



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



***SALMONELLA* INFANTIS'İN EVRİMSEL YAPISI VE
ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ PROFİLİNİN BELİRLENMESİ**

Gültekin ÜNAL

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. H. Kaan MÜŞTAK**

**ANKARA
2025**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SALMONELLA INFANTIS'İN EVRİMSEL YAPISI VE
ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ PROFİLİNİN BELİRLENMESİ**

Gültekin ÜNAL

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. H. Kaan MÜŞTAK**

**ANKARA
2025**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “*Salmonella* Infantis’in evrimsel yapısı ve antimikrobiyal direnç profilinin incelenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Gültekin Ünal

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Mikrobiyoloji Anabilim Dalında
Gültekin Ünal tarafından hazırlanan

“*Salmonella Infantis*’in evrimsel yapısı ve antimikrobiyal direnç profilinin incelenmesi” adlı
tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY
ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

.....Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

.....Üniversitesi

Raportör

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

.....Üniversitesi

Üye

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

.....Üniversitesi

Üye

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

.....Üniversitesi

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

***Salmonella* Infantis’in Evrimsel Yapısı ve Antimikrobiyal Direnç Profiline Belirlenmesi**

Bu tez çalışması, Türkiye'deki *Salmonella* Infantis suşlarının genetik yapısını, antimikrobiyal direnç profillerini ve evrimsel dinamiklerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. 2020-2024 yılları arasında Türkiye'nin farklı bölgelerindeki kanatlı çiftliklerinden izole edilen *S. Infantis* suşları analiz edilmiştir. Fenotipik antibiyotik duyarlılık testleri, tüm genom dizileme (WGS) ve biyoinformatik yaklaşımlar kullanılarak suşların genetik varyasyonu, mobil genetik elementleri, direnç genleri ve filogenetik ilişkileri kapsamlı bir şekilde incelenmiştir.

MLST analizleri, tüm suşların ST32 sekans tipine ait olduğunu ortaya koymuştur. SNP tabanlı filogenetik analizler, suşlar arasındaki genetik farklılıkların düşük seviyede olduğunu ve Türkiye'de tek bir klonal soyun baskın şekilde yayıldığını göstermiştir. Antibiyotik direnç analizleri, suşların büyük çoğunluğunun florokinolonlar (Siprofloksasin, Nalidiksik Asit), beta-laktamlar (Seftriakson, Sefotaksim), fenikoller (Kloramfenikol), tetrasiklinler (tetrasiklin) ve trimetoprim-sülfametaksazol gibi kritik öneme sahip antibiyotiklere karşı dirençli olduğunu göstermiştir.

Biyoinformatik analizler, direnç genlerinin plazmidler aracılığıyla yatay gen transferi ile taşındığını ortaya koymuştur. Özellikle pESI benzeri megaplasmidin varlığı, çoklu ilaç direnci (MDR) ile doğrudan ilişkili bulunmuştur. Plazmid analizi, *blaCTX-M*, *sul1*, *tetA*, *qnrB* ve *aadA* gibi direnç genlerinin suşlar arasında yaygın olarak bulunduğunu ve bu genlerin mobil genetik elemanlar yoluyla aktarılma potansiyelinin yüksek olduğunu göstermiştir.

Çekirdek genom Multi-Locus Sequence Typing (cgMLST) analizleri, örnekler arasındaki genetik farklılıkların minimum seviyede olduğunu ve genomlarının büyük oranda korunduğunu ortaya koymuştur. Filogenetik analizler, Türkiye'deki MDR *S. Infantis* suşlarının Avrupa ve Amerika'da bildirilen suşlarla yüksek genetik benzerlik gösterdiğini belirlemiş ve bu durum suşların küresel dolaşımı ve genetik değişimi açısından önemli bir veri sağlamıştır.

Sonuç olarak, Türkiye'deki *S. Infantis* suşlarının genetik olarak homojen bir yapıya sahip olduğu ve MDR özelliklerinin giderek yaygınlaştığı belirlenmiştir. Çalışma, Türkiye'deki Veteriner ve Halk sağlığı otoritelerinin genomik gözetim sistemlerini güçlendirmesi gerektiğini ve antibiyotik kullanım politikalarının sıkılaştırılmasının zorunlu olduğunu vurgulamaktadır. Bu bulgular, MDR *S. Infantis* suşlarının izlenmesi ve kontrol altına alınması için genomik epidemiyoloji temelli bir yaklaşımın gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Sözcükler: Antimikrobiyal Direnç, Genomik Epidemiyoloji, Plazmid Analizi, *Salmonella* Infantis, Tüm Genom Dizileme

SUMMARY

Evolutionary Structure And Antimicrobial Resistance Profile Of *Salmonella* Infantis: A Genomic Perspective

This thesis study aims to investigate the genetic structure, antimicrobial resistance (AMR) profiles, and evolutionary dynamics of *Salmonella* Infantis isolates in Turkey. A total of *S. Infantis* isolates were collected from poultry farms across different regions of Turkey between 2020 and 2024. Whole genome sequencing (WGS), bioinformatics analyses, and phenotypic antimicrobial susceptibility testing were conducted to comprehensively assess genetic variation, mobile genetic elements, resistance genes, and phylogenetic relationships.

MLST analysis identified all isolates as belonging to sequence type ST32, suggesting a clonal population structure. SNP-based phylogenetic analysis revealed low genetic diversity among the isolates and confirmed the dominance of a single clonal lineage in Turkey. Antimicrobial susceptibility tests showed high resistance rates to clinically important antibiotics, including fluoroquinolones (ciprofloxacin, nalidixic acid), beta-lactams (ceftriaxone, cefotaxime), phenicols (chloramphenicol), tetracyclines (tetracycline), and sulfamethoxazole-trimethoprim.

Bioinformatics analyses demonstrated that resistance genes were primarily disseminated via horizontal gene transfer (HGT), particularly through plasmids. The presence of a pESI-like megaplasmid was strongly associated with multidrug resistance (MDR). Plasmid analyses revealed widespread distribution of resistance genes, including *bla*CTX-M, *sul1*, *tetA*, *qnrB*, and *aadA*, highlighting their high potential for further dissemination through mobile genetic elements.

Core genome Multi-Locus Sequence Typing (cgMLST) analysis showed minimal genetic variability among isolates, indicating a highly conserved genome structure. Phylogenetic analysis revealed a high genetic similarity between Turkish MDR *S. Infantis* isolates and those reported in Europe and the United States, providing evidence for the global dissemination of these strains.

In conclusion, *S. Infantis* isolates in Turkey exhibit a genetically homogeneous population with an increasing prevalence of MDR traits. This study underscores the urgent need to strengthen genomic surveillance systems and implement stricter antibiotic stewardship policies to combat the spread of MDR *S. Infantis*. The findings highlight the necessity of a genomic epidemiology-based approach to effectively monitor and control these resistant strains, which pose a significant public health concern.

Keywords: Antimicrobial Resistance, Genomic Epidemiology, Plasmid Analysis, *Salmonella* Infantis, Whole Genome Sequencing (WGS)

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
Özet	iv
Summary	v
İçindekiler	vi
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	ix
Çizelgeler	x
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Salmonella</i> 'nın Genel Özellikleri	1
1.2. <i>Salmonella</i> Epidemiyolojisi	1
1.3. <i>Salmonella</i> 'nın Laboratuvar Teşhisi	3
1.3.1. Fenotipik Yöntemler	3
1.3.2. Moleküler ve Genotipik Yöntemler	4
1.3.3. Moleküler Tiplendirme Yöntemleri ve Yeni Nesil Dizileme	5
1.4. <i>Salmonella</i> 'nın Antibiyotik Direnci ve Halk Sağlığı Üzerindeki Etkileri	6
1.5. <i>Salmonella</i> 'nın Genomik Yapısı	9
1.6. NGS ve Epidemiyolojik Kullanımı	11
1.7. Bakteriyel Evrim	13
1.8. Biyoinformatik Analizler ve Veri Standardizasyonu	14
2. GEREÇ ve YÖNTEM	17
2.1. Çalışılacak Suşların Belirlenmesi	17
2.2. Seçilen Suşların Aktivasyonu ve Doğrulanması	17
2.3. Antibiyotik Duyarlılık Testi	18
2.4. Nükleik Asit İzolasyonu ve Kütüphane Hazırlığı	19
2.5. Biyoinformatik Analiz Aşamaları	20
2.5.1. Kalite Kontrol ve Veri Ön İşleme	20
2.5.2. Okuma Klasifikasyonu	22
2.5.3. Montaj (Assembly) ve Kalite Değerlendirme	22
2.5.4. Genom Anotasyonu	22
2.5.5. MLST ve cgMLST Analizleri	23
2.5.6. Genomik Antibiyotik Direnç Analizi	24
2.5.7. Plazmid Analizi	24
2.5.8. Filogenetik Analizler	25
2.5.9. Evrimsel Analiz	26
2.6. Biyoinformatik İş Akışı Geliştirilmesi	27
2.7. Kalite Kontrolü ve Tekrarlanabilirlik	28
2.8. İstatistiksel Analiz	28
3. BULGULAR	30
3.1. Çalışılacak Suşların Belirlenmesi	30
3.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi	31
3.3. Nükleik Asit İzolasyonu ve Kütüphane Hazırlığı	35
3.4. Biyoinformatik Analiz	35
3.4.1. Kalite Kontrol ve Veri Ön İşleme	35

3.4.2.	Okuma Filtreleme (Trimming)	37
3.4.3.	Okuma Klasifikasyonu	40
3.4.4.	Montaj (Assembly) ve Kalite Değerlendirme	41
3.4.5.	Genom Anotasyonları	47
3.4.6.	MLST ve cgMLST sonuçları	53
3.4.7.	Genomik Antibiyotik Direnç Analizi	56
3.4.8.	Plazmid Analizi	60
3.4.9.	Filogenetik Analiz	66
3.4.10.	Evrimsel Analiz	72
3.5.	Biyoinformatik Analiz İş Akışı Geliştirilmesi	79
3.5.1.	İş Akışı Geliştirme Aşamaları	79
3.6.	İstatistiksel Analiz	81
4.	TARTIŞMA	82
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	88
	KAYNAKLAR	91
	ÖZGEÇMİŞ	110

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Infantis'in antimikrobiyal direnç ve genomik özelliklerindeki değişimlerin detaylı bir şekilde incelenmesini amaçlamaktadır. Gıda kaynaklı patojenlerin halk sağlığı üzerindeki ciddi etkileri göz önüne alındığında, özellikle çoklu ilaç direncine (MDR) sahip *Salmonella* Infantis suşlarının yaygınlaşması hem klinik tedavi stratejilerini hem de halk sağlığı politikalarını tehdit etmektedir. Bu bağlamda, çalışmamız, hedef organizmanın evrimsel ve genomik özelliklerinin yanı sıra, antimikrobiyal direnç genlerinin 2020-2024 yılları arasındaki dağılımını ve dinamiklerini genomik verilerle destekleyerek kapsamlı bir şekilde analiz etmektedir. Biyoinformatik yaklaşımlar ve ileri düzey genomik yöntemler ile yürütülen bu çalışma hem temel bilimler hem de uygulamalı alanlar için önemli bir referans oluşturmayı hedeflemektedir.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana zaman ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim Prof. Dr. Hamit Kaan MÜŞTAK'a teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum.

Bugünlere gelmemde emeği olan, beni karşılıksız, canı gönülden seven annem Gülendamar Ünal, babam Aytekin Ünal ve Kardeşim Beste Ünal'a bu yolculukta hep yanımda oldukları için teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca bilgi ve becerisi ile bana yardımcı olan danışman hocama ve varlıklarıyla, Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü'ndeki arkadaşlarıma ve tüm hocalarıma da teşekkür ederim. Ek olarak desteklerini üzerimden hiçbir zaman esirgemeyen Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji A.D. ve Veteriner Fakültesi'ndeki tüm hocalarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	Santigrat Derece
±	Artartı eksi (yaklaşık)
µg	Mikrogram
≤	Küçük eşit
≥	Büyük eşit
%	Yüzde
AMD	Antimikrobiyal Direnç
ANI	Ortalama Nükleotid Benzerliği
BEAST	Bayesian Evrimsel Analiz Örnekleme Araç Takımı
BLAST	Temel Yerel Hizalama Arama Aracı
BUSCO	Evrensel Tek Kopya Ortologları Değerlendirme Aracı
CARD	Kapsamlı Antibiyotik Direnç Veritabanı
CDC	Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
ENA	Avrupa Nükleotid Arşivi
ESBL	Genişletilmiş Spektrumlu Beta-Laktamaz
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
FISH	Floresan in situ Hibridizasyon
GC	Guanin-Sitozin (GC) İçeriği
HGT	Yatay Gen Transferi
HPC	Yüksek Performanslı Hesaplama
ISO	Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu
MDR	Çoklu İlaç Direnci
MIC	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MLST	Çok Lokuslu Dizi Tiplendirme
MLVA	Çok Lokuslu Değişken Sayılı Tandem Tekrar Analizi
MRSA	Metisiline Dirençli Staphylococcus aureus
NGS	Yeni Nesil Dizileme
ONT	Oxford Nanopore Teknolojileri
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFGE	Darbe Alanlı Jel Elektroforezi
RGI	Direnç Gen Tanımlayıcı
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
SPI	Salmonella Patojenite Adacıkları
T3SS	Tip III Sekresyon Sistemi

TSI	Üçlü Şeker Demir Agarı
WGS	Tüm Genom Dizileme
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
XLD	Ksiloza Lizin Deoksikolat Agarı
cgMLST	Çekirdek Genom Çok Lokuslu Dizi Tiplendirme
pESI	Plazmid Kodlu Salmonella Infantis Megaplazmidi
qPCR	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qRT	PCR Kantitatif Ters Transkripsiyon PCR



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Salmonella tiplendirmesinde kullanılan moleküler yöntemler	6
Şekil 3.1. Farklı direnç profilleri ve kapsadıkları antibiyotik sayısı	37
Şekil 3.2. Yıllara göre fenotipik direnç ve tekil AMD profillerinin karşılaştırılması	37
Şekil 3.3. FastQC analiz sonuçlarına ilişkin grafik	37
Şekil 3.4. Filtreleme öncesi ve sonrası kalite değerlendirme sonuçları	38
Şekil 3.5. Kraken2 sonuçlarına ilişkin grafik	41
Şekil 3.6. Bir numaralı örneğe ait 288036 bp uzunluğundaki plazmid üzerinde, antimikrobiyal direnç genlerinin, GC içeriğinin, profaj bölgelerinin, horizontal gen transferi (HGT) bölgelerinin gösterimi	43
Şekil 3.7. Bir numaralı örneğe ait montaj işlemi sonucunda oluşan iki adet kontiğin bandage programı kullanılarak görselleştirilmesi	44
Şekil 3.8. Montaj Sonucunda elde edilen, genom uzunluğu, fragman sayısı, kapsam değerleri ve en uzun fragmanların gösterildiği grafik	45
Şekil 3.9. Montaj sonuçlarının toplam uzunluk, kapsam, N50 ve kontig dağılımı ile görselleştirildiği grafik	45
Şekil 3.10. Her örnek başına SNP ve INDEL sayılarının örnek başına gösterimi	47
Şekil 3.11. CDS ve gen dağılımının yüzdelik oranlarıyla görselleştirilmesi	49
Şekil 3.12. cgMLST sonuçlarına ait ısı haritası ve filogenetik ağaç görselinin bir arada gösterilmesi	55
Şekil 3.13. Yıllara göre kromozomal AMD gen sayıları	57
Şekil 3.14. AMD genlerine ait çeşitliliğin yıllara göre dağılımı. ResFinder, CARD, MEGAs, ARG-ANNOT ve NCBI veri tabanları kullanıldı	58
Şekil 3.15. Yıllara göre plazmid AMD gen sayıları	61
Şekil 3.16. İki numaralı örneğe ait plazmidin görseli	62
Şekil 3.17. Plazmidlerde bulunan IS elementlerinin dağılımı	63
Şekil 3.18. Plazmidler ve üzerlerinde bulunan profaj bölgeleri	66
Şekil 3.19. Türkiye'deki örneklere ait ağ analizine ait grapetree görseli	68
Şekil 3.20. Türkiye'den girilen GCF_005886015.1 numaralı suşun ağ analizine göre bulunduğu konumun gösterilmesi	69
Şekil 3.21. Çekirdek genom ve 1000 replikasyon kullanılarak çizilen klonal analize ait filogenetik ağaç	71

Şekil 3.22. Toplam gen sayısının genom sayısına göre oranlanması ile bulunan pan-genom açıklık durumu	73
Şekil 3.23. Zamana bağlı yaş frekansının gösterilmesi	74
Şekil 3.24. Frekansa bağlı skyline plot değerlerinin gösterilmesi	75
Şekil 3.25. Rekombinasyonların yoğun olduğu örneklerin filogenetik ağaç üzerinde gösterilmesi	76
Şekil 3.26. BEAST analizi sonucunda elde edilen ağaç dosyası kullanılarak oluşturulan evrimsel filogenomik ağaç	77
Şekil 3.27. Tüm örneklerle yapılan BEAST analizi sonucu suşların kümelenme haritasının gösterilmesi	78
Şekil 3.28. Komut satırında iş akışına ait Nextflow çalışmasına ait denemeden bir görüntü	81

ÇİZELGELER

Çizelge 3.1. Çalışma için seçilen örneklere ait metaveriler	30
Çizelge 3.2. Test edilen 9 S. Infantis suşunun AMD profilleri	32
Çizelge 3.3. Ham NGS veri kalite özeti	36
Çizelge 3.4. Barkodlara ait kalite değerlendirme raporlarının özet sonuçları	39
Çizelge 3.5. Montaj işlemi sonucu elde edilen veriler	42
Çizelge 3.6. Anotasyon sonucunda elde edilen genlere ilişkin bilgiler	48
Çizelge 3.7. Yıllara göre farklı veri tabanlarında AMD gen çeşitleri ile ilgili veriler	58
Çizelge 3.8. Fenotipik direnç profilleri ile genotipik direnç profillerinin karşılaştırılması	59



1. GİRİŞ

1.1. *Salmonella*'nın Genel Özellikleri

Hayvanlarda ve insanlarda enfeksiyöz hastalıklara sebep olan *Salmonella* genusu, *Enterobacteriaceae* familyası içerisinde yer alan, Gram negatif çomak şekilli bakterilerdir (Lan vd., 2009). Bu bakteriler fakültatif anaerob olup S tipli, yuvarlak koloniler oluşturmaktadır. Genus içinde yer alan *S. Pullorum* ve *S. Gallinarum* hariç diğer *Salmonella* türleri peritrik flagellaları sayesinde hareketlidir. *Salmonella* türleri tifo, paratifo, gıda zehirlenmesi, gastroenterit, sepsis gibi çeşitli hastalıklara neden olabilmektedir (McVey vd., 2022; Swayne ve Glisson, 2013).

Salmonella genusu, *S. bongori* ve *S. enterica* olmak üzere iki türe ayrılır. *S. enterica*, altı alt türden oluşmaktadır: *S. enterica* subsp. *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* ve *indica*. İnsan ve hayvanlardan izole edilen *Salmonella* suşlarının büyük çoğunluğu *S. enterica* subsp. *enterica* alt türüne aittir (Gianella, 1996; McVey vd., 2022).

Serotipler, konak spesifik olanlar ve konak spesifik olmayanlar olarak sınıflandırılmaktadır. Konak spesifik olan serotipler; Typhi ve Paratyphi (insan), Choleraesuis (domuz), Gallinarum/Pullorum (kanatlı), Dublin (sığır), Abortus-ovis (koyun), Abortus-equi (at)'dir. Konak spesifik olmayan serotiplerden Infantis, Hadar, Virchow, Enteritidis, gibi serotipler hem insanlarda hem hayvanlarda enfeksiyona neden olabilmektedir. Serotipler ayrıca tifoidal ve paratifoidal etkenler olarak da ikiye ayrılmaktadır. Tifoidal serotipler sadece insanda hastalık oluşturan *S. Typhi*, *S. Paratyphi* iken; paratifoidal serotipler ise başta *S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis* olmak üzere diğer serotiplerin tamamıdır (Barlow ve Hall, 2002; Grimont vd., 2000).

1.2. *Salmonella* Epidemiyolojisi

Non-tifoidal *Salmonella*, küresel çapta en önemli gıda kaynaklı bakteriyel patojenlerden biri olarak kabul edilmektedir. Yıllık tahminlere göre, yaklaşık 94 milyon insan enfekte olmakta ve bu vakalarında %86'sının gıda kaynaklı olduğu

bildirilmiştir (Alba vd., 2020; Majowicz vd., 2010). Dünyada, non-tifoidal *Salmonella* enfeksiyonlarının insanlardaki yıllık ölüm sayısının ortalama 215.000 civarında olduğu öngörülmektedir. Bu durum, non-tifoidal *Salmonella*'yı insanlarda en önemli gıda kaynaklı enterik hastalıklardan biri haline getirmektedir (Kumar vd., 2025; Majowicz vd., 2010; WHO, 2018).

Salmonella serotiplerinin küresel dağılımı, bölgesel faktörler, hayvansal üretim sistemleri, gıda güvenliği uygulamaları ve hijyen koşullarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Dünya genelinde en sık izole edilen *Salmonella* serotipleri arasında *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Newport* ve *S. Heidelberg* bulunmaktadır (EFSA, 2022). Avrupa Birliği Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından 2021 yılında yayınlanan rapora göre, *S. Enteritidis* (%50,3) en yaygın insan enfeksiyonu etkeni olarak tanımlanırken, bunu *S. Typhimurium* (%10,7) ve *S. Infantis* (%6,3) takip etmektedir (EFSA, 2022). Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde ise Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi (CDC)'nin PulseNet programı aracılığıyla yapılan genomik izleme çalışmalarına göre, 2020 yılında en sık rastlanan *Salmonella* serotipleri *S. Enteritidis* (%19,3%), *S. Newport* (%10,7), *S. Typhimurium* (%9,5) ve *S. Infantis* (%7,9) olarak bildirilmiştir (Nadon vd., 2017).

Son yıllarda *S. Infantis*'in özellikle kümes hayvanlarında ve insanlarda giderek daha sık tespit edildiği ve pESI-Megaplasmid gibi mobil genetik elementler taşıyan MDR klonlarının yayılım gösterdiği bildirilmektedir (Alba vd., 2020). Gelişmekte olan ülkelerde ise *S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis* dışında *S. Weltevreden*, *S. Agona*, *S. Kentucky* gibi serotiplerin de yaygın olduğu gözlemlenmiştir (Popa vd., 2021). Gıda kaynaklı hastalık salgınları açısından, kontamine yumurta ve kanatlı eti *S. Enteritidis* ve *S. Infantis* için başlıca bulaş kaynakları olurken, sığır eti ve süt ürünleri *S. Dublin* ile ilişkilendirilmiştir (EFSA, 2022).

Türkiye'de kanatlı ve kanatlı etindeki *Salmonella* serotiplerinin sıklığı üzerine yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar, dünya genelindeki eğilimlerle büyük ölçüde paralellik göstermektedir. Ulusal Salmonella Kontrol Programı (Ulusal Salmonella Kontrol Programı [USKP], 2018) kapsamında yayımlanan rapora göre Türkiye'de gıda

kaynaklı *Salmonella* enfeksiyonlarının en yaygın etkenleri *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* ve *S. Infantis* olarak bildirilmekte ve *S. Infantis* sayısında bir artış olduğu belirtilmektedir. USKP haricinde Şahan vd. (2014)'nin yaptığı farklı bir çalışmada %77 oranıyla *S. Infantis*'in en sık karşılaşılan serotiplerden biri olduğu belirtilmektedir. Acar vd. (2017) özellikle kanatlı sektöründe, *S. Infantis* suşlarının yaygınlığı, direnç profili ve farklı genotipik özelliklerine dikkat çekmektedir.

Türkiye'de 2012-2016 yılları arasında *S. Enteritidis*, en yaygın olarak izole edilen *Salmonella* serotipi olmuş olup bu oran %57,3 ile %74,1 arasında değişmektedir. Yıllara bağlı farklılıklar olmakla birlikte, *S. Typhimurium* (%3,0-8,5), *S. Infantis* (%4,0-6,7), *S. Paratyphi B* (%3,2-3,8) ve *S. Kentucky* (%2,7-3,8) en sık tespit edilen diğer serotipler arasında yer almıştır. Bu veriler, insanlarda klinik vakalardan elde edilen örneklerin analiz edilmesiyle belirlenmiştir (USKP, 2018). Özellikle antibiyotik dirençli *S. Infantis* suşlarının Türkiye'de giderek daha yaygın hale geldiği ve kümes hayvanlarından insanlara bulaşma riskinin arttığı gözlemlenmiştir. *Salmonella* suşları üzerindeki genomik izleme çalışmalarının artırılması, özellikle direnç profili yüksek serotiplerin yayılımının kontrol altına alınması açısından büyük önem taşımaktadır.

1.3. *Salmonella*'nın Laboratuvar Teşhisi

1.3.1. Fenotipik Yöntemler

Salmonella izolasyonu ve teşhisinde standart yöntemlerden biri ISO 6579 prosedürüdür. Bu prosedürle izole edilen 2500'den fazla *Salmonella* serotipi, Kauffmann-White şeması temel alınarak formülize edilerek sınıflandırılmaktadır (ISO 6579:1:2017; Popoff vd., 2002). Serotiplendirme, somatik "O", flagellar "H" ve virülens "Vi" antijenlerinin aglütinasyonu esasına dayanmaktadır (Grimont ve Weill, 2007; McVey vd., 2022).

Fenotipik teşhiste selektif ve diferansiyel besiyerleri kullanılmaktadır. *Salmonella* izolasyonu için yaygın olarak Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) agar, Brilliant Green Agar (BGA) ve Hektoen Enteric (HE) agar tercih edilmektedir. Bu

ortamlarda *Salmonella*, H₂S üreten, laktoz negatif koloniler oluşturarak diğer enterik bakterilerden ayırt edilebilmektedir (Swayne ve Glisson, 2013). Bunun yanı sıra, biyokimyasal testler de teşhiste önemli rol oynamaktadır. Triple Sugar Iron Agar (TSI) testi, glukoz fermentasyonu, H₂S üretimi ve gaz oluşumunu belirlemek için kullanılırken, Simmons Sitrat Agar testi bakterinin sitrat kullanma yeteneğini analiz etmektedir. Ayrıca, üreaz testi ile *Salmonella* suşlarının genellikle üreaz negatif olduğu doğrulanabilmektedir (Lan vd., 2009).

Fenotipik yöntemler, *Salmonella*'nın kültür özellikleri, biyokimyasal profili ve hareketliliği gibi fiziksel özelliklerine dayanmaktadır. Rutin teşhislerde yaygın olarak kullanılan bu yöntemler, her ne kadar altın standart olarak kabul edilse de hassasiyet ve özgüllük açısından sınırlamalara sahiptir ve kesin teşhis için genellikle moleküler yöntemlerle desteklenmesi gerekmektedir (Dalyan Cilo vd., 2013; Parry vd., 2011). Bu fenotipik yöntemler uygulama kolaylığı ve düşük maliyeti nedeniyle avantajlı olsa da zaman alıcı olmaları, fenotipik varyasyonlara bağlı hatalara açık olmaları nedeniyle özgüllükleri ve duyarlılıkları ile ilgili problem yaşanabilmektedir (Yoshida vd., 2016).

1.3.2. Moleküler ve Genotipik Yöntemler

Fenotipik yöntemlerin sınırlamalarını aşmak için moleküler genetik teknikler geliştirilmiştir. Bu yöntemler, *Salmonella*'nın spesifik genetik dizilimlerini hedef alarak daha hassas ve hızlı teşhis sağlamaktadır. Moleküler yöntemler, kültür bağımsız teşhis sağlayarak özellikle hızlı ve güvenilir epidemiyolojik incelemelerde önemli avantajlar sunmaktadır. Bu yöntemlerin başında Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve türevleri gelmektedir (Dalyan Cilo vd., 2013).

Salmonella'nın tespitinde en yaygın kullanılan genetik belirteçler *invA* (invazyon geni), *fimA* (fimbria), *stn* (enterotoksin), *spvR* (sistemik virülans regülatör), *spvC* (sistemik virülans C proteini), *spiC* (*Salmonella* patojenite adası 2 (SPI-2) sekresyon sistemi proteini) ve *pipD* (Tip III sekresyon sistemi efektör proteini) genleridir (Foley vd., 2013). Konvansiyonel PCR yöntemi (Dalyan Cilo vd., 2013), *Salmonella* tür spesifik genlerini hedefleyerek varlığını belirlerken, gerçek zamanlı

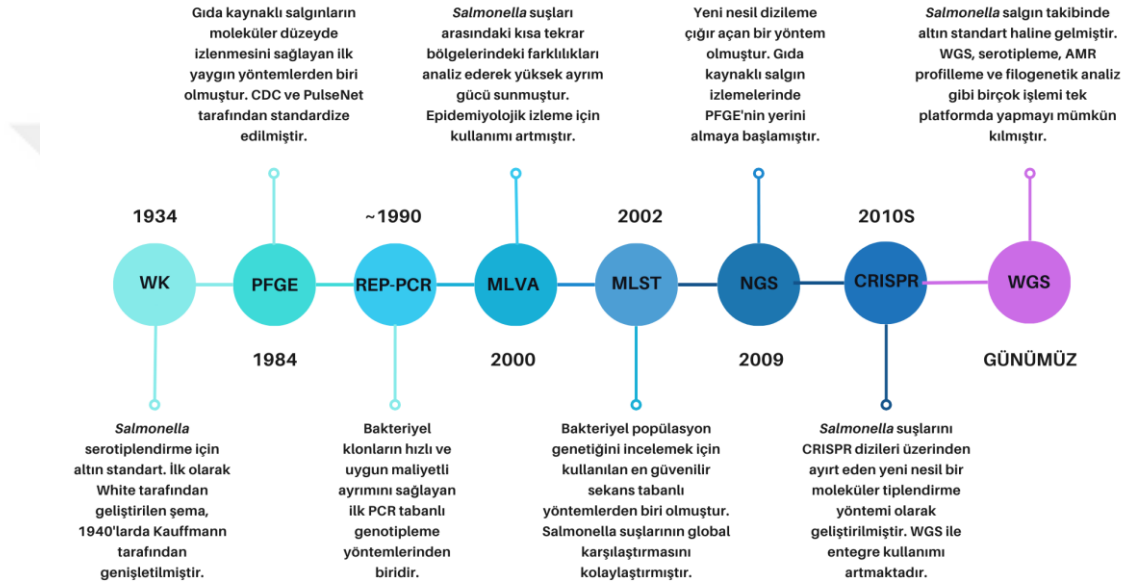
PCR (qPCR) (Kardoğan vd., 2019) ise bakterinin DNA'sını kantitatif olarak analiz eder ve düşük miktarlardaki *Salmonella* DNA'sının bile saptanmasını sağlar. Multiplex PCR, birden fazla genin eşzamanlı olarak amplifikasyonuna imkân vererek farklı *Salmonella* serotiplerini aynı anda tespit edebilir (Dalyan Cilo vd., 2013; Kardoğan vd., 2019; O'regan vd., 2008).

Moleküler teşhis yöntemleri arasında nükleik asit hibridizasyon teknikleri de yer almaktadır. Fluorescent in situ hybridization (FISH) yöntemi, *Salmonella*'ya özgü DNA dizilerini floresan probalar ile işaretleyerek tespit ederken, DNA microarray teknolojisi aynı anda binlerce genetik diziyi analiz ederek *Salmonella* teşhisinde yüksek hassasiyet sağlamaktadır (Özer ve Kimiran-Erdem, 2013). DNA mikroarray teknolojisi, *Salmonella* gibi patojenlerin hızlı ve hassas tespiti için kullanılan bir moleküler tanı yöntemidir. Hedef DNA dizilerine bağlanan probaların floresan işaretleme ile okunmasına dayanarak, aynı anda binlerce genetik diziyi analiz edebilir. Gıda güvenliği, klinik mikrobiyoloji ve çevresel izleme gibi alanlarda yaygın olarak kullanılan bu teknoloji, *Salmonella* suşlarının serotipik ve genetik farklılıklarını belirlemenin yanı sıra, antibiyotik direnç genleri ve virülans faktörlerinin eş zamanlı tespitinde büyük avantajlar sunar (Almeida vd., 2010; Özer ve Kimiran-Erdem, 2013).

1.3.3. Moleküler Tiplendirme Yöntemleri ve Yeni Nesil Dizileme

Moleküler genotiplendirme, farklı *Salmonella* suşlarını genetik düzeyde ayırt etmek ve salgınları tespit etmek için kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden Multilocus Sequence Typing (MLST) (Enright ve Spratt, 1999), *Salmonella* suşlarının evrimsel ilişkisini belirlemek için kullanılır (Achtman vd., 2012; Carattoli vd., 2014). MLST haricinde *Salmonella* serovarlarının epidemiyolojik anlamda birbirinden genotipik olarak ayrılabilmesini sağlayan moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) (Schwartz ve Cantor, 1984), Repetitive Extragenic Palindromic Polymerase Chain Reaction (Rep-PCR) (Hiatt ve Seal, 2009), ribotiplendirme (Esteban vd., 1993), Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) (Ranjbar vd., 2016), Multi-Locus Sequence Typing (MLST) (Sarıçam ve Müştak, 2018), Yeni Nesil Dizileme (NGS) (Taylor vd., 2015),

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) (Liu vd., 2011) ve Tüm Genom Dizileme (WGS) (Nadon vd., 2017) gibi diğer moleküler yöntemlerdir (Şekil 1.1). Geçtiğimiz yıllarda DNA ve genom dizileme teknolojilerinde meydana gelen hızlı ilerlemeler, dizileme kalitelerinde iyileştirmeler, biyoinformatik araçların daha kullanılır hale gelmesi ve azalan dizileme maliyetleri sonucunda NGS'nin WGS için kullanım alanı oldukça genişlemiştir (Allard vd., 2016).



Şekil 1.1. *Salmonella* tiplendirmesinde kullanılan moleküler yöntemler (Alikhan vd., 2018; Leekitcharoenphon vd., 2014)

Gelişen farklı NGS teknolojileri ile birlikte WGS, *Salmonella* teşhisinde ve filogenetik analizlerinde giderek daha geniş bir kullanım alanı bulmaktadır (Alikhan vd., 2018; Leekitcharoenphon vd., 2014). WGS ile *Salmonella* genomunun tamamı yüksek genom derinliğiyle dizilenecek suşların genetik farklılıkları, antimikrobiyal direnç profilleri ve salgın kaynakları belirlenebilmektedir. WGS verileri kullanılarak yapılan tek nükleotid polimorfizm (SNP) analizleri, *Salmonella* suşları arasındaki küçük farklılıkların bile tespit edilmesine bu sayede suşların klonal ilişkilerinin ortaya konmasına olanak sağlar (Alikhan vd., 2018; Allard vd., 2016; Ashto vd., 2016).

