - \frac{\lambda_1(t)}{\lambda_0(t)} \quad (\text{Tehlike oranına dayalı, } VE_{s,\lambda})$$

Oransal tehlike modeline dayanan III seviye parametresi VE_{PH} yalnızca enfeksiyon sürelerinin sıralanmasını gerektirmektedir.

$$VE_{s,PH} = 1 - \exp(\beta) \quad (\beta \text{ log tehlike oranıdır})$$

2.2.2. Tahmin ve Çıkarım

Gösterilecek hesaplamaların amacı aşı etkinliğinin tahmini ve tahminin yorumlanmasıdır. Aşıl原因 bireyleri (deney grubu) N_1 , kontrol grubu N_0 olarak tanımlandığında gruptaki toplam birey sayısı $N = N_0 + N_1$ olmaktadır.

Bu grup 0 ve T [0,T] zaman aralığı boyunca gözlemlenebilmektedir. Kontrol grubunda gözlemlenen vaka sayısı c_0 ve deney grubunda gözlemlenen vaka sayısı c_1 'dir. Risk altındaki toplam kişi-zaman ise kontrol grubunda Y_0 ve aşı grubunda Y_1 ile gösterilmektedir.

$VE_{s,CI}(T)$ 'nin kümülatif insidans veya maruz kalma oranlarına bağlı olarak tahmin edilmesi sadece kişilerin T zamanı sonunda enfekte olup olmaması hakkında sonuç değeri verisini gerektirmektedir (10):

$$VE_{s,CI}(T) = 1 - \frac{c_1 / N_1}{c_0 / N_0}$$

2.2.3. Örneklem Sayısının Belirlenmesi

Yerel epidemiyoloji ve enfeksiyon bulaşma oranı, insidanda görülen mevsimsel ve yıllık değişim ile diğer nitelikleri anlayabilmek için dikkatli bir biçimde gerçekleştirilen uzun süreli temel çalışmalar hesaplanan örneklem büyüklüğünün güvenli olarak kabul edilebilmesi için gerekli olabilmektedir. Aşı çalışmaları için örneklem boyutu hesaplamalarında genellikle bilgisayar simülasyonlarına ihtiyaç duyulmaktadır ancak aşağıda basit örneklem boyutunun hesaplanması için birkaç formül sunulmaktadır (10):

$$y = (z_{\alpha/2} + z_{\beta})^2 \frac{\lambda_0 + \lambda_1}{(\lambda_0 - \lambda_1)^2}$$

Burada $z_{\alpha/2}$ ve z_{β} , $\alpha/2$ ve β 'nın üst kuyruk olasılıklarına karşılık gelen standart normal dağılım değerleridir. Eğer sonuç oranlara dayanıyorsa (10):

$$n = (z_{\alpha/2} + z_{\beta})^2 \frac{\pi_0(1 - \pi_0) + \pi_1(1 - \pi_1)}{(\pi_0 - \pi_1)^2}$$

Müdahale edildiği durumdaki π_0 ve müdahale edilmeyen durumdaki π_1 gerçek nüfus oranları olarak kabul edildiğinde her bir gruptaki birey sayısı da n dir. Eğer sıtma paraziti benzeri gibi süreklilik içeren bir yanıt varsa amaç müdahale ve kontrol gruplarında bu değişkenin ortalamasının karşılaştırılmasıdır (10).

$$n = (z_{\alpha/2} + z_{\beta})^2 \frac{\sigma_0^2 + \sigma_1^2}{(\mu_0 - \mu_1)^2}$$

Burada μ_0 ve μ_1 gerçek popülasyonun ortalamaları σ_0 ve σ_1 aşı ve kontrol gruplarındaki sonuç değişkenine ait standart sapmalar, n ise grupta yer alan birey sayısını ifade etmektedir (10).

3. Bulgular

3.1. Minitab Uygulaması

Kendine özel kodlama sistemi olması ve temel matematiksel işlemler dâhil pek çok analizi gerçekleştirebiliyor olması nedeniyle analiz için Minitab paket programı 21.1.1. versiyonu kullanılmıştır. Örnek olaylar (18, 19) referansları kullanılarak yeniden uyarlanmıştır.

Örnek Olay: Yeni geliştirilen bir aşının kullanıma sunulması için etkililiği araştırılıyor. Aşılana ve aşısız bireylerin karşılaştırılacağı uygulamada;

Standart Sapma: 56,5

Yanılma Payı : 0.05

Güç: %80 (0.80)

Beklenen Ortalama Koruyuculuk Oranı En Az: 80 olarak kabul edilmiştir.

