

T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ  
KOORDİNASYON BİRİMİ



**PROJE BAŞLIĞI**

Kayseri Bölgesinde saptanan HCV genotip 4 izolatlarının moleküler epidemiyolojisi

**Proje No:**  
2013-4419

Proje Türü  
ÖAN

**SONUÇ RAPORU**

**Proje Yürütücüsü:**

Adı Soyadı  
Birimi/Bölümü  
Prof. Dr. Selma GÖKAHMETOĞLU  
Tıp Fakültesi Temel Tıp Bölümü Tıbbi Mikrobiyoloji ABD

Araştırmacının Adı Soyadı  
Birimi/Bölümü

Prof. Dr. Hakan Abacıoğlu, Prof. Dr. Gül Ergör, Doç.Dr. Mustafa Altay Atalay, Prof.  
Dr. Sebnem Gürsoy, Ceylan Polat.



## TEŐEKKÖR

'Kayseri bölgesinde saptanan HCV genotip 4 izolatlarının moleküler epidemiyolojisi'  
adlı proje Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Biimi  
tarafından desteklenmiştir. Teőekkürlerimizi sunarız.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
ABSTRACT	6
1. GİRİŞ VE AMAÇ	8
2.GENEL BİLGİLER	9
3. GEREÇ VE YÖNTEM	14
4. BULGULAR	25
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	33
6.KAYNAKLAR	36
7.EKLER	38

## ÖZET

**Amaç:** Kayseri bölgesinde HCV genotip 4 enfeksiyonları diğer bölgelere göre yüksek olup, %35 dolayındadır. Bu çalışmada Kayseri bölgesinde saptanan HCV genotip 4 izolatlarının moleküler epidemiyolojisinin araştırılması amaçlandı.

**Gereç ve Yöntem:** Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanelerine başvuran ve HCV RNA pozitif olan tedavi almamış kronik aktif hepatit C hastalarından; HCV genotip 4 ile enfekte 61 hasta çalışmaya dahil edildi. Hastalara ve 71 kontrol grubuna anket uygulandı. Ankette hastalara ait bilgilerin ve hepatit bulaş yollarına ait soruların bulunmaktaydı.. Kontrollerle olgu grubu aynı cinsten seçildi ve yaş farkı en fazla 8 yaş idi. Kontrol grubu olgu grubu ile aynı mahallede yaşayan kişilerden oluşmaktaydı ve kontrol grubundaki kişiler anti HCV negatif idi.

Çalışmada HCV Core/E1 geninin 843-1315. nukleotidleri arasındaki bölge ve NS5B gen bölgesindeki 8256-8636 nukleotidleri arasındaki bölge yuvalanmış ("nested") polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı. Çoğaltılan bölge, ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, Amerika) cihazında Sanger yöntemi ile dizilendi ve filogenetik analizi yapıldı. Çalışmaya dahil edilen 49 hastada HCV'nin her iki gen bölgesi; 11 hastada sadece Core/E1 gen bölgesi, bir hastada ise sadece NS5B gen bölgesinin dizi analizi yapıldı.

Bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenle ilişkisini değerlendirmede sayımla belirtilen değişkenler için ki-kare testi kullanılmıştır. Olasılıklar oranı ile %95 güven aralığı hesaplanarak riskin boyutu belirlenmiştir. Bağımlı değişkenin oluşumunda bağımsız değişkenin etkisinin belirlenmesi amacıyla lojistik regresyon analizi yapılmıştır.  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

**Bulgular:** Çalışmaya dahil edilen 61 hastanın tümü Kayseri'de ikamet etmekte ve 37 (%60.6)'si kadın, 24 (%39.4)'ü erkek idi. Hastaların yaş ortalaması 56,7 yıl; HCV RNA viral yüklerinin ortalaması  $6.28 \log_{10}$  IU/mL olarak bulundu. Hastaneye yatış, biyopsi-endoskopi yapılması, kan transfüzyonu yapılması, cerrahi girişim, enjeksiyon yapılması, prezervatif kullanmadan ilişki olmaması, HCV 4 enfeksiyonu olma riskini anlamlı olarak artırmaktadır ( $p < 0.001$ )

Buna rağmen, çoklu analiz sonucunda cerrahi girişim, kan transfüzyonu HCV 4 enfeksiyonu açısından önemli risk faktörleri olarak bulundu.

Kayseri izolatları filogenetik olarak HCV genotip 4d referans dizileri ile birlikte ancak onlardan ayrı bir grup olarak kümelendi. Moleküler saat analizine göre, Kayseri tip 4d izolatlarının bölgeye 36-50 yıl önce girdiği saptandı.

**Sonuç:** Epidemiyolojik veriler, HCV tip 4d enfeksiyonlarının hastalara uygulanan tıbbi girişimlerden kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir. Elde edilen filogenetik veriler ise, daha önceki yıllarda Kayseri'deki HCV tip 4d ile enfekte hastalara ait filogenetik analiz sonuçları ile benzer sonuçlar vermektedir.

**Anahtar kelimeler:**HCV, genotip 4, epidemiyoloji

## ABSTRACT

### MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF HEPATITIS C VIRUS (HCV) GENOTYPE 4 ISOLATES IN KAYSERI

**Introduction:** The frequency of genotype 4 HCV infection is significantly higher in Kayseri compared to other provinces in Turkey. In this study our aim was to investigate molecular epidemiology of HCV genotype 4 isolates in Kayseri region.

**Material and Methods:** Sixty one HCV genotype 4 strains isolated from HCV infected patients were included in the study. The survey was administered to the patients and 71 controls. Information about the patients and the questions related with HCV transmission routes were taken place in the survey. Controls were matched to the patients for age within 8 years, gender. Controls were selected among people living in the same neighborhood as the patients and all of the controls were anti HCV negative.

472 bp region in the Core/E1 gene between 843 and 1315 nucleotides were amplified by nested PCR. 380 bp stretch in the NS5B gene between positions 8256 and 8636 were amplified by heminested PCR. Both of the regions (Core/E1 and NS5B) were amplified and sequenced in 49 HCV strains. Only Core/E1 region could be amplified in 11 strains and only NS5B region could be amplified in one strain. The chi-square test was used for categorical variables when evaluating the association of independent variables with the dependent variable. Dimension of risk was determined by calculating odds ratio and 95 % confidence intervals. Logistic regression analysis was performed to determine the effect of risk factors by controlling for confounding variables.. In all the analysis  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

PCR products were directly sequenced by Sanger method (ABI Prism 3130, Applied Biosystems, USA). Phylogenetic analysis and molecular clock analysis were performed using MEGA software 5.02.

**Results:** All of the patients were citizens of Kayseri. 37 of them (60.7%) were female; 24 of them (39.3%) were male. The mean ages of patients were 56.7 year; mean levels of HCV RNA viral load were 6.28 log<sub>10</sub> IU/mL.

Risk factors found to be statistically associated with HCV 4 infection were having history of hospitalisation, biopsy and endoscopy, blood transfusion, surgery, enjection, sexual intercourse without using a condom ( $p < 0.001$ ).

However, on multivariate analysis only blood transfusion and surgical intervention were found to be significant independent risk factors for HCV genotype 4 infection.

HCV genotype 4 isolates were closely related with type 4d sequences but formed a separate cluster. The introduction of HCV genotype 4d into Kayseri region probably took place 36-50 years ago as predicted by molecular analysis.

**Conclusion:** Epidemiological data showed us that HCV type 4d infections could be related with unsafe medical procedures. Phylogenetic data were similar with the previous studies done in Kayseri.

**Key words:**HCV, genotype 4, epidemiology

## **GİRİŞ VE AMAÇ**

Hepatit C virüsü (HCV) flaviviridae ailesine ait Hepacivirüs cinsinin bir üyesidir (1). Filtreleme ve elektron mikroskopi çalışmalarına göre, HCV parçacıkları 40-70 nm çapındadır (2). HCV virionu, pozitif tek zincirli lineer bir RNA genomundan oluşur ve genellikle ikosahedral şekilde bulunan nükleokapsid içindedir. Bu yapı E1 ve E2 olmak üzere iki farklı glikoproteinden oluşan bir zarf ile çevrilidir.

HCV'nin 7 genotipi ve çok sayıda subtipi olduğu bilinmektedir. Kronik HCV enfeksiyonları tedavisi HCV genotipine göre belirlenmektedir.

Ülkemizde HCV'li olgularda en sık saptanan genotip, genotip 1b'dir (%68-94). Ülkemizde yapılan çalışmalarda HCV 4 genotipi %2-3.7 olarak bulunmasına rağmen, bölgemizde yaptığımız çalışmada %35.6 olarak bulunmuştur. Bundan dolayı bölgemizde saptanan HCV genotip 4 izolatlarının moleküler epidemiyolojisinin araştırılması amaçlandı.



## GENEL BİLGİLER

Hepatit C virüsü (HCV) flaviviridae ailesine ait Hepacivirüs cinsinin bir üyesidir (1). Filtreleme ve elektron mikroskopi çalışmalarına göre, HCV parçacıkları 40-70 nm çapındadır (2). HCV virionu, pozitif tek zincirli lineer bir RNA genomundan oluşur ve genellikle ikosahedral şekilde bulunan nükleokapsid içindedir. Bu yapı E1 ve E2 olmak üzere iki farklı glikoproteinden oluşan bir zarf ile çevrilidir (3). HCV'nin 9.6 kilobazlık genomu kısa bir 5' kodlanmayan bölge (UTR), uzun bir açık okuma çerçevesi (ORF) ve kısa bir 3'-UTR olmak üzere 3 farklı bölge içerir.