1.4. *Salmonella*'nın Antibiyotik Direnci ve Halk Sağlığı Üzerindeki Etkileri

Bakterilerde antibiyotik direncinin çeşitli biyokimyasal süreçleri vardır. Bunlar hedef proteinin mutasyonel değişimi, ilacın enzimatik inaktivasyonu, diğer türlerden direnç genlerin edinimi, ilacın hücreye girişinin azaltılması, aktif dışarı atım gibi mekanizmaları barındırır (Nikaido, 2009). Bunlardan florokinolonlar genellikle DNA topoizomera mutasyonları tarafından oluşur (Hooper, 2000). Aminoglikozidlerde, aminoglikozit-modifiye enzimi adı verilen birçok enzim bulunmaktadır. Bunlardan bazıları, *aac(3)-II*, *aph(3')-I* ve *aac(3)-II* gibi enzim üreten ve Gram negatif bakterilerdeki aminoglikozit direncinin %60'dan fazla bir çoğunluğuna sebep olmaktadır (Över vd., 2001; Shaw vd., 1993). Gram negatif bakterilerde β -Laktam R (resistans) plazmidi ile taşınan direnç ilk olarak 1962'lerde bildirilmiştir. Sonrasında filogenetik ailelerine ambler sınıflandırması isimiyle A (Serin), B (Metallo), C (*ampC*) ve D (OXA) olarak sınıflandırılmıştır. Karbapenemler bu sınıflardan A, B ve D içinde yer almaktadır (Papp-Wallace vd., 2011). Tetrasiklin direnç geni *tetA*, Gram negatiflerde aktif efluks pompasına bağlı dirence (Levy vd., 1992), plazmidlerde bulunan *qnr* genleri florokinolon direncine (Robicsek vd., 2006) ve ESBL enzimi üretilmesini sağlayan CTX-M kodlayan genler de R plazmidi ile dirence sebep olmaktadır (Bonnet, 2004).

Salmonella türlerinde antibiyotik direnci özellikle beta-laktamlar (sefalosporinler, karbapenemler), florokinolonlar (siprofloksasin, nalidiksik asit) ve tetrasiklinler gibi klinik açıdan kritik öneme sahip antibiyotiklerde direnç görülmektedir (Wang vd., 2017). Avrupa ve ABD'de yapılan, özellikle *S. Infantis* suşlarında florokinolon ve geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı %50'den fazla ve hızla artan direnç oranları bildirilmektedir (Alba vd., 2020; Alba vd., 2023; Sarı ve Can, 2021; Robicsek vd., 2015). Fenotipik olarak en sık gözlenen direnç mekanizmaları arasında efluks pompaları (*AcrAB-TolC*), porin kayıpları (*ompF*) ve beta-laktamaz üretimi (*CTX-M*, *TEM*, *SHV*, *ampC*) yer almaktadır. *Salmonella*, intrinsik olarak eritromisin, rifampisinler ve polimiksinlere (Kolistin dahil) karşı dirençlidir, bu nedenle bu ajanlar tedavide etkisizdir (Chuanchuen ve Padungtod, 2009). *S. Infantis* araştırmaları sırasında, insan ve hayvan kaynaklı izolatlar arasındaki direnç farklılıkları dikkatle incelenmelidir. Özellikle hayvan kaynaklı suşların

genellikle üç veya daha fazla antibiyotiğe dirençli MDR ve bu direnç genlerini taşıyan pESI megaplasmid içerebilmektedir.

Hayvansal üretimde profilaktik, teröpötik ve metafilaktik amaçlı antibiyotik kullanımı olabilmektedir. Buna ek olarak hayvanlarda kullanılan antibiyotik oranlarının insanlardan birkaç kat fazla olduğu da bilinmektedir (McEwen vd. 2002). Son yıllarda, patojen mikroorganizmalarda antibiyotik direnci, antibiyotiklerin yaygın ve yanlış kullanımı, kontrolsüz uygulamalar, izleme programlarının yetersiz kalması gibi nedenlerden ötürü giderek artmaktadır. Bu artış ilerleyen süreçte çeşitli yollar ile kazanılan direnç mekanizmalarına sahip bakterilerin seçilmesi ve yayılmasıyla sonuçlanmaktadır (Lan vd., 2009; WHO, 2017). Bunlardan bir tanesi olan dirençli *Salmonella* enfeksiyonları, uzun süreli hastanede yatışlara, daha maliyetli tedavilere ve ciddi komplikasyonlara yol açabilmektedir (CDC, 2022; Kumar vd., 2025; WHO, 2017). Örneğin, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) her yıl 700 bin kişinin antimikrobiyal dirençli bakteriler nedeniyle hayatını kaybettiğini ve bu sayının 2050'de 10 milyona ulaşabileceğini öngörmektedir (O'Neill, 2016; WHO, 2017).

CDC tarafından yayınlanan 2020 yılı verilerine göre, ABD'de yılda en az 2,8 milyon kişi antibiyotiklere dirençli mikroorganizmalarla enfekte olmakta ve en az 35,000 kişi bu enfeksiyonlar sonucu hayatını kaybetmektedir. Hayvanlar, insanlar gibi, bağırsaklarında antibiyotiğe dirençli bakteriler de dahil olmak üzere çok sayıda zoonoz ve kommensal bakteri taşımakta, bu bakteriler de gıdalar ile insanlara bulaşabilmektedir ve salgınlara yol açabilmektedir (CDC, 2022). MDR içeren *Salmonella* suşları dünya çapında yayılım göstermekte ve birçok farklı ülkenin bildirim yapmasını takiben 2019 yılında DSÖ, geniş spektrumlu beta laktamaz (ESBL) üreten *Enterobacteriaceae* türlerini halk sağlığı için büyük risk oluşturan "Kritik Öncelikli Patojenler" listesine eklemiştir (WHO, 2017).

İnsanlarda *Salmonella* enfeksiyonları genellikle tipik gastroenterit semptomlarıyla seyretmekte, ciddi enfeksiyonlar meydana geldiğinde de üçüncü kuşak sefalosporinler ve florokinolonlar aracılığıyla tedavi edilmektedir (Montone vd., 2023). Bu yüzden bu antimikrobiyallere karşı oluşan direnç özellikle az gelişmiş

lkelerde büyük problemler yaratmaktadır. 2010 yılından beri artmaya devam eden MDR *S. Infantis* suşları, bu direnç mekanizmalarının yanında, virülens, yayılım ve bakteriyel direnç gibi parametrelerin artmasıyla sonuçlandığı bildirilmektedir (Alvarez vd., 2023). Bu mekanizmalardan bazıları bakterinin kromozomunda meydana gelirken, bazıları da plazmidler aracılığıyla aktarılmaktadır. Özellikle günümüzde *S. Infantis* suşlarında bulunan megaplazmid olan (pESI), genellikle geniş spektrumlu beta laktamaz (ESBL; rneğın, *bla*CTX-M) ve sulfonamid (*sulI*) gibi antimikrobiyalleri içerirken, kromozom aracılığıyla nalidiksik asit (*gyrA* mutasyonu) nitrofurantoin (*nfsA*) gibi antimikrobiyallere direnç meydana getiren genleri barındırabilmektedir (Aviv vd., 2014). *ampC* β-laktamazları, *S. Infantis*'in sefalosporinlere karşı direncini artıran önemli bir mekanizmadır.

1.5. *Salmonella*'nın Genomik Yapısı

Salmonella enterica, ortalama 4,5-5,5 milyon baz ifti (Mb) uzunluğunda bir kromozoma sahiptir. Genomu, yaklaşık 4,500 ile 5,500 protein kodlayan geni içermektedir ve bu genler, metabolizma, virülens, antimikrobiyal direnç ve çevresel adaptasyonla ilişkili birçok önemli mekanizmayı kontrol etmektedir. *Salmonella* genomunda ayrıca ribozomal RNA (rRNA) operonları, transfer RNA (tRNA) genleri ve mobil genetik elementler de bulunmaktadır (Alikhan vd., 2018; Allard vd., 2016).

Salmonella'nın genomik yapısı, fajlar, plazmidler ve patojenite adaları (SPI-*Salmonella* Pathogenicity Islands) gibi mobil genetik elementler açısından da oldukça dinamiktir. *Salmonella* serotipleri arasında değişiklik göstermekle birlikte, özellikle SPI bölgeleri, bakterinin konağı enfekte etme yeteneğinde kritik rol oynar (Connor vd., 2016). SPI-1 ve SPI-2 adaları, Tip III Salgı Sistemleri (T3SS) aracılığıyla hücre içine giriş ve makrofaj içinde hayatta kalma süreçlerini düzenler (Aviv vd., 2014).

Bazı *Salmonella* serotipleri, plazmidler aracılığıyla ek direnç ve virülens faktörleri kazanabilir. Örneğın, *S. Infantis*, *S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis* gibi serotipler, taşıdıkları plazmid aracılı genler sayesinde antibiyotik direnci ve konak adaptasyonu açısından avantaj sağlayabilir. *Salmonella* suşları arasında değişiklik göstermekle birlikte, genellikle plazmid büyüklükleri 50 kb ile 300 kb arasında

değişmektedir. Bu plazmidler ESBL ve MDR gibi özellikler içerebilir (Aviv vd., 2014; Connor vd., 2016; McVey vd., 2022).

Ayrıca, *Salmonella*'nın genomunda transpozonlar, faj entegrazonları ve rekombinasyon bölgeleri bulunur. Bu hareketli genetik elementler, bakterinin genetik çeşitliliğini artırarak antibiyotik direnci ve virülens faktörlerinin kazanılmasına olanak tanır. Bu nedenle, *Salmonella*'nın genomik yapısı, evrimsel adaptasyonu, konak patogenezi ve halk sağlığı açısından önemli bir araştırma alanı olmaya devam etmektedir (Montone vd., 2023; Raphenya vd., 2022).

Salmonella enterica serovarları, SPI, T3SS, adezyon proteinleri ve çeşitli toksinler gibi birçok virülens faktörü içermektedir. SPI-1 ve SPI-2, *Salmonella*'nın konağa invazyonunu ve makrofaj içinde hayatta kalmasını sağlayan en kritik patojenite adalarıdır (Alikhan vd., 2018; Alvarez vd., 2023). SPI-1, enterosit hücrelerine giriş için gerekli *invA*, *sipA* ve *sipC* gibi genleri barındırırken, SPI-2, *Salmonella*'nın hücre içi ortamda replike olmasını ve immün kaçış mekanizmalarını destekleyen *sseB* ve *sseC* genlerini kodlar (Marcus vd., 2000; Schlumberger vd., 2006).

Salmonella'da antimikrobiyal direnç çeşitli genetik mekanizmalarla sağlanmaktadır. Sulfonamidlere karşı direnç, *sul1*, *sul2* ve *sul3* genleri aracılığıyla dihidropteroat sentetaz enziminde modifikasyon yapılarak antibiyotiğin etkisinin engellenmesi ile gerçekleşir (Sarı ve Can, 2021). Kinolon direnci, *gyrA* ve *parC* mutasyonları yoluyla DNA giraz ve topoizomeras IV enzimlerinin modifikasyonu veya *qnrB*, *qnrD*, *qnrS* gibi plazmid aracılı direnç genleri ile sağlanır. Beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç, özellikle *blaTEM*, *blaCTX-M* ve *blaOXA* gibi beta-laktamaz genleri tarafından sağlanmakta olup, bu genler antibiyotiği hidrolize ederek etkisiz hale getirir (Wang vd., 2017). Kloramfenikollere karşı direnç, *floR* ve *catA1* genleri aracılığıyla efluks pompalarının aktivasyonu veya asetil transferazlar yoluyla antibiyotiğin inaktivasyonu ile gerçekleşir. Aminoglikozid direnci, *aac(6')*, *ant(3'')* ve *aph(3')* gibi enzimler tarafından sağlanarak antibiyotiğin etkisi bloke edilir (Chuanchuen ve Padungtod, 2009). Tetrasiklinlere karşı direnç ise, *tetA*, *tetB*, *tetC* gibi genler aracılığıyla efluks pompalarının aktivasyonu veya ribozomal koruma

proteinlerinin ekspresyonu ile gerçekleşmektedir. Bu direnç mekanizmaları, *Salmonella*'nın çevresel baskılara adaptasyonunu artırarak antibiyotik tedavilerinin etkinliğini azaltmaktadır (Punchihewage-Don vd., 2024).

1.6. NGS ve Epidemiyolojik Kullanımı

NGS, bakteriyel genomların tamamının dizilenebilmesini sağlayan yüksek verimli bir teknolojidir. Bu teknoloji bakterilerin genetik yapısını, patojenite faktörlerini, antibiyotik direnç genlerini ve evrimsel ilişkilerini detaylı bir şekilde analiz etme imkânı sunar. Klasik moleküler tiplendirme yöntemlerine kıyasla, NGS daha yüksek çözünürlük sağlayarak suşlar arasındaki tek nükleotid polimorfizmlerini (*Single Nucleotide Polymorphisms, SNP*) hassasiyetle tespit edebilmektedir (Bansal vd., 2005). Epidemiyolojik çalışmalar, salgın araştırmaları ve gıda güvenliği izleme programlarında NGS'nin kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (Ashton vd., 2016). NGS yöntemleri günümüzde kısa ve uzun okuma şeklinde iki farklı teknolojik yöntem kullanılarak uygulanmaktadır. Bu yöntemlerden olan uzun okuma teknolojisi kısa okuma teknolojisine göre daha az bilgisayar gücü gerektirmesi, gerçek zamanlı dizileme yapmaya imkân vermesi ve daha uzun genom dizileri oluşturmaya olanak sağladığından dolayı günümüzde sıkça kullanılmaktadır (Karst vd., 2021). Uzun dizileme teknolojisinin en önemli özelliklerinden biri olan rekombinasyonları, tekrar eden bölgeleri ve kromozom/plazmid ayrımını tespit edebilme özelliği sağlamaktadır. Bu teknoloji ile bakteriyel suşlara ait bütün ve parsiyel kromozomlar, fajlar ve plazmidler gibi mobil elementlere ait DNA dizileri hızlı ve doğru bir şekilde ortaya konulabilmektedir (Raphenya vd., 2022).

NGS çalışmaları kapsamında dizilemesi yapılan *Salmonella* sayısında dünya genelinde bir artış görülmektedir. Dünyada benzer çalışmaları yapan başlıca kurumlar olan ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) (Allard vd., 2016), PulseNet International (Nadon vd., 2017), Wellcome Trust Sanger Centre (Connor vd., 2016), Public Health England (Ashton vd., 2016) ve Denmark Technical University (DTU) (Leekitcharoenphon vd., 2014) yer yıl kendi laboratuvarlarında rutin olarak *Salmonella* ile ilgili yüzlerce tüm genom dizileme çalışması gerçekleştirmektedir. Günümüzde NGS çalışmaları sonucunda ortaya çıkan büyük veri (Big Data) bilgilerinin analizi, biyoinformatik analizler olarak adlandırılmakta ve bu analizlerin

gerçekleştirilebilmesi için biyoinformatik iş akışları yazılmaktadır. Bu sayede elde edilen verilere ait sonuçların standardizasyonu, tekrarlanabilirliği, ulaşılabilirliği ve kolaylaştırılmasının sağlanması ihtiyacı giderilmektedir (Bansal, 2005). Bu çalışmalar sonucu ortaya çıkan verilerin analizinin gerçekleştirilmesi büyük veri manipülasyonları ve uzmanlık gerektirdiği için büyük bir altyapı gerektirmektedir. Laboratuvarlar bu sorunun üstesinden biyoinformatik uzmanları ve ortaya çıkan bu büyük verilerin analizini gerçekleştirebilen yüksek işlemcili bilgisayar (HPC)'lar ile gelmektedirler. Bu gibi merkezler, ortaya çıkan bu büyük verinin analizinin diğer verilerden farklı olması ve biyoinformatik uzmanı kişiler gerektirmesinden dolayı, standardize edilmiş “*pipeline*” (iş akışı)'lar aracılığıyla otomatize ederek gerçekleştirmektedir.

WGS çalışmaları tamamlandıktan sonra epidemiyolojik ilişkileri genotipik verileri kullanarak göstermek adına çözünürlüğü normal MLST yönteminden fazla olan Tüm Genom Multilocus Sequence Typing (wgMLST) ve Core Genome Multilocus Sequence Typing (cgMLST) gibi yöntemler kullanılarak suşlar arasında genomik benzerlikler sekans tipleri ve SNP farklarına göre ortaya konabilmektedir. Kullanılan gen sayısı ve bu genlerin büyüklüklerine göre birbirinden ayrılan bu iki yöntem kullanılarak oluşturulan iki farklı online veri bankası, Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk>) (Alikhan vd., 2018) ve PGADB-builder (<http://wgmlstdb.imst.nsysu.edu.tw/>) (Liu vd., 2016) bulunmaktadır. Yukarıdaki gibi veri tabanlarının kullanımı her ne kadar standardize bir yöntem gibi görünse de WGS sonuçları analiz edilirken kullanılan farklı biyoinformatik araçlar ve programlar da elde edilen sonuçları dramatik bir şekilde etkileyebilmektedir (Seoane vd., 2021).

WGS verileri ve örneklere ait metaveriler kullanılarak gerçekleştirilen genomik epidemiyoloji, bakteriyel patojenlerin moleküler düzeyde takibini sağlayarak hastalıkların kaynağını belirlemek, bulaş zincirlerini tespit etmek ve halk sağlığına yönelik önlemler geliştirmek amacıyla kullanılmaktadır (Alcock vd., 2020). Pek çok farklı patojen için de kullanılabilen bu yöntem *S. Infantis* için de son yıllarda dünya genelinde gıda kaynaklı etkenlerin tespiti için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Leekitcharoenphon vd., 2014; Pang vd., 2012; Zankari vd., 2012). Son yıllarda

genomik epidemiyoloji, sadece salgınların kaynağını belirlemekle kalmamış, aynı zamanda yeni ortaya çıkan direnç mekanizmalarının tespit edilmesinde de kritik bir rol oynamıştır. PulseNet ve GenomeTrakr gibi küresel veri tabanları, *S. Infantis* genomlarının gerçek zamanlı analizini sağlayarak halk sağlığı otoritelerinin bu direnç mekanizmalarının anlaşılması ve acil halk sağlığı aksiyonlarının alınmasına olanak tanımaktadır (Brown vd., 2019; Carriço vd., 2013; Connor vd., 2016).

Avrupa Birliği'nde yapılan genomik epidemiyoloji çalışmaları, *S. Infantis*'in pESI-Megaplasmid taşıyan klonlarının hızla yayıldığını ve bu suşların genellikle MDR özelliği gösterdiğini ve bu durumun antimikrobiyal direnç açısından büyük problemler yarattığını ortaya koymaktadır (Alba vd., 2020, Alba vd., 2023, Alvarez vd., 2023; ECDC, 2024; EFSA, 2019). Örneğin; EFSA'nın 2019 yılında gerçekleştirdiği geniş çaplı çalışmada, kanatlı hayvanlardan izole edilen *S. Infantis* suşlarının insan kaynaklı enfeksiyonlarla genetik olarak büyük benzerlik taşıdığı ve çoğunun florokinolon ve geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklere dirençli olduğu belirlenmiştir (EFSA, 2019). CDC ise ABD'de 2014-2020 yılları arasında süregelen *S. Infantis* salgınlarını inceleyerek, bu suşların kanatlı etiyle ilişkili olduğunu ve plazmid aracılı direnç genleri taşıdığını ve MDR suşlarının bu salgınlarda olduğunu tespit etmiştir (CDC, 2022).

Bu nedenle, *S. Infantis*'in genomik epidemiyolojisi, küresel sağlık otoriteleri tarafından halk sağlığı risklerini en aza indirmek, antibiyotik dirençli suşların yayılımını izlemek ve gıda güvenliğini sağlamak amacıyla aktif olarak kullanılan bir araç haline gelmiştir. Yapılan çalışmalar, genomik izleme sistemlerinin yaygınlaştırılması gerektiğini ve yüksek risk taşıyan MDR *S. Infantis* suşlarının özellikle kanatlı hayvancılığı başta olmak üzere gıda üretim zincirinde sıkı denetim altına alınması gerektiğini ortaya koymaktadır.

1.7. Bakteriyel Evrim

Bakteriler, hızlı adaptasyon yetenekleri ve geniş ekolojik yayılımları sayesinde dünyadaki en başarılı mikrobiyal gruplardan biri olarak kabul edilir. Bakteriyel evrim, mutasyonlar, genetik rekombinasyon ve özellikle horizontal gen transferi (HGT) yoluyla şekillenir (Ochman vd., 2000). Bu süreçler, bakterilerin antibiyotik direnci

kazanmasına, konak uyum mekanizmaları geliştirmesine ve yeni metabolik işlevler edinmesine olanak tanır (Davies ve Davies, 2010). Özellikle antibiyotik direnci, bakteriyel evrimin en iyi belgelenmiş örneklerinden biridir. Örneğin, *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi patojenlerde β -laktamaz genlerinin taşınabilir genetik elementlerle yayılması, bu bakterilerin geniş spektrumlu antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesine neden olmuştur (Bush ve Bradford, 2016). Benzer şekilde, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşları, *mecA* geni aracılığıyla β -laktam antibiyotiklerden kaçınmayı başarmış ve küresel bir sağlık tehdidine dönüşmüştür (Lakhundi ve Zhang, 2018).

Bakterilerin evrimsel süreçleri yalnızca direnç kazanımıyla sınırlı değildir; aynı zamanda patogeneze, simbiyotik etkileşimler ve çevresel adaptasyonlar gibi biyolojik işlevlerde de önemli değişimlere neden olur. Örneğin, *Salmonella enterica*'nın farklı konak türlerine uyum sağlaması, gen kayıpları ve yeni gen kazanımlarıyla şekillenen bir evrimsel süreçtir (Langridge vd., 2015). Son yıllarda WGS ve filogenomik analizler, bakterilerin evrimsel dinamiklerini incelemekte kritik bir rol oynamaktadır (Didelot vd., 2012). Bu yöntemler, bakteriler arasındaki genetik akışın, popülasyon yapısının ve türler arası adaptasyonun daha iyi anlaşılmasını sağlamaktadır. Bakteriyel evrimi anlamak, yalnızca temel mikrobiyoloji açısından değil, aynı zamanda halk sağlığı, tarım ve biyoteknoloji alanlarında da büyük öneme sahiptir.

1.8. Biyoinformatik Analizler ve Veri Standardizasyonu

Bakterilerde biyoinformatik analizler genellikle bir dizi belirli aşamadan oluşur. İlk olarak, genomik verilerin elde edilmesi için uygun bir sekanslama tekniği seçilir ve bakteri örneği üzerinde sekanslama işlemi gerçekleştirilir. Ardından, elde edilen sekans verileri temizlenir ve kalite kontrolünden geçirilir, böylece doğru ve güvenilir sonuçlar elde edilir. Daha sonra, temizlenmiş veriler bir dizi analiz aşamasından geçirilir. Bu analizler arasında genom montajı, gen tanımlama, gen varyantı analizi, filogenetik analiz ve fonksiyonel analiz bulunabilir. Genom montajı, kısa DNA dizilerinin birleştirilerek bakteri genomunun tamamının oluşturulması işlemidir. Gen tanımlama aşamasında ise, monte edilmiş genom üzerinde potansiyel genlerin tanımlanması ve anotasyonu yapılır. Gen varyantı analizi, farklı bakteri

suşları arasındaki genetik farklılıkların belirlenmesini sağlar ve bu farklılıkların fenotipik özellikler üzerindeki etkileri incelenir. Filogenetik analiz, bakterilerin evrimsel ilişkilerini ve soy ağaçlarını ortaya çıkarmak için kullanılırken, fonksiyonel analizde ise tanımlanan genlerin fonksiyonları ve biyolojik süreçlerdeki rolleri belirlenir. Bu aşamaların tamamlanmasıyla, bakterilerin genomik verilerinden önemli bilgiler elde edilir ve bu bilgiler genetik yapıları, evrimlerini, çevresel adaptasyonlarını ve patojenik mekanizmalarını anlamamıza yardımcı olur (Carhuaricra-Huaman vd., 2024; Carriço vd., 2014).

Bakterilerde biyoinformatik analizlerde tekrarlanabilirlik, sonuçların güvenilirliğini sağlamak için önemlidir. Bu analizler genellikle büyük miktarda veriyle çalışırlar ve birçok farklı parametreyi içerirler. Tekrarlanabilirlik, aynı analizlerin veya işlemlerin farklı zamanlarda veya farklı araştırmacılar tarafından tekrarlanabilme yeteneğini ifade eder. Bu durum, sonuçların doğruluğunu ve güvenilirliğini değerlendirmek için kritik öneme sahiptir (Montone vd., 2023). Özellikle bakterilerde, farklı suşlar arasındaki genetik ve fenotipik varyasyonların incelenmesi genellikle tekrarlanabilir analizler gerektirir. Aynı zamanda, bakteriyel genomların karmaşıklığı ve değişkenliği nedeniyle, tekrarlanabilirlik, elde edilen sonuçların doğru bir şekilde yorumlanmasını sağlamak için önemlidir (Garfías-Gallegos vd., 2022).

Farklı biyoinformatik iş akışı çeşitleri ve platformları arasında tercih yaparken dikkate alınması gereken avantajlar ve dezavantajlar bulunmaktadır. Bunun haricinde Galaxy (Galaxy Project, n.d.), BV-BRC (BV-BRC, n.d) ve InsaFLU (Borges vd., 2018) gibi online platformlar ise kullanıcı dostu arayüzleri ve kolay paylaşım imkanlarıyla öne çıkar, ancak sınırlı özelleştirme seçenekleri, bağımlılık ve yüklenebilecek veri kısıtlamaları yüzünden dezavantajları bulunmaktadır (Wratten vd., 2021). Hangi platformun seçileceği, kullanıcıların deneyimleri, gereksinimleri ve tercihleri doğrultusunda belirlenmelidir. Geliştirilen iş akışının gereksinimleri ve hedefleri dikkate alınarak en uygun platformun seçilmesi önemlidir (Garfías-Gallegos vd., 2022; Wratten vd., 2021).

Geleneksel olarak komut satırı tabanlı veya “*bash script*”ler kullanılarak oluşturulan iş akışları, esneklik ve kontrol sağlar, ancak karmaşıklık ve hata eğilimi gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bununla birlikte, Nextflow (Di Tommaso vd., 2017), Snakemake (Köster vd., 2012) ve Workflow Description Language (WDL) (Voss vd., 2017) gibi kullanımı scriptlerden daha kolay olan platformlar, otomatik paralelleştirme ve taşınabilirlik gibi avantajlar sunar, ancak öğrenme eğrisi ve bazen performans açısından dezavantajları olabilir. Günümüzde mikrobiyolojik etkenlere spesifik geliştirilen bazı iş akışı örnekleri bulunmaktadır. Örneğin, *Mycobacterium tuberculosis* için geliştirilen TB-Profiler aracı, tüm genom verilerinden antibiyotik direnç mutasyonlarının hızlı ve doğru tespitini sağlarken (Coll vd., 2015), SARS-CoV-2 genom analizinde ARTIC ağının oluşturduğu iş akışı, multiplex PCR ile elde edilen genomik verilerin otomatik analizi ve varyant takibi açısından büyük katkı sağlamıştır (Grubaugh vd., 2017). Ayrıca, farklı bakteriyel etkenler için optimize edilmiş genomik analiz iş akışı BacSeq (Chukamnerd vd., 2023), RSYD-BASIC (Steinke vd., 2023) ve Bactopia (Petit ve Read, 2020) gibi birçok farklı iş akışı olduğunu yayınlarda görülmektedir. Ancak, literatürde *Salmonella* ve özellikle *S. Infantis*’e özgü, optimize edilmiş ve otomatikleştirilmiş bir iş akışının bulunmaması, bu alanda geliştirilecek yeni iş akışlarının önemini ortaya koymaktadır.

Bu tez çalışmasında, 2020-2024 yılları arasında kanatlı kümeslerinden elde edilen *S. Infantis* suşlarının antimikrobiyal direnç (AMD) profillerinin tüm genom dizileme yöntemi ile belirlenmesi, yıllar içerisindeki değişimlerinin karşılaştırılmasının yapılması, bölgesel olarak dağılımları ve birbirleri arasındaki epidemiyolojik ilişkilerin araştırılması amaçlanmıştır. Bununla birlikte her bir suşa ait gen dizilerindeki benzer bölgeler hizalanarak oluşturulacak hizalama verileri ile en uygun filogenetik ağacın çizilmesi ve farklı yerlerden izole edilmiş olan suşlar arasındaki filogenetik ilişkinin incelenmesi hedeflenmiştir. Son olarak, bu çalışma kapsamında geliştirilen biyoinformatik analiz yöntemi *S. Infantis*’in NGS ile teşhis edilebilmesi için bir iş akışı ileride yapılacak olan diğer biyoinformatik analizlerin standardizasyonu için bir öneri geliştirilmiş olup, yapılacak diğer çalışmalar için bir örnek model teşkil etmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Çalışılacak Suşların Belirlenmesi

Bu tez çalışmasında, 2020-2024 yılları arasında kanatlı kümeslerinin altlık, toz, çevresel, kemirici, yem ve su örneklerinden “ISO 6579 Salmonella İzolasyon ve İdentifikasyon Metodu” ile izole edilerek Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonunda saklanan *S. Infantis* suşları tekrardan canlandırılarak kullanıldı. Bu suşlardan, her yıldan 2 adet olmak üzere toplam 10 suş rastgele seçildi.

2.2. Seçilen Suşların Aktivasyonu ve Doğrulanması

Seçilen suşlar “ISO 6579 Salmonella İzolasyon ve İdentifikasyon Metodu” (ISO 6579:1:2007) kullanılarak tekrardan canlandırıldı. Bu amaçla, seçilen suşlar ilk olarak nitruent agar (Merck, Katalog No: 1.05450)’a ekildi. Sonrasında Rappaport-Vassiliadis Soya Broth (RVS) (Oxoid, Katalog No: CM0866) ve Muller-Kauffman Tetrathionate Broth (MKTTn) (OXOID, Katalog No: CM1048) gibi seçici besiyerlerde 24 saat boyunca 41,5°C’de inkübe edildi. Ardından, besiyerlerindeki üreme kontrol edildi ve *Salmonella*’nın karakteristik büyüme özellikleri gözlemlendi. Eğer bu aşamada pozitiflik görülmediyse, örnekler Xylose Lysine Deoxycholate agar (Merck, Katalog No: 105289) ve Brilliant Green agar (BGA) (Merck, Katalog No: 70134-500G) gibi seçici besiyerlerde 24 saat boyunca 35-37°C’de yeniden inkübe edildi. *Salmonella* şüpheli koloniler seçilerek biyokimyasal testlere tabi tutuldu. Bu doğrulama sürecinde, öncelikle SIM Testi (Sülfür İndol Motilite Testi) ile *Salmonella*’nın H₂S, indol oluşturma ve hareket yetenekleri değerlendirildi. Ardından, Triple Sugar Iron Agar (Merck, Katalog No: 91428)’a ekilerek suşların karbonhidrat fermentasyon yetenekleri ve gaz üretme kapasitesi incelendi. Son olarak, Citrate Testi ile *Salmonella*’nın sitrat kullanma yeteneği belirlendi. Bu adımların tamamlanmasının ardından, *Salmonella* spp. olduğu doğrulanan örnekler, fenotipik antimikrobiyal duyarlılık testlerine tabi tutuldu. *Salmonella* spp. olduğu belirlenen suşların serotiplendirilmesi Kauffmann-White şemasına göre aglütinasyon yöntemiyle

yapılarak *S. Infantis* olduğu belirlenen suşlar tez çalışmasında kullanılmak üzere seçildi.

2.3. Antibiyotik Duyarlılık Testi

AMD'nin fenotipik olarak belirlenmesi için DSÖ'nün izlenmesi gerektiğini belirttiği florokinolon (siprofloksasin, ofloksasin, nalidiksik asit), geniş spektrumlu beta-laktamlar, üçüncü nesil sefalosporinler ve sülfametoksazol-trimetoprim gibi halk sağlığı açısından önemli antibiyotiklere karşı gerçekleştirildi. Çalışma kapsamında kullanılan bütün yöntemlerde pozitif kontrol olarak *Salmonella* Infantis ATCC 51741 suşu kullanıldı.

Bu çalışmada, beta-laktamlar, florokinolonlar, aminoglikozidler, polimiksinler, fenikoller, tetrasiklinler ve sülfonamid-trimetoprim kombinasyonu gibi farklı antibiyotik sınıfları test edildi. Bu sınıflardan, Pefloksasin (PEF, 5 µg, OXOID, Katalog No: CT0661B), Polimiksin B (PB, 300 Ü, OXOID, Katalog No: CT0044B), Nalidiksik Asit (NA, 30 µg, OXOID, Katalog No: CT0031B), Ampisilin (AMP, 10 µg, OXOID, Katalog No: CT0003B), Ceftriakson (CRO, 30 µg, OXOID, Katalog No: CT0417B), Cefoperazon (CFP, 30 µg, OXOID, Katalog No: CT0193B), Kloramfenikol (C, 30 µg, OXOID, Katalog No: CT0013B), Ofloksasin (OFX, 5 µg, OXOID, Katalog No: CT0446B), Siprofloksasin (CIP, 5 µg OXOID, Katalog No: CT0425B), Sülfametoksazol-Trimetoprim (SXT, 25 µg, OXOID, Katalog No: CT0052B), Amikasin (AMK, 30 µg, OXOID, Katalog No: CT0107B), İmipenem (IPM, 10 µg, OXOID, Katalog No: CT0455B), Sefazidim (CAZ, 30 µg, OXOID, Katalog No: CT0412B) ve Ampisilin/Sulbaktam (SAM, 20/10 µg, OXOID, Katalog No: CT0520B), Tetrasiklin (TET, 30 µg, OXOID, Katalog No: CT0054B) ve Streptomisin (STR, 10 µg, OXOID, Katalog No: CT0047B) antibiyotik diskleri kullanıldı. Bu antibiyotiklerin *S. Infantis* suşları üzerindeki etkileri disk difüzyon yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (EUCAST)'nin ve Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI)'nin kırılım noktaları referans alınarak antibiyotik duyarlılık testleri yapıldı. Çalışma sonucunda elde edilen fenotipik veriler antibiyotiklere karşı direnç gelişimi açısından WGS ile biyoinformatik analizler yardımıyla karşılaştırıldı.

İzole edilen suşlar Brain Heart Infusion Broth (BHI, OXOID CM0225) içerisine transfer edilerek 37°C’de, türbiditesi 0,5 McFarland standardına gelinceye kadar inkübe edildi ve spektrofotometre (UV-Vis) kullanılarak doğrulandı. Broth içerisindeki kültürün 625 nm dalga boyunda 0,08-0,13 aralığında sabitlendiği değer EUCAST standardına göre optimum olarak değerlendirildi. Türbidite ayarlandıktan sonra steril svab, kültür içerisine daldırılıp tüpün çeperinde süzdürülerek 4 mm kalınlığındaki Mueller Hinton Agar (OXOID, CM0405) yüzeyine yayıldı. Agar yüzeyi kuruduktan sonra antibiyotik diskleri yerleştirilerek, 15 dakika içerisinde 37°C’de 24 saat inküasyona alındı.