Minitab paket programında takip edilen işlem adımları;

Stat → Power and Sample Size → 2 Sample t test seçeneği uygulanmıştır.

Açılan test ekranında;

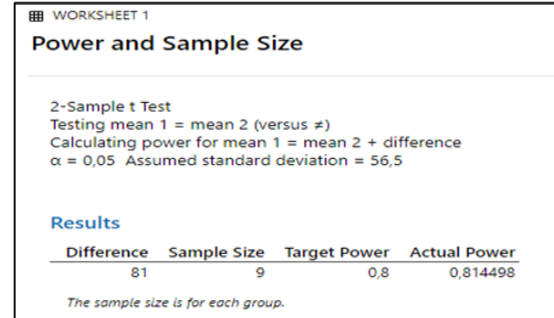
Sample Size : Boş bırakılmıştır.

Differences : 81

Power Value : 0.80

Standard Deviation : 56,5 verileri girilmiştir.

Hesaplanan örneklem sayısı Şekil 1. de gösterildiği gibi 9 olarak hesaplanmıştır. Minitab grafik çıktısı ise Şekil 2. de gösterilmiştir. Minitab programında hesaplanan bu değere göre aşı uygulanması gereken kişi sayısı 9 ve plasebo denek sayısı 9 olarak denek çalışmaya dâhil edilmelidir. Bu durumda araştırmaya dâhil edilmesi gereken denek sayısı en az 18 olarak hesaplanmıştır.



Difference	Sample Size	Target Power	Actual Power
81	9	0.8	0.814498

The sample size is for each group.

Şekil 1. %80 Koruyuculuk Örneklem Sayısı Belirleme Minitab Test Sonucu

Standart Sapma: 63,63

Yanılma Payı : 0.05

Güç: %90 (0.90)

Beklenen Ortalama Koruyuculuk Oranı En Az: 90 olarak kabul edilmiştir.

Minitab paket programında takip edilen işlem adımları;

Stat → Power and Sample Size → 2 Sample t test seçeneği uygulanmıştır.

Açılan test ekranında;

Sample Size : Boş bırakılmıştır.

Differences : 81

Power Value : 0.90

Standard Deviation : 63,63 verileri girilmiştir. Hesaplanan örneklem sayısı Şekil 3. te gösterildiği gibi 15 olarak hesaplanmıştır. Minitab programında hesaplanan bu değere göre aşı uygulanması gereken kişi sayısı 15 ve plasebo denek sayısı 15 olarak denek çalışmaya dâhil edilmelidir. Bu durumda araştırmaya dâhil edilmesi gereken denek sayısı en az 30 olarak hesaplanmıştır.

Standart Sapma: 70

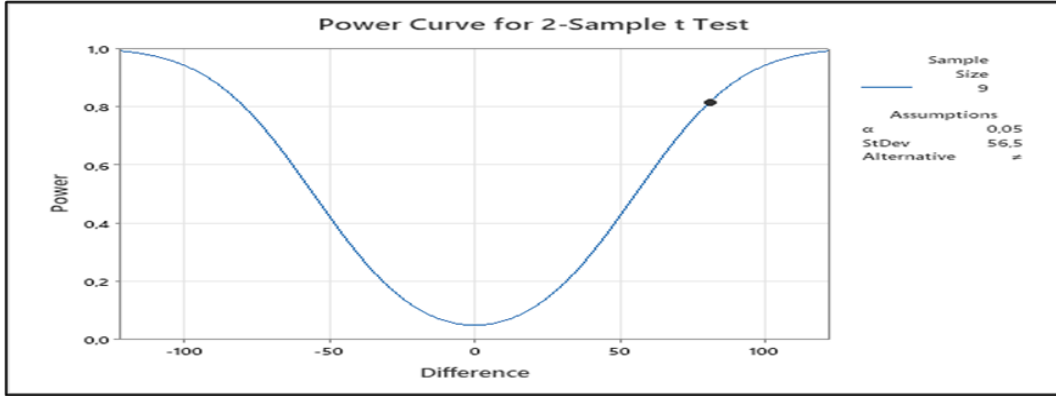
Yanılma Payı : 0.05

Güç: %99 (0.99)

Beklenen Ortalama Koruyuculuk Oranı En Az: 99 olarak kabul edilmiştir.

Minitab paket programında takip edilen işlem adımları;

Stat → Power and Sample Size → 2 Sample t test seçeneği uygulanmıştır.