RNA'nın 5'-UTR bölgesi yüksek düzeyde korunmuş olup iki bölgeden oluşur: HCV replikasyonu sırasında pozitif zincire bağlanıp uzamasına ("priming") katılan gövde ilmek ("stem-loop") yapısı ve kep bağımsız viral RNA translasyonuna aracılık eden internal ribozomal giriş bölgesi (IRES). ORF bölgesi 9000'den fazla nükleotitten oluşur ve yaklaşık 300 aminoasitlik bir poliproteini kodlar (4). 3'-UTR, kısa değişken bir bölge olup yaklaşık 40 bazlık bir değişken dizi, değişken uzunlukta bir poli U/UC bölgesi ve yüksek derecede korunmuş 98 nükleotid uzunluğunda bir X-bölgesinden oluşur (5,6). 3'-UTR'de bulunan korunmuş bölgeler (25 bazlık poli (U) bölgesi) in vitro ve in vivo HCV replikasyonu için gereklidir (7,8).

HCV translasyonunda yaklaşık 3000 amino asitlik bir poliprotein oluşturulur. Bu çoklu protein hücresel ve viral proteazlar tarafından dört yapısal (kor proteini, zarf proteinleri E1,E2 ve p7) ve altı tane yapısal olmayan proteine (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A ve NS5B) parçalanır (9).

HCV'nin 7 genotipi ve çok sayıda subtipi tanımlanmıştır. Bu genotipler arasında interferona yanıt açısından farklar vardır. Genotip 1 ve 4 interferon tedavisine daha dirençli iken genotip 2 ve 3 virüsler interferon tedavisine daha iyi yanıt vermektedir. HCV genotiplerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan yöntemler arasında; DNA dizi analizi, genotipe özgül oligonükleotid problarla ters hibridizasyon, restriksiyon enzim analizi (RFLP) ve genotipe özgül primerlerle PCR sayılabilir (10). Genotipler nükleotid düzeyinde birbirinden %31-33 farklılık gösterirken subtipler %20-25'lik bir fark göstermektedir(1). Genotip 1, 2 ve 3 Amerika, Avrupa, Avustralya ve Dogu Asya'da (Japonya, Tayvan, Tayland ve Çin) geniş dağılım göstermektedir (11). Subtip dağılımında ise daha anlamlı farklılıklar vardır. Örneğin tip 1a sıklıkla Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika'da saptanırken, tip 1b Japonya, Güney ve Doğu Avrupa'daki en yaygın genotiptir. Tip 2 tüm dünyada tip 1'e göre daha nadir görülür ve asemptomatik enfeksiyonlarda sık olduğu ileri sürülmektedir. Tip 3 ise değişik ülkelerde farklı dağılım göstermektedir ve özellikle İskoç kan donörlerinde, Güneydogu Asya ülkelerinde ve genç hastalarda saptanmaktadır. Ortadoğu ülkeleri, Mısır ve Orta Afrika ülkelerinin baskın genotipi tip 4'tür. HCV tip 5 özellikle Güney Afrika'da ve tip 6 baskın olarak Güney Dogu Asya'da (Hong Kong ve kısmen Vietnam'da) bulunmaktadır. Son zamanlarda Avrupa'dan yapılan çalışmalarda, genotip 1a ve 3a'da artış, genotip 2a, 2c ve gençlerde 1b'de azalma bildirilmektedir. Bu bulgular damar içi ilaç kullanıcılarında baskın olan genotipin 1a ve 3a olmasından ve bu kisilerin bulaşda rol oynamasından ve hızlı göç hareketlerinden kaynaklanmaktadır. Ülkemizde de değişik gruplar tarafından değişik zamanlarda HCV genotiplerini belirlemek amacıyla çalışmalar yapılmış ve baskın HCV genotipi 1b (%68-94) olarak bulunmuştur. Bu çalışmaların hepsi göz önüne alındığında; genotip 1b'nin yanında, %2-5 oranında 2a, %1-4 arasında ise tip 4 bulunduğu bildirilmiştir (12-14). Kayseri ilinde yaptığımız çalışmada ise HCV genotiplerinin %61,7'si genotip 1 (%85,5 1b); %35,6'sı genotip 4; %2,7'si genotip 2 olarak bulundu (15). Ortadoğu'da ve Afrika'da, HCV enfeksiyonlarının %80'ninden sorumlu olan HCV genotip 4 (HCV-4) en

yaygın genotiptir ve son zamanlarda bazı Avrupa ülkesinde de yayılmaktadır. Mısır dünya çapında en yüksek HCV prevalansına (%15) sahip ülkedir. Bu ülkede HCV enfeksiyonlarının %90'ını HCV-4 oluşturur ve kronik hepatit, karaciğer sirozu, hepatoselüler karsinom ve karaciğer transplantasyonun ana nedeni olarak kabul edilir (16). Mısır dışında Kuveyt, Lübnan, Suudi Arabistan ve Suriye gibi Arap ülkelerinde ve Gabon, Nijerya ve Kamerun gibi Orta Afrika ülkelerinde de en sık görülen genotip HCV-4'tür (9). Libya'da son yıllarda yapılan bir çalışmada HCV genotip 4%35.7, genotip 1 %32.6 ve genotip 2 %13.2 oranında bulunmuştur (17). HCV-4 tüm dünyada 170 milyon kronik hepatit C olgusunun yaklaşık %20'sinin nedeni olmasına rağmen tam olarak dünya çapında araştırma konusu olmamıştır (18).

HCV-4, diğer genotipler ile karşılaştırıldığında anlamlı genetik uyumsuzluk gösteren ve çok sayıda subtipi olan çok heterojen bir genotiptir. Günümüzde değişik coğrafi bölgelerden tanımlanan 18 subtipi (4a, 4b, 4d, 4e, 4f, 4g, 4h, 4k, 4l, 4m, 4n, 4o, 4p, 4q, 4r, 4s, 4t, 4u) vardır (1,19).

Zaire, Gabon, Orta Afrika Cumhuriyeti, Tanzanya gibi Orta Afrika ülkeleri ve Kamerun'dan yapılan küçük ölçekli saha çalışmaları, Orta Afrika ülkeleri ve Kamerun'daki HCV-4 türlerinin büyük ölçüde heterojen olduğunu göstermektedir ve HCV'nin en yakın ortak atalarının tahmini tarihinin 1500 yıl önceye dek gitmesi (%95 CI:1350-1700) muhtemelen uzun bir süredir endemik olduğunu göstermektedir. Kamerun'da 1920 ve 1960 yılları arasında saptanan genotipin katıysal yayılımı ile trapanosomiasis'e karşı kitlesel kampanyalar ve ası çalışmaları arasında bir paralellik vardır (20,21). Sahra-altı Afrika'sındaki bu büyük çeşitlilik, HCV-4'ün diğer bölgelere yayılmadan önce Orta ve Batı Afrika'dan orijin aldığı ve yayıldığı hipotezinin ileri sürülmesine neden olabilir (22,23). Mısır genotip 4a izolatları üzerine yapılan moleküler evrimsel analizler, Mısır HCV salgınının, geniş kapsamlı anti-sistozomiasis kitlesel tedavi kampanyaları sırasında, kusturucu tartarat (Potasyum antimon tartarat)'ın bir dizi intravenöz enjeksiyonu ve sırınga

ve iğnelerin uygun bir şekilde steril edilmeden tekrar kullanılmasına bağlı olarak başladığını ve yayıldığını göstermektedir (24,25). HCV-4a'nın, kırsal alanlarda 1930'lardan 1980'li yılların başına kadar yayılımının katsayısal artışı ile kitlesel kampanyalar arasında paralellik vardır (25,26).

Suudi Arabistan'da HCV prevalansı %3-5'tir. En sık görülen genotip %62 oranı ile genotip 4'tür, bunu 1b (%21.4), 1a (%14.3) ve 2a (%3.6) takip eder. Mısır'da en sık görülen subtip olan 4a'nın aksine Suudi Arabistan'da en sık görülen subtiplerin 4c/4d olması, bunu 4h, 4e ve 4a takip etmesi, HCV-4'ün orijininin ve geçişinin Mısır'dan farklı olduğunu düşündürmektedir (18).

Son zamanlarda HCV-4'ün İtalya, Fransa, Yunanistan ve İspanya gibi Akdeniz'e kıyısı olan Güney Avrupa ülkelerinde de görülme sıklığı artmaktadır. Bazı bölgelerde %10-24 oranlarına ulaştığı bildirilmektedir. Avrupa'da HCV-4'ün epidemiyolojik paternleri ve bu genotipin bulaşındaki risk faktörleri iyi tanımlanmamıştır. Öte yandan bazı yayınlarda HCV-4'ün intravenöz ilaç kullanıcılarında (Avrupalı ve Avrupalı olmayan), HCV ve HIV koenfeksiyonu olan hastalarda ve Kuzey ve Sahra altı Afrika ülkelerinden gelen göçmenlerde çok daha sık görüldüğü bildirilmektedir (27-32). Şimdiye kadar yayınlanan çalışmalardan, HCV-4'ün tek başına çok patojenik olduğunu gösteren yeterli kanıt yoktur ve kronik HCV-4 monoenfeksiyonundaki fibrozis ilerleme oranlarının diğer genotiplerle rapor edilenler ile kıyaslanabilir olduğu görülmektedir (18).

Sonuç olarak, epidemiyolojik çalışmalar HCV-4'ün kaleleri olan Afrika ve Orta Doğu'dan Batı ülkelerine doğru yayılmaya başladığını göstermektedir (18).

HCV enfeksiyonu her şeyden önce iyatrojenik bir enfeksiyondur. Yapılan araştırmalar virüsün küresel yayılımından I. ve II. Dünya savaşları arasındaki süreçte uygulanan güvenilir olmayan enjeksiyonların sorumlu olduğunu düşündürmektedir. Sonraları kullan at enjektörlerin kullanılması ile bu yolun önemi azalmış, bu kez güvenli olmayan kan transfüzyonlarına bağlı enfeksiyonlar öne çıkmıştır. Gelişmiş ülkelerde 1980'lerde her 50

kandan birinin HCV ile enfekte olduğu bilinmektedir. 1990'ların başında kanların taranmaya başlanması ile, özellikle gelişmiş ũlkelerde insidans hızla dūřmüřtür. Geliřmiř ũlkelerde řu anda en önemli bulaş yolu damar iēi uyuşturucu kullanımıdır. Buna karşın, gelişmekte olan ũlkelerde iyatrojenik nedenler hala ön plandadır (10).