2.4. Nükleik Asit İzolasyonu ve Kütüphane Hazırlığı

Nutrient agarda saf olarak üretilmiş suşlardan tek koloni alınarak, Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research, US, Katalog No: D6005) kiti ile Gram negatif bakteriler için izolasyon metoduyla üreticinin talimatlarına göre total nükleik asit izole edildi. UV ışıktaki biyomoleküllerin sahip olduğu absorbsiyon sayesinde optik yoğunluk ölçmeye yarayan “NanoDrop ND-1000” spektrofotometre cihazı aracılığı ile elde edilen nükleik asitlerin absorbsiyon değerleri ölçülerek; uygun konsantrasyon ve saflıkta elde edilen dizileme işlemine kadar -20°C’de saklandı.

Tüm suşların total nükleik asit örneklerinin DNA konsantrasyonları Qubit 3.0 Fluorometer (Invitrogen, Singapur) cihazı ve dsDNA High-Sensitivity Assay kit (Life Technologies, USA, Katalog No: Q32851) kiti kullanılarak ölçüldü. Kütüphane hazırlığı için gerekli olan 48 µl DNA her örnekten ayrı ayrı alındı ve sonrasında DNA *repair mix* ile hazırlandı. Native Barcode Ligation aşaması için her örneğe farklı bir barkod bağlandı. Bir sonraki aşamada adaptör ligasyonu ve *clean-up* aşamaları Adapter Mix II, Ligation Reaction Buffer ve T4 DNA Ligase’ın eklendiği 65 µl’lik bu havuz içerisinde toplandı. Manyetik boncuk *clean-up* aşaması gerçekleştirirken AMPure XP beads (Beckman Coulter, UK, Katalog No: A63881) kullanıldı ve her *clean-up* aşamasından sonra ölçümleri yapılarak çalışmanın doğruluğu garanti altına alındı. Barkodlanmış sekans kütüphanesi hazırlığı, 700 ng örnek ve DNA Native Barcoding Genomic DNA kit (SQK-LSK109) - Oxford Nanopore Technologies

(ONT, UK) kullanılarak tamamlandı. Sonrasında hazırlanan kütüphane FLO-PRO002 akışhücrelerine yüklendi ve PromethION (ONT, UK) cihazında 72 saat dizilendi.

2.5. Biyoinformatik Analiz Aşamaları

Biyoinformatik analiz süreci, sekanslama sonrası elde edilen ham verilerin *fastq* dosyasına dönüştürülmesi ile başladı. Kalite kontrol ve ön işleme adımları gerçekleştirildikten sonra montajlama işlemi gerçekleştirildi. Montaj kalitesi değerlendirilip sonrasında referans genom (LN649235.1, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Infantis genome assembly SINFA, chromosome) ile hizalayarak varyant analizi gerçekleştirildi. Montajlama işlemi sonucunda elde edilen kontigler ile MLST, cgMLST, antimikrobiyal direnç profillemesi, virülens genlerin tespiti, gen anotasyonları, görselleştirmeler hem kromozomal DNA hem de plazmid profilleri için tamamlandı. Yapılan bu analizlerden sonra filogenetik analizin tamamlanması için benzer genomlar ile karşılaştırmalar gerçekleştirildi. Filogenetik analizler sonrasında evrimsel olarak suşların yapısı incelendi.

2.5.1. Kalite Kontrol ve Veri Ön İşleme

Sekanslama sonucunda elde edilen okumaları içeren POD5 dosyaları dorado basecaller (Oxford Nanopore Technologies, 2023) ile demultiplex işlemi gerçekleştirilerek *fastq* formatına çevirildi. Her bir barkod için ayrı ayrı elde edilen *fastq* dosyaları, birleştirildikten sonra FastQC v0.11.5 (Andrews, 2010) ve MultiQC (Ewels vd., 2016) aracı ile; sekans dosyasına ait basit istatistik, baz düzeyinde sekans kalitesi, sekans düzeyinde kalite değerlerinin dağılımı, baz ve sekans düzeyinde “GC” içeriği, okunamayan sekans içeriği, sekans uzunluk dağılımı, sekans tekrar düzeyi ve Kmer içeriği üzerine kalite raporu oluşturmak için kullanıldı. Bu işlemin ardından veriler fastp (Chen vd., 2018) aracı kalite değerlerine göre filtrelendi. Filtreleme işleminde uzun okuma sistemleri kullanıldığından dolayı minimum kalite skoru “7” olarak seçildi.

2.5.2. Okuma Klasifikasyonu

Bu çalışmada, dizileme sonrası elde edilen okumaların taksonomik klasifikasyonu için Kraken2 (Wood vd., 2019) aracı kullanıldı. Klasifikasyon işlemi, Standart 8GB Kraken2 veri tabanı (Versiyon, 12/28/2024) ile gerçekleştirildi. Analiz sürecinde, her örneğe ait okuma verileri Kraken2 ile işlenmiş ve tür düzeyindeki sınıflandırmalar belirlendi.

2.5.3. Montaj (Assembly) ve Kalite Değerlendirme

Trimming işlemi yapılmış diziler, dizi uçlarının eşleştirilmesi ve daha sonra montaj işlemi için Flye (Kolmogorov vd., 2019, sürüm 2.9.3-b1797) programı ile montaj işlemi gerçekleştirildi. Montaj işlemi, Flye yazılımı kullanılarak filtrelenmiş ve trimlenmiş Nanopore dizileri ile gerçekleştirilmiş olup, parantez içindeki parametreler (*flye nano-raw fastq_files.fastq --genome-size 5m --threads 12 --out-dir*) kullanıldı. Elde edilen sonuçlar kayıt altına alındı.

Montaj sonuçları Bandage (Wick, 2015) programı ile “.gff” dosyaları yardımıyla görsel olarak değerlendirildi. Değerlendirme yapıldıktan sonra kontiglerin derinlik, sayı ve N50 değerleri kayıt altına alındı ve kendi içinde karşılaştırıldı. Oluşturulan draft genomların kalitesini ölçmek için QUAST v 4.3 (Gurevich vd., 2013) ve BUSCO (Manni vd., 2021) programları kullanıldı. Oluşturulan genomların yakın olduğu suşu bulabilmek adına BLAST yöntemi ve ANI yöntemi kullanılarak referans genoma olan benzerlikleri hesaplandı.

Bu çalışma kapsamında değerlendirilen suşların içinde hangi varyantlar olduğunu değerlendirmek adına bir dizi analiz gerçekleştirildi. Bu analizler için ilk olarak ham veriler referans genoma (LN649235.1, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Infantis genome assembly SINFA, chromosome) minimap2 (Li, 2018) programı ile hizalandı. Oluşan *bam* göre hizalandırma (Danecek vd., 2021), SNP’lerin ve diğer yapısal varyantların tespiti için Clair3 (Yu vd., 2023) programı kullanıldı. Bu program, *trimming* işlemi sonucu elde edilen yüksek kaliteli ONT okumaları ile gerçekleştirildi. Elde edilen *vcf* dosyaları *bam* formatına çevrildikten sonra sırasıyla,

samtools sort, index ve mardup fonksiyonları kullanılarak farklı mutasyon ve varyantları tespit edebilmek için variant calling işlemi tamamlandı.

Varyant çağırma işlemi sonrasında elde edilen *vcf* dosyaları kullanılarak snpEff (Cingolani vd., 2012) programı ve snpEff'in kendi içinde olan "*Salmonella_enterica_serovar_Infantis*" veri tabanı kullanılarak varyantların anotasyonları yapıldı. Anotasyon işleminden hemen önce bcftools (Danecek vd., 2021) aracı ile kalite değeri 20'nin altında olan varyantlar filtrelendi. Varyantların anotasyonları, filtrelenmeleri ve çağırma işlemleri tamamlandıktan sonra ivar (Grubaugh vd., 2019) programı kullanılarak her suş için consensus genom oluşturuldu.

2.5.4. Genom Anotasyonu

Elde edilen dizilerle, Prokka (Seeman, 2014) aracı kullanılarak sekansın gen, CDS, tRNA, rRNA protein vb. anotasyonları yapıldı. Gen anotasyon analizi sonucunda test edilen suşların kendi türü içerisindeki diğer suşlarda bulunan genlerle homolog ve özgün (tekil) olan gen sayıları belirlendi. Her örnek için yapılan bu işlem sonucunda elde edilen sonuçlar kontrol edildi. Bu kontrol gerçekleştirilirken *Salmonella*'da olması beklenen gen sayısı (~4200), rRNA genleri ve pseudo gen sayısının %10'dan az olması gibi kriterler göz önünde bulunduruldu.

Bakteriyel genom görselleştirmeleri Proksee.ca (Grant vd., 2023) platformu kullanılarak gerçekleştirildi. Bu platform, prokaryotik genomların kapsamlı bir şekilde analiz edilmesini sağlayarak, gen anotasyonu, mobil genetik elementlerin tespiti ve AMD profillemesi gibi çeşitli biyoinformatik analizleri entegre etmektedir. Montaj sonuçları bu siteye yüklendikten sonra, Prokka aracı ile genom anotasyonu yapıldı ve genler, tRNA'lar ile rRNA'lar tespit edildi (Seemann, 2014). Anotasyon sonrasında, genomlarda mobil genetik elementlerin belirlenmesi için MobileOG-db kullanıldı ve suşlar arasındaki gen aktarımı analiz edildi (Brown vd., 2022). Yatay gen transferi ile edinilen bölgelerin tespiti amacıyla Alien Hunter kullanılarak patojenite adaları ve diğer mobil genetik elementler belirlendi (Vernikos ve Parkhill, 2006). AMD profillemesi için, CARD-RGI (Comprehensive Antibiotic Resistance Database –

Resistance Gene Identifier) yazılımı kullanılarak genomlarda direnç genlerinin varlığı tespit edildi (Alcock vd., 2020). Elde edilen analiz sonuçları, görselleştirme amacıyla CGView (Stothard, 2005) yazılımı ile halkasal genom haritalarına dönüştürüldü. Ayrıca, genomların diğer referans dizilerle karşılaştırılması Microbial Genome BLAST (Altschul vd., 1990) kullanılarak yapıldı ve homolog bölgeler belirlendi.

2.5.5. MLST ve cgMLST Analizleri

S. Infantis suşlarının genotiplendirilmesi amacıyla MLST ve cgMLST analizleri gerçekleştirildi. Bu doğrultuda, sekans tiplerini belirlemek amacıyla MLST analizi, *mlst* (Seeman, n.d.; Jolley vd., 2018) programı (sürüm: 2.23.0) kullanılarak gerçekleştirildi. *S. Infantis* için PubMLST (Jolley vd., 2018) veritabanı referans olarak alınmış ve alel profilleri temelinde sekans tipleri belirlendi. Analizler, *aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA* ve *thrA* genlerini içeren yedi lokustan oluşan klasik MLST şeması temelinde yürütüldü (*mlst --scheme salmonella /*.fasta > mlst_results.txt*) ve %95'in altında kalan sonuçlar değerlendirme dışı bırakıldı.

cgMLST analizi, ChewBBACA yazılımı (sürüm: 2.8.5) kullanılarak gösterildi. Analizlerde, "*Salmonella enterica*" için oluşturulmuş INNUENDO cgMLST şeması referans olarak kullanıldı. Bu şema 8,558 lokus içermektedir ve çalışmada kullanılan *S. Infantis* suşlarının genetik ilişkilerinin belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Bu kapsamda analizler belirli parametrelerle (BLAST Score Ratio (BSR): 0.6, Translation Table: 11 (Bacterial, Archaeal and Plant Plastid Code), Minimum Locus Length: 5000 bp, Size Threshold: 0,05) ve cgMLST "*AlleleCall*" seçeneği kullanılarak gerçekleştirildi. ChewBBACA tarafından yapılan ön kontrol sonucunda, kullanılan INNUENDO cgMLST şemasının eski bir sürüm olduğu tespit edildi. Bu nedenle, şema dosyası PrepExternalSchema komutu ile güncellendi ve ChewBBACA 2.8.5 sürümüne uyumlu hale getirildi. Tüm analizler Ubuntu 22.04 LTS işletim sistemine sahip bir sunucuda gerçekleştirildi. İşlem sırasında Intel Core i7-11800H işlemci kullanılmış ve analizler 16 çekirdek CPU ile yürütüldü. Elde edilen veriler, suşlar arasındaki genetik farklılıkların belirlenmesi ve filogenetik analizlerin gerçekleştirilmesi için sonraki aşamalarda kullanıldı.

Sonuçlara ilişkin allel matrisi in-house kodlar yardımıyla uzaklık matrisine dönüştürüldü. Sonrasında fastme (Lefort vd., 2015, versiyon 2.1.6.3) programı ve Neighbour Joining methodu (Gascuel, 1997) ile oluşturulan matrixten filogenetik ağaç oluşturuldu. Oluşturulan bu filogenetik ağaç ve cgMLST matriksi birlikte analiz edildi.

2.5.6. Genomik Antibiyotik Direnç Analizi

Bakteriyel genom montajları kullanılarak kromozomal ve plazmid kaynaklı AMD genlerinin tespiti ve karakterizasyonu gerçekleştirildi. Analizlerde ARIBA (Hunt vd., 2017) aracılığıyla, CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database) (Alcock vd., 2020), NCBI AMR Reference Gene Database (Feldgarden vd., 2019), ResFinder (Zankari vd., 2012), MEGARes (Doster vd., 2020) ve ARG-ANNOT (Gupta vd., 2014) gibi çeşitli direnç gen veri tabanları kullanıldı. Direnç mekanizmalarının sınıflandırılması, veri tabanındaki tanımlanmış direnç gen kümeleriyle karşılaştırılarak gerçekleştirildi. Kromozomal genlerin direnç mekanizmaları ile ilişkisi, belirlenen gen dizilerinin referans veri setleri ile eşleştirilmesi yoluyla doğrulandı. Elde edilen AMD sonuçları fenotipik veriler ile karşılaştırıldı.

2.5.7. Plazmid Analizi

Plazmid kaynaklı direnç genlerinin belirlenmesi için de CARD, NCBI AMR ve ResFinder veri tabanları kullanıldı, tespit edilen genlerin montajlar içerisindeki konumları belirlenerek analiz edildi. MEGARes ve ARG-ANNOT veri tabanları ile ek değerlendirmeler yapılarak direnç genlerinin farklı veri tabanları arasında tutarlılığı incelendi. Elde edilen direnç profilleri, genomlardaki genetik organizasyonu değerlendirmek amacıyla görselleştirilmiş ve direnç genlerinin montajlar arasındaki dağılımı tablolar ile özetlendi.

Montaj işleminden elde edilen kontiglerden plazmidlere ait olanları Prokka ile anotasyon işlemine tabii tutuldu. Her plazmid için anotasyon işlemi tamamlandıktan sonra bu plazmidlerde bulunan IS elementleri de analiz edildi. Son olarak bu

plazmidlerde bulunan profaj bölgeleri ve kodlama yapan gen bölgeleri de PHASTEST (Wishart vd., 2016) programı docker üzerinden analiz edilerek sonuçlar kayıt altına alındı.

2.5.8. Filogenetik Analizler

Bu çalışmada, *S. Infantis* izolatlarının tür ve suş düzeyinde doğru sınıflandırılması amacıyla hem benzerlik tabanlı hem de genomik karşılaştırma yöntemleri kullanıldı. Örneklerin tür düzeyinde tanımlanması için Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) algoritması (Altschul vd., 1990) kullanılarak, referans veri tabanlarındaki genomlarla karşılaştırıldı. Daha ayrıntılı filogenetik değerlendirme ve suş düzeyinde benzerlik analizi için FastANI (Jain vd., 2018) kullanılarak izolatların ortalama nükleotid benzerliği (ANI) hesaplandı. ANI değerleri %95'in üzerinde olan ve %100'e yakınlık gösteren suşlar aynı tür içinde kabul edildi. Bu analizler hem kromozomların tanımlanması hem de plazmidlerin isimlendirilmesi için kullanıldı. BLAST ve FastANI sonuçları birlikte değerlendirilerek, incelenen izolatların genomik benzerliği detaylı olarak analiz edildi.

Filogenetik analizlerde kullanmak adına kontigler BLAST sonuçlarına göre isimlendirildi. İsimlendirilen örnekler SNP filtresi uygulandı. Bu filtreleri geçen örnekler ile SNP ağacı oluşturuldu. Sonrasında NCBI'dan kullanılan 115 genom da kullanılarak parsnp programı ile suşlara SNP bazlı ağ analizi gerçekleştirildi. Bu analiz sonucunda elde edilen nwk formatındaki filogenetik ağaç graptree programı ile görselleştirilerek ağ analizi sonuçları kayıt altına alındı. Oluşturulan ağacın kontrolünü yapmak için ayrıca MEGA XI programı kullanıldı (Tamura vd., 2021). İkinci aşama olarak da MEGA sonuçları IToL (Letunic vd., 2021) yazılımı ile görsel açıdan düzenlendi ve SNP ağ analizi doğrulandı (treegraph.bioinfweb.info/).

Filogenetik ilişkilerin tam olarak desteklenebilmesi için roary çıktısı olan core genom hizalama dosyası kullanılarak ilk olarak filogenetik ağaç çizildi. Filogenetik analizde kullanılan hizalanmış veri seti olup FASTA formatında düzenlendi. ModelFinder Plus (MFP) kullanılarak en uygun model belirlenmiş ve analizde

GTR+F+I modeli tercih edildi. Bootstrap analizi 1000 replikasyon ile gerçekleştirilmiş, sonuçların güvenilirliği arttırmak amaçlandı. Çalışma sırasında 16 CPU çekirdeği tespit edilmiş, ancak maksimum verimlilik için 3 çekirdek kullanılması uygun bulunmuştur. Parsimony ağaç oluşturma yöntemi olarak Phylogenetic Likelihood Library (PLL) tercih edilmiş ve oluşturulan Maksimum Olabilirlik (ML) ağacı GTR+F+I modeli kullanılarak optimize edildi. Bu işlemler “*iqtree2 -s core_gene_alignment.aln -m MFP -T AUTO -B 1000 --prefix core_tree*” komutu ile gerçekleştirildi. ModelFinder, 286 farklı DNA modeli üzerinde çalışarak en uygun modeli seçmesi sağlandı. AIC, AICc ve BIC kriterlerine göre en iyi model GTR+F+I+G4 (gamma dağılımlı) modeli olarak belirlendi. Ancak BIC kriterine göre GTR+F+I modeli en uygun model olarak seçilmiş ve nihai analizler bu modelle yürütüldü. Seçilen GTR+F+I modeli, sabit nükleotid frekansları (F), invariable sites (I) içeren genel zaman geri dönüş modelidir.

2.5.9. Evrimsel Analiz

Bu çalışmada, *S. Infantis*’in evrimsel süreçlerini incelemek amacıyla toplam 124 genom analiz edildi. Bu genomlardan 115’i NCBI GenBank’tan “*complete genome*” seçeneği ile veri tabanından indirilerek kullanıldı. Tüm örneklerle ilişkin metadata bilgileri çok büyük olduğu için online olarak görülebilmesi adına link üzerinde ulaşılabilir şekilde GitHub web sitesinde (https://github.com/cinnetcrash/thesis_tables/blob/main/NCBI_metadata_files.csv) erişime açıktır. Bu metaveri tablosu, genomlara ait ülke bilgileri, montaj metrikleri ve genomik özellikleri içermektedir.

Tüm genomlar kullanılarak evrimsel analiz yapmak için öncelikle tüm örneklerle ait anotasyon işlemleri Prokka kullanılarak gerçekleştirildi. Prokka ile protein kodlayan gen bölgeleri, tRNA ve rRNA anotasyonları çıkarılmış ve elde edilen gff dosyaları ile gen düzeyinde evrimsel ilişkiler Roary (Page vd., 2015) ile pangenom analizi yöntemiyle gerçekleştirildi. Pangenom analizine ek olarak genom büyüklüğünün ve aksesuar gen içeriğinin değerlendirilmesi amacıyla Roary ve BPGA (Chaudhari vd., 2016) kullanıldı. Roary tarafından oluşturulan hizalanmış pangenom

matrisi, filogenetik zaman tahmini yapmak, evrimsel ataların belirlenmesi, evrim düzeyi ve rekombinasyon özelliklerini tespit etmek için BEAST2 (Bouckaert vd., 2019) analizlerinde giriş dosyası olarak kullanıldı. BEAST2 ile yürütülen analizlerde Bayesçi evrimsel modellemeler “beauti” ile xml dosyası oluşturulduktan sonra BEAST2 programında çalıştırıldı. Elde edilen sonuçlar “tracer” modülü ile değerlendirildi. BEAST analizinde 500 milyon Markov Chain Monte Carlo (MCMC) zinciri uzunluğu kullanılarak yapılan çalışmada, genelleştirilmiş Skyline demografik model seçildi. Örnekler arasında 979 farklı nükleotid varyasyonu (*patterns*) bulunmaktadır. Başlangıç ağacı, sabit popülasyon büyüklüğüne sahip bir koalesan model ile oluşturulmuş ve başlangıç popülasyon büyüklüğü 100 olarak belirlendi. Ağaç modeli, HKY (Hasegawa-Kishino-Yano) mutasyon modeli ile modellenmiş olup, geçiş/geçişim oranı (kappa) 2,0 olarak ayarlandı. Saat modeli olarak log-normal dağılımlı düzensiz (uncorrelated relaxed) moleküler saat kullanıldı ve ortalama saat hızı (ucl.d.mean) 1,0, standart sapması ise 0,333 olarak belirlendi. Bayes faktörü kullanılarak oran dağılımı değerlendirildi ve oran kategorileri tahmin edildi. Ayrıca, popülasyon büyüklüğünün zamana bağlı değişimini modellemek için 10 boyutlu Skyline model kullanıldı. Analizler sonucunda elde edilen ağaç “treeannotator” programı sayesinde konsensus ağaç oluşturmak için “burn-in” değeri %10 seçilerek kullanıldı. Sonrasında oluşturulan ağaç ITOL programı ile metaveriler ile birleştirilerek görselleştirildi.

2.6. Biyoinformatik İş Akışı Geliştirilmesi

Son olarak tüm analizlerin birbirleri ile bütünleşik bir şekilde çalışmasını sağlamak amacıyla bir “*Nextflow*” iş akışı geliştirildi ve analiz süreçleri bu sayede otomatize edildi. Bu iş akışı www.github.com/cinnetcash/gelidonyamr üzerinden araştırmacılar ile paylaşıldı ve standardize bir şekilde rapor formatı oluşturularak, elde edilen tüm sonuçların herhangi bir kullanıcı tarafından kolay bir şekilde değerlendirilmesine ve tekrar tekrar çalıştırılabilmesine olanak sağlamaktadır.

Bu iş akışının nextflow kullanılarak geliştirilmesi planlandı. Nextflow, analiz süreçlerini modüler hale getirerek paralelleştirme ve büyük veri setleriyle çalışma yeteneği kazandırmaktadır. Aynı zamanda *Conda* aracılığıyla bağımlılık yönetimi sağlanarak her bir analiz modülü için gerekli olan yazılımların uyumlu bir şekilde

çalışması garanti altına alındı. İş akışı, farklı platformlarda (Linux, HPC, bulut sistemleri) çalışacak şekilde tasarlandığından, yüksek ölçeklenebilirlik ve taşınabilirlik sunmaktadır.

İş akışı, sadece *S. Infantis* için değil, genel olarak *Salmonella*'lar ve diğer gıda kaynaklı patojenlerin genomik analizi için küçük modifikasyonlar ile kullanılabilecek modüler bir yapıda tasarlandı. Bu sayede bu iş akışının, gelecekte benzer epidemiyolojik çalışmalar için referans ve standardize sonuç üreten bir platform olma potansiyeli hedeflendi.

2.7. Kalite Kontrolü ve Tekrarlanabilirlik

Geliştirilen iş akışının doğru bir şekilde çalıştığını gösterebilmek adına çalışma kapsamında analiz edilen ham verilerin haricinde 10 adet *S. Infantis*'e ait ham veri Avrupa Nükleotid Arşivi (ENA)'den indirilerek iş akışına girdi olarak kullanıldı. Sonuçları doğrulayabilmek adına yapılan bu analiz ve tez çalışması sırasında kullanılan analizler karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlar sadece iş akışının çalıştığını görmek adına yapıldı. Analiz sonuçları kayıt altına alınmadı.

2.8. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada, *S. Infantis* suşlarında yıllara göre AMD genlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim olup olmadığını değerlendirmek amacıyla Kruskal-Wallis testi uygulandı. Çalışmada, 2020-2024 yılları arasında belirlenen direnç genleri sayıları yıl bazında gruplandırılarak Kruskal-Wallis testi ile bu gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak analiz edildi.

NGS verileri üzerinde uygulanan kalite kontrol işlemlerinin istatistiksel etkilerini değerlendirmek amacıyla öncesi ve sonrası metrikler karşılaştırıldı. Analizlerde, aynı örneğe ait farklı durumlar arasındaki farkları test etmek için eşleştirilmiş (paired) T-testi kullanıldı (Tavşancıl, 2019). Öncelikle, toplam okuma sayısı, toplam baz miktarı, Q30 kalite oranı ve GC içeriği gibi temel kalite metrikleri belirlenmiş ve istatistiksel analize uygun hale getirildi. Eşleştirilmiş T-testi, iki bağımlı

veri seti arasındaki ortalama farkın anlamlı olup olmadığını belirlemek için uygulandı (Rosner, 2015). $p\text{-değeri} < 0,05$ olduğu durumlarda, H_0 hipotezi reddedilerek anlamlı bir farklılık olduğu sonucuna varıldı.

Yapılan tüm istatistiksel analizler kayıt altına alındı ve devamlılığı bozmamak adına elde edilen sonuçlar ilgili başlıkların altında verildi. Analiz sürecinde, istatistiksel testler Python programlama dili ve SciPy kütüphanesi (Virtanen vd., 2020) kullanılarak gerçekleştirildi.



3. BULGULAR

3.1. Çalışılacak Suşların Belirlenmesi

Bu tez çalışmasında, farklı şehirlerde bulunan broyler kümeslerinin altlıklarından izole edilen 10 farklı *S. Infantis* suşu rastgele seçildi. Seçilen suşlardan Örnek 5, *S. Infantis* olmadığı belirlenerek çalışmadan çıkarıldı. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı suş koleksiyonundan seçilen tüm suşların örnek kodu, izolasyon yeri, tarihi ve yetiştirme türünü içeren bilgiler Çizelge 3.1’de gösterildi.

Çizelge 3.1. Çalışma için seçilen örneklerle ait metaveriler

Örnek	İzolasyon Yeri	İzolasyon Materyali	İzolasyon Tarihi	Yetiştirme Türü
01	Zonguldak	Kümes Altlık	11.06.2022	Broyler
02	Balıkesir	Kümes Altlık	08.08.2024	Broyler
03	Aydın	Kümes Altlık	3.02.2022	Broyler
04	Elazığ	Kümes Altlık	09.12.2024	Broyler
06	Bolu	Kümes Altlık	24.05.2020	Broyler
07	Düzce	Kümes Altlık	29.03.2020	Broyler
08	Düzce	Kümes Altlık	06.07.2023	Broyler
09	Mersin	Kümes Altlık	15.10.2023	Broyler
10	Manisa	Kümes Altlık	01.02.2021	Broyler

3.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi

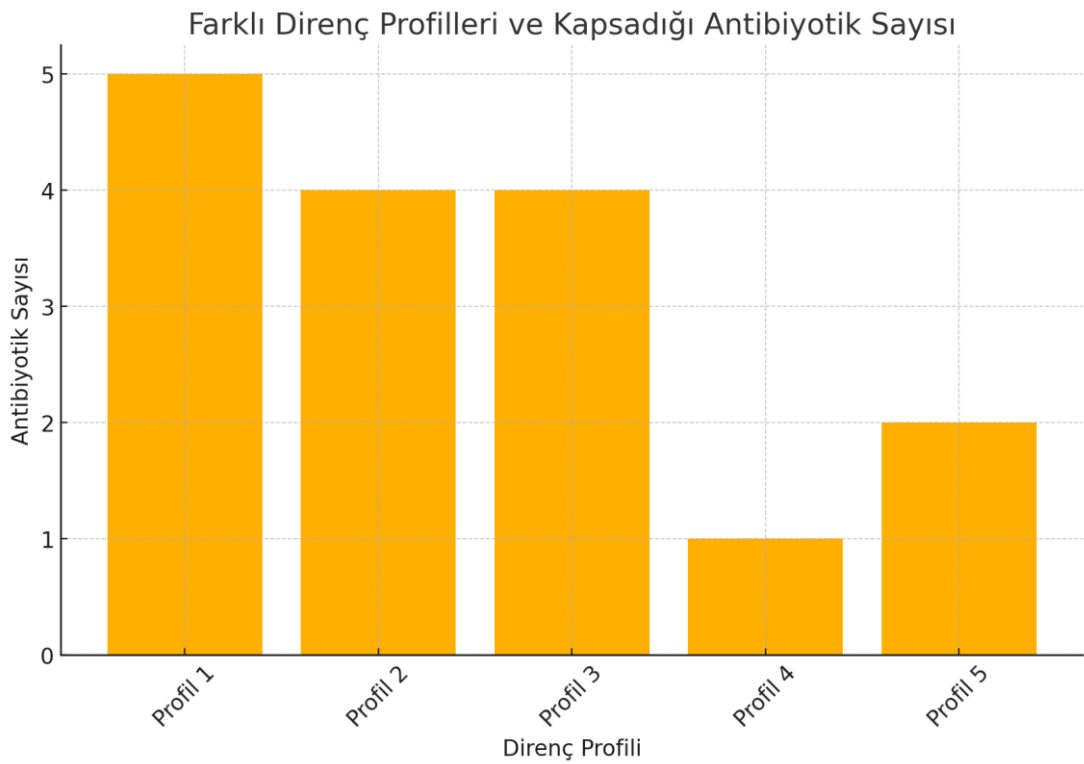
Üç veya daha fazla antibiyotiğe dirençli olan suşların MDR (Över vd., 2001) olduğu bilgisi ışığında tüm veriler değerlendirildi. Elde edilen sonuçlara göre seçilen dokuz suş için AMD profillemesi sonuçları Çizelge 3.2’de verildi. Her bir örnek için tespit edilen fenotipik direnç ve direnç kategorileri değerlendirildi. Bu değerlendirme yapılırken CLSI 2024 ve EUCAST 2024 kırılım değerleri gözetilerek Dirençli (R), Olası Dirençli (I) ve Duyarlı (S) olarak isimlendirildi. Çizelge 3.2’de de gösterildiği gibi, PEF (Pefloksasin) ve NA (Nalidiksik Asit) antibiyotikleri için tüm suşların (%100) dirençli olduğu belirlendi. AMP (Ampisilin) için suşların %66,7’si (6/9) dirençli, geri kalan %33,3’ü (3/9) duyarlı olarak belirlendi. CAZ (Sefazidim) ve SAM (Ampisilin/Sulbaktam) için tüm örnekler dirençli (%100) bulundu. CIP (Siprofloksasin) için direnç oranı %88,9 (8/9) olarak belirlendi. OFX (Ofloksasin) için direnç oranı %88,9 (8/9) olarak tespit edildi. Ceftriakson (CFP) için direnç dağılımı, %77,8 olası dirençli (I), %11,1 dirençli (R) ve %11,1 duyarlı (S) şeklindedir. TMP-STX (Sülfametoksazol-Trimetoprim) için 6 örnek dirençli (%66,7), 3 örnek duyarlı (%33,3) bulundu. Tetrasiklin (TET) ve Streptomisin (STR) için %88,9 oranında direnç saptandı. AMK (Amikasin) için direnç oranı %66,7 (6/9) olarak hesaplandı. PB (Polimiksin B) için suşların büyük bir kısmı duyarlı (%77,8) olup, yalnızca %22,2 olası dirençli (I) olarak tespit edildi. IPM (İmipenem) için suşların %55,6’sı duyarlı, %44,4’ü olası dirençli (I) bulundu. Yıllara göre dağılım için istatistiksel olarak Ki-kare (χ^2) testi ile analiz yapıldığında p-değeri 0,206 bulundu.