Şekil 2. %80 Koruyuculuk Örneklem Sayısı Belirleme Testi Minitab Grafik Çıktısı

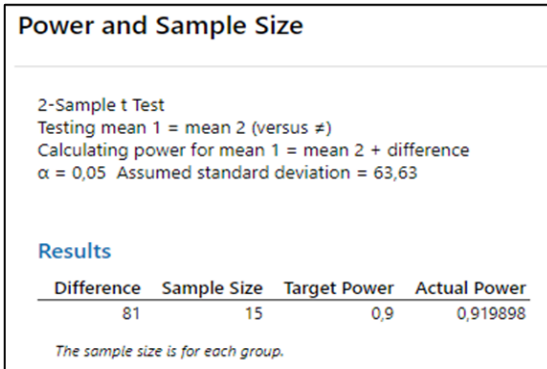
Açılan test ekranında;

Sample Size : Boş bırakılmıştır.

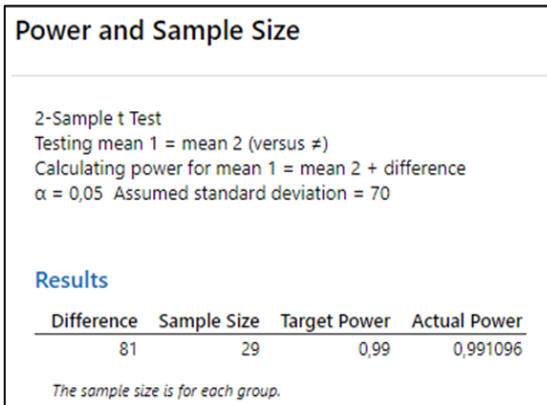
Differences : 81

Power Value : 0.99

Standard Deviation : 70 verileri girilmiştir. Hesaplanan örneklem sayısı Şekil 4'te gösterildiği gibi 29 olarak hesaplanmıştır. Minitab programında hesaplanan bu değere göre aşı uygulanması gereken kişi sayısı 29 ve plasebo denek sayısı 29 olarak denek çalışmaya dâhil edilmelidir. Bu durumda araştırmaya dâhil edilmesi gereken denek sayısı en az 58 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3. %90 Koruyuculuk Örneklem Sayısı Belirleme Minitab Test Sonucu



Şekil 4. %99 Koruyuculuk Örneklem Sayısı Belirleme Minitab Test Sonucu

4. Tartışma

İnsanlarda ve hayvanlarda enfeksiyon hastalıklarının kontrolünde ve koruyucu hekimlikte aşılardan yeri oldukça önemlidir. İnsanlık tarihindeki ilk aşı 18. yüzyılda çiçek hastalığına karşı geliştirilmiştir. Koruyucu nitelikli aşılardan günümüzde hala başlıca iki farklı konvansiyonel yöntem kullanılarak üretilmektedir bunlar; inaktif (ölü) aşılardan ve aktif (canlı, attenué) aşılardır. Son yıllarda ise moleküler biyoloji, immünoloji ve biyoteknoloji bilim alanlarında yaşanan ilerlemeler nedeniyle daha etkili ve kaliteli aşılardan geliştirilmeye başlanmıştır. Yeni teknolojiler kullanılarak geliştirilen bu aşı türleri içerisinde subunit aşılardan, nükleik asit bazlı aşılardan, dendritik hücre aşılardan ve sentetik peptid aşılardan sayılabilmektedir.

Klasik yöntemlerle geliştirilen aşılardan, aşı etkinliği ve güvenilirliği genellikle aşı ruhsatı alınmadan önce rastgele ve iyi kontrol edilen klinik deneylerle değerlendirilmektedir. Bu çalışmalar deney ve kontrol grubu katılımcılarını içermektedir. Bu gruplar belirli süreler boyunca izlenerek her iki gruptaki vakalar tablolar haline getirilmektedir. Ancak bu yöntem; takibin uzun yıllar gerektirmesi ve son derece maliyetli olması gibi nedenlerle giderek daha da zorlaşmaktadır. Ayrıca hastalığın nadir olması durumunda vaka sayısının da sınırlı olması aşılardan etkinlik tahminini zorlaştırmaktadır.