HCV'nin temel bulaş yolu parenteraldir. HCV enfeksiyonunun temel risk faktörleri arasında, kan ve kan ürünlerinin transfüzyonu, damar iēi uyuşturucu kullanımı, hemodiyaliz, yüksek riskli cinsel davranışlar, cerrahi girişim öyküsü, kontamine iğne batması ve HCV pozitif olgulardan yapılan organ nakilleri sayılabilir. Yine de olguların bir bölümünde bulaş yolu bilinmemektedir (10).

### **3.GEREÇ VE YÖNTEM**

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Gevher Nesibe Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji Laboratuvarında yapıldı.

#### **ÖRNEK ve HASTALAR**

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanelerine başvuran ve HCV RNA pozitif olan tedavi almamış kronik aktif hepatit C hastalarından; HCV genotip 4 ile enfekte 61 hasta çalışmaya dahil edildi. Hastalara Ek.1’de bulunan anket uygulandı. Ayrıca 71 kontrol grubuna da aynı anket uygulandı. Anket yapılırken ‘berberde sakal traşı olma’ sorusu sadece erkeklere; sağlık kuruluşunda doğum yapma ile ilgili soru sadece kadınlara soruldu. Kontrollerle olgu grubu aynı cinsten seçildi ve yaş farkı en fazla 8 yaş idi. Kontrol grubu olgu grubu ile aynı mahallede yaşayan anti HCV negatif kişilerden oluşmaktaydı.

Plazma örneklerinde HCV RNA tayini ‘real time’ PCR yöntemi (COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV Test, v2.0, Roche) ile araştırıldı.

#### **HCV genotip 4 izolatlarının DNA dizi analizi**

HCV genotip 4 izolatlarının E1core ve NS5B gen bölgelerinde DNA dizi analizi Sanger (ABI 3130 Genetic Analyzer) yöntemiyle yapıldı.

## **DNA dizi analizi işlemleri 9 kısımda tamamlandı.**

- 1.RNA İzolasyonu
- 2.Revers transkripsiyon işlemi ile cDNA eldesi
- 2.PCR
3. PCR ürünlerinin görüntülenmesi
4. PCR ürünlerinin temizlenmesi
5. PCR ürünlerinin tekrar görüntülenmesi ve DNA ölçümü
- 6.Sekans PCR
- 7.Sekans PCR ürünlerinin temizlenmesi
- 8.Örneklerin cihaza yüklenmesi
- 9.Dizilerin direnç açısından değerlendirilmesi.

## **Otomatize Cihazla RNA İzolasyonu**

Örnekler EZ1 Advanced cihazı (Qiagen-Almanya) kullanılarak üretici firmanın ön gördüğü EZ1 Virüs Mini Kit v2.0 (Qiagen-Almanya) test kiti prosedürüne uygun olarak çalışıldı.

### **RNA izolasyonu için kit içeriği:**

- Reaktif kartuşları
- Tek kullanımlık “tip holders”
- Tek kullanımlık filtreli uçlar
- Örnek tüpleri (2mL)
- Elüsyon tüpleri (1.5mL)
- Carrier RNA
- Buffer AVE

### **RNA İzolasyon Prosedürü:**

1.

1. Birinci diziye elüsyon tüpleri (1.5mL) yerleştirildi.
2. İkinci diziye filtreli uç içeren tip holders yerleştirildi.
3. Buffer AVE ve carrier RNA'dan karışım hazırlandı ve 3. diziye yerleştirildi.
4. Dördüncü diziye örnek tüpleri yerleştirildi ve her örnekten 400 µl örnek alındı.
5. Reaktif kartuşlar, kartuş raflarına yerleştirildi. Sıcak bloklara 2 mL'lik tüpler yerleştirildi.
6. Cihaz çalıştırıldı ve izolasyon işlemi başladı.
7. İzolasyon işleminden sonra 1. dizideki elüsyon tüplerinde 60 µl'lik RNA izolatu elde edildi. Nukleik asit ölçüm cihazında (Qubit) RNA ölçümü yapıldı.

### **cDNA elde edilmesi**

RNA izolatından cDNA eldesi cDNA sentez kiti (Thermo Fisher, ) ile kit prosedürüne uygun olarak yapıldı (Tablo 1).

**Tablo 1: cDNA elde edilmesi**

<b>Karışım</b>	<b>miktar (µl)</b>
10x buffer	2
dNTP	0.8
19x random primer	2
Revers transkriptaz	1
RNA'ase inhibitör	1
dH <sub>2</sub> O	3.2
RNA	10
<b>TOPLAM</b>	<b>20</b>

### **PCR İşlemi**

Çalışmada HCV Core/E1 geninin 843-1315. nukleotidleri arasındaki bölge yuvalanmış ("nested") ve NS5B gen bölgesindeki 8256-8636 nukleotidleri arasındaki bölge 'hemnested' polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı. Çoğaltılan bölge, ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, Amerika) cihazında Sanger yöntemi ile dizilendi. Dizi analizi çift yönlü olarak yapıldı. 49 suşta her iki gen bölgesi; sadece Core/E1 gen bölgesi 11 suşta; sadece NS5B gen bölgesi bir suşta çoğaltılabildi. Çalışmada amplifikasyon işlemi ve DNA dizi analizi esnasında kullanılan primerler Tablo 2'de sunulmuştur.



**Tablo 2:Amplifikasyonda ve sekansta kullanılan primerler**

<b>E1core Primerleri*</b>		<b>Dizi</b>	<b>Pozisyon</b>
108	Geri	5'-TTCATCATCATRTCCCANGCCAT-3'	1293-1315
109	İleri	5'- AAYYTDCCCGGTTGCTCTTTYTCTAT -3'	843-868
110	Geri	5'-GTRGGNGACCARTTCATCATCA-3'	1306-1327
111	İleri	5'- GCAACAGGGAAYYTDCCYGGTTGCT C-3'	834-859
<b>NS5B Primerleri**</b>			
PR3.1	İleri	5'-TATGAYACCCGCTGYTTTGAYTC-3'	8256-8278
PR4	Geri	5'-GCNGARTAYCTVGT CATAGCCTC-3'	8622-8644
PR5	Geri	5'-GCTAGTCATAGCCTCCGT-3'	8619-8636

\* Y: C/T D:T/G/C/A N:T/C/G/A R:C/T/A (33).

\*\*Y: C/T R:A/G V:A/C/G N:A/T/G/C (34).

PCR reaksiyon kompozisyonları ve PCR protokolleri NS5B bilgisi için sırasıyla Tablo 3,4,5,6 'da; E1core bölgesi için sırasıyla Tablo 7,8,9,10'da sunulmuştur.

### NS5B bölgesi 1.tur PCR

**Tablo 3. PCR reaksiyon kompozisyonu**

<b>Karışım</b>	<b>Toplam µl</b>
Amplitaq gold fast	10 µl
Primer (PR3.1) 10pmol	1µl
Primer (PR4) 10pmol	1µl
dH2O	6µl
DNA	2µl
<b>TOPLAM</b>	<b>20µl</b>

**Tablo 4. PCR Protokolü**

PCR Basamağı	
Aktivasyon	95°C 10 dk
Denatürasyon	96°C 3 sn
Bağlanma	35 döngü 50°C 3 sn
Uzama	68°C 5 sn
Son Uzama	72°C 10 sn
	4°C sonsuz

**NS5B 2.tur PCR****Tablo 5. PCR reaksiyon kompozisyonu**

Karışım	Toplam µl
Amplitaq gold fast	10 µl
Primer (PR3.1) 10pmol	1µl
Primer (PR5) 10pmol	1µl
dH2O	5µl
DNA	3µl
<b>TOPLAM</b>	20µl

**Tablo 6. PCR Protokolü**

PCR Basamağı	
Aktivasyon	95°C 10 dk
Denatürasyon	96°C 3 sn
Bağlanma	35 döngü 48°C 3 sn
Uzama	68°C 5 sn
Son Uzama	72°C 10 sn
	4°C sonsuz

### E1core bölgesi 1.tur PCR

**Tablo 7. PCR reaksiyon kompozisyonu**

Karışım	Toplam $\mu$ l
Amplitaq gold fast	10 $\mu$ l
Primer (110) 10pmol	1 $\mu$ l
Primer (111) 10pmol	1 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	6 $\mu$ l
DNA	2 $\mu$ l
<b>TOPLAM</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>

**Tablo 8. PCR Protokolü**

PCR Basamağı	
Aktivasyon	95°C 10 dk
Denatürasyon	96°C 3 sn
Bağlanma	} 35 döngü
Uzama	
Son Uzama	68°C 5 sn
	72°C 10 sn
	4°C sonsuz

## E1core bölgesi 2.tur PCR

**Tablo 9. PCR reaksiyon kompozisyonu**

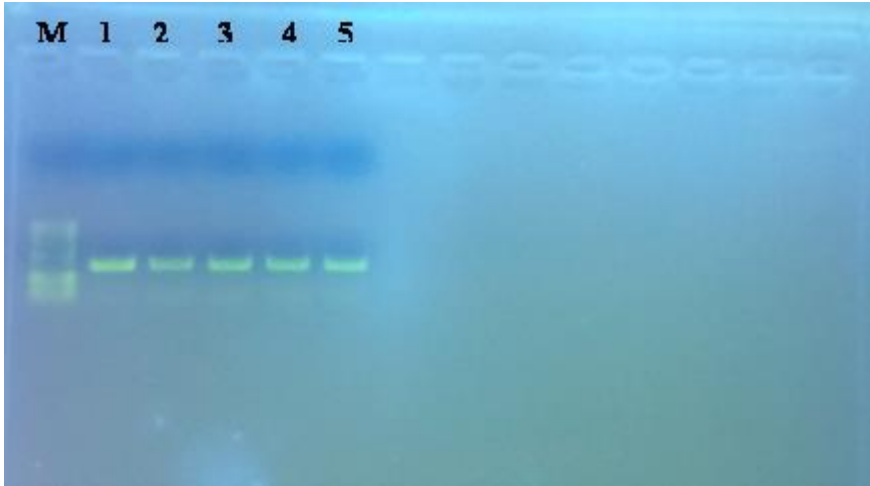
Karışım	Toplam $\mu$ l
Amplitaq gold fast	10 $\mu$ l
Primer (108) 10pmol	1 $\mu$ l
Primer (109) 10pmol	1 $\mu$ l
dH2O	5 $\mu$ l
DNA	3 $\mu$ l
<b>TOPLAM</b>	20 $\mu$ l