Çizelge 3.2. Test edilen 9 S. Infantis suşunun AMD profilleri

Örnek Numaraları ve Antimikrobiyal Direnç Disk Yarıçapı Sonuçları									
Kullanılan Antibiyotik (Yoğunluğu ve Kısaltması)	01	02	03	04	06	07	08	09	10
Pefloksasin (5 µg, PEF)	16(R)	13(R)	16(R)	16(R)	16(R)	10(R)	18(R)	12(R)	10(R)
Polimiksin B (300 Ü, PB)	16(S)	16(S)	16(S)	18(S)	15(S)	11(I)	15(S)	13(S)	12(I)
Nalidiksik Asit 30 (30 µg, NA)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)
Ampisilin (10 µg, AMP)	0(R)	23(S)	25(S)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	20(S)
Ceftriakson (30 µg, CRO)	24(I)	24(I)	26(I)	25(I)	24(I)	20(I)	21(R)	22(I)	23(I)
Cefoperazon (20 µg, CFP)	12(R)	20(I)	20(I)	12(R)	14(R)	9(R)	10(R)	11(R)	18(I)
Kloramfenikol (30 µg, C)	10(R)	22(S)	21(S)	14(R)	4(R)	12(R)	12(R)	12(R)	18(S)
Ofloksasin (5 µg, OFX)	16(R)	18(R)	18(R)	12(R)	16(R)	12(R)	2(R)	10(R)	24(S)
Siprofloksasin (5 µg, CIP)	18(R)	22(R)	26(S)	16(R)	20(R)	12(R)	16(R)	14(R)	22(R)
Trimetoprim-Sülfametaksazol (25 µg, SXT)	0(R)	26(S)	0(R)	0(R)	18(S)	0(R)	0(R)	24(S)	0(R)
Amikasin (30 µg, AMK)	0(R)	16(R)	14(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	14(R)
İmipenem (10 µg, IPM)	24(S)	24(S)	26(S)	28(S)	24(S)	22(I)	22(I)	21(I)	22(I)
Sefazidim (30 µg, CAZ)	16(R)	14(R)	14(R)	16(R)	8(R)	8(R)	14(R)	14(R)	14(R)
Ampisilin/Sulbaktam (20/10 µg, SAM)	4(R)	6(R)	4(R)	2(R)	2(R)	2(R)	8(R)	6(R)	8(R)
Tetrasiklin (30 µg, TET)	0(R)	28(S)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)
Streptomisin (10 µg, STR)	0(R)	28(S)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)

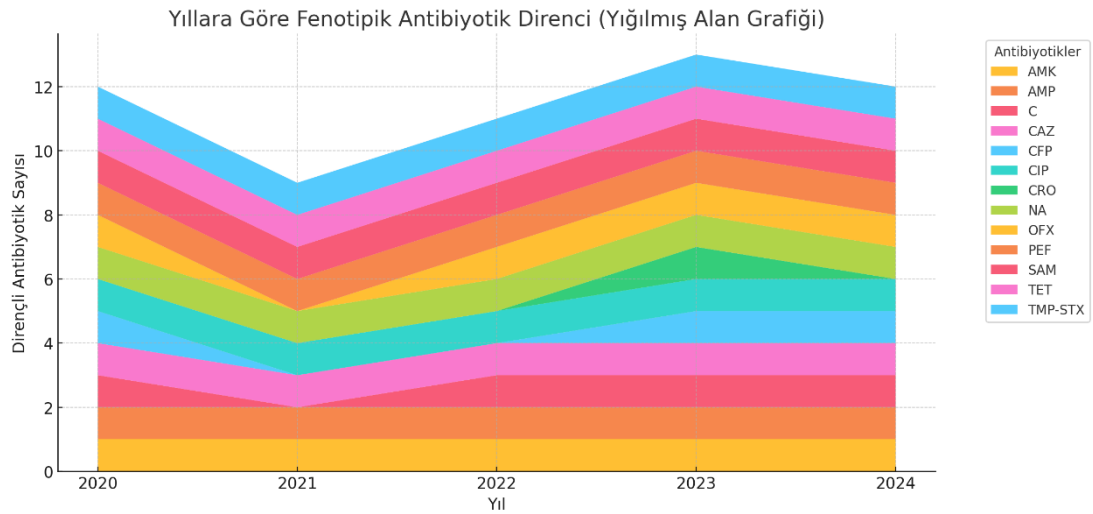
*R: Dirençli, I: Olası dirençli, S: Duyarlı

Çizelge 3.2'nin analizi sonrasında suşlarda toplam 5 farklı direnç profili tespit edilmiştir. Profil 1, en yaygın direnç profili olup, tüm örneklerde Nalidiksik Asit (NA), Sefazidim (CAZ), Pefloksasin (PEF), Amikasin (AMK) ve Ampisilin/Sulbaktam (SAM) antibiyotiklerine karşı direnç göstermektedir (9/9, %100). Profil 2, 8 suшта direnç gösteren Streptomisin (STR), Siprofloksasin (CIP), Ofloksasin (OFX) ve Tetrasiklin (TET) antibiyotiklerini içermektedir. Profil 3 ise 6/9 suшта dirençli olan Kloramfenikol (C), Cefoperazon (CFP), Sülfametoksazol-Trimetoprim (SXT) ve Ampisilin (AMP) antibiyotiklerinden oluşmaktadır. Profil 4 sadece Ceftriakson (CRO) antibiyotiğine karşı direnç gösteren 1/9 örneği kapsarken, Profil 5 ise Polimiksin B (PB) ve İmipenem (IPM) antibiyotiklerine karşı dirençli (0/9) örnek içermemektedir. Bu veriler Şekil 3.1'de görselleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Farklı direnç profilleri ve kapsadıkları antibiyotik sayısı

Yıllara göre fenotipik antibiyotik direnç profillerini içeren Şekil 3.2 incelendiğinde, bazı antibiyotiklerde direnç seviyelerinin stabil kaldığı, bazılarında ise belirgin artış veya azalış eğilimleri olduğu gözlemlendi. PEF (Pefloksasin) ve NA (Nalidiksik Asit) için direnç tüm yıllarda stabil olarak %100 seviyesinde kaldı. CIP (Siprofloksasin) ve OFX (Ofloksasin) direnç seviyeleri genel olarak yüksek olduğu görüldü. Tetrasiklin (TET) ve Streptomisin (STR) için 2020-2023 yıllarında yüksek direnç oranları görülmüş, ancak 2024 yılında dirençli suş sayısında bir miktar azalma (n=1, %8,3) olduğu tespit edildi. CAZ (Sefazidim) ve SAM (Ampisilin/Sulbaktam) için direnç oranları tüm yıllarda %100 olarak kaldığı, herhangi bir değişiklik olmadığı tespit edildi. TMP-STX (Sülfametoksazol-Trimetoprim) için direnç oranı 2020’de yüksek iken, 2021’de belirgin (n=3, %25) bir düşüş gösterdiği, ancak 2023 ve 2024 yıllarında tekrar artış eğilimi gösterdiği belirlendi. AMK (Amikasin) için direnç seviyeleri 2020-2022 arasında yüksek seyretmiş, 2023’te azalmış, ancak 2024’te tekrar artış gösterdiği görüldü.



Şekil 3.2. Yıllara göre fenotipik direnç ve tekil AMD profillerinin karşılaştırılması

3.3. Nükleik Asit İzolasyonu ve Kütüphane Hazırlığı

Total nükleik asit izolasyonu gerçekleştirildi. Bazı suşlarda düşük DNA konsantrasyonu olması nedeniyle izolasyon tekrarlandı. Yapılan QUBIT ölçümlerinde suşlardan elde edilen DNA konsantrasyonları sırasıyla Örnek_01: 59,8 ng/μL, Örnek_02: 76,2 ng/μL, Örnek_03: 35,4 ng/μL, Örnek_04: 35,4 ng/μL, Örnek_06: 46,6 ng/μL, Örnek_07: 31,8 ng/μL, Örnek_08: 22,8 ng/μL, Örnek_09: 42,4 ng/μL ve Örnek_10: 73 ng/μL olarak ölçüldü. Sonrasında kütüphane hazırlığı sırasında, her bir örnekten 10 μL kullanıldı. Hazırlanan kütüphaneler sonrasında Oxford Nanopore PromethION platformunda 72 saat boyunca dizilendi.

Sekanslama sonrası elde edilen ham verilere ait kalite değerlendirme raporları, oluşturuldu ve baz düzeyinde sekans kalitesi, GC içeriği, sekans uzunluk dağılımı değerlendirildi (Çizelge 3.3). Sekanslama sırasında FLO-PRO114M tipinde bir akışhücresi ve SQK-NBD114-96 kiti kullanılarak, toplamda 72 saatlik çalışma süresince 9,52 Gb baz çağırıldı. Veriler arasında toplamda 9,43 Gb DNA üretilmiş olup, 2,96 milyon okuma elde edildi. Ortalama okuma uzunluğu 10,83 kb olan bu veriler, yüksek doğruluklu bir basecalling modeli (high-accuracy model, 400 bps) ile analiz edildi.

3.4. Biyoinformatik Analiz

3.4.1. Kalite Kontrol ve Veri Ön İşleme

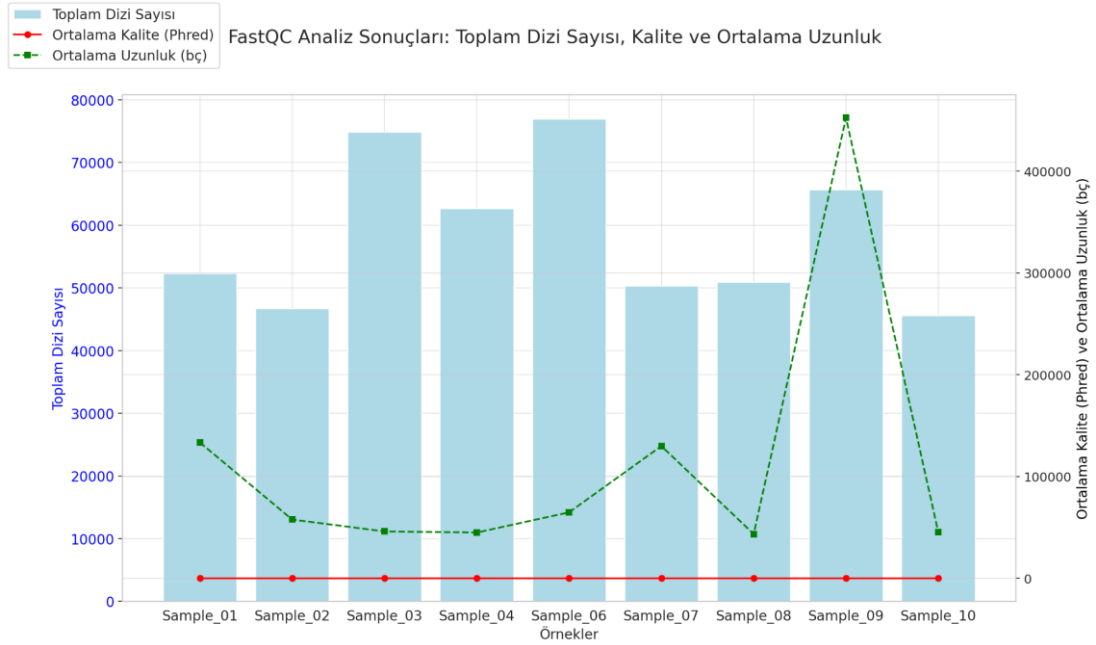
Her bir örneğe ait kalite değerlendirme raporları, FastQC ve MultiQC araçları kullanılarak oluşturulmuş olup ve baz düzeyinde sekans kalitesi, GC içeriği, sekans uzunluk dağılımı ve Kmer içeriği değerlendirildi. Bu veriler daha kolay karşılaştırılması yapılabilmesi açısından Şekil 3.2'deki gibi görselleştirildi.

Çizelge 3.3. Ham NGS veri kalite özeti

Örnek	Toplam Dizi Sayısı	GC Yüzdesi	Min. Dizi Uzunluğu	Maks. Dizi Uzunluğu	Ortalama Kalite (Phred)	Ortalama Uzunluk (bç)	Çoğaltma Yüzdesi
01	52324	51	71	266776	10,58	133423,5	75,60
02	46733	51	78	115467	23,55	57772,5	72,27
03	74875	51	82	92176	24,81	46129	71,51
04	62690	51	84	89940	28,14	45012	73,95
06	76962	51	76	129654	20,55	64865	69,35
07	50327	51	81	259893	12,34	129987	76,34
08	50934	51	92	86954	23,29	43523	73,17
09	65667	51	70	904981	6,54	452525,5	71,08
10	45595	51	76	90553	24,99	45314,5	75,46

FastQC analizi sonuçlarına göre, her suşa ait ham okumalara yönelik veriler Şekil 3.2'de özetlendi. Analiz edilen suşlarda toplam sekans sayılarının 46733 ile 76962 arasında değişiklik gösterdiği görüldü. Tüm örneklerde GC yüzdesi sabit olarak %51 olarak ölçülmüş, minimum sekans uzunluğu 71 ile 84 bç arasında değişiklik göstermekte olduğu tespit edildi. Maksimum sekans uzunlukları ise 89940 bç ile 266776 bç arasında bir dağılım gösterdiği, ortalama kalite skoru, suşlar arasında önemli varyasyonlar olduğu ve en düşük 10,58 (Örnek 01) ile en yüksek 28,14 (Örnek 04) arasında değiştiği görüldü. Ortalama sekans uzunlukları ise 45012 bç ile 133423 bç arasında ölçüldü.

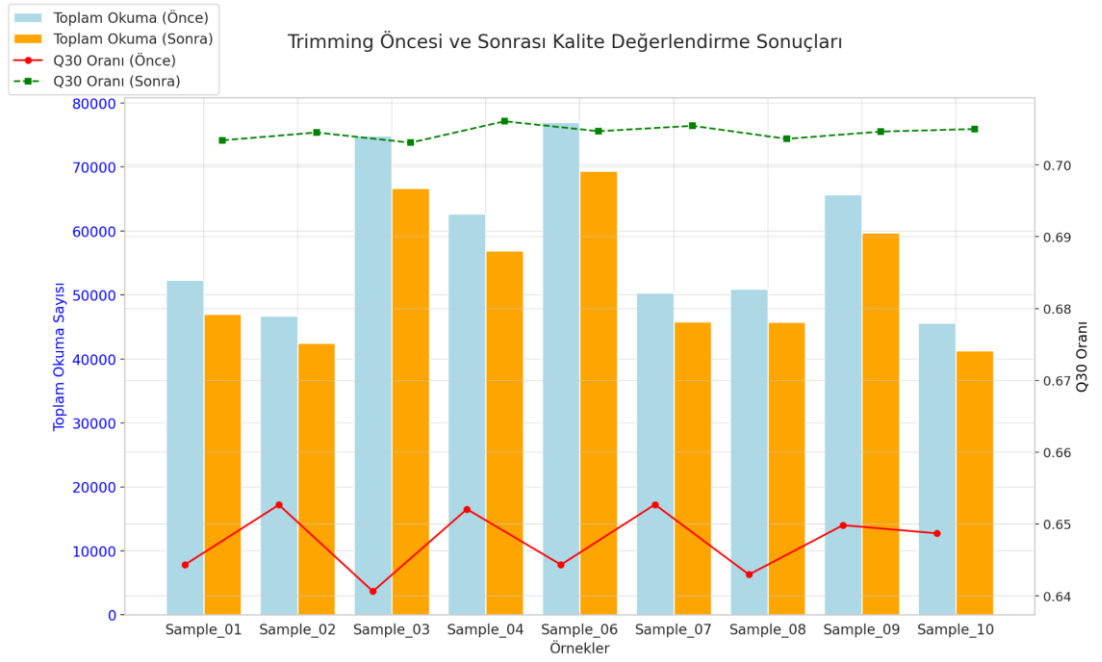
Şekil 3.3'de de görüldüğü üzere ortalama uzunluğun en çok olduğu suşun Örnek 09, en az olanın ise Örnek 08 olduğu görüldü. En fazla okumanın Örnek 06'da, en az okumanın da Örnek 02'de olduğu görüldü. Örneklerdeki ortalama dizi kalitesinin de birbirine yakın olduğu görüldü.



Şekil 3.2. FastQC analiz sonuçlarına ilişkin grafik

3.4.2. Okuma Filtreleme (Trimming)

Filtreleme sonrası toplam okuma sayısı, guanin/sitozin (GC) içeriği, ortalama kalite skoru (Phred), minimum ve maksimum dizi uzunlukları, ortalama okuma uzunluğu ve çoğaltma yüzdesi değerlendirildiği veriler Çizelge 3.4’de verildi. Filtreleme işlemi, *fastp* aracı kullanılarak kalite skoru 7’nin altında olan diziler çıkarılarak gerçekleştirildi. Yapılan okuma filtreleme işlemi sonucunda ortaya çıkan veriler Şekil 3.4’teki gibi görselleştirilerek analiz edildi.



Şekil 3.3. Filtreleme öncesi ve sonrası kalite değerlendirme sonuçları (Turkuaz renk, “Toplam Okuma (Önce)”; turuncu renk “Toplam Okuma (Sonra)”; kırmızı çizgi “Q30 Oranı (Önce)”; yeşil çizgi ise “Q30 Oranı (Sonra)” göstermektedir)

Çizelge 3.4. Barkodlara ait kalite değerlendirme raporlarının özet sonuçları (Filtreleme işlemi öncesi toplam okuma, toplam baz, Q30 oranı, GC içeriği gibi bilgiler ile filtreleme sonrası, filtreleme işlemi öncesi toplam okuma, toplam baz, Q30 oranı, GC içeriği gibi karşılaştırması)

Örne k Adı	Toplam Okuma (Önce)	Total Baz (önce)	Q30 (önce)	GC (Önce)	Toplam Okuma (Sonra)	Toplam Baz (Sonra)	Q30 (Sonra)	GC (Sonra)
01	52324	340641781	0,64	0,51	46988	30947074 9	0,70	0,518
02	46733	338822219	0,65	0,51	42450	31124825 5	0,70	0,518
03	74875	492634499	0,64	0,51	66702	44498515 0	0,70	0,518
04	62690	498487038	0,65	0,51	56877	45622782 6	0,70	0,518
06	76962	482862549	0,64	0,51	69343	43768310 9	0,70	0,518
07	50327	343114829	0,65	0,51	45810	31461859 4	0,71	0,518
08	50934	322080521	0,64	0,51	45718	29169294 9	0,70	0,518
09	65667	444901819	0,64	0,51	59704	40680977 8	0,70	0,518
10	45595	345650388	0,64	0,51	41298	31551773 1	0,70	0,517

Filtreleme öncesi ve sonrası verilerin karşılaştırılması sonucunda, toplam okuma sayılarında ortalama %9,5, total baz sayısının da %8,5-9,7 oranında azalma tespit edildi. En fazla okuma kaybı %10,9 ve en büyük baz kaybı %9,67 ile Örnek 03'te, en düşük okuma kaybı ise %9,1 ve toplam baz sayısı azalması %8,14 ile Örnek 02'de hesaplandı.

Filtreleme sonrası Q30 oranları incelendiğinde, tüm örneklerde kalite değerlerinde belirgin bir iyileşme kaydedilmiş ve Q30 oranlarında %7,9 ila %9,7 arasında artış olduğu görüldü. En fazla kalite artışı %9,74 ile Örnek 03 örneğinde tespit edildi. GC içeriğindeki değişim değerlendirildiğinde, trimming işlemi sonrasında GC oranlarında küçük düşüşler saptandı. Tüm örneklerde GC yüzdesi ortalama %0,1 ila

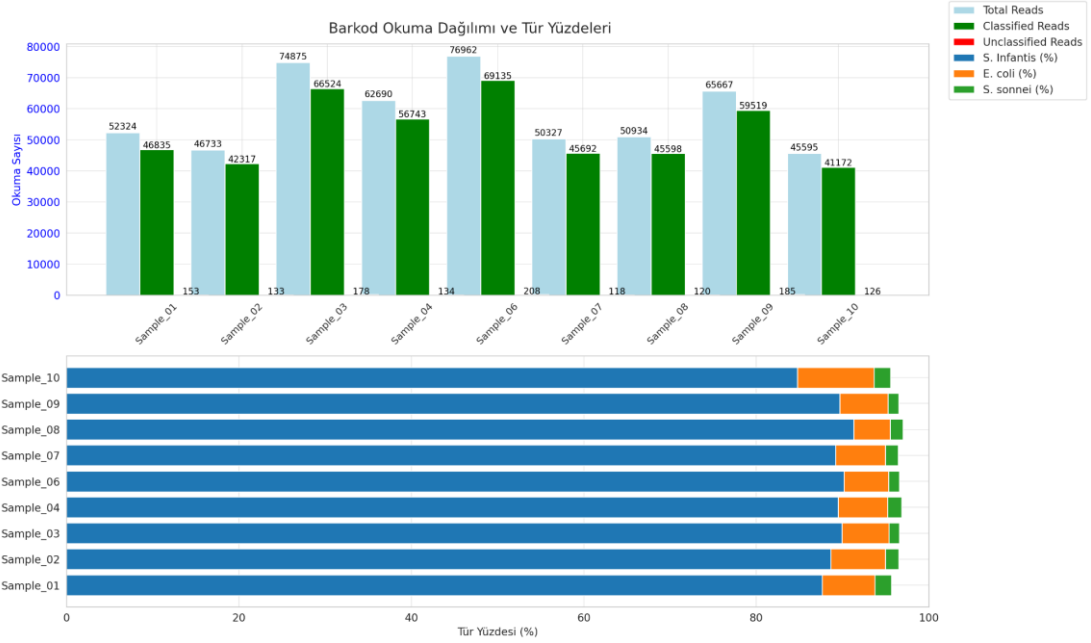
%0,2 oranında azalmış olup, en fazla değişiklik %0,18 ile Örnek 03 örneğinde görüldü. Ayrıntılı bilgiler Çizelge 3.4’de verildi.

Bu çalışmada, ham NGS verileri üzerinde yapılan kalite kontrol işlemlerinin etkisini değerlendirmek amacıyla öncesi ve sonrası metrikler istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Eşleştirilmiş (paired) T-testi kullanılarak toplam okuma sayısı, toplam baz miktarı, Q30 kalite oranı ve GC içeriği analiz edildi. Sonuçlara göre, toplam okuma sayısı ve toplam baz miktarında anlamlı bir azalma tespit edildi ($p<0,001$). Bu durum, düşük kaliteli bazların ve adaptör sekanslarının filtrelenmesiyle açıklanabilir. Bununla birlikte, en dikkat çekici değişiklik Q30 oranında gözlemlendi. Ham veriyle karşılaştırıldığında, temizlenmiş veride Q30 oranı önemli ölçüde arttı ($p<0,0001$), bu da kalite kontrol işleminin veri doğruluğunu artırdığını gösterdi. Öte yandan, GC içeriğinde küçük ama istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlemlendi ($p<0,001$). Ancak, bu değişimin biyolojik olarak büyük bir farklılık yaratacak seviyede olmadığı görüldü.

3.4.3. Okuma Klasifikasyonu

Filtreleme işlemi tamamlanmış okumaların taksonomik klasifikasyonu için Kraken2 aracı ve Standart 8GB veri tabanı kullanıldı. Çalışma kapsamında dizilemesi yapılan örneklerle ait Kraken2 analiz sonuçlarına göre toplamda 9 örnek tür düzeyinde tanımlandı. Analiz edilen örneklerde toplam okuma sayıları 41,298 ile 66,702 arasında değişiklik göstermekte olduğu görüldü. Örneklerin büyük bir kısmında sınıflandırılan okumaların oranı oldukça yüksek olup %99,67 ile %99,76 arasında değiştiği görüldü. Sınıflandırılmamış okuma oranları ise oldukça düşük olup %0,24 ile %0,33 arasında yer aldığı görüldü. Tür düzeyindeki sınıflandırma sonuçlarına göre, *S. Infantis* her örnekte en baskın tür olarak tespit edildi. Örneğin, Örnek 01 (barcode17) üzerinde *S. Infantis* %87,66 oranında, Örnek 02 (barcode18) üzerinde %88,64 oranında, Örnek 10 (barcode26) üzerinde ise %84,77 oranında sınıflandırıldı. Bunun yanında, ikinci en yaygın tür *Escherichia coli* olup, örneklerdeki oranı %4,23 ile %8,88 arasında değiştiği görüldü. Üçüncü en yaygın tür ise *Shigella sonnei* olarak tespit edilmiş ve oranı %1,22

ile %1,92 arasında gözlendi. Bu analiz sonucu elde edilen sonuçlar Şekil 3.5’da ayrıntılı şekilde görselleştirildi.



Şekil 3.4. Kraken2 sonuçlarına ilişkin grafik (Classified Reads: Sınıflandırılabilmiş okumalar, Unclassified Reads: Sınıflandırılamamış Okumalar, Total Reads: Toplam Okuma sayısı)

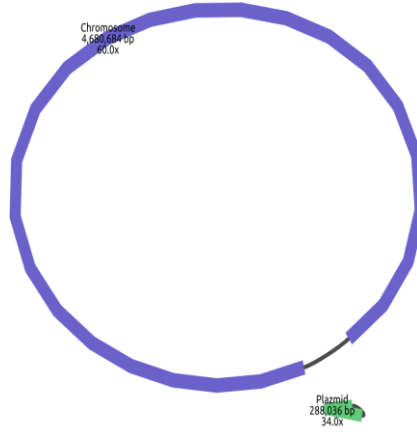
3.4.4. Montaj (Assembly) ve Kalite Değerlendirme

Filtreleme işlemi sonrasında oluşturulan *fastq* dosyalarından, Flye aracı kullanılarak montaj (assembly) işlemi gerçekleştirildi. Sonrasında oluşan montaj sonuçları analiz edildi. Montaj sonuçlarına göre toplam kontig sayıları ve toplam genom boyutları Çizelge 3.5’te sunulmaktadır.

Çizelge 3.5. Montaj işlemi sonucu elde edilen veriler

Örnek Adı	Toplam Uzunluk (bç)	N50 (bç)	Fragman Sayısı	En Uzun Fragman (bç)	Scaffold	Ortalama Kapsam
01	4968720	4680684	2	4680684	0	58
02	4937328	4767298	2	4767298	0	60
03	5027424	4695275	3	4695275	0	84
04	4876941	4678813	2	4678813	0	90
06	4960095	4679386	2	4679386	0	84
07	4906014	4678998	2	4678998	0	61
08	4877650	4677867	2	4677867	0	57
09	4896269	4678832	2	4678832	0	79
10	4952885	4720589	2	4720589	0	59

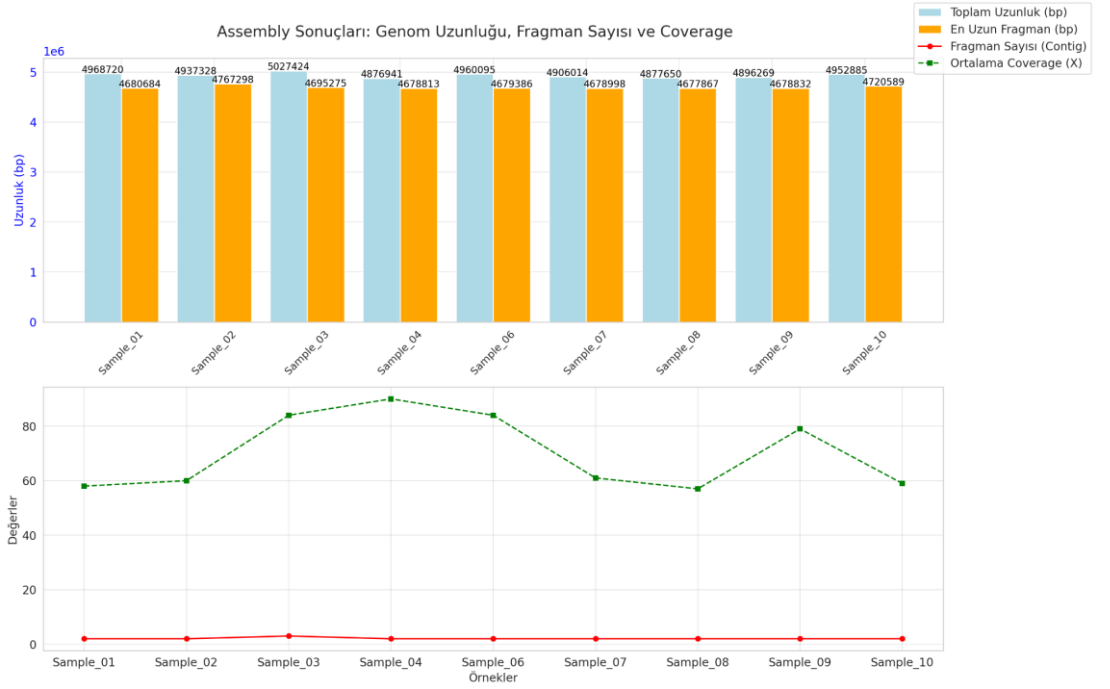
Montaj sonuçları, genomun genel yapısını ve kontig organizasyonunu görselleştirmek amacıyla Bandage (Wick, 2015) ve Proksee.ca programı kullanılarak analizler gerçekleştirildi. Bandage programı ile yapılan analizlerde, *gfa* dosyaları yardımıyla belirlenen mutasyon bölgeleri ve montaj yapıları detaylı bir şekilde incelendi (Şekil 3.7). Bandage ile montaj grafikleri görselleştirilerek kontig bağlantıları ve genom organizasyonu değerlendirildi. Yapılan değerlendirmeler sonucunda, kontig derinliği, sayısı ve N50 değeri gibi istatistiksel parametreler analiz edilerek montaj kalitesi değerlendirildi. Proksee ile yapılan analizlerde, mobil genetik elemanlar, gen anotasyonu, AMD genlerinin bulunduğu yerler, tRNA ve rRNA'lar tespit edildi ve görsel olarak analiz edildi (Şekil 3.6).



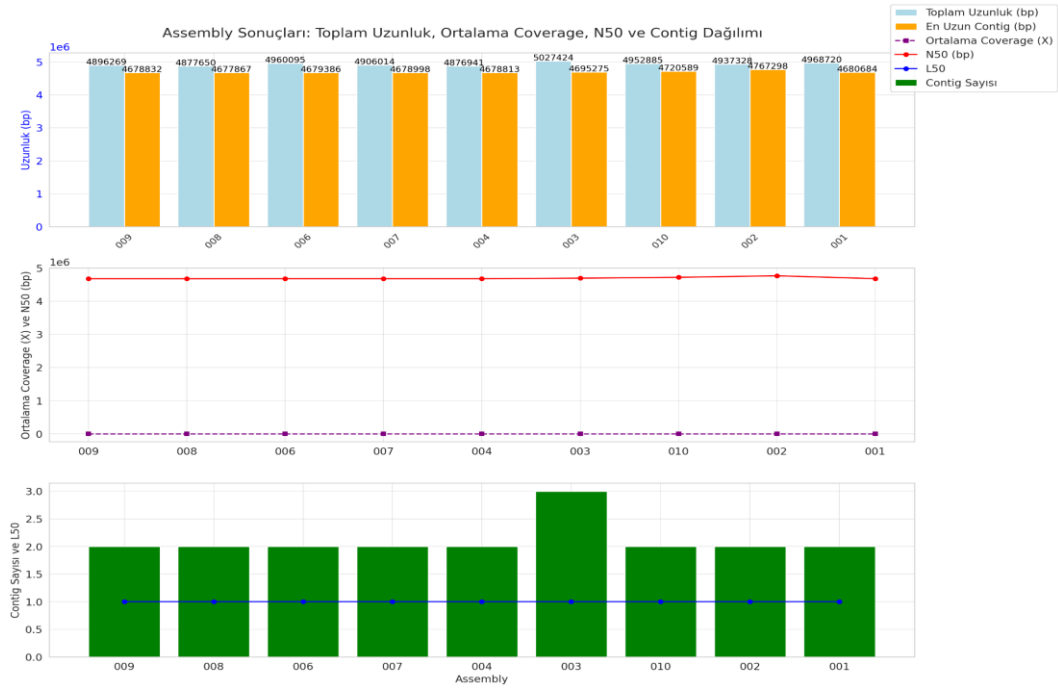
Şekil 3.6. Bir numaralı (Örnek 01) örneğe ait montaj işlemi sonucunda oluşan iki adet kontiğin bandage programı kullanılarak görselleştirilmesi. Kromozom (4,680,684 bç, 60x) ve Plazmid (288,036 bç, 34x) olmak üzere iki adet kontig

QUAST kullanılarak yapılan analiz sonucunda montajların kalite metrikleri detaylı bir şekilde incelendi. Çeşitli montajlar için, minimum uzunluklara göre (≥ 0 bç, ≥ 1000 bç, ≥ 5000 bç, ≥ 10.000 bç ve ≥ 25.000 bç) sınıflandırılan kontig sayıları değerlendirildi. Çoğu örnekte, kontig sayılarının tutarlı olduğu ve genellikle 2-3 arasında değiştiği gözlemlendi. Bu durum, montajların genellikle yüksek bir bütünlük seviyesine sahip olduğunu göstermektedir. Özellikle, ≥ 10.000 bç eşik değerini geçen kontig sayılarında belirgin bir farklılık görülmedi.

Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda, montajların genel tutarlılığını ve genomların yüksek oranda kapsanabilir olduğu anlaşıldı. Montaj kalitesiyle ilgili detaylı sayısal sonuçlar Şekil 3.8 ve Şekil 3.9’da sunulmuş olup, tüm analiz edilen veri setlerinde gözlemlenen eğilimleri ayrıntılı bir şekilde özetlendi. Bu sonuçlara göre örneklerin bir sonraki aşamalara geçebilecek veriyi ürettiği görüldü.



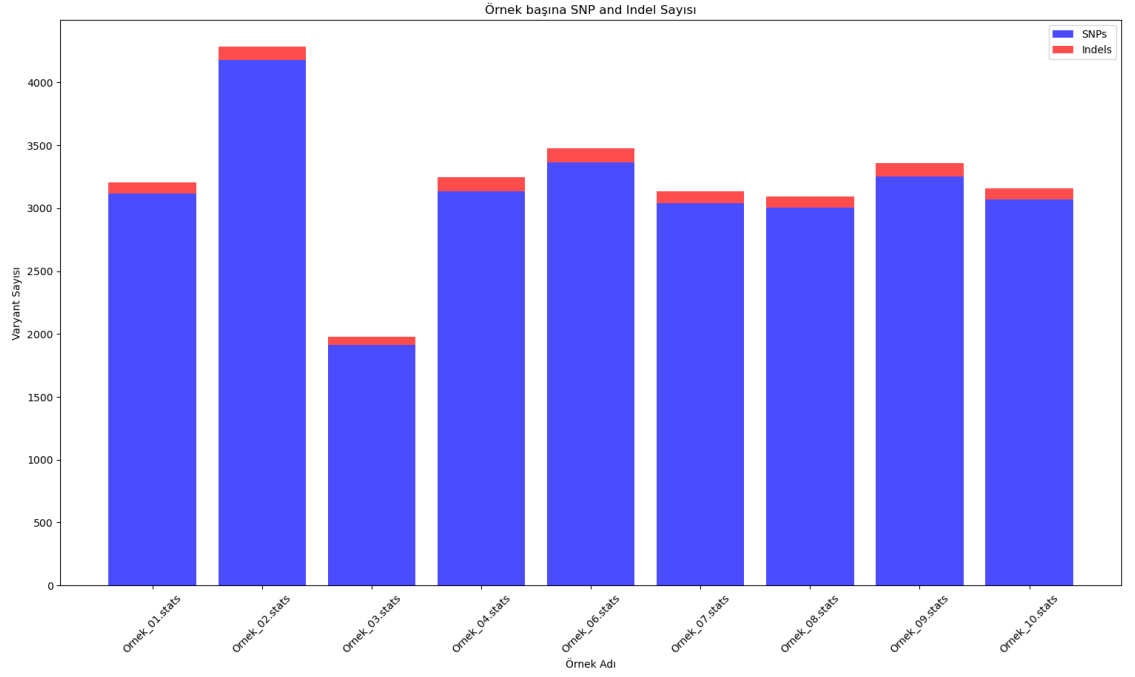
Şekil 3.7. Montaj Sonucunda elde edilen, genom uzunluğu, fragman sayısı, kapsam değerleri ve en uzun fragmanların gösterildiği grafik



Şekil 3.8. Montaj sonuçlarının toplam uzunluk, kapsam, N50 ve kontig dağılımı ile görselleştirildiği grafik

Yapılan BUSCO analizlerinde, bacteria odb10 veri setiyle gerçekleştirilen değerlendirmede her örnek 124 BUSCO grubuna karşı test edildi. Örneğin, Örnek 03'te %95,2 tamlik oranı (118/124 complete BUSCO) elde edilirken, sadece %0,8 eksik ve %4,0 fragmente BUSCO görüldü. En düşük tamlik oranı Örnek 02'de %88,7 (110/124 complete BUSCO) olarak kaydedildi. Tüm örneklerde, tam BUSCO'ların %100'ünün tek kopyalı olması, dizilerin tekrarlı bölge içermediğini ve dolayısıyla yüksek kalitede bir derleme elde edildiğini gösterdi. Ayrıca, fragmente ve eksik BUSCO oranlarının sırasıyla %4,0–%7,3 ve %0,8–%4,0 arasında seyretmesi, genel bütünlüğün korunduğunu ve genomik verilerin sonraki analizler için güvenilir olduğunu gösterdiği için sonraki adımlara geçildi.