Günümüzdeki modern biyoteknolojik sistemler canlı mikroorganizmalardan teknoloji yardımıyla fayda sağlanması temeline dayanmaktadır. Biyoteknoloji temeline moleküler biyoloji, kimya, biyokimya, matematik, bilgisayar yazılımları, istatistik, eczacılık gibi pek çok disiplini de içermektedir. Biyoteknoloji kullanılarak geliştirilen herhangi bir aşının immünojenisite denemesi koruma için uygun bağlantıların tespit edilerek bu miktarların iyi tasarlanmış biyoanalizlerle ölçülmesi şeklinde planlanmaktadır. Biyoanaliz protokollerinin oluşturulması sürecin standart olmasını gerektirmektedir.

Bu çalışmada biyoteknolojik bir aşının geliştirilmesinden sonra örneklem büyüklüğünün belirlenmesi analizi örnek bir olay üzerinden Minitab uygulamasıyla başarılı bir şekilde hesaplanabilmektedir. Minitab paket programının kullanılması ile gerçekleştirilen uygulamada standart sapma: 56,5, yanılma payı: 0,05, güç: 0,80 olarak kabul edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre beklenen koruyuculuk oranı en az %80 olduğunda aşı uygulanması gereken kişi sayısı aşı uygulanan ve plasebo gruplarında toplam 18 olarak hesaplanmıştır.

Diğer taraftan beklenen koruyuculuk oranı %90 olarak belirlendiğinde aşılınması gereken kişi sayısı aşı uygulanan ve plasebo grupları için toplam 30 olarak hesaplanmıştır. Koruyuculuk oranı %99 olarak belirlendiğinde ise aşılınması gereken kişi sayısı aşı uygulanan ve plasebo grupları için toplam 58 olarak hesaplanmıştır. Minitab uygulaması biyoteknolojik ya da geleneksel aşılardan geliştirilmesi veya test edilmesi aşamalarında pek çok aşı çalışmasında da görüldüğü gibi sıklıkla tercih edilmektedir (20, 21). Sonuç olarak çalışmamız ve önceki çalışmalardan elde edilen bulgular, aşı çalışmalarında aşı etkinliğinin hesaplanması için biyoistatistiksel yöntemlerin kritik önemini göstermektedir.

5. Sonuç ve Öneriler

Aşı geliştirme sürecinin farklı aşamaları için farklı türde çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Aşı geliştirme sürecinde başvuru istatistik yöntemler küçük bir örneklemin analiz edilmesinden random olarak gerçekleştirilen saha denemelerine kadar çeşitlenmektedir. Bu nedenle istatistik bilimi modern teknoloji kullanılarak aşı geliştirme sürecinin vazgeçilmez bir unsuru haline gelmiştir.

Bu yöntemlerin başlıcaları; binom ve stokastik aktarım modelleri, deterministik diferansiyel denklem modelleri ve geliştirilen aşılardan koruyucu etkilerinin değerlendirildiği istatistik analizler olarak karşımıza çıkmaktadır.

6. Alana Katkı

Sağlık alanındaki teknoloji yoğun ilerlemeler; analiz, tahmin ve sonuç elde etmeyi de etkilemektedir. Biyoteknolojik aşılardan geliştirilirken biyoistatistik analiz yöntemleri sıklıkla tercih edilmektedir. Kullanılan yöntemlerin teorik altyapısının bilinmesinin, uygulama aşamasında literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Ayrıca uygulama için tercih edilen Minitab paket programının kendi kodlama arayüzü olması, istatistik ve matematiksel işlemlerin rahatlıkla uygulanabilir olmasını sağlamaktadır.

Araştırmanın Etik Yönü

Bu çalışma etik kurul onayı gerektirmemektedir.

Çıkar Çatışması

Bu makalede herhangi bir nakdi/aynı yardım alınmamıştır. Herhangi bir kişi ve/veya kurum ile ilgili çıkar çatışması yoktur.

Yazarlık Katkısı

Fikir/Kavram: ŞÇ, AAG; **Tasarım:** ŞÇ, AAG; **Denetleme:** ŞÇ, AAG; **Kaynak ve Fon Sağlama:** ŞÇ, AAG; **Malzemeler:** ŞÇ, AAG; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** ŞÇ, AAG; **Analiz/Yorum:** ŞÇ, AAG; **Literatür Taraması:** ŞÇ, AAG; **Makale Yazımı:** ŞÇ, AAG; **Eleştirel İnceleme:** ŞÇ, AAG.