**Tablo 10. PCR Protokolü**

PCR Basamağı	
Aktivasyon	95°C 10 dk
Denatürasyon	96°C 3 sn
Bağlanma	} 35 döngü
Uzama	
	68°C 5 sn
Son Uzama	72°C 10 sn
	4°C sonsuz

### PCR ürünlerinin görüntülenmesi

PCR ürünleri temizle işleminden önce elektroforez yöntemiyle test edildi. %2'lik agaroz jel (SeaKem LE Agarose, Lanza) 0.5X TBE solüsyonu içerisinde hazırlandı. Örnekler için hazırlanan 3µl PCR reaksiyon ürünü ve marker, 1µl 6x Fermentas boya (loading buffer) ve 1µl SYBR green I (25x SYBR Green I Nucleicacid Gel Stain, Invitrogen) parafilm üzerinde mikropipetle karıştırıldıktan sonra jele yüklenerek PCR ürünlerinin varlığı ve boyu 170 voltta 15 dk yürütüldükten sonra değerlendirildi. PCR ürünlerinin jel görüntüleri Şekil 1'de yer almaktadır.



**Şekil 1.** Hastaların NS5B bölgesi PCR ürünlerinin jel görüntüleri

## **PCR ürünlerinin temizlenmesi**

PCR ürünleri High Pure PCR Product Purification Kit (İnvitrogen, ) ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda saflaştırıldı.

### **High-Pure PCR Ürünü Saflaştırma Prosedürü**

1. PCR ürününün üzerine 80 µl “Binding Buffer”eklendi ve karıştırıldı.
2. Filtreli tüp, toplama tübünün içine yerleştirildi.
3. Örnek filtreli tüpe koyuldu.
4. 10000 rpm.de 1 dk santrifüjlendi.
5. Aşağıya geçen sıvı atıldı.
6. 650 µl “Wash Buffer”eklendi.
7. 10000 rpm.de 1 dk santrifüjlendi.
8. Aşağıya geçen sıvı atıldı.
9. En yüksek devirde 3 dk santrifüjlendi
10. Toplama tüpü atıldı ve filtreli tüp 1.5 mL’lik temiz bir tüpe yerleştirildi
11. 50 µl “Elution Buffer” eklendi
12. 12.500 rpm.de 2 dk santrifüjlendi.
13. Filtreli tüp atılıp DNA örneği elde edildi.

DNA ölçümü

## **PCR ürünlerinin tekrar görüntülenmesi**

Pürifikasyon işlemi sırasında PCR ürününün varlığını göstermek için; saflaştırılan PCR ürününün 3µl’si %2’lik agarose jeline yüklenerek PCR ürünlerinin varlığı ve boyu tekrar kontrol edildi. Elektroforez işlemi 170 voltta 15 dk yürütülerek gerçekleştirildi.

Nukleik asit ölçüm cihazında (Qubit) RNA ölçümü yapıldı.

## **Sekans PCR**

Sekans PCR reaksiyonu aşağıdaki Tablo 11'e göre hazırlandı. Reaksiyonlar 0.2 mL'lik PCR tüpleri içerisinde gerçekleştirildi.

**Tablo 11. Sekans PCR**

DNA Kalıbı	bigDye TerminatorCycleSequencing Kit (GE Healthcare)	Primer(1pmol)	Terminator buffer	dH <sub>2</sub> O
1.5 µl	2 µl	3.2 µl	1 µl	Toplam hacmi 20 µl'ye tamamlayacak kadar

Sekans PCR için kullanılan protokol aşağıda yer almaktadır.

96°C, 1 dk  
96°C, 10 sn } 25 döngü  
50°C, 5 sn }  
60°C, 4 dk }  
4°C, sonsuz

NS5B gen bölgesi PR 3.1 ve PR 5 ; E1core bölgesi için 109,108 nolu primerler le sekans PCR işlemi gerçekleşti.

### **Sekans PCR Ürünlerinin Temizlenmesi**

PCR ürünlerinin temizlenmesi için Big Dye X Terminator kiti (Thermo Fisher) kullanıldı.

1. Örneklerin üzerine 90 µl SAM ve 20 µl X terminator eklendi.
2. Örneklerin hepsi plate'e aktarılır ve üzeri kapatılır.
3. Örnekler 1500rpm'de 40 dk karıştırılır
4. Plate santrifüjde 2 dk santrifüjlendikten sonra cihaza yüklenir.

### **Örneklerin Cihaza Yüklenmesi**

Temizleme sonrası elde edilen örnekler ABI 3130 Genetic Analyzer (ABD) dizi analizi cihazına yüklendi. DNA dizileme işlemi Sanger tarafından geliştirilen enzimatik sentez

yöntemi kullanılarak yapıldı. Boya terminasyon işaretleme adı verilen bir metod kullanılarak farklı bazlarda (A,G,T,C) sonlanan DNA sentez ürünlerine floresan işaretli boyalar eklendi. Elektroforez, örnekler bir kapillerden geçirilerek uygulandı. Floresan işaretli boyaları uyararak için bir lazer, boyaların yaydığı ışığı toplamak için ise bir CCD kamera kullanıldı. Böylece lazer uyarımının ardından dört boya tarafından yayılan farklı dalga boylarındaki ışık tek kulvarda belirlenebildi.

### **İstatistiksel analiz**

Veri SPSS 20.0 paket programı ile değerlendirilmiştir. Veri analizinde tanımlayıcı bulgular için sayımla belirtilen değişkenler sayı, yüzdelerle ve % 95 güven aralıklarıyla, ölçümle belirlenen değişkenler ortalama±standart sapma ile belirtilmiştir. Bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenle ilişkisini değerlendirmede sayımla belirtilen değişkenler için ki-kare testi kullanılmıştır. Olasılıklar oranı ile güven aralığı hesaplanarak riskin boyutu belirlenmiştir. Bağımlı değişkenin oluşumunda bağımsız değişkenin etkisinin belirlenmesi amacıyla lojistik regresyon analizi yapılmıştır. Lojistik modele tek değişkenli analizlerde ve literatürde anlamlı bulunan değişkenler dahil edilmiştir. Aralarında yüksek korelasyon bulunan değişkenlerden biri dışlanmıştır. Model uyumu için Hosmer-Lemeshow testi kullanılmıştır.  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

### **Filogenetik analiz ve moleküler saat analizi**

Referans diziler ile birlikte hizalama (MEGA 5.02) yapıldıktan sonra 'maximum likelihood' yöntemi (Model:'General Time Reversible' Parametre:'Gamma distributed with invariant sites') ile diziler filogenetik olarak analiz edildi ve 'bootstrap' değeri 1000 olarak alındı. Moleküler saat analizi 'maximum likelihood' yöntemi ile yapıldı.



## BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 61 hastanın tümü Kayseri'de ikamet etmekte ve 37 (%60.6)'si kadın, 24 (%39.4)'ü erkek idi. Hastaların yaş ortalaması 56,7 yıl; HCV RNA viral yüklerinin ortalaması 6.28 log<sub>10</sub> IU/mL olarak bulundu. Hastaların özellikleri Tablo 12'de gösterilmiştir.

**Tablo 12:Hastaların özellikleri**

Cinsiyet (K/E)	37/24
Yaş (ortalama)	56.7 yıl
HCV RNA (ortalama)	6.28 log <sub>10</sub>
Hastaneye yatış öyküsü	%73.8
Biyopsi, endoskopi	%86.9
Kan transfüzyonu	%39.3
Diş tedavisi	%93.4
Cerrahi girişim	%75.4
Enjeksiyon	%37.7
Sağlık kuruluşunda doğum/kürtaj (kadın)	%97.3
Yurt dışında yaşama	%16.4
Yurt dışı seyahat	%32.8
Eş yurt dışı yaşama	%19.7
Eş yurt dışı seyahat	%24.6
Cinsel eş sayısı (tek eş)	%80.3
Prezervatif kullanmadan ilişki	%59
Cinsel yolla geçen hastalık	%8.2
Berberde sakal traşı olma (erkek)	%70.8