Her suş üzerinde işlenen genomik pozisyonların ile varyant adaylarının tespiti için yapılan analizler sonucunda elde edilen veriler kayıt altına alındı. Örneğin, Örnek_01'de 47,795 pozisyon işlenirken, *pileup* modelinden 2,023 ve *full-alignment* modelinden 3,120 aday varyant tespit edildi. Bu durumda final *vcf*'ye, yüksek güvenilirlikte toplam 5,143 varyant kabul edildi ve kalan pozisyonlar kriterleri sağlamadığı için reddedildi. Benzer şekilde, Örnek_02'de 51,601 pozisyonda sırasıyla 2,840 (*pileup*) ve 4,426 (*full-alignment*) aday varyant raporlandı. Örnek_03'te 42,294 pozisyonda 1,489 ve 1,847; Örnek_04'te 42,118 pozisyonda 1,807 ve 3,037; Örnek_06'da 43,156 pozisyonda 1,992 ve 2,887; Örnek_08'de 48,398 pozisyonda 2,048 ve 2,887; Örnek_09'da 42,946 pozisyonda 1,993 ve 2,881; ve Örnek_10'da 47,470 pozisyonda 1,993 ve 2,881 varyant tespit edildi. Bu analiz sonucunda elde edilen *vcf* dosyalarına bcftools ile filtreleme uygulandı ve düşük frekanslı ve kötü kalite değeri olan varyantlar elendi. Sonrasında elde edilen *vcf* dosyaları daha iyi bir karşılaştırma yapılabilmesi için Şekil 3.10'daki gibi görselleştirildi.



Şekil 3.9. Her örnek başına SNP ve INDEL sayılarının örnek başına gösterimi

3.4.5. Genom Anotasyonları

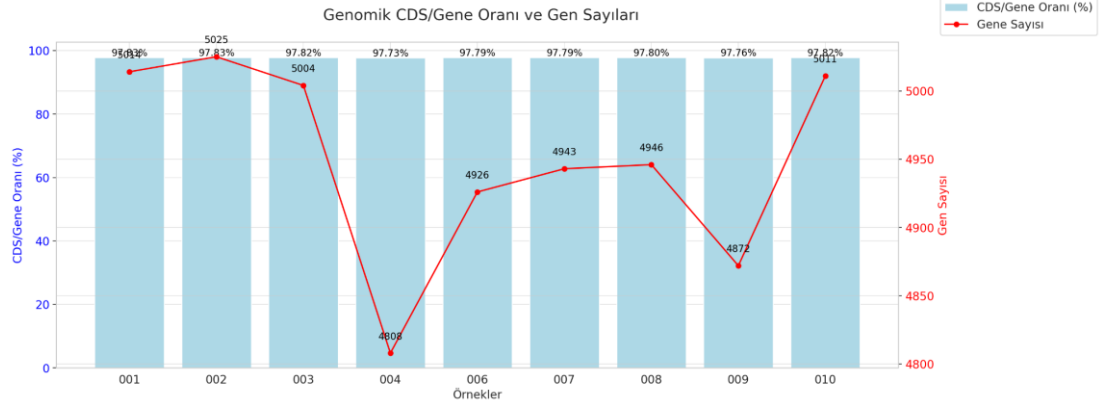
S. Infantis suşlarına ait genomik analiz sonuçları, farklı örneklerde benzer genomik özellikler ortaya koydu. Tüm örneklerde 22 adet ribozomal RNA (rRNA) geni ve 86 adet transfer RNA (tRNA) geni bulundu. Ayrıca, tek bir tmRNA geni ve 2 adet tekrar bölgesi gözlemlendi. Örneklerde kodlanan CDS (protein kodlayan gen) sayıları 4699 ile 4916 arasında değişirken, toplam baz uzunlukları 4876941 ile 5027424 arasında değiştiği görüldü. Gen sayıları ise 4808 ile 5025 arasında değişiklik gösterdi. Ayrıntılı genom bilgisi Çizelge 3.6 ve Şekil 3.11’de gösterildi.

Çizelge 3.6. Anotasyon sonucunda elde edilen genlere ilişkin bilgiler

Örnek	CDS	Baz Sayısı	Gen	rRNA	Tekrar Bölgesi	tRNA	tmRNA
01	4905	4968720	5014	22	2	86	1
02	4916	4937328	5025	22	2	86	1
03	4895	5027424	5004	22	2	86	1
04	4699	4876941	4808	22	2	86	1
06	4817	4960095	4926	22	2	86	1
07	4834	4906014	4943	22	2	86	1
08	4837	4877650	4946	22	2	86	1
09	4763	4896269	4872	22	2	86	1
10	4902	4952885	5011	22	2	86	1

*CDS: Kodlama yapan dizi

Örnek 01'de toplamda 3061 önemli gen tespit edildi. Bu genler arasında ribozomal RNA'lar (5S, 23S ve 16S ribosomal RNA), transfer RNA'lar (örneğin, tRNA-Glu(ttc)) ve Bifunctional purine biosynthesis protein (*purH*) gibi metabolik işlevlerde rol oynayan proteinler öne çıkmaktadır. Ayrıca, *Phosphoribosylamine-glycine ligase* gibi nükleotid biyosentezinde yer alan proteinler ve *Transcriptional regulatory protein (ZraR)* gibi regülatör proteinler dikkat çektiği görüldü. Öne çıkan genlerden biri de çinko *resistance-associated protein*'dir ve bu, bakterinin çevresel metal stresi altında hayatta kalma kapasitesini artırabilir.



Şekil 3.10. CDS ve gen dağılımının yüzdelik oranlarıyla görselleştirilmesi

Örnek 02 içerisinde 3060 önemli gen tespit edildi. Cytochrome c-type biogenesis protein *CcmH* ve *Heme exporter protein D* gibi genler, elektron transfer zincirlerinde ve oksijen taşımada kritik rol oynamaktadır. Ayrıca, *Periplasmic nitrate reductase* ve Cytochrome c biogenesis ATP-binding export protein (*ccmA*) gibi proteinlerin varlığı, bakterinin anaerobik solunum kapasitesini destekleyebilecek adaptasyonları göstermektedir. Bu özellikler, bakterinin düşük oksijenli ortamlarda hayatta kalma kapasitesine işaret etmektedir. Örnek 03'de toplamda 3075 önemli gen belirlendi. Ribozomal RNA'lar ve transfer RNA'lar dışında, D-methionine transport system permease protein (*metI*) ve Methionine import ATP-binding protein (*metN*) gibi metiyonin taşıma sistemleri öne çıkmaktadır.

D-glycero-beta-D-manno-heptose-1,7-bisphosphate 7-phosphatase gibi genler, bakterinin lipopolisakkarit biyosentezi ve hücre zarı yapısında bulundu. Örnek 04'de toplamda 3068 önemli gen bulundu. Öne çıkan genler arasında Multidrug export protein *AcrF* ve *AcrE* bulunmaktadır. Bu proteinler, bakterinin çoklu ilaç direnç mekanizmalarını destekleyen taşıma sistemleriyle ilişkilidir. Bunun yanı sıra, HTH-type transcriptional regulator (*AcrR*) gibi genler, bakterinin gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynayabilir. Ribozomal RNA ve transfer RNA'lar da yine dikkat çeken gruplardandır. Örnek 06'da toplamda 3071 gen tespit edildi. Bu genlerden *disulfide interchange protein (dsbA)*, protein katlanmasında önemli bir rol oynamaktadır ve hücre zarındaki proteinlerin stabilizasyonunda kritik bir işlevi vardır. Bunun yanında, Molybdenum cofactor guanylyltransferase Protein (*YihD*) gibi genler,

bakterinin metabolik adaptasyon kapasitesini artırabilecek özelliklere sahiptir. Ribozomal RNA'ların ve transfer RNA'ların varlığı ise bakterinin protein üretim kapasitesini desteklemektedir. Örnek 07 içerisinde toplamda 3074 önemli gen bulunmaktadır. Bu genler arasında *hypothetical protein* 'ler öne çıkmakta olup, bu genlerin fonksiyonlarının belirlenmesi için ek çalışmalar gereklidir. Ayrıca, *CDP-diacylglycerol--serine O-phosphatidyltransferase* gibi genler, lipid biyosentezinde önemli bir rol oynamaktadır.

Örnek 08'de toplamda 3069 önemli gen tespit edildi. Multidrug export protein *AcrF* ve *AcrE* gibi genler, bakterinin ilaç direnç mekanizmalarına katkıda bulunabilir. Bunun yanında, ribozomal RNA ve transfer RNA'ların varlığı, bakterinin genetik materyalinin stabilizasyonunda ve protein üretiminde önemli bir rol oynar. Hypothetical proteinlerin yüksek sayıda olması, potansiyel olarak keşfedilmemiş fonksiyonel mekanizmaların varlığına işaret etmektedir. 009_assembly'de toplamda 3075 gen belirlendi. Ribozomal RNA ve transfer RNA'ların yanı sıra, DNA *topoisomerase 1* ve *shikimate dehydrogenase* (NADP (+)) gibi genler dikkat çekmektedir. Bu genler, DNA yapısının düzenlenmesi ve metabolik süreçlerde rol oynamaktadır. Ayrıca, Peptide deformylase gibi genler, bakterinin protein biyosentez mekanizmalarındaki kritik rollerine işaret etmektedir.

Örnek 10'da toplamda 3075 önemli gen bulundu. Hypothetical proteinler, ribozomal RNA ve transfer RNA'larla birlikte, Alpha-ketoglutarate permease ve CDP-diacylglycerol--serine O-phosphatidyltransferase gibi genler de öne çıkmaktadır. Bu genler, hücre metabolizmasının düzenlenmesi ve membran biyosentezi süreçlerinde önemli olabilir.

Tüm montaj sonuçlarında toplam 2989 farklı gen tespit edildi. Bu genler arasında ribozomal RNA'lar (16S, 23S, 5S), transfer RNA'lar (örneğin, tRNA-Glu(ttc)) ve birçok temel metabolik süreçte görev alan proteinler bulunmaktadır. Özellikle Multidrug export protein *AcrF* ve *AcrE*, bakterinin ilaç direnç mekanizmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca, hypothetical protein'lerin varlığı, hala keşfedilmemiş biyolojik işlevlerin olabileceğine işaret etmektedir. Bu genler,

bakterinin hayatta kalma yeteneğini artıran ve halk sağlığı açısından önemli tehditler sunan unsurlardır. Montajların çoğunda (toplam 8 tanesinde) bulunan 32 gen tespit edildi. Bu genler, bakterinin patojenite ve virülans mekanizmalarına katkıda bulunabilecek genler olarak öne çıkmaktadır. Bunlardan bazıları DNA topoisomerase 1 ve Multidrug efflux proteindir.

Kromozom üzerinde bulunan virülens genlerinin analizi yapıldığında, bu çalışma kapsamındaki suşlarda belirli virülens genlerinin tüm örneklerde korunduğu görüldü. Bu genler, patojenitenin temel bileşenlerini oluşturan ve enfektivite açısından kritik öneme sahip olan faktörleri olduğu bilinmektedir. Özellikle *sseL*, *sopA*, *sifB*, *sseJ*, *steC*, *pipB*, *invA*, *invC*, *prgH*, *prgI* gibi Tip III Salgı Sistemi (T3SS) bileşenleri tüm örneklerde korunduğu görüldü. Bununla birlikte, *fimH*, *fimD*, *fimC*, *lpfA*, *lpfC* gibi adezyon ve kolonizasyon süreçlerinde rol oynayan genlerin de tüm örneklerde bulunması, suşların konak hücreye tutunma ve enfekte etme yeteneğini sürdürdüğünü gösterdi.

Bazı virülens genleri ise belirli örneklerde bulunurken diğerlerinde tespit edilmedi. Özellikle *avrA*, *slrP*, *sopE2*, *sseK1*, *sseK2*, *ratB* ve *shdA* genlerinde varyasyonlar gözlemlendi. *avrA* geninin bazı suşlarda kaybolması, bu suşların bağırsak epiteline yönelik immün modülasyon yeteneklerinde değişiklikler olabileceğini düşündürmektedir. *slrP* geninin bazı örneklerde bulunmaması ise, protein modifikasyon süreçlerinde farklılaşmalara işaret edebilir. *sopE2* ve *sseK* ailesine ait genlerin bazı örneklerde tespit edilmemesi, suşların farklı konak adaptasyonları geliştirdiğine dair bir ipucu olabilir. Ayrıca, *ratB* ve *shdA* genlerinin bulundu. Bunlara ek olarak tüm örneklerde yersiniabactin kodlayan gen plazmid üzerinde tespit edildi.

Yıllara göre analiz yapıldığında, bazı virülens genlerinde kayıplar veya kazanımlar gözlemlendi. Özellikle 2018-2023 yılları arasında bazı genlerin belirli yıllarda daha fazla ya da daha az oranda tespit edilmesi, suşların genomik plastisitesinin yüksek olduğunu göstermektedir. *sopE2*, *sseK2*, *avrA* ve *slrP* gibi genlerin belirli yıllarda kaybolması, suşların konak adaptasyonu ve virülans

profillerinde dinamik değişiklikler yaşıandığını göstermektedir. Buna karşın, *sopA*, *sifB*, *sseJ*, *steC* ve *invA* gibi genler yıllar boyunca tüm örneklerde sabit kaldığı görülmüştür.

Bu durum, analiz edilen suşların yüksek virülens potansiyeline sahip olduğunu ve konak bağışıklık sisteminden kaçış mekanizmalarını koruduklarını göstermektedir. Buna karşın, *sopA*, *sifB*, *sseJ*, *steC* ve *invA* gibi genler yıllar boyunca tüm örneklerde sabit kaldığı görülmüştür.

Bu çalışmada, *S. Infantis* suşlarındaki plazmidlerde bulunan virülens genleri incelenmiş ve bu genlerin örnekler arasındaki dağılımı ile yıllara göre değişimi analiz edildi. Elde edilen veriler, bu serovarin patojenite mekanizmalarını koruma ve çevresel adaptasyon süreçlerinde önemli genetik dinamiklere sahip olduğunu göstermektedir. Tüm örneklerde ortak olarak bulunan *sseK1*, *mgtC*, *mgtB*, *misL* ve *lpfA* genleri, *Salmonella*'nın patojenite mekanizmalarının temel unsurlarını oluşturmaktadır. *sseK1*, Tip III Salgı Sistemi (T3SS) efektör proteinlerinden biri olup, konağın immun yanıtını baskılamada önemli bir rol oynar. *mgtC* ve *mgtB* genleri, bakterinin magnezyum iyonu taşınması ve makrofaj içinde hayatta kalma mekanizmalarını düzenlerken, *misL* geni ototransporter ailesine ait bir protein kodlamakta ve *Salmonella*'nın bağırsak epitel hücrelerine yapışmasını sağlamaktadır. *lpfA* ise uzun polar fimbriaya kodlayan bir gen olup, bağırsak yüzeyine kolonizasyon sürecinde rol almaktadır. Bu genlerin tüm yıllarda ve tüm suşlarda korunması, *S. Infantis*'in temel virülens özelliklerini muhafaza ettiğini ve patojenitesini sürdürebilmek için genomik olarak stabil bölgeler içerdiğini göstermektedir. Belirli örneklerde tespit edilen virülens genleri ise suşlar arasında genetik farklılıkların ve potansiyel yatay gen transferinin varlığına işaret etmektedir. *spvC*, sadece belirli örneklerde (01, 02, 06, 07, 09) tespit edildi ve *Salmonella*'nın sistemik enfeksiyon oluşturma yeteneğiyle ilişkilidir. *siiE* geni (01, 04, 06, 08) epitel hücrelere tutunma sürecinde kritik rol oynarken, *sopB* geni (02, 03, 07, 10) bakterinin konağın hücrelerine invazyon mekanizmasını düzenlemektedir. *gogB* (01, 03, 04, 08) geni ise bağışıklık sisteminden kaçışı sağlayan bir efektör protein kodlamaktadır. Yıllara göre virülens gen profili incelendiğinde, belirli genlerin zaman içinde kaybolduğu veya kazanıldığı görülmüştür. 2020-2022 yılları arasında *spvC* ve *gogB*

gibi virölens genleri belirli örneklerde bulunurken, 2023-2024 yıllarında bu genlerin bazı suşlardan eksildiği gözlemlendi. Buna karşılık, *mgtC*, *mgtB* ve *misL* gibi genlerin tüm yıllarda ve tüm örneklerde stabil bir şekilde korunduğu belirlendi.

3.4.6. MLST ve cgMLST sonuçları

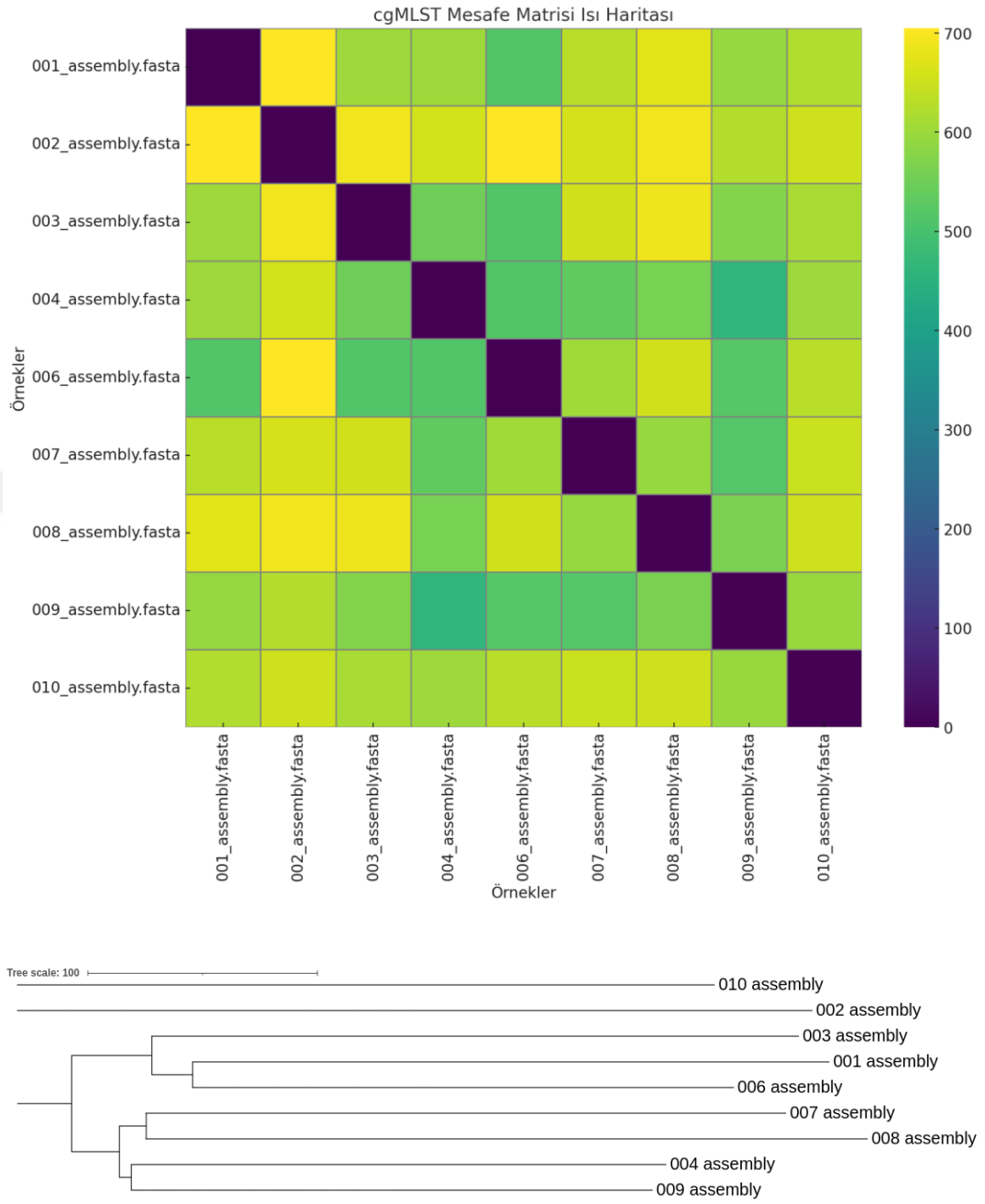
MLST analizi sonucunda, test edilen tüm *S. Infantis* suşlarının sekans tipi ST32 olarak tanımlandı. Bu sonuçlar %100 benzerlik oranıyla doğrulanmış olup örneklerin tümünün aynı genotipe ait olduğunu gösterdi. Bu durum, analiz edilen örneklerin genetik olarak yüksek derecede homojen olduğunu ve aynı klonal soyun bir parçası olabileceğini işaret ettiği belirlendi.

cgMLST analiz sonuçlarına göre, örneklerde toplam 3000 gen bölgesinden büyük bir kısmı eksiksiz (EXC) olarak tanımlandı. Örneklerin kontig başına ortalama 3300-3500 eksiksiz gen bölgesi içerdiği görüldü. Buna ek olarak, LNF (Eksik Genler) sayısı 4720 ile 4869 arasında değiştiği görüldü. İnferans edilen (INF) gen bölgelerinin sayısı örnekler arasında farklılık gösterdiği ve en düşük 72 (Örnek 10) ile en yüksek 228 (Örnek 01) arasında olduğu görüldü. Analiz sırasında herhangi bir problemli bölgeye (PLOT) rastlanılmadı. Ek olarak, genom başına ortalama 15-47 arasında "NIPH" (yeni belirlenmiş genler) ve 21-37 arasında "ALM" (belirlenemeyen genler) bulunduğu görüldü. Örneklerin genomlarının ortalama "ASM" (genom tamlığı metriği) değeri 154-247 arasında değiştiği ve bununda örneklerin yüksek derecede tamlık gösterdiğini şeklinde değerlendirildi. cgMLST analizi sonuçlarına göre, toplam 3002 lokus üzerinden yapılan değerlendirmede, farklı montajlamalarda çağrılan alel sayısı 2373 ile 2513 arasında değişiklik gösterdiği görüldü. En yüksek çağrılan alel oranı %83,71 ile 004_assembly örneğinde görülürken, en düşük çağrılan alel oranı %79,05 ile 008_assembly örneğinde belirlendi. Genel olarak, incelenen montajlamalarda çağrılan alel yüzdesi %79,05 ile %83,71 arasında değiştiği belirlendi.

Belirlenen cgMLST (çekirdek genom sekans tipi) değerleri arasında, 273754, 93270, 23611, ve 241041 gibi farklı tipler tespit edildi. 273754 sekans tipi Örnek 01 ve Örnek 06'da belirlenmiş olup, bu örneklerin yüksek oranda benzer genetik

profillere sahip olduğu görüldü. 93270 sekans tipi ise Örnek 04, Örnek 07 ve Örnek 08'de ortak olarak bulundu. 23611 sekans tipi Örnek 02 ve Örnek 10'da tespit edildi. Genel olarak, cgMLST analizinde elde edilen sonuçlara göre, belirlenen sekans tipleri içerisinde en yüksek alel uyumu %82,71 ile Örnek 04'de görüldü. En düşük alel uyum oranı ise %78,01 ile Örnek 08'de tespit edildi. Örnekler arasında genel olarak %78,01 ile %82,71 arasında değişen alel eşleşme oranları belirlendi.

Şekil 3.12'deki verilere göre verilere göre, örnekler arasındaki en düşük mesafe 460, en yüksek mesafe ise 705 olarak belirlendi. Ortalama mesafe 606,89 civarında olup, medyan değeri 612,5 ile buna yakındır. Standart sapma 62,58 olduğundan, mesafelerin ortalama etrafında ne kadar dağıldığını göstermektedir. Ayrıca cgMLST sonuçlarına göre Örnek 10 ve Örnek 02'nin diğer örneklerden ayrıştığı açıkça görülmektedir Örnek 03, Örnek 06 ve 01'in birbirlerine filogenetik olarak yakınsadığı görülmektedir. Örnek 07 ve 08'in birbirine yakınlığı ve Örnek 04 ve 09'un da benzer yakınlıkta olduğu görüldü.

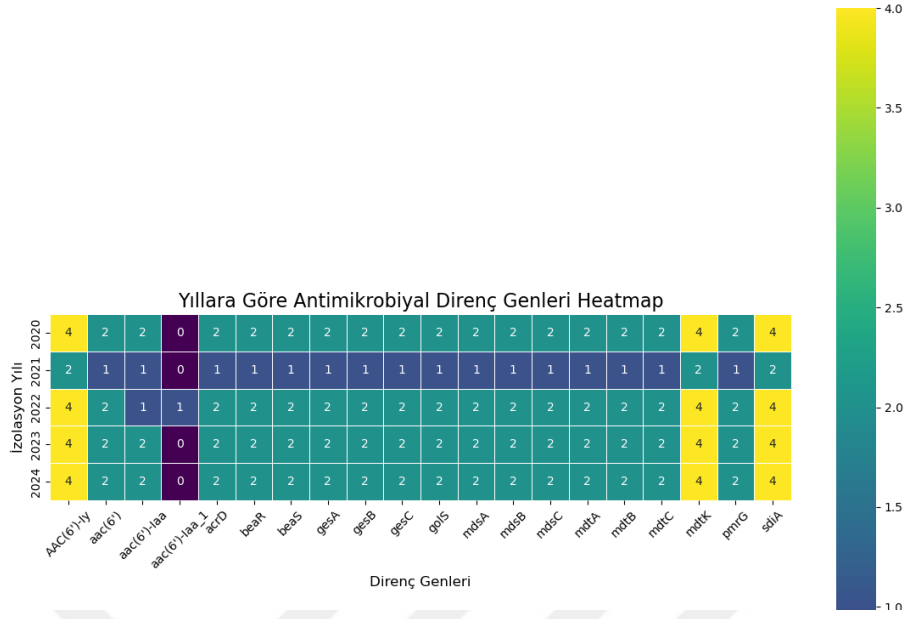


Şekil 3.11. cgMLST sonuçlarına ait ısı haritası ve filogenetik ağaç görselinin bir arada gösterilmesi

3.4.7. Genomik Antibiyotik Direnç Analizi

Genomik analizler sonucunda, *S. Infantis* suşlarında çeşitli kromozomal antibiyotik direnç genleri tespit edildi. Montaj sonrası elde edilen yüksek kaliteli genom verileri kullanılarak yapılan bu analizlerde genlerin kromozomal olarak konumlandığını doğrulandı. *aac(6')*, *aac(6')-Iaa* ve *aac(6')-Iy* genleri, aminoglikozid antibiyotiklerine karşı direnç sağlayan asetiltransferaz enzimlerini kodlamaktadır. Şekil 3.13'de de görüldüğü gibi bu genlerin farklı direnç veri tabanlarında sürekli olarak tespit edilmesi, bakterinin aminoglikozidlere karşı doğal direnç repertuarında yer aldığını gösterdi. Farklı yıllara ait genom analizlerinde bu genlerin varlığını koruması, stabil direnç mekanizmalarından biri olarak değerlendirilmesini desteklediği görüldü.

acrD, *mdsA*, *mdsB*, *mdsC*, *mdtA*, *mdtB*, *mdtC* ve *mdtK* genleri, antibiyotiklerin ve toksik bileşiklerin hücre dışına atılmasını sağlayan efluks pompa sistemlerine ait genlerdir. Bu genlerin MEGAres, CARD ve ARG-ANNOT gibi farklı direnç veri tabanlarında sürekli tespit edilmesi, bakterinin farklı antibiyotik sınıflarına karşı korunmasını destekleyen bir mekanizmaya sahip olduğunu ortaya koyduğu şeklinde kayıt altına alındı. Efluks pompa sistemleri, özellikle MDR ile ilişkilendirildiğinden, *S. Infantis* suşlarının geniş spektrumlu antibiyotiklere karşı direnç kazanma potansiyeline sahip olduğu belirlendi. *gesA*, *gesB* ve *gesC* genleri, beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç geliştiren sınıf A beta-laktamaz enzimlerini kodlamaktadır. Genom analizleri sonucunda bu genlerin 2020 yılından 2024 yılına kadar olan tüm veri tabanlarında korunduğu görüldü. Genom analizlerinde *pmrG* genin farklı yıllarda ve çeşitli direnç veri tabanlarında sürekli olarak bulunduğu belirlendi.

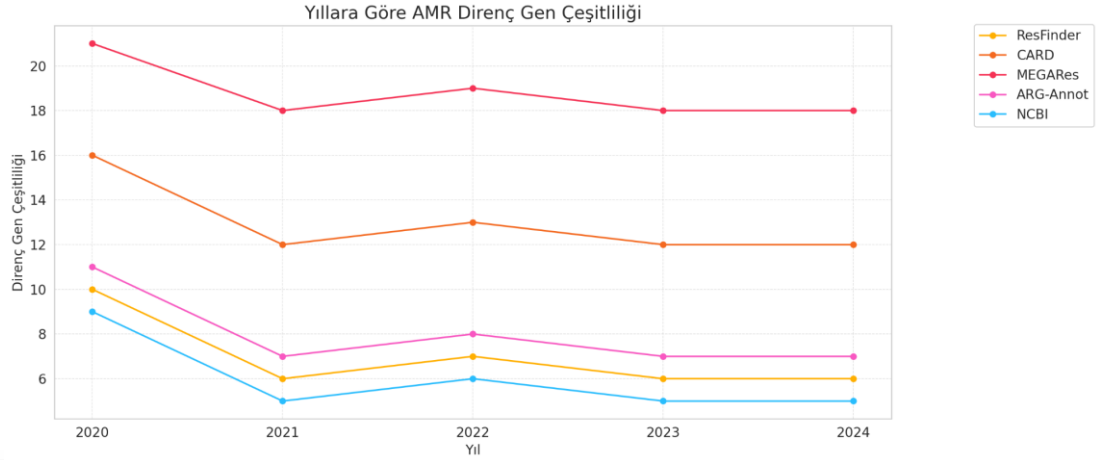


Şekil 3.12. Yıllara göre kromozomal AMD gen sayıları

Genom analizlerinde *sdiA* geni, bakteriyel quorum sensing (hücreler arası iletişim) mekanizmalarında görev almakta olan genin 2020-2024 yılları arasında tüm örneklerde tespit edilmesi, bakterinin çevresel uyaranlara karşı adaptasyon yeteneğini sürdürdüğünü gösterdi. Sonuç olarak, *S. Infantis* suşlarının direnç gen profili incelendiğinde, aminoglikozid ve beta-laktam direnç genleri ile efluks pompa sistemlerinin kromozomal olarak konumlandığı belirlendi.

Şekil 3.14’de ve Çizelge 3.7’de farklı AMD gen veri tabanlarında yıllara göre tespit edilen direnç gen çeşitliliği gösterdiği tespit edildi. 2020 yılında tüm veri tabanlarında en yüksek direnç gen sayısına ulaşılmış olduğu, özellikle MEGARES (n=21) ve CARD (n=16) veri tabanlarında geniş bir direnç repertuarı tespit edildi. 2021 yılından itibaren direnç gen çeşitliliğinde genel bir azalma gözlenmiş, resfinder, CARD, MEGARES, ARG-ANNOT ve NCBI veri tabanlarındaki direnç gen sayıları sabit bir seviyeye ulaştığı görüldü. 2023 ve 2024 yıllarında tespit edilen direnç gen sayıları, 2021 ve 2022 yıllarıyla benzer bir eğilim gösterdiği belirlendi. Yıllara göre AMD gen çeşitliliği açısından farklı veri tabanları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulundu ($p < 0,05$). Özellikle MEGARES ve CARD veri tabanları, gen çeşitliliği bakımından diğer veri tabanlarına göre daha yüksek değerler gösterdiği görüldü. Genel olarak, yıllar içinde belirgin bir artış veya azalış eğilimi

gözlenmemekle birlikte, bazı veri tabanları arasında farklılıkların olduğu anlaşıldı.



Şekil 3.13. AMD genlerine ait çeşitliliğin yıllara göre dağılımı. ResFinder, CARD, MEGARes, ARG-ANNOT ve NCBI veri tabanları kullanıldı

Çizelge 3.7. Yıllara göre farklı veri tabanlarında AMD gen çeşitleri ile ilgili veriler

Yıl	resfinder	CARD	MEGARES	ARG-ANNOT	NCBI
2020	10	16	21	11	9
2021	6	12	18	7	5
2022	7	13	19	8	6
2023	6	12	18	7	5
2024	6	12	18	7	5

Bu çalışma kapsamında değerlendirilen suşlara ait fenotipik direnç profilleri ile genotipik profiller karşılaştırıldığında, fenotipte görülen tüm direnç profillerini karşılığı olan genetik faktörlerin bulunduğu belirlendi. Tek fark olarak özellikle kolistin direncine katkı sağlayan olan *pmrG* geninin genomda tespit edilmesine rağmen fenotipte polimiksin B direnci görülmediği anlaşıldı. Yıllara göre direnç profilleri karşılaştırıldığında AMD genlerinin fenotipik profillere benzer özellikte arttığı görüldü. Fenotipik ve genotipik direnç profilleri arasında orta-iyi düzeyde bir pozitif korelasyon (0,69) bulundu. Yani, fenotipik olarak daha fazla antibiyotiğe dirençli olan örneklerin, genotipik olarak da daha fazla direnç geni taşıma eğiliminde olduğu görüldü. Ayrıntılı karşılaştırma verileri Çizelge 3.8’de verildi.