Kaynaklar

1. mikrobiyoloji.org [internet]. Viral Aşılardan; 2022 [cited 12 Nisan 2022] Available from: <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFA79D6F5E6C1B43FF4B5119729FFAA2F9>.
2. Gebre MS, Brito LA, Tostanoski LH, Edwards DK, Carfi A, Barouch DH. Novel approaches for vaccine development. *Cell*. 2021 March 18; 184(6): 1589-1603. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.030>.
3. Meuleman TJ, Cowton VM, Patel AH, Liskamp RMJ. Design and synthesis of hcv-e2 glycoprotein epitope mimics in molecular construction of potential synthetic vaccines. *Viruses*. 2021; 13(2): 326. Available from: <https://doi.org/10.3390/v13020326>

4. Moyle PM. Biotechnology approaches to produce potent, self-adjutant antigen-adjutant fusion protein subunit vaccines. *Biotechnology Advances*. 2017 May-June; 35: 375-389.

5. Ho W, Gao M, Li F, Li Z, Zhang XQ, Xu X. Next-generation vaccines: nanoparticle-mediated dna and mrna delivery. *Advanced Healthcare Materials*. 2021 January 18; 10(8): 1-17. Available from: <https://doi.org/10.1002/adhm.202001812>

6. Ho NI, Huis in 't Veld LGM, Raaijmakers TK, Adema GJ. Adjuvants enhancing cross-presentation by dendritic cells: the key to more effective vaccines?. *Frontiers in Immunology*. 2018 December 13; 9: 1-12.

7. Pearson K. Antityphoid inoculation. *British Medical Journal*. 1904 December 17; 2: 1667-1668.

8. Greenwood M, UG Yule. The statistics of anti-typhoid and anti-cholera inoculations, and the interpretation of such statistics in general. *Proc R Soc Med*, 1915 June 4; 8(part 2): 113-194.

9. Kendrick P, Eldering G. A study in active immunization against pertussis. with statistical analyses of the data by aj borowski. *American Journal of Hygiene*. 1939; 29: 133-53.

10. Halloran ME, Longini IM, Struchiner CJ, Longini IM. Design and analysis of vaccine studies. New York: Springer; 2010. 103-129p.

11. Adak D, Majumder A, Bairagi N. Mathematical perspective of Covid-19 pandemic: Disease extinction criteria in deterministic and stochastic models. *Chaos, Solitons & Fractals*. 2020 October 19; 142: 1-11.

12. Longini Jr, Ira M. Chain binomial model. *Encyclopedia of Biostatistics*. Wiley Online Library Encyclopedia of Biostatistics. 2005 July 5. Available from: <https://doi.org/10.1002/0470011815.b2a07008>

13. Kyvsgaard NC, Vang Johansen M, Carabin H. Simulating transmission and control of taenia solium infections using a reed-frost stochastic model. *International Journal for Parasitology*. 2006 November 24; 37(5): 547-558. Available from: 10.1016/j.ijpara.2006.11.018

14. Greenwood M. The statistical study of infectious diseases. *Journal of the Royal Statistical Society*. 1946; 109(2): 85-110.

15. Riley MC, Clare M, King RD. Locational distribution of gene functional classes in arabidopsis thaliana. *BMC Bioinformatics*. 2007 March 30; 8(112): 1-12.

16. Ulutürk Akman S. Biyoistatistik [Internet]. İstanbul Üniversitesi Açık ve Uzaktan Eğitim Fakültesi [Cited 15 February 2022]. Available from: http://auzefkitap.istanbul.edu.tr/kitap/kok/biyo_istatistik.pdf

17. Akpınar H. Bulaşıcı hastalıkların yayılımının tahmininde deterministik modellerin kullanılması. *Öneri Dergisi*. 2012 Temmuz; 10(38): 97-103.

18. By Minitab Inc. Minitab User Guide 2: Data Analysis and Quality Tools Release 13 for Windows, Windows 95, Windows 98, and Windows NT 2000. ISBN 0-925636-44-4; 2000. Chapter 9 (1-13p.)

19. uroturk.org.tr [Internet]. [cited 2022 September 10] Available from: <https://uroturk.org.tr/urolojiData/Uploads/files/gelecek-akademisyen-1210/Sunum-9.pdf>

20. McNulty CAM, Bowen JK, Williams AJ. Hepatitis B vaccination in predialysis chronic renal failure patients a comparison of two vaccination schedules. *Vaccine*. 2005 July 14; 23(32): 4142-4147.

21. Alhindi Y, Albarakati R, Almatrafı L, Fatta G, Fatani B. Report on the Investigating Factors Associated with Vaccine Hesitancy in Makkah [Internet]. KSA [cited 2022 1 April]. 1-8 p. Available from: https://drive.uqu.edu.sa/up/profile/Books/4290019/book_path_SqaGX9FFlr.pdf