**Tablo 13: HCV genotip 4 olguları ve kontrollerinin özellikleri**

	Olgu(%)	Kontrol(%)	OR	GA	P
<b>Cinsiyet</b>					
K	37(60.7)	44(62)	1.06	0.52 - 2.13	0.877
E	24(39.3)	27(38)			
<b>İçerde yaşama</b>					
Merkez	52(85.2)	62(87.3)	1.19	0.44 - 3.22	0.729
Merkez dışı	9(14.8)	9(12.7)			
<b>Medeni durum</b>					
Evli	55(90.2)	67(94.4)	1.83	0.49 - 6.80	0.512
Yurt dışında yaşama	10(16.4)	9(12.7)	1.35	0.51 - 3.58	0.545
Yurt dışı seyahat	20(32.8)	17(23.9)	1.55	0.72 - 3.33	0.261
Eş yurt dışı yaşama	11(20)	8 (11.9)	1.84	0.68 - 4.97	0.226
Eş yurt dışı seyahat	15(27.3)	15(22.4)	1.30	0.57 - 2.97	0.534
Hastaneye yatış	50(82)	40 (56.3)	3.52	1.577-7.869	0.002
Biyopsi endoskopi	54(88.5)	19(26.8)	21.11	8.193-54.404	<0.001
Yurt bakımevinde kalma	7(11.5)	3(4.2)	2.94	0.73 - 11.90	0.131
Kan transfüzyonu	24(39.3)	4(5.6)	10.87	3.50 - 33.70	<0.001
Diş tedavisi	57(93.4)	63(88.7)	1.81	0.52 - 6.33	0.353
Cerrahi girişim	46(75.4)	32(45.1)	3.74	1.77 - 7.89	0.001
Doğum yapma Olgu n:37 Kontrol n:44	35 (97.3)	42(95.5)	1.71	0.15 - 19.70	0.665
Tıraş bıçağı kullanma	13(21.3)	7(9.9)	2.48	0.92 - 6.68	0.073
Berberde sakal traşı olma Olgu n:24 Kontrol n:27	17(70.8)	21(77.8)	1.44	0.41 - 5.10	0.57
Madde kullanımı	2(3.3)	5(7)	2.24	0.42 - 11.96	0.336
Enjeksiyon	23(37.7)	5(7.0)	7.99	2.81 - 22.75	<0.001
Prezervatif kullanmadan ilişki	37(60.7)	68(95.8)	14.70	4.15 - 52.11	<0.001
Cinsel eş sayısı (birden fazla)	5(8.2)	2(2.8)	3.08	0.58 - 16.48	0.189
<b>Yaş grubu</b>					
39 yaş ve altı	5(8.1)	7(9.9)	Ref	-	-
40-54 yaş	13(21.3)	16(22.5)	1.12	0.32 - 4.80	0.92
55-70 yaş	32(52.4)	41(57.7)	1.13	0.30 - 4.11	0.92
71 yaş ve üzeri	11 (18.0)	7 (9.9)	2.13	0.54 - 10.32	0.31
<b>Eğitim</b>					
İlköğretim ve altı	45 (73.8)	38 (53.5)	2.80	1.10 - 7.51	0.03
Orta-lise	8 (13.1)	14 (19.7)	1.42	0.42 - 4.60	0.60
Yüksek öğrenim	8 (13.1)	19 (26.8)	Ref	-	-
<b>Meslek</b>					
Beyaz yakalı	3 (4.9)	5 (7.0)	1.92	0.2 - 16.5	0.80
Evhanımı	36 (59.0)	33 (46.5)	3.54	1.1 - 13.5	0.04
İşçi	15 (24.6)	7 (9.9)	6.63	1.6 - 31.4	0.01
Profesyonel meslek	4 (6.6)	13 (18.3)	Ref	-	-
Diğer	3 (4.9)	13 (18.3)	0.80	0.1 - 4.0	>0.99

Hastaneye yatışın olması, HCV enfeksiyonu olma riskini 3.52 kat anlamlı olarak artırmaktadır (p=0.002).

Biyopsi-endoskopi yapılması, HCV enfeksiyonu olma riskini 21.1 kat artırmaktadır (p<0.001).

Kan transfüzyonu yapılması, HCV enfeksiyonu olma riskini 10.9 kat artırmaktadır (p<0.001).

Cerrahi girişim yapılması, HCV enfeksiyonu olma riskini 3.74 kat artırmaktadır (p< 0.001).

Enjeksiyon yapılması, HCV enfeksiyonu olma riskini 8.0 kat artırmaktadır (p<0.001).

Prezervatif kullanmadan cinsel ilişkisi olmaması, HCV enfeksiyonu olma riskini 14.7 kat artırmaktadır (p<0.001).

İlköğretim ve altı mezunu olma, yükseköğretim mezunu olmaya göre HCV enfeksiyonu olma riskini 2.8 kat anlamlı olarak artırmaktadır (p=0.03).

İşçi olma, profesyonel meslek sahibi olmaya göre HCV enfeksiyonu olma riskini 6.6 kat anlamlı olarak artırmaktadır (p=0.01).

Cinsiyetin HCV enfeksiyonu olmaya istatistiksel olarak anlamlı düzeyde etkisi yoktur (p=0.877).

İlçede yaşamanın, HCV enfeksiyonu olmaya istatistiksel olarak anlamlı düzeyde etkisi yoktur (p=0.729).

Orta-lise mezunu olmanın, yükseköğretim mezunu olmaya göre HCV enfeksiyonu olma üzerine anlamlı etkisi yoktur (p=0.6).

Ev hanımı olma, profesyonel meslek sahibi olmaya göre HCV enfeksiyonu olma riskini 3.5 kat anlamlı olarak artırmaktadır (p=0.04).

Beyaz yakalı çalışan olmanın ve diğer meslek gruplarından olmanın, profesyonel meslek sahibi olmaya göre HCV enfeksiyonu olma üzerine anlamlı etkisi yoktur (sırasıyla p değeri=0.80; >0.99).

Medeni durumun, HCV enfeksiyonu olmaya istatistiksel olarak anlamlı düzeyde etkisi yoktur (p=0.512).

Hastanın yurtdışında yaşamasının, HCV enfeksiyonu olmaya istatistiksel olarak anlamlı düzeyde etkisi yoktur (p=0.544).

Hastanın yurtdışına seyahat etmesinin, HCV enfeksiyonu olmaya istatistiksel olarak anlamlı düzeyde etkisi yoktur (p=0.259).

Hastanın eşinin yurtdışında yaşamasının, HCV enfeksiyonu olmaya istatistiksel olarak anlamlı düzeyde etkisi yoktur (p=0.222).

Hastanın eşinin yurtdışına seyahat etmesinin, HCV enfeksiyonu olmaya istatistiksel olarak anlamlı düzeyde etkisi yoktur (p=0.533).

Yurt-bakımevinde kalmanın, HCV enfeksiyonu olmaya istatistiksel olarak anlamlı düzeyde etkisi yoktur (p= 0.131).

Diş tedavisi yapılmasının, HCV enfeksiyonu olmaya istatistiksel olarak anlamlı düzeyde etkisi yoktur (p= 0.353).

Doğum yapmanın, HCV enfeksiyonu olmaya istatistiksel olarak anlamlı düzeyde etkisi yoktur (p=1.00).

Tıraş bıçağı kullanmanın, HCV enfeksiyonu olmaya istatistiksel olarak anlamlı düzeyde etkisi yoktur (p=0.073).

Berberde sakal tıraşı olmanın, HCV enfeksiyonu olmaya istatistiksel olarak anlamlı düzeyde etkisi yoktur (p=0.57).

Madde kullanımının, HCV enfeksiyonu olmaya istatistiksel olarak anlamlı düzeyde etkisi yoktur (p=0.336).

40-54 yaş grubunda olmanın, 55-70 yaş grubunda olmanın, 71 yaş ve üzerinde olmanın, 39 yaş ve altında olmaya göre, HCV enfeksiyonu olmaya istatistiksel olarak anlamlı düzeyde etkisi yoktur (sırasıyla p değeri=0.9;0.9;0.3).

Cinsel eş sayısının, HCV enfeksiyonu olmaya istatistiksel olarak anlamlı düzeyde etkisi yoktur (p =0.189) (Tablo 13).

Hemodiyaliz yapılan kişi ve dövmesi olan kişi bulunmadığından risk hesaplanamadı

Olgu grubunda akupunktur yaptıran kişi ve manikür-pedikür yaptıran kişi olmadığından analiz yapılamamıştır

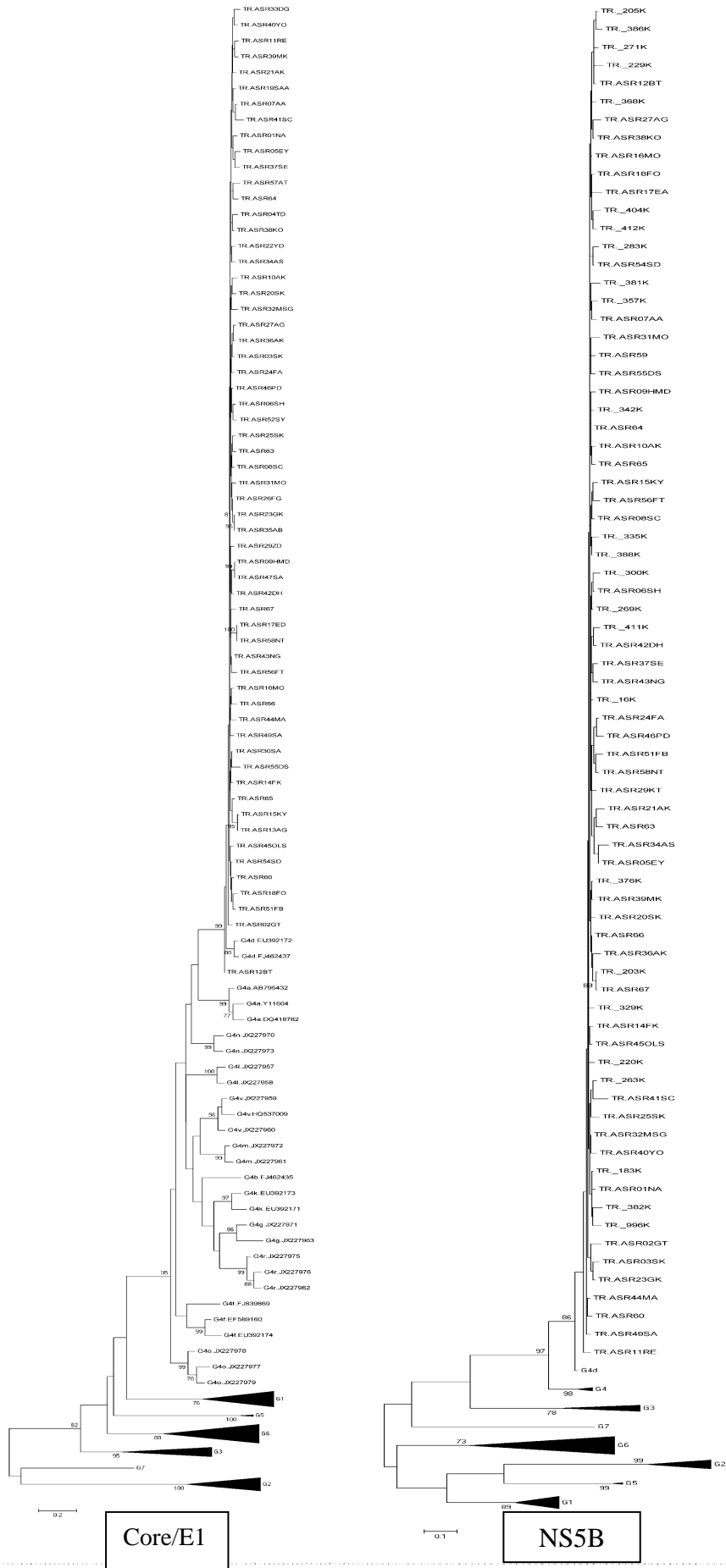
Kontrol grubunda cinsel yolla geçen hastalığı bulunan kişi olmadığından analiz yapılamamıştır.