Çizelge 3.8. Fenotipik direnç profilleri ile genotipik direnç profillerinin karşılaştırılması

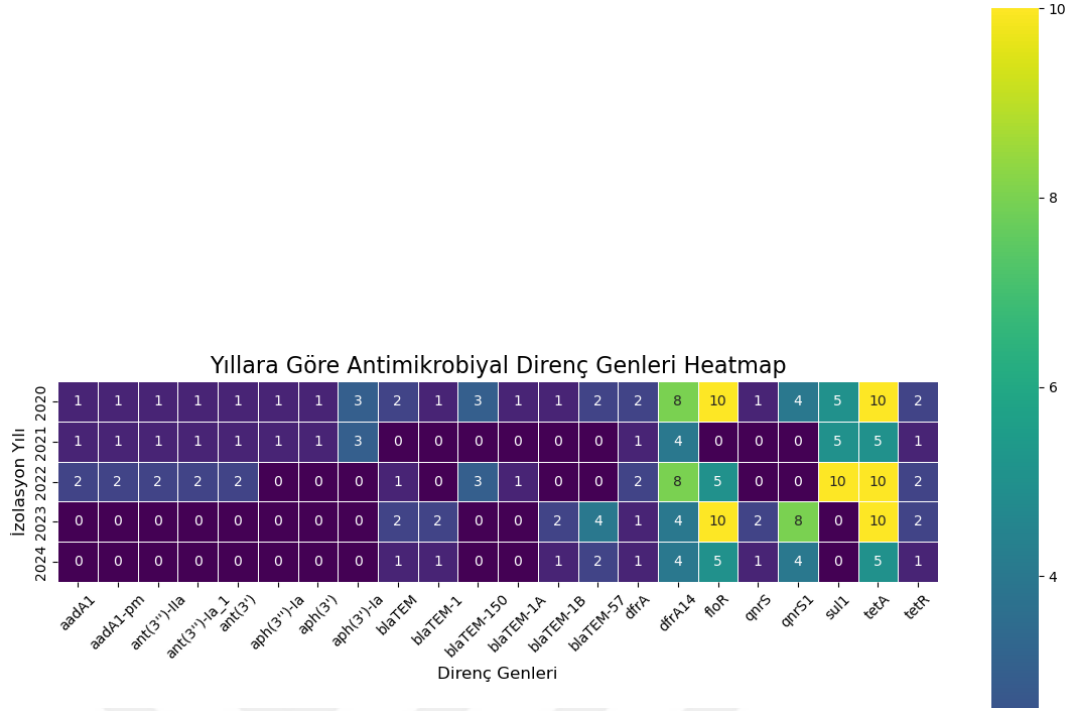
Örnek	Fenotipik Direnç Profilleri	Genotipik Direnç Profilleri	Yıl
1	PEF, NA, AMP, CAZ, C, OFX, CIP, TMP-STX, AMK, SAM, TET	<i>aac(6')</i> , <i>ant(3'')-IIa</i> , <i>ant(3')</i> , <i>aac(6')-Iaa</i> , <i>aac(6')-Iy</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA1-pm</i> , <i>acrD</i> , <i>ant(3'')-Ia</i> , <i>baeR</i> , <i>baeS</i> , <i>blaTEM-150</i> , <i>blaTEM-1A</i> , <i>dfrA</i> , <i>dfrA14</i> , <i>floR</i> , <i>gesA</i> , <i>gesB</i> , <i>gesC</i> , <i>golS</i> , <i>mdsA</i> , <i>mdsB</i> , <i>mdsC</i> , <i>mdtA</i> , <i>mdtB</i> , <i>mdtC</i> , <i>mdtK</i> , <i>pmrG</i> , <i>sdiA</i> , <i>sulI</i> , <i>tetA</i> , <i>tetR</i>	2022
2	PEF, NA, CIP, AMK, CAZ, SAM	<i>aac(6')-Iy</i> , <i>aac(6')</i> , <i>aac(6')-Iaa</i> , <i>aac6-Iy</i> , <i>acrD</i> , <i>baeR</i> , <i>baeS</i> , <i>gesA</i> , <i>gesB</i> , <i>gesC</i> , <i>golS</i> , <i>mdsA</i> , <i>mdsB</i> , <i>mdsC</i> , <i>mdtA</i> , <i>mdtB</i> , <i>mdtC</i> , <i>mdtK</i> , <i>pmrG</i> , <i>sdiA</i>	2024
3	PEF, NA, OFX, TMP-STX, AMK, CAZ, SAM, TET	<i>aac(6')-Iy</i> , <i>aac(6')</i> , <i>ant(3'')-IIa</i> , <i>ant(3')</i> , <i>aac(6')-Iaa</i> , <i>aac6-Iy</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA1-pm</i> , <i>acrD</i> , <i>ant(3'')-Ia</i> , <i>baeR</i> , <i>baeS</i> , <i>dfrA</i> , <i>dfrA14</i> , <i>gesA</i> , <i>gesB</i> , <i>gesC</i> , <i>golS</i> , <i>mdsA</i> , <i>mdsB</i> , <i>mdsC</i> , <i>mdtA</i> , <i>mdtB</i> , <i>mdtC</i> , <i>mdtK</i> , <i>pmrG</i> , <i>sdiA</i> , <i>sulI</i> , <i>tetA</i> , <i>tetR</i>	2022
4	PEF, NA, AMP, CFP, C, OFX, CIP, TMP-STX AMK, CAZ, SAM, TET	<i>aac(6')-Iy</i> , <i>aac(6')</i> , <i>qnrS</i> , <i>aac(6')-Iaa</i> , <i>aac6-Iy</i> , <i>acrD</i> , <i>baeR</i> , <i>baeS</i> , <i>blaTEM-1</i> , <i>blaTEM-1B</i> , <i>blaTEM-57</i> , <i>dfrA</i> , <i>dfrA14</i> , <i>floR</i> , <i>gesA</i> , <i>gesB</i> , <i>gesC</i> , <i>golS</i> , <i>mdsA</i> , <i>mdsB</i> , <i>mdsC</i> , <i>mdtA</i> , <i>mdtB</i> , <i>mdtC</i> , <i>mdtK</i> , <i>pmrG</i> , <i>qnrS1</i> , <i>sdiA</i> , <i>tetA</i> , <i>tetR</i>	2024
6	PEF, NA, AMP, CFP, C, OFX, CIP, AMK, CAZ, SAM, TET	<i>aac(6')-Iy</i> , <i>aac(6')</i> , <i>ant(3'')-IIa</i> , <i>ant(3')</i> , <i>aac(6')-Iaa</i> , <i>aac6-Iy</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA1-pm</i> , <i>acrD</i> , <i>ant(3'')-Ia</i> , <i>baeR</i> , <i>baeS</i> , <i>blaTEM-150</i> , <i>blaTEM-1A</i> , <i>floR</i> , <i>gesA</i> , <i>gesB</i> , <i>gesC</i> , <i>golS</i> , <i>mdsA</i> , <i>mdsB</i> , <i>mdsC</i> , <i>mdtA</i> , <i>mdtB</i> , <i>mdtC</i> , <i>mdtK</i> , <i>pmrG</i> , <i>sdiA</i> , <i>sulI</i> , <i>tetA</i> , <i>tetR</i>	2020
7	PEF, NA, AMP, CFP, C, OFX, CIP, TMP-STX, AMK, CAZ, SAM, TET	<i>aac(6')-Iy</i> , <i>aac(6')</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>aph(3')</i> , <i>qnrS</i> , <i>aac(6')-Iaa</i> , <i>aac6-Iy</i> , <i>acrD</i> , <i>aph(3'')-Ia</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>baeR</i> , <i>baeS</i> , <i>blaTEM-1</i> , <i>blaTEM-1B</i> , <i>blaTEM-57</i> , <i>dfrA</i> , <i>dfrA14</i> , <i>floR</i> , <i>gesA</i> , <i>gesB</i> , <i>gesC</i> , <i>golS</i> , <i>mdsA</i> , <i>mdsB</i> , <i>mdsC</i> , <i>mdtA</i> , <i>mdtB</i> , <i>mdtC</i> , <i>mdtK</i> , <i>pmrG</i> , <i>qnrS1</i> , <i>sdiA</i> , <i>tetA</i> , <i>tetR</i>	2020
8	PEF, NA, AMP, CRO, CFP, C, OFX, CIP, TMP-STX, AMK, CAZ, SAM, TET	<i>aac(6')-Iy</i> , <i>aac(6')</i> , <i>aac(6')-Iaa</i> , <i>aac6-Iy</i> , <i>acrD</i> , <i>baeR</i> , <i>baeS</i> , <i>blaTEM-1</i> , <i>blaTEM-1B</i> , <i>blaTEM-57</i> , <i>dfrA</i> , <i>dfrA14</i> , <i>floR</i> , <i>gesA</i> , <i>gesB</i> , <i>gesC</i> , <i>golS</i> , <i>mdsA</i> , <i>mdsB</i> , <i>mdsC</i> , <i>mdtA</i> , <i>mdtB</i> , <i>mdtC</i> , <i>mdtK</i> , <i>pmrG</i> , <i>qnrS</i> , <i>qnrS1</i> , <i>sdiA</i> , <i>tetA</i> , <i>tetR</i>	2023
9	PEF, NA, AMP, CFP, C, OFX, CIP, AMK, CAZ, SAM, TET	<i>aac(6')-Iy</i> , <i>aac(6')</i> , <i>aac(6')-Iaa</i> , <i>aac6-Iy</i> , <i>acrD</i> , <i>baeR</i> , <i>baeS</i> , <i>blaTEM-1</i> , <i>blaTEM-1B</i> , <i>blaTEM-57</i> , <i>floR</i> , <i>gesA</i> , <i>gesB</i> , <i>gesC</i> , <i>golS</i> , <i>mdsA</i> , <i>mdsB</i> , <i>mdsC</i> , <i>mdtA</i> , <i>mdtB</i> , <i>mdtC</i> , <i>mdtK</i> , <i>pmrG</i> , <i>qnrS</i> , <i>qnrS1</i> , <i>sdiA</i> , <i>tetA</i> , <i>tetR</i>	2023
10	PEF, NA, AMP, CIP, TMP-STX, AMK, CAZ, SAM, TET	<i>aac(6')-Iy</i> , <i>aac(6')</i> , <i>ant(3'')-IIa</i> , <i>ant(3')</i> , <i>aac(6')-Iaa</i> , <i>aac6-Iy</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA1-pm</i> , <i>acrD</i> , <i>ant(3'')-Ia</i> , <i>aph(3'')-Ia</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>baeR</i> , <i>baeS</i> , <i>dfrA</i> , <i>dfrA14</i> , <i>gesA</i> , <i>gesB</i> , <i>gesC</i> , <i>golS</i> , <i>mdsA</i> , <i>mdsB</i> , <i>mdsC</i> , <i>mdtA</i> , <i>mdtB</i> , <i>mdtC</i> , <i>mdtK</i> , <i>pmrG</i> , <i>sdiA</i> , <i>sulI</i> , <i>tetA</i> , <i>tetR</i>	2021

3.4.8. Plazmid Analizi

Bu çalışmada, *S. Infantis* suşlarında tespit edilen plazmid kökenli AMD genleri farklı yıllar boyunca analiz edildi. Farklı veri tabanlarına (ResFinder, CARD, MEGARES, ARG-ANNOT ve NCBI) dayalı olarak belirlenen bu genlerin dağılımı, bakterinin plazmid aracılığıyla kazanılmış direnç mekanizmalarını nasıl koruduğunu ve geliştirdiğini araştırıldı.

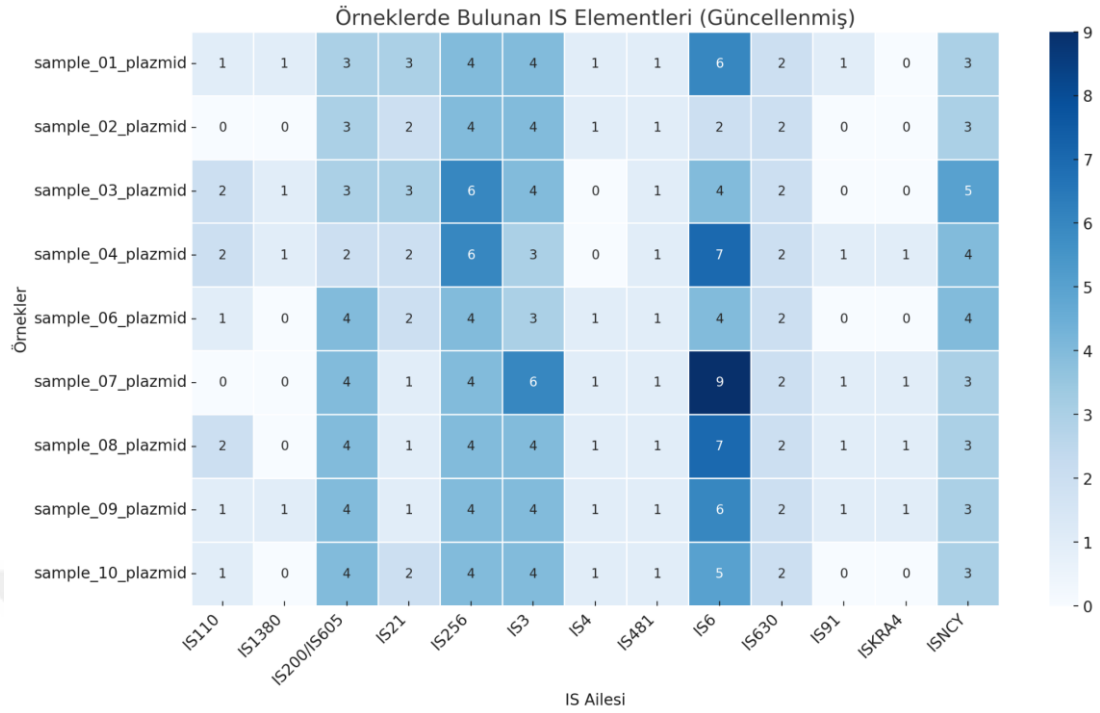
Yıllara göre yapılan analizlerde 2020 yılında tüm suşlarda aminoglikozid (*aadA1*, *ant(3'')-Ia*), beta-laktam (*blaTEM-150*), folat sentez inhibitörü (*dfrA14*), florfenikol direnci sağlayan *floR*, sülfanamid direnciyle ilişkilendirilen *sul1* ve tetrasiklin direnciyle ilişkili *tetA* gibi direnç genleri tespit edildi. 2021 yılında benzer direnç profili korunurken, 2022 yılında bu genlerin farklı örneklerde tekrar tespit edildiği gözlemdi. 2023 ve 2024 yıllarında ise gen dağılımında büyük değişiklikler olduğu, ancak belirli genler bazı örneklerde korunmaya devam ettiği anlaşıldı.

Plazmid kökenli direnç genlerinin yıllar içinde büyük ölçüde korunduğu görüldü. *blaTEM*, *floR*, *sul1*, *tetA* ve *dfrA14* genleri, farklı yıllarda tekrar tekrar tespit edilerek, bu genlerin plazmid aracılığıyla stabil bir şekilde taşındığını ve yayılma potansiyeline sahip olduğunu gösterdiği anlaşıldı. Özellikle *blaTEM* ve *floR* genleri, hem MEGARES, CARD hem de *resfinder* gibi çeşitli veri tabanlarında sürekli olarak yer aldığı görüldü. Kromozomal direnç genleri ile karşılaştırıldığında, plazmid kökenli direnç genlerinin daha değişken bir dağılıma sahip olduğu ve farklı örneklerde farklı yıllarda tespit edildiği görüldü. Plazmidlerin yatay gen transferi yoluyla bakteriler arasında kolaylıkla yayılabildiği bilinmektedir, bununla birlikte, direnç profillerinde büyük değişimler gözlemlenmedi (Şekil 3.15).



Şekil 3.14. Yıllara göre plazmid AMD gen sayıları

Örneklerin birçoğunda pESI megaplazmidlerin varlığı tespit edilirken, 2 numaralı örnekte farklı olarak IncFIB (pN55391) plazmid tipi saptandı. Yapılan karşılaştırma sonucunda 02 numaralı örneğin, %99,92 oranında CP169512.1 erişim numaralı plazmid ile benzer olduğu görüldü. Bu durum, 2 numaralı örneğin plazmid profili açısından diğer örneklerden ayrıştığını gösterdi. Megaplazmidlerin ortak olarak bulunduğu örneklerde belirli bir genomik yapı korunurken, IncFIB (pN55391)'in varlığı, konjugasyon, mobil genetik elemanlar ve toksin-antitoksin sistemleri açısından dikkat çekicidir. Genom anotasyonu, plazmidde *ccdA*, *ccdB*, *vagC*, *vapC* gibi toksin-antitoksin sistemlerini kodlayan genlerin varlığını gösterdi. Ayrıca, *tra*, *trb*, *mobB* gibi konjugasyonla ilişkili genler de tespit edildi. *repA*, *sopA*, *sopB* gibi replikasyon ve segregasyon genleri de tespit edildi. Yatay gen transferi analizi ile bu örnek üzerinde beş farklı HGT bölgesi belirlendi. Bu bölgelerin, 1-20000, 22500-27500, 35000-45000, 82500-87500 ve 127500-152500 aralıklarında yer aldığı gözlemlendi. Özellikle yüksek skor değerine sahip bölgeler, potansiyel olarak yabancı genlerin kazanıldığı veya plazmidin diğer bakterilerle genetik değişim yaptığı bölgeler olabileceği değerlendirildi (Şekil 3.16).



Şekil 3.16. Plazmidlerde bulunan IS elementlerinin dağılımı

PHASTEST analizi sonucunda bir numaralı örnekte 30,7 kb uzunluğunda intact (bütün halde) bir faj bölgesi tespit edildi. Bu bölgenin NC_042128 fajı ile en yüksek benzerliği gösterdiği anlaşıldı. Faj bölgesi içerisinde transpozon elemanları (*IS605*, *IS26*, *IS110*, *IS431*), rekombinasyon enzimleri (*tyrosine rekombinaz/integrace*, *resolvaz*, *xerD*), toksin-antitoksin sistemleri (*pemI/pemK*), antibiyotik direnç mekanizmaları (*Beta-laktamaz TEM*, *aminoglikozid adenilyltransferaz*, *dihidropteroat sentaz*), potasyum taşıma proteinleri (*Kup 1*), sekresyon sistemleri (*Colicin V*, *hifC*, *faeI*, K88 fimbrial proteinleri) ve olası virülans faktörleri bulunduğu tespit edildi.

İki numaralı örnekte 27,5 kb uzunluğunda intact bir faj bölgesi tespit edildi. Bu bölgenin Shigel_Stx_NC_029120 fajı ile en yüksek benzerliği gösterdiği anlaşıldı. Faj bölgesinde transkripsiyon düzenleyici proteinler (*rfaH*), toksin-antitoksin sistemleri (*ccdA/ccdB*, *vagC/vapC*), sekresyon sistemleri (*Colicin V*, *Microcin-H47*), fimbrial proteinler (*hifC*, *faeI*, K88) ve potansiyel virülans faktörleri dahil olmak üzere çeşitli genler bulundu. Ayrıca, bölgede transpozon elemanları ve rekombinasyon enzimleri (*xerD*, *pSLT051*), antibiyotik dirençle ilişkili proteinlerin varlığı tespit edildi.

Üç numaralı örnekte 27,2 kb uzunluğunda intact bir faj bölgesi tespit edildi. Bu bölgenin Brevib_Jenst_NC_028805 fajı ile en yüksek benzerliği gösterdiği anlaşıldı. Faj bölgesinde rekombinasyon enzimleri (*prophage P4 integrase*, *tyrosine rekombinaz/integrace*, *resolvaz*), transpozon elemanları (*IS110*, *IS605*, *ISSod4*), virülans ile ilişkili fimbrial proteinler (*K88*, *faeD*, *hifC*, *F17*), toksin-antitoksin sistemleri (*ccdA/ccdB*, *vapC/vagC*), antibiyotik direnç mekanizmaları (*aminoglikozid adenyltransferaz*, *dihidropteroat sentaz*) ve olası sekresyon sistemleri (*Colicin V*, *Microcin-H47*) gibi genlerin bulunduğu görüldü.

Dört numaralı örnekte 12,8 kb uzunluğunda intact bir faj bölgesi tespit edildi. Bu bölgenin Shigel_PO CJ13_NC_025434 fajı ile en yüksek benzerliği gösterdiği anlaşıldı. Faj bölgesinde rekombinasyon ve mobil genetik elemanlarla ilişkili enzimler (*prophage P4 integrase*, *tyrosine rekombinaz/integrace*, *transpozon enzimleri IS110*, *IS605*, *ISSod4*), faj replikasyon proteinleri, virülans ile ilişkili fimbrial proteinler (*K88*, *faeD*, *faeE*, *hifC*, *F17*), toksin-antitoksin sistemleri (*ccdA/ccdB*, *vapC/vagC*), olası sekresyon sistemleri (*Colicin V*, *Microcin-H47*) ve antibiyotik direnç mekanizmaları (*Beta-laktamaz TEM*, *tetrasiklin direnç proteinleri*) gibi genlerin varlığı belirlendi.

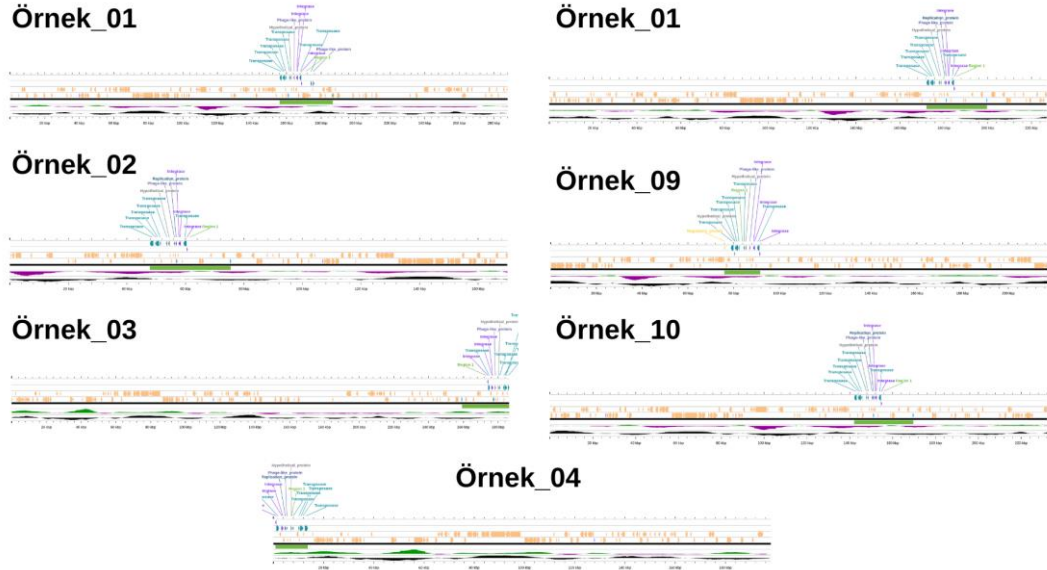
Altı numaralı örnekte 36,2 kb uzunluğunda intact bir faj bölgesi tespit edildi. Bu bölgenin PHAGE_Escher_RCS47_NC_042128 fajı ile en yüksek benzerliği gösterdiği görüldü. Faj bölgesinde rekombinasyon ve mobil genetik elemanlarla ilişkili enzimler (*prophage P4 integrase*, *tyrosine rekombinaz/integrace*, *transpozon enzimleri IS605*, *IS110*, *IS26*, *ISSod4*), virülans ile ilişkili fimbrial proteinler (*K88*, *HifC*, *FaeI*, *F17*), toksin-antitoksin sistemleri (*CcdA/CcdB*, *VapC/VagC*), olası sekresyon sistemleri (*Colicin V*, *Microcin-H47*) ve antibiyotik direnç mekanizmaları (*Beta-laktamaz TEM*, *tetrasiklin direnç proteinleri*, *aminoglikozid adenyltransferaz*) gibi genlerin bulunduğu görüldü.

Yedi numaralı örnekte analiz edilen plazmidin 227,016 bp uzunluğunda olduğu ve GC içeriğinin %49,96 olarak hesaplandığı belirlendi. PHASTEST analizi sonucunda 27,5 kb uzunluğunda intact bir faj bölgesi tespit edilerek PHAGE_Shigel_Stx_NC_029120 fajı ile yüksek benzerlik gösterdiği anlaşıldı.

Plazmidin mobil genetik elemanlar (*IS605*, *IS110*, *IS26*, *ISSod4*, *IS431mec*, *Tn552*, *Tn1721*, *Tn3*), rekombinasyon enzimleri (*tyrosine recombinase/integrase*, *prophage P4 integrase*), virölans faktörleri (*K88* ve *F17 fimbrial proteinleri*, *Chaperone protein HifB* ve *Outer membrane usher protein HifC*), toksin-antitoksin sistemleri (*CcdA/CcdB*, *VapC/VagC*), antibiyotik direnç genleri (Beta-laktamaz TEM, tetrasiklin, kloramfenikol, aminoglikozid) ve çeşitli sekresyon sistemleri içerdiği görüldü.

Sekiz numaralı örnekte herhangi bir faj bölgesi saptanmadı. Dokuz numaralı örnekte ise 217.437 bp uzunluğundaki plazmidde, 15,7 kb uzunluğunda intact bir faj bölgesi tespit edildi. Bu bölgenin PHAGE_Mycoba_Phann_NC_031266 ile en yüksek benzerliği gösterdiği ve GC içeriğinin %49,55 olarak hesaplandığı belirlendi. Faj bölgesinde mobil genetik elemanlar (*IS605*, *IS110*, *IS431mec*, *IS640*, *IS200*, *IS257*, *IS3A*, *Tn3*, *Tn552*, *Tn1721*), rekombinasyon enzimleri (*tyrosine recombinase/integrase*, *prophage P4 integrase*), virölans faktörleri (*K88* ve *F17 fimbrial proteinleri*, *Chaperone protein HifB* ve *Outer membrane usher protein (hifC)*), toksin-antitoksin sistemleri (*ccdA/ccdB*, *vapC/vagC*, *pemI/pemK*), antibiyotik direnç genleri ve poliketid sentez genleri içerdiği tespit edildi.

On numaralı örnekte analiz edilen plazmidin 232,296 bp uzunluğunda olduğu görüldü. PHASTEST analizi sonucunda 27,5 kb uzunluğunda intact bir faj bölgesi tespit edilerek PHAGE_Shigel_Stx_NC_029120 fajı ile en yüksek benzerliği gösterdiği belirlendi. Plazmidin antibiyotik direnç mekanizmaları (Beta-laktamaz TEM, tetrasiklin, kloramfenikol, aminoglikozid, sülfonamid), virölans faktörleri (*K88* ve *F17 fimbrial proteinleri*), toksin-antitoksin sistemleri (*CcdA/CcdB*, *VapC/VagC*), sekresyon sistemleri (*Colicin V*, *Microcin-H47*) ve çevresel adaptasyon sağlayabilecek ağır metal direnç genleri içerdiği görüldü. Tüm örneklerle ait plazmidler ve üzerindeki faj bölgeleri Şekil 3.18'da ayrıntılı şekilde gösterildi.



Şekil 3.17. Plazmidler ve üzerlerinde bulunan profaj bölgeleri

3.4.9. Filogenetik Analiz

Bu çalışma kapsamında genomik analizleri yapılan dokuz adet suş BLAST analizi yapıldı. Yüksek oranda benzerlik olan 2020_TR06_Turkey genomu, GCF_005886015.1, GCF_040279165.1, GCF_040279375.1 ve GCF_040279285.1 suşları olarak belirlendi ve bu suşlar kullanılarak ANI analizleri gerçekleştirildi. Bu suşlara ait plazmid BLAST analizi sonucunda bir plazmid diğerlerinden farklı olarak (IncFIB (pN55391) isimlendirildi. Sonrasında bu plazmidler pESI-megaplazmid ile benzerliklerinin anlaşılması için ANI analizine tabii tutuldu.

Bu çalışmada, kromozom ve plazmide özgü ayrı ayrı ANI (Average Nucleotide Identity) analizleri gerçekleştirildi. Plazmid karşılaştırmaları, referans pESI plazmidi (Aviv vd., 2020) ile yapılan benzerlik analizlerine dayanmaktadır. Türkiye’den girilen diğer suşlarında eklenerek yapıldığı analizde elde edilen ANI değerleri %99,45 ile %99,92 arasında değiştiği görüldü. 01 Örneği %99,83, 02 örneği %99,88, 03 örneği %99,92, 04 örneği %99,64, 06 örneği %99,89, 07 örneği %99,45, 08 örneği %99,49, 09 örneği %99,47 ve 10 örneği %99,88 oranında ve Türkiye suşları ile benzerlik gösterdikleri görüldü.

06 kodlu örneğin genomu, 2017_GCF_005886015.1_Turkey genomuna %99,72 oranında benzer bulundu. 07 Kodlu örneğin genomu ile 10 kodlu örneğin genomu arasındaki benzerlik %99,96, 01 Kodlu örneğin genomu ile 03 kodlu örneğin genomu arasındaki benzerlik %99,96, 2023_GCF_040279165.1_Turkey genomu ile 2023_GCF_040279375.1_Turkey genomu arasındaki benzerlik %99,97 olarak tespit edildi. Diğer genomlar arasında da benzer oranlar gözlemdi.

Bu çalışmada, belirlenen plazmidlerin pESI referans plazmidi ile ANI (Average Nucleotide Identity) karşılaştırmaları gerçekleştirildi. Yapılan analizler sonucunda, plazmidlerin pESI referans dizisiyle benzerlik oranlarının %99,45 ile %99,92 arasında değiştiği belirlendi. 01 plazmidi referans pESI plazmidi ile %99,83 ANI değerine sahiptir. 02 plazmidi %99,88, 03 plazmidi %99,92, 04 plazmidi %99,64, 06 plazmidi %99,89, 07 plazmidi %99,45, 08 plazmidi %99,49, 09 plazmidi %99,47 ve 10 plazmidi %99,88 oranında benzerlik gösterdi. ANI analizleriyle birlikte, her plazmidin pESI referans plazmidiyle karşılaştırmalı eşleşme uzunlukları da belirlendi. Örneğin, 01 plazmidi 91 eşleşme bölgesi ve 96 referans bölgesi ile analiz edildi. Benzer şekilde, 03 plazmidi 94 eşleşme ve 95 referans bölgesi, 06 plazmidi ise 88 eşleşme ve 93 referans bölgesi ile hesaplandı. Bu bulgular, incelenen plazmidlerin pESI referans plazmidi ile yüksek oranda benzerlik taşıdığını gösterdi.

Filogenetik analizlerde, belirli genetik klonların salgınlarla ilişkili olup olmadığını anlamak için genomlar arası SNP mesafeleri hesaplandı ve genomik network analizi gerçekleştirildi. *S. Infantis* suşlarının belirli bir genetik havuza ait olduğunu ve zaman içinde belirli mutasyonlarla adaptasyon gösterdiğini ortaya çıkardı. Bu sonuçlara göre Türkiye’den yapılan dizileme çalışmaları sonucunda elde edilen örneklerin birbirleri ile bağlantılı olduğu görüldü. Bu çalışmaya ait suşların yıl bakımından birbirinden evrimsel olarak farklı olsa da SNP bakımından birbirlerine çok yakın olduğu hatta neredeyse tüm ülke suşlarının bir arada ağ içinde olduğu görüldü ve bu ağ Şekil 3.19’deki gibi Türkiye ağı olarak isimlendirildi. Bu ağdaki suşlardan, 10 ve 02 kodlu suş birbirine 0,0023, 09 ve 04 kodlu suşlar 0,0020, 07 ve 08 kodlu suş 0,0025, 01 ve 06 kodlu suşlar ise 0,0024 SNP uzaklıkta oldukları belirlendi. 03 kodlu suşun bu suşlardan ayrıştığını ve ortak atadan daha az SNP farkı olduğu görüldü.

analiz edilmiş ve maksimum log-olasılık değeri -931245 olarak hesaplandı. Bu süreçte empirik nükleotid frekansları aşağıdaki şekilde belirlendi (A: %23 C: %25,4 G: %28,2 T: %23,4). Filogenetik ağaç üzerinde rekombinasyonun etkisini ölçmek için dalların uzunlukları düzeltilmiş ve optimize edildi. Bu analiz sırasında, rekombinasyonun genomik evrimdeki rolünü belirlemek amacıyla çeşitli istatistiksel ölçümler yapıldı. Maksimum log-olasılık değeri -892,294 olarak hesaplanırken, rekombinasyon ve mutasyon oranlarını belirleyen ana parametreler şu şekilde belirlendi: rekombinasyon/mutasyon oranı (R/θ) = 0.35, ortalama DNA *import* uzunluğu 87,535 bç, rekombinasyon yoluyla alınan DNA'nın ortalama evrimsel uzaklığı 0,0323497 olarak bulunmuştur.

Klonal ilişkinin derinlemesine incelenmesi için yapılan analizde ML filogenetik ağacına göre Avrupa ve Türkiye suşlarının klonal ilişkisinin derinliğinin arttığı görüldü. Türkiye'den girilen suşların yine aynı dal içinde olduğu, ayrıca aynı Şehirlerden geldiği bilinen, Örnek 07 ve Örnek 08'in yakın klonal ilişkisinin olduğu ortaya konulmuş oldu. Yıllara göre yapılan analizde Türkiye ve Avrupa'daki suşların 1993'den bu yana belirli klonal yayılımlara sahip olduğu analiz sonuçlarında görüldü. Ayrıntılı bilgileri içeren Avrupa klad'ına yönelik çizilen filogenetik ağaç Şekil 3.21.'de verildi.

Özellikle filogenetik ağacın dallarında rekombinasyon oranlarının hesaplanması sonucunda, farklı coğrafi bölgelerden gelen genomlar arasında belirgin farklılıklar tespit edildi. Güney Afrika, Nijerya, Kamerun ve Türkiye gibi bazı bölgelerden gelen genomlar diğer bölgelere kıyasla daha yüksek rekombinasyon oranlarına sahip görüldü.

Oluşturulan filogenetik ağaç verisinde Türkiye’den girilen örneklerin bir arada toplandığı ve birbirleri ile çok benzer oldukları görüldü. Yapılan daha ayrıntılı incelemelerde örneklerin Avrupa’da tespit edilen ve dizilenerek NCBI’a yüklenen *S. Infantis* genomları ile yüksek benzerlik gösterdiği görüldü. Bu da Türkiye’den yüklenen genomlar ile Avrupa’daki suşlar arasında bir bağlantı olabileceğini gösterdi. Buna ek olarak Türkiye suşlarının ikincil olarak da 2016 yılında Irak’tan yüklenen GCF_017693045 suşu ile yakın benzerlik gösterdiğini gösterdi. Türkiye suşlarında farklı yıllardan alınmış örnekler olsa da çekirdek genomlar baz alınarak bir analiz gerçekleştirildiği için yıl açısından Türkiye örneklerinin kendi arasında çeşitlilik gösterdiği görüldü. Ayrıntılı görsel Şekil 3.22’ verildi.

3.4.10. Evrimsel Analiz

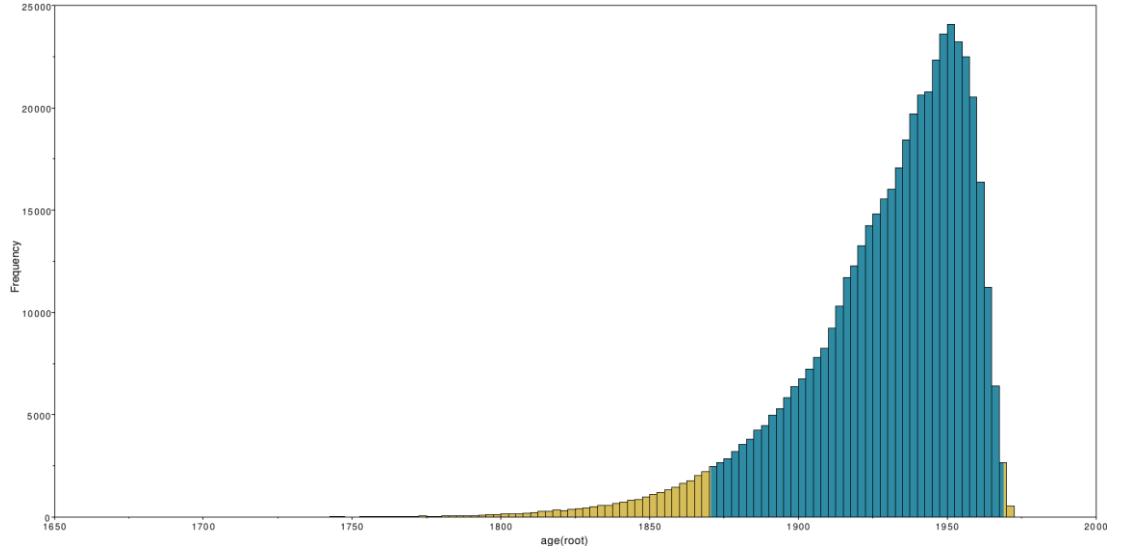
Yapılan filogenetik analizere ek olarak bayesçi evrimsel bağlantıların ortaya konması adına birçok analiz gerçekleştirildi. Bunlardan Roary kullanılarak yapılan analizler sonucunda, bu çalışmada analiz edilen 124 *S. Infantis* genomu, toplamda 10,716 farklı gen içermektedir. Genomların büyük bir kısmı cloud genler (%54,7, 5,867 gen) olarak sınıflandırıldı. Çekirdek genomda ise (%95-100 tüm suşlarda ortak olan) yalnızca 3,864 gen bulundu. *Shell* (%8,5) ve *soft-core* (%0,7) genlerin toplam sayısının nispeten düşük olduğu görüldü. Yapılan pan-genom analizi sonucunda, genom sayısı arttıkça toplam gen sayısının da sürekli olarak yükseldiği gözlemlendi. Bu eğilim, Şekil 3.23’de de görüldüğü üzere, *S. Infantis* türünün "açık pan-genom" yapısına sahip olduğu olarak sonuçlandırıldı.