**Tablo 14:HCV risk faktörlerinin lojistik regresyon ile çok değişkenli analizi.**

	B	OR	%95 CI	
			Alt	Üst
Eğitim	0.015	-	-	-
Eğitim 1	1.921	6.828	1,791	26,034
Eğitim 2	0.834	2.303	,547	9,695
cinsiyet	0.282	1.325	,505	3,481
Kan transfüzyonu	2.386	10.869	3,170	37,262
Cerrahi girişim	1.395	4.034	1,641	9,919

Eğitim ve cinsiyete göre kontrol edildiğinde, kan transfüzyonu yapılmış olması, HCV enfeksiyonu riskini 10.9 kat (% 95 GA, 3.2-37.3), cerrahi girişim olması 4.0 kat (% 95 GA, 1.6-9.9) artırmaktadır (Tablo 14).

HCV genotip 4 izolatlarının Elcore ve NS%B gen bölgelerinin filogenetik analizi Şekil 2 'de sunulmuştur.



**Şekil 2:** HCV genotip 4 izolatlarının E1core ve NS5B gen bölgelerinin filogenetik analizi Core/E1 ve NS5B gen bölgesinde bu çalışmada sunulan suşlar TR ASR olarak kodlanmıştır. NS5B gen bölgesinde Kayman ve ark. (35) çalışmasında sunulan suşlar TR olarak kodlanmıştır.

Kayseri izolatları filogenetik olarak HCV genotip 4d referans dizileri ile birlikte ancak onlardan ayrı bir grup olarak kümelendi (Şekil 2). Moleküler saat analizine göre, Kayseri tip 4d izolatlarının bölgeye 36-50 yıl önce girdiği saptandı.



## TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünyada yaklaşık olarak 130 milyon insan HCV ile enfektedir. HCV, kronik karaciğer hastalığı, siroz ve hepatosellüler karsinoma yol açabilmesinden dolayı dünyada önemli bir halk sağlığı problemidir. Hepatit C enfeksiyonu prevalansı ülkeler arasında farklılık göstermektedir. En düşük prevalans Birleşik Krallık ve İskandinavya'dan (%0.01-0.1), en yüksek prevalans ise Mısır'dan (%15-20) rapor edilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri'nde ise hepatit C enfeksiyonu prevalansı %1.6'dır. Ülkemiz benzer şekilde HCV enfeksiyonu açısından orta endemisine göstermektedir.

HCV'nin 7 genotipi ve çok sayıda subtipi olduğu bilinmektedir. Kronik HCV enfeksiyonları tedavisi HCV genotipine göre belirlenmektedir. Ülkemizde HCV'li olgularda en sık saptanan genotip, genotip 1b'dir (%68-94). Ülkemizde yapılan çalışmalarda HCV 4 genotipi %2-3.7 olarak bulunmasına rağmen, bölgemizde yaptığımız çalışmada HCV 4 genotipi %35.6 olarak bulunmuştur (15).

HCV, en sık parenteral yol ve daha az oranda da anneden bebeğe vertikal yol ve cinsel yolla bulaşabilen bir virüstür. Kan ve kan ürünleri transfüzyonu, intravenöz ilaç kullanımı ve hemodiyaliz, HCV bulaşında önemli risk faktörleridir. Gelişmiş ülkelerde son birkaç dekad boyunca yeni HCV enfeksiyonlarının başlıca kaynağı intravenöz uyuşturucu kullanımınıdır (10). Gelişmekte olan ülkelere ise güvenli olmayan terapotik enjeksiyonların ve transfüzyonun başlıca geçiş yolu olduğu tahmin edilmektedir. Yapılan araştırmalar HCV 'nin küresel yayılımından I. ve II. Dünya savaşları arasındaki süreçte uygulanan güvenilir olmayan enjeksiyonların sorumlu olduğunu düşündürmektedir. Sonraları kullan at enjektörlerin kullanılması ile bu yolun önemi azalmış, bu kez güvenli olmayan kan transfüzyonlarına bağlı enfeksiyonlar öne çıkmıştır. Gelişmiş ülkelerde 1980'lerde her 50 kandan birinin HCV ile enfekte olduğu bilinmektedir. 1990'ların başında kanların taranmaya

başlanması ile, özellikle gelişmiş ülkelerde insidans hızla düşmüştür. Gelişmiş ülkelerde şu anda en önemli bulaş yolu damar içi uyuşturucu kullanımınıdır. Buna karşın, gelişmekte olan ülkelerde iyatrojenik nedenler hala ön plandadır (10).

Bu çalışmada HCV genotip 4 saptanan hastalara ve HCV enfeksiyonu geçirmemiş olan kontrol grubuna HCV risk faktörleri ile ilgili soruları içeren anket uygulandı. Çalışmada 61 HCV genotip 4 hastası ve 71 kontrol grubunu oluşturmaktaydı. HCV 4 enfeksiyonu açısından risk faktörleri incelendiğinde; hastaneye yatış öyküsü, biopsi ve endoskopi, kan transfüzyonu, cerrahi girişim, enjeksiyon, kondom olmadan cinsel ilişki HCV enfeksiyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Ancak prezervatif kullanmadan ilişki için hastalar HCV oldukları için kontrol grubuna göre daha fazla prezervatif kullanarak cinsel ilişkiye girmiş olabileceği düşünülmektedir.

Hastaneye yatış ve biyopsinin HCV'li hastalarda fazla olmasının nedeni hastaların HCV nedeni ile biyopsi olması ve hastanede daha fazla yatmış olabileceğine bağlanabilir. Bu sebeplerden dolayı prezervatif kullanmadan ilişki, biyopsi ve hastaneye yatış HCV için risk faktörü olmayabilir. Ayrıca ilköğretim ve altı mezunu olma yükseköğretim mezunu olmaya göre HCV enfeksiyonu olma riskini 2.8 kat; işçi olma, profesyonel meslek sahibi olmaya göre HCV enfeksiyonu olma riskini 6.6 kat anlamlı olarak arttırmaktadır.

Çalışmada verilerin regresyon analizi sonucunda eğitim ve cinsiyete göre kontrol edildiğinde, kan transfüzyonu yapılmış olması, HCV enfeksiyonu riskini 10.9 kat (% 95 GA, 3.2-37.3), cerrahi girişim olması 4.0 kat (% 95 GA, 1.6-9.9) artırdığı bulundu.

Ülkemizde Yıldırım ve arkadaşları (36) yaptığı çalışmada kronik HCV enfeksiyonu olanlarda cerrahi girişim, kan transfüzyonu, çoklu cinsel partner, diş tedavisi öyküsünün kontrol grubuna kıyasla daha fazla olduğu bulunmuştur. Bizim yaptığımız çalışmada cerrahi girişim ve kan transfüzyonunun HCV enfeksiyonunu daha fazla oranda görülmesi iki çalışmanın sonuçlarının benzerliğini göstermektedir. Meksika'da yapılan bir çalışmada HCV enfeksiyonu olan hastalarla ve kontrol grubu kıyaslandığında intravenöz ilaç kullanımı, kan transfüzyonu ve dövme önemli risk faktörü olduğu belirtilmektedir (37). Yaptığımız çalışmada madde kullanımı kontrol ve hasta grubunda çok azdı ve hiçbir hastada ve kontrol grubunda dövme öyküsü yoktu. Bu durum HCV bulaşında etkili olan risk faktörlerinin coğrafi bölgelere göre ülkeden ülkeye değiştiğini göstermektedir.

Murhy ve arkadaşları (38) ABD'de kan donörlerinde HCV enfeksiyon risk faktörlerini belirledikleri bir vaka kontrol çalışması yapmışlardır. Belirtilen çalışmada kan donörlerinde çoklu analiz sonucunda; enjeksiyonla ilaç kullanımı, enjeksiyonla ilaç kullanmayanlar arasında kan transfüzyonu, ve enjeksiyonla ilaç kullanan kişi ile cinsel ilişkide bulunmayı HCV enfeksiyonu açısından risk faktörleri olarak bulunmuştur (38). Bizim yaptığımız çalışmada çoklu analiz sonucunda, cerrahi girişim ve kan transfüzyonu HCV 4 enfeksiyonu

açısından önemli risk faktörleri olarak bulundu. Kan transfüzyonunun her iki çalışma da risk faktörü olarak bulunması göze çarpmaktadır.

Bu çalışmada HCV genotip 4 izolatlarının hepsi 4d olarak bulunmuştur. Güney İtalya'da yapılan bir çalışmada genotip 4 izolatları arasında subtip 4d baskın olarak bulunmuştur (39). Fransa'da Cantaloube ve arkadaşları (40) genotip 4d'nin Akdeniz tarafında bulunduğunu göstermişlerdir. Ngui ve arkadaşları (41) yaptıkları çalışmada İngiltere'de genotip izolatları arasında 4d'nin en sık görülen subtip olduğunu belirtmişlerdir.