Şekil 3.21. Toplam gen sayısının genom sayısına göre oranlanması ile bulunan pan-genom açıklık durumu

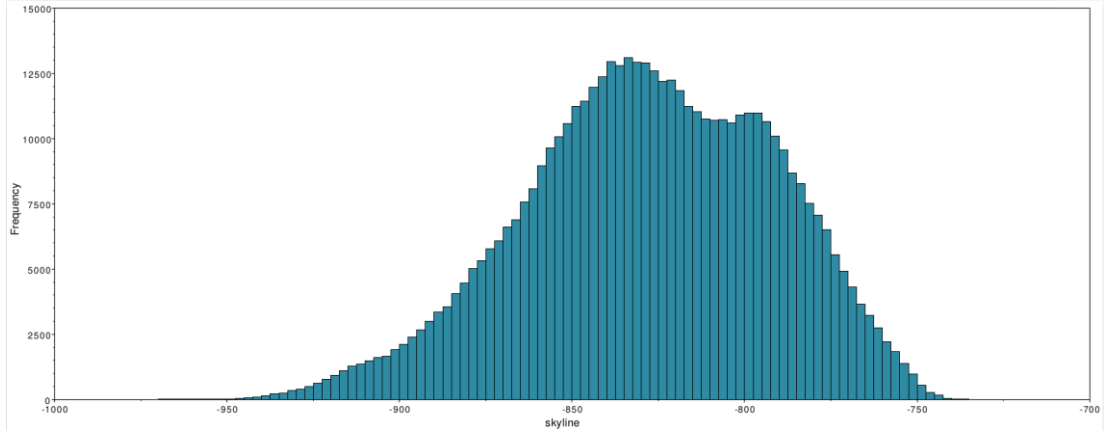
BPGA ile oluşturulan pan-genom eğrisi, pan-genomun açık olduğunu, yani yeni genomlar eklendikçe yeni genlerin keşfedilmeye devam ettiğini gösterdi. Bu sonuç, *S. Infantis* türünün genetik olarak oldukça dinamik ve çeşitlenmeye açık olduğunu göstermektedir.

Yapılan BEAST analizi sonucunda, ortalamalar ve güven aralıkları hesaplanarak en olası filogenetik parametreler elde edildi. 95% HPD aralığı (-46,786.99,-46,636.58) ile belirlendi. ESS değeri 167.7, örnekleme etkinliği açısından düşük olup, daha uzun zincirlerle iyileştirilebilir. *Auto-correlation time* (ACT) 2.92×10^6 olarak hesaplanmış ve toplamda 4.9×10^5 örnekleme yapıldı. Saat modeli olarak log-normal dağılımlı düzensiz (uncorrelated relaxed) moleküler saat kullanılmış ve ortalama saat hızı (ucld.mean) $5.02E-5$, standart sapması (ucld.stdev) $5.93E-3$ olarak belirlendi. Bayes faktörü kullanılarak oran dağılımı değerlendirildi ve oran kategorileri tahmin edildi.



Şekil 3.22. Zamana bağlı yaş frekansının gösterilmesi

Popülasyon büyüklüğünün zamana bağlı değişimini modellemek için 10 boyutlu Skyline model kullanıldı. Skyline modelinde (Şekil 3.24) popülasyon büyüklüğü değerleri 31,28-774,50 arasında değişmekte ve popülasyon grupları arasında farklı dinamikler gözlenmektedir. Analiz sonucunda, ortalamalar ve güven aralıkları hesaplanarak en olası filogenetik parametreler elde edildi. Ağacın kök yüksekliği (treeModel.rootHeight) 95,02, en son ortak atanın yaşı (age (root)) 1928,98, toplam dal uzunluğu (treeLength) 2266,53 olarak hesaplandı. Ağaç olasılık değeri (treeLikelihood)-42,153.96 olarak belirlenirken, kovaryans değeri (covariance)-1354.31 ve varyasyon katsayısı (coefficientOfVariation) 0.054 olarak tespit edildi (Şekil 3.25).



Şekil 3.23. Frekansa bağlı skyline plot değerlerinin gösterilmesi

Yapılan analizlerde rekombinasyon bölgeleri değerlendirildi. Bu değerlendirmeye göre birçok suşta rekombinasyonların olduğu görüldü. Özellikle Türkiye’de bulunan suşlarda bu olasılığın yüksek olduğu tüm örnekte görülmesi ile desteklendi. Şekil 3.25’da yapılan bu analize ait elde edilen görselde bu sonuçlar verildi. Bu görsele göre elde edilen sonuçlar, ülkelere ait suşlarla ilişkilendirilebileceğini ortaya koydu.

3.5. Biyoinformatik Analiz İş Akışı Geliştirilmesi

3.5.1. İş Akışı Geliştirme Aşamaları

Bu çalışmada, *S. Infantis* suşlarının genomik analizi ve antimikrobiyal direnç profillemesini kapsayan biyoinformatik analizlerin otomatize edilmesi amacıyla Nextflow tabanlı bir biyoinformatik iş akışı geliştirildi. İş akışı, ham dizileme verilerini (fastq) alarak kalite kontrol, montaj, anotasyon, antimikrobiyal direnç analizi ve filogenetik değerlendirme gibi temel adımları modüler bir şekilde ilerlemektedir. Birden fazla örneğin aynı zamanda işlenmesini sağlayan bu süreç gerçek zamanlı olarak görüntülenebilmektedir (Şekil 3.28).

İş akışı'nın temel amacı, *S. Infantis* suşlarının genomik epidemiyolojisini incelemek için standartlaştırılmış, ölçeklenebilir ve taşınabilir bir analiz altyapısı sunmaktır. İş akışı, tüm genom dizileme (WGS) verilerini girdi olarak alarak çeşitli biyoinformatik araçlarla analiz süreçlerini gerçekleştirmekte ve nihai olarak suşların genetik ilişkilerini ortaya koyan raporlar üretmektedir. İş akışı'nın geliştirilmesi sürecinde Nextflow iş akışı içerisinde Conda içinde çeşitli biyoinformatik yazılımlar entegre edilerek modüler ve esnek bir sistem oluşturuldu.

İş akışının ilk aşaması kalite kontrol ve veri ön işleme adımlarıdır. Bu aşamada, FastQC ve MultiQC araçları kullanılarak ham dizileme verilerinin kalitesi değerlendirilmiş, fastp aracı ile düşük kaliteli bazlar ve adaptör sekansları filtrelendi. Ardından, uzun okuma teknolojisi ile üretilen verilerin montajı (assembly) Flye yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen genom taslakları (draft assembly) QUAST ve BUSCO analizleriyle kalite açısından değerlendirildi. Genom montajı tamamlandıktan sonra, suşların genetik bileşimi Prokka ile anotasyonlanarak protein kodlayan genler, rRNA ve tRNA bölgeleri belirlendi. Daha sonra parsnp analizi gerçekleştirilerek, suşlar arasındaki genomik farklılıklar ortaya kondu.

Genotiplendirme analizleri, *S. Infantis* suşlarının filogenetik ilişkilerini belirlemek için gerçekleştirildi. MLST ve cgMLST analizleri, suşlar arasındaki genetik varyasyonları tanımlamaya yardımcı oldu. Özellikle ChewBBACA aracı

kullanılarak yapılan cgMLST analizleri, suşların klonal ilişkilerini ortaya koymuş ve epidemiyolojik bağlantılarının değerlendirilmesini sağladı. SNP tabanlı filogenetik analizler için Minimap2 ve MUMmer araçları kullanarak tüm genom dizileme verileri referans bir genom ile hizalanmış ve suşlar arasındaki mutasyon farklılıkları hesaplandı. Filogenetik ağaçlar, iş akışı dışında online olarak kullanılan iTOL yazılımı ile görselleştirildi.

Antibiyotik direnç analizi için, genomlarda bulunan direnç genleri abricate kullanılarak belirlenmiş ve sonuçlar CARD, ResFinder, MEGARES ve NCBI gibi çeşitli veri tabanları ile karşılaştırıldı. Elde edilen direnç profilleri hem kromozomal hem de plazmid kaynaklı genleri kapsayacak şekilde analiz edildi. Plazmidlerin belirlenmesi ve karakterizasyonu için PlasmidFinder ve MobileOG-db kullanılmış, mobil genetik elementlerin yayılımı ve antibiyotik direnç genlerinin taşınabilirliği değerlendirildi.

İş akışı'nın doğrulama süreci, hem bu çalışmada kullanılan *S. Infantis* suşları hem de Avrupa Nükleotid Arşivi (ENA)'dan indirilen 20 farklı *S. Infantis* genom verisi ile gerçekleştirildi. İş akışı'nın çıktıları, manuel analiz sonuçları ile karşılaştırılmış ve tekrarlanabilirliği test edildi. Yapılan değerlendirmeler, iş akışının tutarlı ve güvenilir sonuçlar ürettiğini gösterdi. Tüm örneklerden sonuç alınabildiğini gösterdi.

Geliştirilen iş akışı, www.github.com/cinnetcash/gelidonyamr adresinde açık kaynak olarak araştırmacılarla paylaşıldı. İş akışı'nın ilerleyen aşamalarda Docker ve Singularity kapsayıcı teknolojileri ile daha taşınabilir hale getirilmesi ve genomik mobil elementlerin daha ayrıntılı analizini yapacak ek modüllerin entegrasyonu planlanmaktadır.

```
(gelidonyamr) analysis@analysis-Dell-615-5511:~/Desktop/Pipeline/gelidonyamr$ nextflow run main.nf --reads

NEXTFLOW ~ version 24.10.4

Launching 'main.nf' [wise_mccarthy] DSL2 - revision: 195a7e496e

executor > local (16)
[b8/b86915] process > FASTQC (Kalite kontrol işlemi yapılıyor...: FastQC) [100%] 9 of 9, cached: 9 ✓
[b8/52f356] process > TRIMMING (Traşlama işlemi yapılıyor...: fastp) [100%] 9 of 9, cached: 9 ✓
[f5/85ba3c] process > ASSEMBLY (Genom Montajlama işlemi yapılıyor...: Flye) [100%] 9 of 9, cached: 7 ✓
[63/a64696] process > AMR (AMR Analizi Yapılıyor...: Abriicate) [22%] 2 of 9
[-] process > MULTIQC [0%] 0 of 1
[ab/5365ea] process > ANNOTATION (Anotasyon işlemi yapılıyor...: Prokka) [55%] 5 of 9
[be/71286e] process > MLST (MLST Analysis: mlst) [44%] 4 of 9
[4b/976258] process > KRAKEN2 (Kraken2 Analizi Yapılıyor...) [100%] 9 of 9, cached: 9 ✓
[71/856fef] process > CGMLST (cgMLST Analizi: chewBBACA) [0%] 0 of 9
```

Şekil 3.27. Komut satırında iş akışına ait Nextflow çalışmasına ait denemeden bir görüntü

3.6. İstatistiksel Analiz

Kruskal-Wallis testi sonuçlarına göre, yıllar arasında direnç genleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilmedi ($p \approx 0,406$, $p > 0,05$). Bu durum, direnç genlerinin yıllar içinde belirli dalgalanmalar gösterdiğini ancak bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığını ortaya koymaktadır. Özellikle, belirli yıllarda daha fazla direnç geni tespit edilmesine rağmen, bu değişikliklerin rastlantısal olabileceği ve direnç gen frekanslarının belirgin bir trend göstermediği görüldü.

4. TARTIŞMA

Salmonella Infantis, küresel olarak artan MDR saptanan bir patojen olup, hayvan ve insan enfeksiyonlarında giderek daha fazla tespit edilmektedir. Bu suşların taşıdığı MDR genleri, direnç mekanizmalarının yayılmasına katkı sağlayarak mevcut tedavi seçeneklerini kısıtlamaktadır. Bu nedenle, MDR *S. Infantis* suşları önemli bir halk sağlığı riski oluşturmaktadır. Özellikle Avrupa’da çok fazla görülmeye başlayan bu patojenin, Avrupa’daki kanatlı kaynaklı *S. Infantis* izolatlarında pESI-megaplazmidini ile tespit edilmektedir (Alba vd., 2020, Aviv vd., 2014). Özellikle ABD’deki araştırmalar ise *Salmonella* etkenlerinde zoonotik bulaşmayı kanıtlayarak (McMillan, 2022; Miller vd., 2020), pESI konjugatif plazmidini taşıyan suşların klonal yayılımının yaygınlaştığını (Hindermann vd., 2017) ve direnç genlerinin farklı coğrafi bölgelerde dağıldığını göstermektedir. Bu bilgiler MDR *S. Infantis* suşlarının küresel yayılımını işaret etmekte ve genomik süveyansın artarak devam etmesi gerektiğini göstermektedir.

Bu tez çalışmasında, 2020-2024 yılları arasında Türkiye’deki kanatlı kaynaklı *S. Infantis* izolatlarının hem genomik hem de fenotipik profilleri ortaya konmuş, suşların evrimsel dinamikleri incelenmiş ve klonal ilişkileri değerlendirilmiştir. Ayrıca, bu analizlerin standardize bir şekilde tekrarlanabilmesi için bir biyoinformatik iş akışı geliştirilmiş ve ileride *Salmonella* ve diğer patojenlere yönelik genomik süveyans çalışmalarına katkı sağlaması hedeflenmiştir. Son olarak, bu çalışma kapsamında NGS ve biyoinformatik analiz yöntemlerinin kullanımına dair bir yöntem önerilmiş ve ülkemizdeki direnç genlerinin varlığı, filogenetik ilişkiler ve plazmid aracılı direnç mekanizmaları değerlendirilmiştir.

Antimikrobiyal direnç profillerini belirlemek için bu çalışma kapsamında gerçekleştirilen disk difüzyon yöntemine yönelik fenotipik direnç testleri, MDR suşlarının 2020-2024 yılları boyunca sürekli olarak varlığını sürdürdüğünü göstermiştir. MDR suşlarının hem Türkiye’de (Acar vd., 2017; Aksakal vd., 2009; Şahan vd., 2014) hem de dünya genelinde başta ABD (Tate vd., 2017) olmak üzere, Rusya (Bogomazova vd., 2020), Avrupa (Franco vd., 2015), Peru (Martínez-Puchol

vd., 2021) ve Şili (Lapierre vd., 2020)'de bu suşların halk sağlığı açısından büyük bir tehdit oluşturduğu ortaya konmuştur. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar literatürle tutarlı bulunmuştur. Örneğin, Acar vd. (2019)'nin yaptığı çalışmada sadece tetrasiklin, streptomisin, kanamisin ve bazen de ampisilin direnci görülmesine rağmen bu çalışmada fazladan, beta-laktam ve florokinolon direnci de saptanmıştır. Buna rağmen bu çalışmadaki özellikle florokinolon, beta-laktam, tetrasiklin ve sülfonamid direnci dikkat çekse de fenotipik direnç verilerinin yıllara göre analizinde anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p=0,206$). Bunun temel nedenlerinden birinin, bu çalışma kapsamında test edilen örneklem sayısının sınırlı olmasıdır. Daha büyük bir örneklem boyutu ve daha geniş temsil edilebilirlik ile gelecekte kapsamlı moleküler araştırmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

NGS teknolojisi, bu çalışmada fenotipik analizlere ek olarak kullanılmış ve ileri genomik analizler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kontig sayıları ve N50 değerleri, verilerin yüksek kalitede olduğunu göstermektedir. Uzun okuma (ONT) teknolojisi ile gerçekleştirilen bu çalışmada tüm örneklerde bir kromozoma ve bir plazmide ait kontig tespit elde edilmiştir. Literatürde, kısa okuma tabanlı çalışmalar (Klassen ve Currie, 2012; Pop ve Salzberg, 2008) genellikle birden fazla kontig üretmekte, bu da sonraki analizlerde hata riskini arttırdığı görülmektedir. Bu çalışma kapsamında günümüzde yeni yeni kullanılmaya başlayan uzun okuma ve kısa okuma teknolojilerinin bir arada kullanıldığı hibrit montajlama (Chen vd., 2020) yöntemine gerek duyulmadan yüksek kaliteli ($\sim 60\times$) genom verisi elde edilmiştir. Özellikle plazmid ile kromozom arasındaki genomik farkı ortaya koymak için tercih edilen bu yöntemle elde edilen genomik veri Zhao vd. (2023)'nin bulguları ile benzerlik göstermektedir. Yapılan çalışmalardaki laboratuvar süreçleri olan ıslak laboratuvar çalışmalarından iyi sonuçlar alınmış olsa da bu süreçler kullanıcı bağımlı olduğundan tekrarlanabilirlik konusunda daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Bu nedenle, çalışmada elde edilen dizileme sonuçlarının büyük ölçekli çalışmalarla karşılaştırılması ve laboratuvar yöntemlerinin standardize edilmesi tavsiye edilmektedir.

Genom anotasyonları sayesinde kromozomal ve plazmid kaynaklı genler ayrı ayrı tespit edilmiştir. Yıllara göre çekirdek genoma ait genler analiz edildiğinde bu genlerin büyük ölçüde sabit kaldığı fakat plazmid üzerinde genetik çeşitliliğin aksine yüksek olduğu görülmüştür. Özellikle pESI olarak bilinen ilk olarak İsrail'den bildirilen (Aviv vd., 2014) megaplazmidin, bir örnek hariç tüm örneklerde tespit edilmesi bunu destekler niteliktedir. Konjugatif megaplazmid bulunmayan örnekte dahi plazmid üzerinde çok önemli virülens genleri tespit edilmiştir. Tespit edilen pESI plazmidlerinin virülens (Aviv vd., 2014; Zankari vd., 2012) ve antimikrobiyal direnç genleri (Marcus vd., 2000; Schlumberger vd., 2006) benzer çalışmalarla paralellik göstermektedir. Türkiye'de yapılan farklı çalışmalarda da pESI-megaplasmid varlığı bildirilmiştir (Acar vd., 2019; Kürekçi vd., 2021). Bu çalışmalarda elde edilen plazmidlerle genellikle gıda kökenlidir. Bu çalışmada kanatlı kümeslerinden toplanan örnekler ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca yapılan karşılaştırmalar sonucunda belirli genomik benzerlikler saptanmıştır. Örneğin Acar vd. (2019) bu çalışmaya benzer tetrasiklin (*tet*), sülfonamid (*sul1*), aminoglikozit (*aadA*) ve beta laktam genleri tespit edilmiştir. Bu çalışmadan farklı olarak da civa direnç geni (*mer*) ekstra olarak tespit edilmiştir. Bu tarz farkların kullanılan dizileme teknolojisi ile alakalı olabileceği düşünülmüştür. Bu çalışmada ONT teknolojisi kullanılmış olup Acar vd. (2019)'nin çalışmasında Illumina sistemleri kullanılmıştır. Ayrıca kullanılan suşların gıda kaynaklı olması da bu tarz bir direnç mekanizmasını açıklayabilir. İlerde farklı yerlerden izole edilen suşların derinlemesine analiz yapılması tek sağlık yaklaşımına büyük katkı sağlayacaktır.

Yapılan genomik analizler, çeşitli antimikrobiyal direnç genlerinin varlığını ortaya koymuştur. Kinolon, sulfonamid, beta-laktam ve tetrasiklin grubu antibiyotiklere direnç genleri tespit edilmiştir. Fenotipik testlerden farklı olarak, belirli yıllarda bazı direnç genlerinin fazla veya az bulunması, *S. Infantis*'in yüksek genomik plastisiteye sahip olduğunu göstermektedir. Bu durum daha önce yapılan çalışmalarla da uyum göstermektedir (Winfield vd., 2004). Genomda bulunan direnç genlerinin her zaman fenotipik olarak ekspresyona uğramadığı bilinmektedir (Buruk vd., 2016). Bu durum, efluks pompaları ve düzenleyici mekanizmaların gen ekspresyonunda önemli rol oynayabileceğini göstermektedir. Örneğin, kolistin ve polimiksin direnciyle ilişkili

pmrG geni tespit edilmiş olmasına rağmen, fenotipik testlerde bu direnç gözlenmemiştir. Kolistin ve Polimiksin B direncinin özellikle *mcr* gibi gen gruplarının da katkısıyla geliştiği bilinmektedir (Fortini vd., 2022). Bu durum kompleks bakteriyel mekanizmalar ile açıklanabilir. Bu çalışmada sadece genomik olarak analizler gerçekleştirilmiştir. Bu mekanizmaların daha ayrıntılı bir şekilde ortaya konulabilmesi için gelecekte, bu genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi adına ileri transkriptomik analizlerin yapılması gerekmektedir.

Filogenetik analizler, suşların klonal ilişkilerini ve epidemiyolojik bağlamlarını değerlendirmek için kullanılmıştır. Tüm örneklerde daha önce Türkiye’den var olduğu bilinen baskın tip (Kürekçi vd., 2021) ST32 saptanmıştır. SNP bazlı analizler, Türkiye’den izole edilen genomların Rusya ve Avrupa’daki bazı suşlarla yakın benzerlik gösterdiğini ancak farklı filogenetik kladlarda yer aldığını ortaya koymuştur. Daha önceden yapılan bir çalışmada (Guzinski vd., 2024) da Avrupa suşlarının bir kladda yer aldığını bildirmiştir. Bu çalışma kapsamında yapılan analizlerde de bu çalışmaları doğrular nitelikte sonuçlar bulunmuştur. SNP bazlı filogenetik analizler her ne kadar ayırım yapabilmiş olsa da genellikle akut salgınları incelemek için uygundur ancak uzun süre dolaşım gösteren suşları ayırt etmekte yetersiz kalabilir (Alba vd., 2023; Shakya vd., 2020). Çekirdek genoma dayalı analizler, SNP analizlerine kıyasla daha geniş bir evrimsel perspektif sağlamıştır ve Türkiye suşlarının büyük ölçüde Avrupa suşlarıyla ortak kümeler oluşturmuştur. Bu sonuçlar Alba vd. (2023) ve Guzinski vd. (2024) elde ettiği sonuçlarla örtüşmektedir. Bu durumun SNP’lerin sadece tek nokta mutasyonlarına, çekirdek genom bazlı çalışmalarında çekirdek genomda bulunan bölgelere odaklanması ve daha yüksek bir çözünürlük sağladığından dolayı olduğu bildirilmiştir (Alba vd., 2023; Guzinski vd., 2024; Shakya vd., 2020). Filogenetik analizlerde çözünürlük istenildiği takdirde araştırma sorusuna göre ayarlanabilir. Bu yüzden her yöntemin kendi içinde kullanım alanı bulduğu yerler vardır. Özellikle bu çalışmalarda kullanılan filogenetik yöntem, biyoinformatik araçlar ve okuma teknolojilerinin standardizasyonu gelecekte yapılacak araştırmalar için önem arz etmektedir.

Bayesçi istatistiksel yöntemlerle yapılan evrimsel filogenetik analizler, belirli ülkelerden gelen örneklerde yüksek rekombinasyon oranları olduğunu göstermiştir. Özellikle Güney Afrika, Nijerya ve Kamerun'dan izole edilen genomlarda yüksek rekombinasyon oranları tespit edilmiştir. Afrika ülkelerinde saptanan suşlarda yüksek rekombinasyon olduğu çalışmalarla ortaya konmuştur. Bu çalışmada elde edilen suşlar da Afrika suşlarına benzer özellik göstermektedir (Mattock vd., 2022). *Salmonella* genomlarının rekombinasyona açık olduğu ve bu olayların patojenitenin artışıyla ilişkili olduğu bilinmektedir (Winfield vd., 2004). Türkiye'den gelen suşlarda da yüksek rekombinasyon gözlenmiş ve bu durumun genomik çeşitliliği artırdığı belirlenmiştir. Türkiye suşlarının ABD, Şili ve Güney Kore suşları ile filogenetik olarak ilişkilendirildiği görülmüştür. Bu sonuçlar literatürle (Guzinski vd., 2024) benzerlik göstermektedir. Guzinski ve arkadaşları bu çalışmadan farklı olarak Birleşik Krallık'taki suşlara odaklanılmış, daha fazla suş genomu kullanılmış (n=413) ve MCMC değerini 400 milyon olarak seçmiştir. Bu çalışmada bayesçi analizler için 500 milyon seçilmiş ve analizler buna göre gerçekleştirilmiştir. Evrimsel analizlerin benzer sonuçlanması MCMC değerinin benzerliği ile açıklanabilir. Ayrıca çoğu çalışma halen kısa okuma teknolojilerini kullanmaktadır. Bu teknolojinin yarattığı biasın da sonuçları etkileyebileceği unutulmamalıdır. Benzer çalışmaların güvenilir hale getirilmesi için daha yüksek MCMC değerleri ve lokasyon etiketleriyle tekrarlanması önerilmektedir.

Biyoinformatik analizler bu süreçlerin en önemli aşamalarından birisidir. Bu çalışma kapsamında yapılan analizlerin standardizasyonu ve tekrarlanabilirliğini arttırmak adına bir nextflow iş akışı geliştirilmiştir. Bu iş akışı paralel olarak birden fazla örnek için çalışabilmektedir. Günümüzde kullanılan birçok farklı iş akışı bulunmaktadır. Örneğin, komut satırı üzerinden çalışan Bactopia (Petit ve Read, 2020), BacSeq (Chukamnerd vd., 2023) ve online olarak erişilebilen BV-BRC (n.d. 2015) bunlardan bazılarıdır. Bu iş akışları birden fazla patojene özgü olmaları ya da online olarak ulaşılabildiği için kısıtlı sayıda örnek analiz edilebildiğinden problemlere sebep olmaktadır. Ayrıca bu platformların filogenetik analizleri gerçekleştirebilecek alt yapıları eklenmemiştir. Bu çalışmada tasarlanan iş akışı şu an için sadece *Salmonella*'ya özgü olup bu eşleniklerinden ayrılmaktadır. Her ne kadar hızlı ve kolay

bir şekilde uygulanabilse de şu anda sadece nextflow üzerinden çalışabilmesi bir kısıtlayıcı etken olabilir. İlerleyen süreçte diğerk uzmanların da katkısıyla bu iş akışının diğerk platformlara da aktarılması *Salmonella* sörveyansı için faydalı olacaktır.

Bu tez alışması, Türkiye'deki MDR *S. Infantis* suşlarının genomik karakterizasyonuna önemli bir katkı sağlamaktadır. Ancak bazı sınırlamaları bulunmaktadır. İlk olarak, yalnızca dokuz suş incelenmiş olup bu durum popölasyonun tamamını yansıtmayabilir. İkincisi, Türkiye'den halka açık genomik verilerin eksikliğı, yerel suşlarla daha kapsamlı bir karşılaştırma yapılmasını kısıtlamaktadır. Gelecekte, daha büyük ve daha geniş coğrafi dağılıma sahip veri setleri ile genomik sörveyans çalışmalarının artırılması gerekmektedir. Türkiye'de MDR *S. Infantis* suşlarının yayılımını kontrol altına almak için genomik sörveyans programları genişletilmeli, biyogüvenlik önlemleri artırılmalı ve direnç mekanizmaları daha detaylı araştırılmalıdır.

Bu tez alışması, Türkiye'deki MDR özelliğindeki *S. Infantis*'in alarm verici yayılımını ve direnç eğilimlerini takip etmek için genomik sörveyansın önemini vurgulamaktadır. pESI-Megaplasmid taşıyan izolatların varlığı, küresel yayılım açısından potansiyel bir risk oluşturmakta ve kanatlı üretiminde daha sıkı antimikrobiyal direnç politikaları ve biyogüvenlik önlemlerinin uygulanmasını gerektirmektedir. Gelecekteki araştırmaların, Türkiye izolatları için genomik veri tabanlarını genişletmeye ve MDR *S. Infantis*'in halk sağığı üzerindeki etkisini azaltmaya yönelik alternatif kontrol stratejilerini keşfetmeye odaklanması önerilmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, 2020-2024 yılları arasında Türkiye'deki kanatlı kaynaklı *S. Infantis* suşlarının hem fenotipik hem de genomik karakterizasyonunu gerçekleştirerek, MDR suşlarının yaygınlığını, evrimsel dinamiklerini ve klonal ilişkilerini detaylı bir şekilde incelemiştir. Çalışma kapsamında yapılan fenotipik analizler, MDR özellik gösteren suşların yıllar boyunca varlığını sürdürdüğünü ve özellikle florokinolon, beta-laktam ve tetrasiklin gibi kritik antibiyotiklere karşı yüksek direnç seviyeleri sergilediğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte, yıllara göre fenotipik direnç dağılımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Bu durum, MDR suşlarının stabil popülasyonlar oluşturduğunu ve direnç mekanizmalarının sürdürülebilir bir şekilde bakteriyel genom içerisinde korunduğunu düşündürmektedir.

NGS ve bioinformatik analizler kullanılarak yapılan genomik incelemeler, MDR *S. Infantis* suşlarının taşıdığı direnç ve virülens faktörlerini genom ölçeğinde belirlemeye olanak sağlamıştır. Hibrit montajlama yöntemi olmadan yapılan kısa okuma (Illumina) ve uzun okuma (ONT) bazlı analizler, yüksek kaliteli genom verisi elde edilmesini sağlamış ve suşların kromozomal ve plazmid kaynaklı genetik özelliklerini detaylandırmıştır. Özellikle pESI olarak bilinen megaplazmidin, tüm izolatlarda tespit edilmesi ancak bir örnekte bulunmaması, bu mobil genetik elemanın *S. Infantis*'in patojenitesi ve direnç profili üzerindeki potansiyel etkisini vurgulamaktadır. pESI-megaplazmid'in, önceki çalışmalarda hem direnç hem de virülens genlerinin taşınmasında kritik bir rol oynadığı gösterilmiş olup, bu çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bunun yanı sıra, genom anotasyonları sonucunda çekirdek genoma ait genlerin büyük ölçüde korunmuş olduğu, ancak plazmid kaynaklı genetik çeşitliliğin yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Filogenetik analizler, Türkiye'deki *S. Infantis* suşlarının klonal ilişkilerini ve küresel dağılımını anlamak açısından önemli bulgular sunmuştur. SNP bazlı analizler, Türkiye izolatlarının Rusya ve Avrupa'daki suşlarla yakın benzerlik gösterdiğini, ancak farklı filogenetik dallarda yer aldığını ortaya koymuştur. Çekirdek genoma dayalı analizler ise Türkiye suşlarının büyük ölçüde Avrupa suşlarıyla ortak kümeler

oluşturduğunu göstermiştir. Bu durum, *S. Infantis*'in küresel dolaşımının ve genetik çeşitliliğinin yüksek olduğunu, ayrıca yatay gen transferi ve rekombinasyon olaylarının önemli rol oynadığını desteklemektedir. Bayesçi yöntemlerle yapılan evrimsel filogenetik analizler ise Güney Afrika, Nijerya ve Kamerun'dan gelen izolatlarda yüksek rekombinasyon oranları tespit etmiş ve bu bölgelerde MDR suşlarının genetik olarak farklı evrimsel yollar izlediğini göstermiştir. Türkiye'deki izolatlarda da belirli düzeyde rekombinasyon tespit edilmiş olup, bu durum MDR *S. Infantis* suşlarının uzun vadede genomik plastisiteye sahip olduğunu düşündürmektedir.

Çalışma kapsamında geliştirilen biyoinformatik iş akışı, genomik sürveyansın standardizasyonu açısından önemli bir katkı sağlamıştır. Geliştirilen iş akışı hem *Salmonella* hem de diğer patojenler için yeniden üretilebilir analiz süreçleri sunarak, gelecekteki genomik sürveyans çalışmaları için temel oluşturabilecek bir yapı ortaya koymaktadır. Ancak, analiz edilen suş sayısının sınırlı olması ve Türkiye'den halka açık genomik veri eksikliği gibi bazı kısıtlamalar mevcuttur. Daha geniş coğrafi dağılıma sahip, yüksek sayıda izolat içeren çalışmaların gerçekleştirilmesi, elde edilen bulguların doğrulanması açısından önem arz etmektedir.

Sonuç olarak, bu tez çalışması Türkiye'de MDR *S. Infantis* suşlarının alarm verici bir şekilde yayılmakta olduğunu ve bu yayılımın genomik sürveyans ile yakından takip edilmesi gerektiğini göstermektedir. Özellikle, pESI-megaplasmid taşıyan izolatların varlığı, küresel yayılım açısından potansiyel bir risk oluşturmakta ve kanatlı üretiminde daha sıkı antimikrobiyal direnç politikaları ve biyogüvenlik önlemlerinin uygulanmasını gerektirmektedir. MDR suşların halk sağlığı üzerindeki etkilerini minimize etmek için gelecekte şu adımların atılması kritik önem taşımaktadır:

- Ulusal genomik veri tabanlarının genişletilmesi: Türkiye'de MDR *S. Infantis* izolatları ile ilgili daha fazla veri üretilmesi, küresel çapta kıyaslamalar yapılarak halk sağlığı önlemlerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

- Daha büyük ölçekli genomik sürveyans çalışmaları: Daha fazla suş içeren ve farklı coğrafi bölgeleri temsil eden çalışmalar, MDR *S. Infantis* suşlarının yayılım dinamiklerini ve evrimsel değişimlerini daha iyi anlamamıza yardımcı olacaktır.
- Biyogüvenlik önlemlerinin artırılması: MDR suşların kanatlı endüstrisinde yayılımını kontrol altına almak için biyogüvenlik tedbirleri güçlendirilmeli ve direnç mekanizmalarının ortaya çıkışını engelleyecek stratejiler geliştirilmeli ve uygulanmalıdır.
- Alternatif kontrol stratejilerinin araştırılması: MDR suşlara karşı yeni antimikrobiyal ajanlar, bakteriyofajlar veya probiyotik bazlı yaklaşımlar gibi alternatif tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir.
- Antimikrobiyal direnç genlerinin ekspresyon seviyelerinin incelenmesi: Fenotipik ve genotipik direnç arasında gözlenen farklılıkların moleküler mekanizmalarını anlamak için ileri transkriptomik ve proteomik analizlere ihtiyaç vardır.