Kayseri bölgesinde Kayman ve arkadaşlarının (35) yaptığı çalışmada, HCV genotip 4 izolatlarının NS5B gen bölgesinin dizi analizi sonucunda genotip 4d olarak bulunmuş olup, izolatların Kayseri'ye 30-75 yıl önce girdiği saptanmıştır. Yaptığımız çalışmada HCV genotip 4 izolatlarının hepsi 4d olup, suşların Kayseri'ye 36-50 yıl önce girdiği bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmadaki HCV genotip 4 izolatlarının filogenetik analizi de Kayman ve arkadaşlarının çalışmasına benzemektedir (Şekil 2). Bu durum iki çalışmanın sonuçlarının benzer olduğunu göstermektedir. Cicozzi ve arkadaşları (42) Kayman ve arkadaşlarının çalışmasında elde edilen HCV genotip 4d izolatlarını çeşitli Avrupa ülkelerinden elde edilen izolatlarla birlikte filogenetik analiz yapmışlardır. Analiz sonucunda da Kayseri genotip 4d izolatlarının Türkiye'ye girişi 1967 yılı olarak bulunurken, Avrupa'daki genotip 4d izolatlarının savaşlarla girdiği (1928) tespit edilmiştir. Aynı çalışmada Türkiye genotip 4d izolatlarının Avrupa genotip 4d izolatlarından ayrı bir grup olduğu bulunmuştur ve HCV genotip 4 izolatlarının bulaşında tıbbi girişimlerin önemli olduğu belirtilmiştir. Cantaloube ve arkadaşları (40) genotip 4d enfeksiyonlarının Fransa'da 1960'tan 1980'e kadar katlanarak arttığını bulmuşlardır.

HCV genotip 4 izolatlarının bulaşında tıbbi girişimlerin önemli olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada verilerin regresyon analizi sonucunda eğitim ve cinsiyete göre kontrol edildiğinde kan transfüzyonu ve cerrahi girişim olması HCV enfeksiyon riskini arttırdığı bulundu.

Bu durum tıbbi girişimlerin bulaşta önemli olduğunu göstermektedir.

Bu çalışma sonucunda Kayseri bölgesinde HCV genotip 4 izolatlarının moleküler epidemiyolojisi araştırılmış olup, bütün izolatlar genotip 4d olarak bulunmuştur.

Epidemiyolojik veriler, HCV genotip 4d enfeksiyonlarının hastalara uygulanan tıbbi girişimlerden kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir. HCV genotip 4d izolatları ayrı bir grup olup, bölgeye 36-50 yıl önce girmiştir. Elde edilen filogenetik veriler ise, daha önceki yıllarda Kayseri'deki HCV tip 4d ile enfekte hastalara ait filogenetik analiz sonuçları ile benzer sonuçlar vermektedir.

## KAYNAKLAR

1. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005;42:962-73.
2. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature Med* 2005;11:791-96.
3. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 2004;39:5-19.
4. De Francesco R, and Migliaccio G. Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. *Nature* 2005;436:953-60.
5. Kolykhalov AA, Feinstone SM, Rice CM. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* 1996;70:3363-71.
6. Tanaka T, Kato N, Cho MJ, Sugiyama K, Shimotohno K. Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J Virol* 1996;70: 3307-12.
7. Friebe P, Bartenschlager R. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol* 2002;76:5326-38.
8. Yi M, Lemon SM. 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *J Virol*. 2003;77:3557-68.
9. Karataylı SC, Bozdayı M. Hepatit C virusu virolojisi, genotipleri ve subtipleri, tanısı. *J Gastroenterohepatol*. 2010;3:70-6.
10. Öktem MA, Abacıoğlu H. Hepatit C virus, “Özbal Y, Gökahmetoğlu S (eds): Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji” kitabında s. 79-116, Kayseri (2008).
11. Simmonds P. Clinical relevance of hepatitis C virus genotypes. *Gut* 1997;40:291-3.
12. Bozdayı AM, Aslan N, Bozdayı G, Türkyılmaz AR, Sengezer T, Wend U, et al. Molecular epidemiology of hepatitis B, C and D viruses in Turkish patients. *Arch Virol* 2004;149(11):2115-29.
13. Abacıoğlu YH, Davidson F, Tuncer S, Yap PL, Ustacelebi S, Yulug N, et al. The distribution of hepatitis C virus genotypes in Turkish patients. *J Viral Hepat* 1995; 2(6):297-301.
14. Altuglu I, Soyler I, Ozacar T, Erensoy S. Distribution of hepatitis C virus genotypes in patients with chronic hepatitis C infection in Western Turkey. *Int J Infect Dis*. 2008;12(3):239-44.
15. Gökahmetoğlu S, Atalay MA, Kılınç A. Hepatit C virüs genotiplerinin pirosekanslama yöntemi ile belirlenmesi. *Erciyes Tıp Derg*. 2011;33(2): 99-102.
16. Nguyen MH, Keeffe EB. Prevalence and treatment of hepatitis C virus genotypes 4, 5, and 6. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;3(Suppl 2): 97-101.
17. Elasisfer HA, Agnnyia YM, Al-Alagi BA, Daw MA. Epidemiological manifestations of hepatitis C virus genotypes and its association with potential risk factors among Libyan patients. *Virol J*. 2010;7:317.
18. Kamal SM, Nasser IA. Hepatitis C genotype 4: What we know and what we don't yet know. *Hepatology* 2008;47:1371-83.
- 19-Rapicetta M, Argentini C, Dettori S, Spada E, Pellizzer G, Gandin C. Molecular heterogeneity and new subtypes of HCV genotype 4. *Res Virol* 1998;149:293-297.
- 20- Ndjomou J, Pybus OG, Matz B. Phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates indicates a unique pattern of endemic infection in Cameroon. *J Gen Virol* 2003;84:2333-2341.
- 21- Njouom R, Nerrienet E, Dubois M, Lachenal G, Rousset D, Vessière A, et al. The hepatitis C virus epidemic in Cameroon: genetic evidence for rapid transmission between 1920 and 1960. *Infect Genet Evol* 2007;7:361-367.
- 22- Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus—15 years on. *J Gen Virol* 2004;85:3173-3188.
- 23- Smith DB, Pathirana S, Davidson F, Lawlor E, Power J, Yap PL, et al. The origin of hepatitis C virus genotypes. *J Gen Virol* 1997;78:321-328.

- 24-** Simmonds P, Holmes EC, Cha T-A, Chan SW, McOmish F, Irvine B, et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 1993;74:2391-9.
- 25-** Pybus O, Drummond A, Nakano T, Robertson BH, Rambaut A. The epidemiology and iatrogenic transmission of hepatitis C virus in Egypt: a Bayesian coalescent approach. *Mol Biol Evol* 2003;20:381-7.
- 26-** Tanaka Y, Agha S, Saady N, Kurbanov F, Orito E, Kato T, et al. Exponential spread of hepatitis C virus genotype 4a in Egypt. *J Mol Evol* 2004;58:191-195.
- 27-** Payan C, Roudot-Thoraval F, Marcellin P, Bled N, Duverlie G, Fouchard-Hubert I, et al. Changing of hepatitis C virus genotype patterns in France at the beginning of the third millennium: the GEMHEPGenoCII Study. *J Viral Hepat* 2005;12:405-413.
- 28-** Nicot F, Legrand-Abravanel F, Sandres-Saune K, Boulestin A, Dubois M, Alric L, et al. Heterogeneity of hepatitis C virus genotype 4 strains circulating in south-western France. *J Gen Virol* 2005;86:107-114.
- 29-** Ansaldi F, Bruzzone B, Salamaso S, Rota MC, Durando P, Gasparini R, et al. Different seroprevalence and molecular epidemiology pattern of hepatitis C virus infection in Italy. *J Med Virol* 2005;76:327-332.
- 30-** Katsoulidou A, Sypsa V, Tassopoulos NC, Boletis J, Karafoulidou A, Ketikoglou I, et al. Molecular epidemiology of hepatitis C virus (HCV) in Greece: temporal trends in HCV genotype-specific incidence and molecular characterization of genotype 4 isolates. *J Viral Hepat* 2006;13:19-27.
- 31-** Fernandez-Arcas N, Lopez-Siles J, Trapero S, Ferraro A, Ibanez A, Orihuela F, et al. High prevalence of hepatitis C virus subtypes 4c and 4d in Malaga (Spain): phylogenetic and epidemiological analyses. *J Med Virol* 2006;78:1429-1435.
- 32-** Franco S, Tural C, Clotet B, Martí nez MA. Complete nucleotide sequence of genotype 4 hepatitis C viruses isolated from patients co-infected with human immunodeficiency virus type 1. *Virus Res* 2007;123:161-169
- 33-** Murphy DG, Willems B, Deschenes M, Hilzenrat N, Mousseau R, Sabbah S. Use of sequence analysis of the NS5B region for routine genotyping of Hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5' untranslated region sequences. *J Clin Microbiol* 2007;45:1102-1112.
- 34-** Laperche S, Lunel F, Izopet J, Alain S, Deny P, Duverlie G, Gaudy C, Pawlotsky JM, Plantier JC, Pozzetto B et al. Comparison of hepatitis C virus NS5B and 5' noncoding gene sequencing methods in a multicenter study. *J Clin Microbiol* 2005;43:743-739
- 35-** Kayman T, Polat C, Ergör G, Abacıoğlu YH. Characterization of HCV genotype 4d infections in Kayseri, Turkey. *Turk J Med Sci* 2015;45:547-552.
- 36-** Yıdırım B, Tahan V, Özaras R, Aytekin H, Mert A, Tabak F. Şentürk H. Hepatitis C risk factors in the Turkish Community. *Digestive Diseases and Sciences* 2005;50:2352-2355.
- 37-** Hand WL, Vasquez Y. Risk factors for hepatitis C on the Texas-Mexico border. *AM J Gastroenterol* 2005 100(10);2180-2185.
- 38-** Murphy EL, Bryzman SM, Glynn SA, et al. Risk factors for hepatitis C virus infection in United States blood donors. *Hepatology* 2000;31:756-762.
- 39-** Cicozzi M, Equestre M, Costantino A, Marascio N, Quirino A, Presti A, et al. Hepatitis C virus genotype 4d in Southern Italy: Reconstruction of its origin and spread by a phylodynamic analysis. *J Med Virol* 2012;84:1613-1619.
- 40-** Cantaloube JF, Gallian P, Laperche S, Elghouzzi MH, Piquet Y, Bouchardeau F, Jordier F, Biagini P, Attoui H, Micco P. Molecular characterization of genotype 2 and 4 hepatitis C virus isolates in French blood donors. *J Med Virol* 2008;80:1732-1739.
- 41-** Ngui SL, Brant L, Markow PV, Tung JP, Pybus OG, Teo CG, Ramsay ME. Hepatitis C virus genotype 4 in England: Diversity and demographic associations. *J Med Virol* 2015;87:417-423
- 42-** Cicozzi M, Zehender G, Polat C, Lai A, Kayman T, Sorrentino C, et al. Phylogenetic analysis of HCV-4d in Turkey: The curious case of Kayseri province. *J Med Virol* 2014;86:454-460.

**EKLER****Ek1. Anket****HCV ENFEKSİYONLARINA YÖNELİK RİSK FAKTÖRLERİNİ  
BELİRLEME ANKET FORMU  
DEMOGRAFİK BİLGİLER**

ADI-SOYADI		LAB ID
CİNSİYET	DOĞUM YILI (yyyy)	YAŞADIĞI İL
<input type="checkbox"/> Kadın <input type="checkbox"/> Erkek		<input type="checkbox"/> Kayseri <input type="checkbox"/> Diğer (belirtiniz)
EĞİTİM DURUMU (bitirdiği okul)	YAŞADIĞI İLÇE	
<input type="checkbox"/> Okur yazar <input type="checkbox"/> Okur yazar değil <input type="checkbox"/> İlkokul <input type="checkbox"/> Orta, lise <input type="checkbox"/> Yüksek öğretim	<input type="checkbox"/> Merkez <input type="checkbox"/> Diğer (belirtiniz)	
MESLEK	MEDENİ DURUMU	
	<input type="checkbox"/> Evli <input type="checkbox"/> Boşanmış <input type="checkbox"/> Bekar	

**YURT DIŞINDA KALMA/SEYAHAT ÖYKÜSÜ**

ise alttaki soruya geçin

<b>Yurt dışında 1 aydan uzun yaşadınız mı?</b>			<b>Eşiniz yurt dışında 1 aydan uzun yaşadı mı?</b>		
<input type="checkbox"/> HAYIR <input type="checkbox"/> EVET (bu seçenek işaretlendi ise aşağıya geçiniz)			<input type="checkbox"/> HAYIR <input type="checkbox"/> EVET (bu seçenek işaretlendi ise aşağıya geçiniz)		
ÜLKE	TARİH ARALIĞI	YURTDIŞINDA TIBBİ/TIBBİ OLMAYAN (hacamat, sülük, vb) GİRİŞİM ÖYKÜSÜ	ÜLK E	TARİH ARALIĞI	YURTDIŞINDA TIBBİ/TIBBİ OLMAYAN (hacamat, sülük, vb) GİRİŞİM ÖYKÜSÜ
		<input type="checkbox"/> YOK <input type="checkbox"/> VAR (belirtiniz)			<input type="checkbox"/> YOK <input type="checkbox"/> VAR (belirtiniz)
		<input type="checkbox"/> YOK <input type="checkbox"/> VAR (belirtiniz)			<input type="checkbox"/> YOK <input type="checkbox"/> VAR (belirtiniz)
		<input type="checkbox"/> YOK <input type="checkbox"/> VAR (belirtiniz)			<input type="checkbox"/> YOK <input type="checkbox"/> VAR (belirtiniz)
<b>Yurt dışına seyahat ettiniz mi? (hac/umre dahil) İlk yurt dışına çıkış tarihi ve daha sonra gidilen tüm ülkeler kaydedilmeli</b>			<b>Eşiniz yurt dışına seyahat etti mi? (hac/umre dahil) İlk yurt dışına çıkış tarihi ve daha sonra gidilen tüm ülkeler kaydedilmeli</b>		
<input type="checkbox"/> HAYIR <input type="checkbox"/> EVET (bu seçenek işaretlendi ise aşağıya geçiniz) Ülke1: Tarih: 2: 3: 4: 5:			<input type="checkbox"/> HAYIR <input type="checkbox"/> EVET (bu seçenek işaretlendi ise aşağıya geçiniz) Ülke1: Tarih: 2: 3: 4: 5:		

## KİŞİSEL SAĞLIK BAKIMI

Şimdiye kadar herhangi bir nedenle hastanede yattınız mı?				Şimdiye kadar herhangi bir nedenle hemodiyaliz yapıldı mı?			
<input type="checkbox"/> HAYIR <input type="checkbox"/> EVET (hastanede sık yatmayı gerektiren bir kr hastalığı varsa belirtin tanı tarihini yazın)				<input type="checkbox"/> HAYIR <input type="checkbox"/> EVET (Kr böbrek yetmezliği olan hastalar için ilk diyaliz tarihini belirtin)			
No	Yılı	Hastanenin adı ve yeri		No	Yılı	Hastanenin adı ve yeri	
1				1			
2				2			
3				3			

Şimdiye kadar herhangi bir nedenle dövme yaptırdınız mı?		Hiç akupunktur yaptırdınız mı?	
<input type="checkbox"/> HAYIR <input type="checkbox"/> EVET (yanıt evet ise aşağıdaki sorulara geçiniz)		<input type="checkbox"/> HAYIR <input type="checkbox"/> EVET (yanıt evet ise aşağıdaki sorulara geçiniz)	
YILI	Nerede (il )	YILI	Nerede (il )
<b>Tıraş bıçağınızı paylaşıyor musunuz /başkasının tıraş bıçağı ile tıraş olur musunuz? Geçmişte paylaştınız mı?</b>		<b>Ailenizde başka hepatit C'li var mı?</b>	
<input type="checkbox"/> HAYIR <input type="checkbox"/> EVET		<input type="checkbox"/> HAYIR <input type="checkbox"/> EVET (yanıt evet ise aşağıdaki sorulara geçiniz)	
	Yılı	Yakınlığı	
<b>Şimdiye kadar hiç hacamat yaptırdınız mı?</b>		<b>Doktor, Sağlık personeli dışında, bir kişi tarafından kanınızın aktığı herhangi bir uygulama yapıldı mı?</b>	
<input type="checkbox"/> HAYIR <input type="checkbox"/> EVET (yanıt evet ise aşağıdaki sorulara geçiniz)		<input type="checkbox"/> HAYIR <input type="checkbox"/> EVET (yanıt evet ise aşağıdaki sorulara geçiniz)	
YILI		YILI	

## KAN TRANSFÜZYON ÖYKÜSÜ

Yaşamınız boyunca size hiç kan veya kan ürünü verildi mi? Sürekli kan verilmesini gerektiren bir hastalığı varsa belirtin.			
<input type="checkbox"/> HAYIR <input type="checkbox"/> EVET (yanıt evet ise aşağıdaki sorulara geçiniz)			
No	Yılı	Yapılan işlem	İşlemin yapıldığı yer
1			
2			

## DİŞ ÇEKİMİ / TEDAVİSİ

Yaşamınız boyunca dişinizi çektirdiniz veya diş tedavisi yaptırdınız mı?			
<input type="checkbox"/> HAYIR <input type="checkbox"/> EVET (yanıt evet ise aşağıdaki sorulara geçiniz)			
No	Yılı	Yapılan işlem	İşlemin yapıldığı yer
1			
2			

3				3			
---	--	--	--	---	--	--	--

**CERRAHİ GİRİŞİM ÖYKÜSÜ (Tüm hastalar için) GEBELİK/KÜRTAJ ÖYKÜSÜ (Kadın hastalar için)**

<b>Yaşamınız boyunca cerrahi bir girişim yapıldı mı?</b>				<b>Çocuğunuz var mı?</b> <input type="checkbox"/> HAYIR <input type="checkbox"/> EVET		
<input type="checkbox"/> HAYIR <input type="checkbox"/> EVET (yanıt evet ise aşağıdaki sorulara geçiniz)				<b>Kaç tane?</b> ↓		<b>Çocuklarınız hangi yıllarda doğdu?</b> ↓
				Gebeliklerin yılı ve sonucu ve nerede sonlandığını yazın		
No	Yılı	Yapılan işlem	İşlemin yapıldığı yer	<b>Çocuklarınız arasında başka gebeliğiniz oldu mu?</b>		<input type="checkbox"/> HAYIR <input type="checkbox"/> EVET
1				<b>Yılı</b>	<b>Nerede</b>	<b>Sonucu</b>
2						<input type="checkbox"/> ölü doğum <input type="checkbox"/> düşük/kürtaj
3						<input type="checkbox"/> ölü doğum <input type="checkbox"/> düşük/kürtaj
4						<input type="checkbox"/> ölü doğum <input type="checkbox"/> düşük/kürtaj
						<input type="checkbox"/> ölü doğum <input type="checkbox"/> düşük/kürtaj
						<input type="checkbox"/> ölü doğum <input type="checkbox"/> düşük/kürtaj
						<input type="checkbox"/> ölü doğum <input type="checkbox"/> düşük/kürtaj

**RİSKLİ DAVRANIŞLAR**

<b>Herhangi bağımlılık yapan bir madde kullanıyor musunuz?</b>		<b>Başkaları tarafından kullanılan bir enjektörü kendinize enjeksiyon yapmak için hiç kullandınız mı?</b>	
<input type="checkbox"/> HAYIR <input type="checkbox"/> EVET (yanıt evet ise aşağıdaki sorulara geçiniz)		<input type="checkbox"/> HAYIR <input type="checkbox"/> EVET (yanıt evet ise aşağıdaki sorulara geçiniz)	
YILI		YILI	
<b>Şimdiye kadar kaç cinsel eşiniz oldu?</b>		<b>Cinsel eşlerinizle prezervatif, kondom kullanmadan ilişkiniz oldu mu?</b>	
<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 ve üstü		<input type="checkbox"/> HAYIR <input type="checkbox"/> EVET	