Genomik sürveyansın halk sağlığı üzerindeki önemi göz önüne alındığında, bu çalışmada geliştirilen biyoinformatik yaklaşımlar ve elde edilen bulgular, Türkiye'de MDR *S. Infantis* suşlarının izlenmesi ve kontrol altına alınması için temel oluşturmaktadır. Gelecekte yapılacak araştırmaların, MDR suşlarının yayılımını sınırlandıracak etkili politikalar geliştirmeye ve genomik sürveyansın halk sağlığı yönetimindeki rolünü güçlendirmeye odaklanması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Acar, S., Bulut, E., Durul, B., Uner, I., Kur, M., Avsaroglu, M.D., Kirmaci, H.A., Tel, Y.O., Zeyrek, F.Y. & Soyer, Y. (2017). Phenotyping and genetic characterization of *Salmonella enterica* isolates from Turkey revealing arise of different features specific to geography. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 98–107.
- Acar, S., Bulut, E., Stasiewicz, M.J. & Soyer, Y. (2019). Genome analysis of antimicrobial resistance, virulence, and plasmid presence in Turkish *Salmonella* serovar Infantis isolates. *International Journal of Food Microbiology*, 307, 108275.
- Achtman, M., Wain, J., Weill, F.X., Nair, S., Zhou, Z., Sangal, V., Krauland, M.G., Hale, J. L., Harbottle, H., Uesbeck, A., Dougan, G., Harrison, L.H. & Brisse, S. & S. Enterica MLST Study Group. (2012). Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS Pathogens*, 8(6), e1002776.
- Aksakal, A. (2003). Bazı Kanatlıların Dışkılarında *Salmonella* Türlerinin Varlığı ve Yaygınlığı ile Antibiyotiklere Duyarlılıkları. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 14(1): 95-101.
- Alba, P., Carfora, V., Feltrin, F., Diaconu, E.L., Sorbara, L., Dell'Aira, E., Cerci, T., Ianzano, A., Donati, V. & Franco, A. (2023). Evidence of structural rearrangements in ESBL-positive pESI(like) megaplasms of *Salmonella Infantis*. *FEMS Microbiology Letters*, 370, fnad014.
- Alba, P., Leekitcharoenphon, P., Carfora, V., Amoruso, R., Cordaro, G. ... Battisti, A. (2020). Molecular epidemiology of *Salmonella Infantis* in Europe: insights into the success of the bacterial host and its parasitic pESI-like megaplasms. *Microb Genom.*, May;6(5):e000365.

- Alcock, B.P., Raphenya, A.R., Lau T.T.Y., Tsang, K.K., Bouchard, M., Edalatmand, A., ... McArthur, A.G. (2020) CARD: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research.*, 48(D1):D517-D525.
- Alikhan, N.F, Zhou, Z., Sergeant, M.J. & Achtman, M. (2018). A genomic overview of the population structure of *Salmonella*. *PLoS Genetics*, 14:e1007261.
- Allard, M.W, Strain, E., Melka, D., Bunning, K., Musser, S.M., Brown, E.W, Timme, R. (2016). Practical value of food pathogen traceability through building a whole-genome sequencing network and database. *J. Clin. Microbiol.*, 54:1975–1983.
- Almeida, C., Azevedo, N.F., Fernandes, R.M., Keevil, C.W. & Vieira, M.J. (2010). Fluorescence in situ hybridization method using a peptide nucleic acid probe for identification of *Salmonella* spp. in a broad spectrum of samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(13), 4476–4485.
- Altschul, S.F, Gish, W, Miller, W, Myers, E.W. & Lipman D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3):403-410.
- Alvarez, D.M., Barrón-Montenegro, R., Conejeros, J., Rivera, D., Undurraga, E.A. & Moreno-Switt, A.I. (2023). A review of the global emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Infantis. *International Journal of Food Microbiology*, 403, 110297.
- Andrews, S. (2010). FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data (Version 0.11.9) [Computer software]. Babraham Bioinformatics. Retrieved from <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Ashton, P.M., Nair, S., Peters, T.M., Bale, J.A., Powell, D.G. & Salmonella Whole Genome Sequencing Implementation Group. (2016). Identification of *Salmonella* for public health surveillance using whole genome sequencing. *PeerJ*, 4, e1752.

- Aviv, G., Tsyba, K., Steck, N., Salmon-Divon, M., Cornelius, A., Rahav, G., Grassl, G.A. & Gal-Mor, O. (2014). A unique megaplasmid contributes to stress tolerance and pathogenicity of an emergent *Salmonella enterica* serovar Infantis strain. *Environ. Microbiol.*, 16 (4), 977–994.
- Bansal, A.K. (2005). Bioinformatics in microbial biotechnology – a mini review. *Microb. Cell Fact* 4, 19.
- Barlow, M. and Hall, B.G. (2002). Origin and evolution of the *AmpC* beta-lactamases of *Citrobacter freundii*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 46:1190–1198.
- Brown, E., Dessai, U., McGarry, S. & Gerner-Smidt, P. (2019). Use of whole-genome sequencing for food safety and public health in the United States. *Foodborne Pathogens and Disease*, 16(7), 441–450.
- Brown, C.L., Mullet, J., Hindi, F., Stoll, J.E., Gupta, S., Choi, M., Keenum, I., Vikesland, P., Pruden, A. & Zhang, L. (2022). mobileOG-db: A manually curated database of protein families mediating the life cycle of bacterial mobile genetic elements. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(18), e00991-22.
- Bogomazova, A.N., Gordeeva, V.D., Krylova, E.V., Soltynskaya, I.V., Davydova, E.E., Ivanova, O.E. & Komarov, A.A. (2020). Mega-plasmid found worldwide confers multiple antimicrobial resistance in *Salmonella Infantis* of broiler origin in Russia. *International Journal of Food Microbiology*, 319, 108497.
- Borges, V., Pinheiro, M., Pechirra, P., Guiomar, R. & Gomes, J. P. (2018). INSaFLU: An automated open web-based bioinformatics suite for amplicon-based next-generation sequencing viral genome surveillance. *Genome Medicine*, 10(46).
- Bonnet, R. (2004). Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48:1–14.

- Bouckaert, R., Vaughan, T.G., Barido-Sottani, J., Duchêne, S., Fourment, M., Gavryushkina, A. & Drummond, A.J. (2019). BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLOS Computational Biology*, 15(4), e1006650.
- Buruk, K., Öztel Ocak, H., Bayramoğlu, G. & Aydın, F. (2016). Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance genes in quinolone-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. isolates from bloodstream infections. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 50(2), 186-195.
- Bush, K. and Bradford, P.A. (2016). β -Lactams and β -lactamase inhibitors: An overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(8), a025247.
- BV-BRC. (2025). Bacterial and viral bioinformatics resource center. Retrieved February 6, 2025, from <https://www.bv-brc.org>.
- Carattoli, A., Zankari, E., Garcíá-Fernández, A., Larsen, M.V., Lund, O., Villa, L., et al. (2014). In silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother.*, 58:3895–903.
- Carhuaricra-Huaman, D. and Setubal, J.C. (2024). Step-by-step bacterial genome comparison. *Methods in Molecular Biology*, 2802, 107–134.
- Carriço, J.A., Sabat, A.J., Friedrich, A.W. & Ramirez, M.; ESCMID Study Group for Epidemiological Markers (ESGEM). (2013). Bioinformatics in bacterial molecular epidemiology and public health: Databases, tools and the next-generation sequencing revolution. *Euro Surveillance*, 18(4), 20382.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2022). Antimicrobial resistance, <https://www.cdc.gov/drugresistance/index.html>, Son erişim tarihi: 10.12.2024.

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2011). Snapshots of serotypes. In An Atlas of Salmonella in the United States, 1968–2011. Retrieved from <https://www.cdc.gov/salmonella/reportspubs/salmonella-atlas/serotype-snapshots.html>.
- Chuanchuen, R. and Padungtod, P. (2009). Antimicrobial Resistance in Salmonella enterica Isolated from Poultry and Swine. *Journal of Veterinary Medical Science*, 71(10), 1349–1355.
- Chen, Z., Erickson, D.L. & Meng, J. (2020). Benchmarking hybrid assembly approaches for genomic analyses of bacterial pathogens using Illumina and Oxford Nanopore sequencing. *BMC Genomics*, 21(631).
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17), i884–i890.
- Chukamnerd, A., Jeenkeawpiam, K., Chusri, S., Pomwised, R., Singkhamanan, K. & Surachat, K. (2023). BacSeq: a user-friendly automated pipeline for whole-genome sequence analysis of bacterial genomes. *Microorganisms*, Jul 6;11(7):1769.
- Cingolani, P., Platts, A., Wang, L.L., Coon, M., Nguyen, T., Wang, L., Land, S.J., Lu, X. & Ruden, D. M. (2012). A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly*, 6(2), 80–92.
- Coll, F., McNerney, R., Preston, M.D., Guerra-Assunção, J.A., Warry, A., Hill-Cawthorne, G., Mallard, K., Nair, M., Miranda, A., Alves, A., Perdigão, J., Viveiros, M., Portugal, I., Hasan, Z., Hasan, R., Glynn, J.R., Martin, N., Pain, A. & Clark, T. G. (2015). Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences. *Genome Medicine*, 7, 51.

- Connor, T.R., Owen, S.V., Langridge, G., Connell, S., Nair, S. ... Kingsley, R.A. (2016). What's in a name? Species-wide whole-genome sequencing resolves invasive and noninvasive lineages of *Salmonella enterica* serotype Paratyphi B. *mBio*, 7:e00527-16.
- Danecek, P., Bonfield, J.K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan V. ... Li, H. (2021). Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience*, Volume 10:2, giab008.
- Dalyan Cilo, B., Karakeçili, F., Güleşen, R., Levent, B., Özakın, C., Gedikoğlu, S. (2013) Determination of *Salmonella* serotypes by conventional and molecular methods. *Mikrobiyol Bul.*, 47(4):693-701.
- Davies, J. and Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417-433.
- Di Tommaso, P., Chatzou, M., Floden, E. W., Barja, P. P., Palumbo, E., & Notredame, C. (2017). Nextflow enables reproducible computational workflows. *Nature Biotechnology*, 35(4), 316-319.
- Didelot, X., Bowden, R., Wilson, D.J., Peto, T.E., & Crook, D.W. (2012). Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. *Nature Reviews Genetics*, 13(9), 601-612.
- Doster, E., Lakin, S.M., Dean, C.J., Wolfe, C., Young, J.G., Boucher, C., Belk, K.E., Noyes, N.R. & Morley, P.S. (2020). MEGARes 2.0: A database for classification of antimicrobial resistance determinants. *GigaScience*, 9(6), giaa100.
- Enright, M.C. and Spratt, B.G. (1999). Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol.*, 7:482–487.

Esteban, E., Snipes, K., Hird, D., Kasten, R. & Kinde, H. (1993). Use of ribotyping for characterization of *Salmonella* serotypes. *J. Clin. Microbiol.*, 31:233–237.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2024). *Salmonellosis – Annual epidemiological report for 2022*. European Surveillance System (TESSy). Retrieved from <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/salmonellosis-annual-epidemiological-report-2022>.

EUCAST. (2022). “Clinical Breakpoints”, https://www.eucast.org/clinical_breakpoints, son erişim tarihi: 10.12.2022.

Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S. & Käller, M. (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32:3047–8.

Feldgarden, M., Brover, V., Haft, D.H., Prasad, A.B., Slotta, D.J., Tolstoy, I., Tyson, G.H., Zhao, S., Hsu, C.H., McDermott, P.F., Tadesse, D.A., Morales, C., Simmons, M., Tillman, G., Wasilenko, J., Folster, J.P. & Klimke, W. (2019). Validating the AMRFinder tool and resistance gene database by using antimicrobial resistance genotype-phenotype correlations in a collection of isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(11), e00483-19.

Fortini, D., Owczarek, S., Dionisi, A.M., Lucarelli, C., Arena, S., Carattoli, A., Villa, L. & García-Fernández, A.; Enter-Net Italia Colistin Resistance Study Group. (2022). Colistin resistance mechanisms in human *Salmonella enterica* strains isolated by the national surveillance Enter-Net Italia (2016–2018). *Antibiotics*, 11(1), 102.

Galaxy Project. (2025). UseGalaxy. Retrieved February 6, 2025, from <https://usegalaxy.org>

Garfias-Gallegos, D., Ziri6n-Mart6nez, C., Bustos-D6az, E.D., Arellano-Fern6ndez, T.V., Lovaco-Flores, J.A., Espinosa-Jaime, A., Avelar-Rivas, J.A. & S6lem-M6jica, N. (2022). Metagenomics bioinformatic pipelines. *Methods in Molecular Biology*, 2512, 153–179.

- Gascuel, O. (1997). BIONJ: An improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Molecular Biology and Evolution*, 14(7), 685-695.
- Giannella, R. (1996). Salmonella: Epidemiology chapter 21. In: Baron S, editor. Baron's Medical Microbiology. University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Grant J.R., Enns E., Marinier E., Mandal A., Herman E.K., Chen C., Graham M., Van Domselaar G. & Stothard P. (2023). Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*. 51(W1):W30-W38. doi: 10.1093/nar/gkad326.
- Grimont, P.A.D., Grimont, F., Bouvet, P. (2000). Taxonomy of the Genus Salmonella. In: Salmonella in domestic animals. Wray C, Wray A, editors Wallingford, United Kingdom: CABI Publishing
- Grubaugh, N.D., Gangavarapu, K., Quick, J. ... Andersen, K.G. (2019). An amplicon-based sequencing framework for accurately measuring intrahost virus diversity using PrimalSeq and iVar. *Genome Biol.*, 20, 8
- Gupta, S.K., Padmanabhan, B.R., Diene, S.M., Lopez-Rojas, R., Kempf, M., Landraud, L. & Rolain, J.M. (2014). ARG-ANNOT (Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation), a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(1), 212-220.
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N. & Tesler, G. (2013). QUAST: a quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, Apr 15;29(8):1072-5.
- Guzinski, J., Potter, J., Tang, Y., Davies, R., Teale, C. & Petrovska, L. (2024). Geographical and temporal distribution of multidrug-resistant *Salmonella Infantis* in Europe and the Americas. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1244533.

- Hiett, K.L. & Seal, B.S. (2009). Use of repetitive element palindromic PCR (rep-PCR) for the epidemiologic discrimination of foodborne pathogens. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 551, pp. 49–58). Humana Press.
- Hindermann, D., Gopinath G., Chase, H., Negrete, F., Althaus, D., Zurfluh, K. ... Stephan, R. (2017). *Salmonella enterica* serovar Infantis from food and human infections, Switzerland, 2010-2015: poultry-related multidrug resistant clones and an emerging ESBL producing clonal lineage. *Front Microbiol.*, 8:1322
- Hunt, M., Mather, A.E., Sánchez-Busó, L., Page, A.J., Parkhill, J., Keane, J.A. ... Harris, S.R. (2017). ARIBA: rapid antimicrobial resistance genotyping directly from sequencing reads. *Microb. Genomics*, 3:e000131.
- Hooper, D.C. (2000). Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis.*, 31(Suppl 2):S24–28.
- International Standard Organization (ISO). (2025) Microbiology of the food chain-Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella*- Part 1: Detection of *Salmonella* spp. ISO 6579-1:2017. [cited 2025 January 28th]; Available from: URL <https://www.iso.org/standard/56712.html>
- Jain, C., Rodriguez-R, L.M., Phillippy, A.M., Konstantinidis, K.T. & Aluru, S. (2018). High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nature Communications*, 9(1), 5114.
- Jolley, K.A., Bray, J.E. & Maiden M.C.J. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res.*, 3:124.

- Karst, S.M., Ziets, R.M., Kirkegaard, R.H., Sørensen, E.A., McDonald, D., Zhu, Q., ... Albertsen, M. (2021) High-accuracy long-read amplicon sequences using unique molecular identifiers with Nanopore or PacBio sequencing. *Nat. Methods*, 18, 165–169.
- Kardoğan, Ö., Şahan Yapıcıer, Ö., Müştak, K., Müştak, İ.B., Arman, A., Ünal, G. & Kolukırmak, M. (2019). Salmonella Gallinarum ve Salmonella Pullorum için qPCR tanı kitinin geliştirilmesi. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 30(2), 137-142.
- Klassen, J.L. and Currie, C.R., (2012). Gene fragmentation in bacterial draft genomes: extent, consequences and mitigation. *BMC Genomics*, 13:14.
- Kumar, G., Kumar, S., Jangid, H., Dutta, J. & Shidiki, A. (2025). The rise of non-typhoidal *Salmonella*: An emerging global public health concern. *Frontiers in Microbiology*, 16, Article 1524287.
- Kürekci, C., Sahin, S., Iwan, E., Kwit, R., Bomba, A. & Wasyl, D. (2021). Whole-genome sequence analysis of *Salmonella Infantis* isolated from raw chicken meat samples and insights into pESI-like megaplasmid. *International Journal of Food Microbiology*, 337.
- Kolmogorov, M., Yuan, J., Lin, Y. & Pevzner, P.A. (2019). Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nature Biotechnology*, 37(5), 540–546.
- Köster, J. and Rahmann, S. (2012). Snakemake—a scalable bioinformatics workflow engine. *Bioinformatics*, 28(19), 2520-2522.
- Lan, R., Reeves, P.R. & Octavia, S. (2009). Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 9: 996–1005.

- Lakhundi, S. & Zhang, K. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), e00020-18.
- Langridge, G.C., Fookes, M., Connor, T.R., Feltwell, T., Feasey, N., Parsons, B.N. & Parkhill, J. (2015). Patterns of genome evolution that have accompanied host adaptation in *Salmonella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(3), 863-868.
- Lapierre, L., Cornejo, J., Zavala, S., Galarce, N., Sánchez, F., Benavides, M.B., Guzmán, M. & Sáenz, L. (2020). Phenotypic and genotypic characterization of virulence factors and susceptibility to antibiotics in *Salmonella Infantis* strains isolated from chicken meat: First findings in Chile. *Animals*, 10(6), 1–15.
- Leekitcharoenphon, P., Nielsen, E.M., Kaas, R.S., Lund, O. & Aarestrup, F.M. (2014). Evaluation of Whole Genome Sequencing for Outbreak Detection of *Salmonella enterica*. *PLoS One*, Feb 4;9(2):e87991.
- Lefort, V., Desper, R. & Gascuel, O. (2015). A comprehensive, accurate and fast distance-based phylogeny inference program. *Molecular Biology and Evolution*, 32(10), 2798-2800.
- Letunic, I. and Bork, P. (2021) Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.*, 49(W1), W293–W296.
- Li, H. (2018). Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 34:3094-3100.
- Liu, F., Barrangou, R., Gerner-Smidt, P., Ribot, E.M., Knabel, S.J. & Dudley, E.G. (2011). Novel virulence gene and clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) multilocus sequence typing scheme for subtyping of the major serovars of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77:1946–1956.

- Liu, Y.Y., Chiou, C.S. & Chen, C.C. (2016). PGAdb-builder: a Web service tool for creating pan-genome allele database for molecular fine typing. *Sci Rep*, 6:36213.
- Majowicz, S.E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F.J., Kirk, M., ... Hoekstra, R.M. (2010). The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 50: 882–889.
- Marcus, S.L., Brumell, J.H., Pfeifer, C.G. & Finlay, B.B. (2000). *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect.*, 2:145–156.
- Martínez-Puchol, S., Riveros, M., Ruidias, K., Granda, A., Ruiz-Roldán, L., Zapata-Cachay, C., Ochoa, T.J., Pons, M.J. & Ruiz, J. (2021). Dissemination of a multidrug-resistant CTX-M-65 producer *Salmonella enterica* serovar Infantis clone between marketed chicken meat and children. *International Journal of Food Microbiology*, 344, 109090.
- Mattock, J., Smith, A.M., Keddy, K.H., Manners, E.J., Duze, S.T., Smouse, S., Tau, N., Baker, D., Chattaway, M.A., Mather, A.E., Wain, J. & Langridge, G.C. (2022). Genetic characterization of *Salmonella* Infantis from South Africa, 2004–2016. *Access Microbiology*, 4(7), acmi000371.
- Mcewen, S.A. and Fedorka-Cray P.J. (2002). Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin. Infect. Dis.*, 34:S93–S106.
- McMillan, E.A., Weinroth, M.D. & Frye, J.G. (2022). Increased prevalence of *Salmonella* Infantis isolated from raw chicken and Turkey products in the United States due to a single clonal lineage carrying the pESI plasmid. *Microorganisms*, 10:(7).
- McVey, D.S., Kennedy, M., Chengappa, M.M. & Wilkes, R. (Eds.). (2022). *Veterinary Microbiology* (4th ed.). Wiley-Blackwell.

- Manni, M., Berkeley, M.R., Seppey, M. & Zdobnov, E.M. (2021). BUSCO: Assessing genomic data quality and beyond. *Current Protocols*, 1, e323.
- Miller, E.A., Elnekave, E., Flores-Figueroa, C., Johnson, A., Kearney, A., Munoz-Aguayo, J., Tagg, K.A., Tschetter, L., Weber, B.P., Nadon, C.A., Boxrud, D., Singer, R.S., Folster, J.P. & Johnson, T.J. (2020). Emergence of a novel *Salmonella enterica* serotype Reading clonal group is linked to its expansion in commercial turkey production, resulting in unanticipated human illness in North America. *mSphere*, 5(2), e00056-20.
- Montone, A.M.I., Cutarelli, A., Peruzzy, M.F., La Tela, I., Brunetti, R., Pirofalo, M.G., Folliero, V., Balestrieri, A., Murru, N. & Capuano, F. (2023). Antimicrobial resistance and genomic characterization of *Salmonella Infantis* from different sources. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5492.
- Nadon, C., Van Walle, I., Gerner-Smidt, P., Campos, J., Chinen, I., Concepcion-Acevedo, J., Gilpin, B., Smith, A.M., Man Kam, K., Perez, E., Trees, E., Kubota, K., Takkinen, J., Nielsen, E.M., Carleton, H. & FWD-NEXT Expert Panel. (2017). PulseNet International: vision for the implementation of whole genome sequencing (WGS) for global food-borne disease surveillance. *Euro Surveill.*, 22(23):30544.
- Nikaido, H. (2009). Multidrug Resistance in Bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 119–146.
- O'Neill, J. (2016). “Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations”, The review of antimicrobial resistance, Retrieved from https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf
- O'Regan, E., McCabe, E., Burgess, C., McGuinness, S., Barry, T., Duffy, G., Whyte, P. & Fanning, S. (2008). Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of multiple *Salmonella* serotypes in chicken samples. *BMC Microbiology*, 8, 156.

Ochman, H., Lawrence, J.G. & Groisman, E.A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, 405(6784), 299-304.

Oxford Nanopore Technologies. (2023). Dorado: High-accuracy basecalling for Oxford Nanopore sequencing. Oxford Nanopore Technologies. <https://github.com/nanoporetech/dorado>

Över, U., Gür, D., Ünal, S., Miller, G.H. (2001). The changing nature of aminoglycoside resistance mechanisms and prevalence of newly recognized resistance mechanisms in Turkey. *Clin. Microbiol. Infect.*, 7:470–78.

Özer, D. and Kimiran-Erdem, A. (2013). Comparison of different methods for the detection of *Salmonella* spp. in minced meat samples. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.*, 19(5):801-6.

Page, A.J., Cummins, C.A., Hunt, M., Wong, V.K., Reuter, S., Holden, M.T., Fookes, M., Falush, D., Keane, J.A. & Parkhill, J. (2015). Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, 31(22), 3691-3693.

Pang, S., Octavia, S., Reeves, P.R., Wang, Q., Gilbert, G.L. ... Lan, R. (2012). Genetic relationships of phage types and single nucleotide polymorphism typing of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Clin. Microbiol.*, 50:727–734.

Parry, C.M., Wijedoru, L., Arjyal, A. & Baker, S. (2011). The utility of diagnostic tests for enteric fever in endemic locations. *Expert Rev. Anti Infect Ther.*, 9:711–725.

Papp-Wallace, K.M., Endimiani, A., Taracila, M.A. & Bonomo, R.A. (2011). Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11), 4943–4960.

Petit, R.A. III. and Read, T.D. (2020). Bactopia: a flexible pipeline for complete analysis of bacterial genomes. *mSystems*, Aug 4;5(4):e00190-20.

- Pop, M. and Salzberg, S.L. (2008). Bioinformatics challenges of new sequencing technology. *Trends Genet.* 24:142–9.
- Popa, G.L. and Papa, M.I. (2021). *Salmonella* spp. Infection - A continuous threat worldwide. *Germes*, 11(1), 88–96.
- Popoff, M.Y., Bockemühl, J., Brenner, F.W. & Gheesling, L.L. (2001). Supplement 2000 (no. 44) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology*, 152(10), 907–909.
- Punchihewage-Don, A.J., Ranaweera, P.N. & Parveen, S. (2024). Defense mechanisms of *Salmonella* against antibiotics: a review. *Frontiers in Antibiotics*, 3, Article 1448796.
- Rambaut, A. (2012). FigTree v1.4. Molecular evolution, phylogenetics, and epidemiology. Retrieved from <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Ranjbar, R., Ahmadi, M. & Memariani, M. (2016). Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) for genotyping of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotype *Infantis* isolated from human sources. *Microbial Pathogenesis*, 100, 299–304.
- Raphenya, A.R., Robertson, J., Jamin, C., De Oliveira Martins, L., Maguire, F., McArthur, A.G. & CARD Working Group. (2022). Datasets for benchmarking antimicrobial resistance genes in bacterial metagenomic and whole genome sequencing. *Scientific Data*, 9, Article 341.
- Robicsek, A., Jacoby, G.A. & Hooper, D.C. (2006). The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect. Dis.*, 6:629–40.
- Rosner, B. (2015). *Fundamentals of biostatistics* (8th ed.). Cengage Learning.

Schwartz, D.C. and Cantor, C.R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, 37:67–75.

Sarıçam, S. and Müştak, H.K. (2018). Kanatlı kökenli *Salmonella* *Infantis* suşlarının multilokus dizi tiplendirmesi ile filogenetik analizi. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 65(4):407-411.

Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, Jul 15;30(14):2068-9.

Seemann, T. (2025). Mlst, Github <https://github.com/tseemann/mlst>, Erişim Tarihi: 01.01.2025

Seoane, A. and Bou, G. (2021). Bioinformatics approaches to the study of antimicrobial resistance. *Rev Esp Quimioter.*, Sep;34 Suppl 1(Suppl1):15-17.

Shakya, M., Ahmed, S.A., Davenport, K.W., Flynn, M.C., Lo, C.C. & Chain, P.S.G. (2020). Standardized phylogenetic and molecular evolutionary analysis applied to species across the microbial tree of life. *Scientific Reports*, 10, 1723.

Shaw, K.J., Rather, P.N., Hare, R.S. & Miller, G.H. (1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol. Rev.*, 57:138–63

Steinke, K., Thomsen, K.G., Hoegh, S.V., Larsen, S.L., Vilhelmsen, K.K., Jensen, T.G., Skov, M.N. & Sydenham, T.V. (2023). RSYD-BASIC: a bioinformatics pipeline for Routine Sequence analYsis and Data processing of BActerial iSolates for cLIInical miCrobiolOgy. [Preprint]. Version posted: Dec 11.

- Stothard, P. & Wishart D.S. (2005). Circular genome visualization and exploration using CGView. *Bioinformatics*, 21(4):537-539.
- Swayne, D. E. and Glisson, J. R. (2013). Diseases of poultry (13th ed.). Wiley-Blackwell.
- Tate, H., Folster, J.P., Hsu, C.H., Chen, J., Hoffmann, M., Li, C., Morales, C., Tyson, G.H., Mukherjee, S., Brown, A.C., Green, A., Wilson, W., Dessai, U., Abbott, J., Joseph, L., Haro, J., Ayers, S., McDermott, P.F. & Zhao, S. (2017). Comparative analysis of extended-spectrum- β -lactamase CTX-M-65-producing *Salmonella enterica* serovar Infantis isolates from humans, food animals, and retail chickens in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(7), e00488-17.
- Tamura, K., Stecher, G. & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38:3022-3027
- Taylor, A.J., Lappi, V., Wolfgang, W.J., Lapierre, P., Palumbo, M.J., Medus, C. & Boxrud, D. (2015). Characterization of foodborne outbreaks of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis with whole-genome sequencing single nucleotide polymorphism-based analysis for surveillance and outbreak detection. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(10), 3334–3340
- Tavşancıl, E. (2019). Parametrik istatistiksel yöntemler: t testi ve F testi. Ankara Üniversitesi Açık Ders Malzemeleri.
- Wick, R.R., Schultz, M.B., Zobel, J. & Holt K.E. (2015). Bandage: interactive visualisation of de novo genome assemblies. *Bioinformatics*, 31(20), 3350-3352.
- Ulusal Salmonella Kontrol Programı (USKP), [online]. 2018. [cited 2025 January 20] Ulusal Salmonella kontrol programı sonuç raporu. Available from: URL: <https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Duyuru/323/UlusalSalmonella-Kontrol-Programi>

- Schlumberger, M.C. and Hardt, W.D. (2006). Salmonella type III secretion effectors: pulling the host cell's strings. *Curr. Opin. Microbiol.*, 9:46–54.
- Şahan, Ö., Aral, E.M., Aden, M.M.A., Aksoy, A., Yılmaz, Ö., Jahed, R., ... Çetinkaya, B. (2016). Türkiye'deki broyler tavuk işletmelerinden izole edilen Salmonella serovarlarının antimikrobiyel direnç durumu. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 3(1):1-6.
- Vernikos, G.S. and Parkhill, J. (2006). Interpolated variable order motifs for identification of horizontally acquired DNA: revisiting the Salmonella pathogenicity islands. *Bioinformatics*, 22(18):2196-2203.
- Virtanen, P., Gommers, R., Oliphant, T.E., Haberland, M., Reddy, T., Cournapeau, D., Burovski, E., Peterson, P., Weckesser, W., Bright, J., van der Walt, S.J., Brett, M., Wilson, J., Millman, K.J., Mayorov, N., Nelson, A.R.J., Jones, E., Kern, R., Larson, E., Carey, C.J., Polat, İ., Feng, Y., Moore, E.W., VanderPlas, J. & SciPy 1.0 Contributors. (2020). SciPy 1.0: Fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nature Methods*, 17, 261–272.
- Wishart, D.S., Han, S., Saha, S., Oler, E., Peters, H., Grant, J., Stothard, P. & Gautam, V. (2023), PHASTEST: Faster than PHASTER, Better than PHAST. *Nucleic Acids Research*, (Web Server Issue).
- Voss, K., Gentry, J. T. & Van der Auwera, G. (2017). Full-stack genomics pipelining with GATK4 + DL + Cromwell [version 1; not peer reviewed]. *F1000Research*, 6(ISCB Comm J):1379.
- Wang, J., Sun, H., Zeng, J., et al. (2017). Antimicrobial Resistance of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in Shanghai, China. *Frontiers in Microbiology*, 8, 510.
- Winfield, M.D. and Groisman, E.A. (2004). Evolution and ecology of *Salmonella*. *EcoSal Plus*, 1(1).

- Wratten L., Wilm A. & Göke J. (2021). Reproducible, scalable, and shareable analysis pipelines with bioinformatics workflow managers. *Nat Methods.*, Oct;18(10):1161-1168.
- World Health Organization. (2019). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics, World Health Organization, 27. Erişim adresi: <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/> Son erişim tarihi: 01.03.2019.
- World Health Organization. (2017). Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance in Foodborne Bacteria: Application of a One Health Approach. Geneva. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Wood, D. E., Lu, J. & Langmead, B. (2019). Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology*, 20, 257.
- Yang, Z. (2007). PAML 4: Phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8), 1586-1591.
- Yu, H., Zheng, Z., Su, J., Lam, T.W. & Luo, R. (2023). Boosting variant-calling performance with multi-platform sequencing data using Clair3-MP. *BMC Bioinformatics*, 24, 308.
- Yoshida, C., Gurnik, S., Ahmad, A., Blimkie, T., Murphy, S.A., Kropinski, A.M. & Nash, J. H. E. (2016). Evaluation of molecular methods for identification of *Salmonella* serovars. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(8), 1992-1998.
- Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O. ... Larsen, M.V. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother.* 67:2640–4.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Gültekin Ünal

1. Öğrenim Durumu

Yüksek Lisans: Mikrobiyoloji (Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji ABD)

Lisans: Veteriner Hekim (Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 2016)

Lisans: Jeoloji Mühendisliği (İstanbul Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi (2009-2011))

2. Ünvanları

Uzman Veteriner Hekim (19.06.2019)

3. Mesleki Deneyimi

- Dünya Sağlık Örgütü, Türkiye Ülke Ofisi, Biyoinformatik Danışmanı (Aralık 2021-Aralık 2024)
- Bioeksen Ar-Ge Teknolojileri, Ankara Uygulama Bölge Sorumlusu (2017,2021)
- Kanatlılardan ve Gıdalardan salmonella kontrol ve eradikasyonu programları geliştirilmesi, Tübitak 1003, 2. aşama (Kasım 2016-Mayıs 2017)
- Part-Time Asistan Öğrenci, Patoloji A.B.D (2013-2016)
- Hannover Veteriner Üniversitesi, IAESTE Stajyeri
- Laboratuvar Asistanı, Synevo laboratuvarları (03.2013-08.2013)

4. Yayınları

1. Yalçın, S., Cosgun, Y., Dedeoğlu, E., Kopp, K., Bayrakdar, F., Ünal, G., et al. (2024). *Genomic surveillance during the first two years of the COVID-19 pandemic – Country experience and lessons learned from Türkiye*. *Frontiers in Public Health*, 12.

2. Müştak, K., Ünal, G., Kaya, B. (2022). *Detection of Microsporum canis and Trichophyton mentagrophytes by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and real-time quantitative PCR (qPCR) methods*. Veterinary Dermatology, August 24, 2022.
3. Yazlık, M.O., Müştak, İ.B., Ünal, G., Kaya, U. (2021). *The association of intrauterine antimicrobial-resistant Trueperella pyogenes with cytological endometrial inflammation status in repeat breeder cows*. Pakistan Journal of Zoology, 1–7.
4. Diker, K.S., Göncüoğlu, M., Güzin, Ş., Akan, M., Safa, I., Müştak, H.K., Ayaz, N.D., Sarıçan, S., Salar, M.Ö., Açıkalin, H.D., Ünal, G., Çöven, F., Asiye, D., Gülaçtı, İ., Uzunboy, E.N. (2020). *Base study for the establishment of a national Salmonella control program in hatching farms and table eggs in Turkey*. Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences, 44(2), Article 23.