

TÜRKİYE VE DÜNYADA VETERİNER SU ÜRÜNLERİ VE HASTALIKLARI

Editör: Prof.Dr. M. Enis YONAR

yaz
yayınları

Türkiye ve Dünyada Veteriner Su Ürünleri ve Hastalıkları

Editör

Prof.Dr. M. Enis YONAR

yaz
yayınları

2025

Türkiye ve Dünyada Veteriner Su Ürünleri ve Hastalıkları

Editör: Prof.Dr. M. Enis YONAR

© YAZ Yayınları

Bu kitabın her türlü yayın hakkı Yaz Yayınları'na aittir, tüm hakları saklıdır. Kitabın tamamı ya da bir kısmı 5846 sayılı Kanun'un hükümlerine göre, kitabı yayınlayan firmanın önceden izni alınmaksızın elektronik, mekanik, fotokopi ya da herhangi bir kayıt sistemiyle çoğaltılamaz, yayınlanamaz, depolanamaz.

E_ISBN 978-625-8678-85-7

Aralık 2025 – Afyonkarahisar

Dizgi/Mizanpaj: YAZ Yayınları

Kapak Tasarım: YAZ Yayınları

YAZ Yayınları. Yayıncı Sertifika No: 73086

M.İhtisas OSB Mah. 4A Cad. No:3/3
İscehisar/AFYONKARAHİSAR

www.yazyayinlari.com

yazyayinlari@gmail.com

İÇİNDEKİLER

Balık Hastalıklarının Tanılamada Jel Elektroforez Yöntemi	1
--	----------

*M. Enis YONAR, Feyza KARAHÜSEYİNOĞLU,
Serpil MİŞE YONAR*

Balık Hastalıklarının Tanılanmasında Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Kullanımı	17
---	-----------

Serpil MİŞE YONAR, M. Enis YONAR

"Bu kitapta yer alan bölümlerde kullanılan kaynakların, görüşlerin, bulguların, sonuçların, tablo, şekil, resim ve her türlü içeriğin sorumluluğu yazar veya yazarlarına ait olup ulusal ve uluslararası telif haklarına konu olabilecek mali ve hukuki sorumluluk da yazarlara aittir."

BALIK HASTALIKLARINI TANILAMADA JEL ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ

M. Enis YONAR¹

Feyza KARAHÜSEYİNOĞLU²

Serpil MİŞE YONAR³

1. GİRİŞ

Balık hastalıklarının hızlı ve doğru şekilde tanınması, modern su ürünleri yetiştiriciliğinde biyogüvenliğin sağlanması, ekonomik kayıpların azaltılması ve enfeksiyonların yayılımının kontrol altına alınması açısından büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda jel elektroforez yöntemleri, moleküler biyoloji ve biyokimya alanındaki gelişmelerle birlikte balık hastalıklarının tanısında kullanılan temel laboratuvar araçlarından biri hâline gelmiştir. Jel elektroforez; DNA, RNA ve protein gibi biyomoleküllerin elektriksel bir alan altında, başlıca boyut ve/veya yüklerine göre ayrılmasına dayanan güçlü ve güvenilir bir analitik tekniktir (Sambrook & Russell, 2001).

Agaroz jel elektroforezi, balık patojenlerinin tanısında özellikle PCR ürünlerinin analizinde kritik rol oynamaktadır. PCR ile çoğaltılan hedef DNA parçalarının agaroz jelde büyüklüklerine göre ayrılması, bakteriyel, viral, paraziter veya mantar kökenli balık patojenlerine özgü gen bölgelerinin

¹ Prof. Dr, Fırat Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, ORCID: 0000-0001-9519-4247.

² Yük. Lisan Öğr., Fırat Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, ORCID: 0009-0008-0751-8036.

³ Prof. Dr, Fırat Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, ORCID: 0000-0003-2736-5731.

varlığının doğrulanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. *Aeromonas*, *Vibrio*, *Edwardsiella*, *Flavobacterium* ve *Yersinia* gibi önemli balık patojenlerinin 16S rRNA genleri veya spesifik virülens genlerine ait PCR ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi, tanısal doğrulamanın temel aşamalarından biridir (Altinok & Kurt, 2003; Abdelsalam et al., 2023; Ador et al., 2021).

Protein temelli tanı yaklaşımlarında ise SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis) öne çıkmaktadır. SDS-PAGE, viral enfeksiyonlarda virüsün yapısal proteinlerinin ayrılması, bakteriyel patojenlerde hücre duvarı/dış membran proteinleri veya toksinlerinin karakterizasyonu ve Western blot analizleri öncesinde protein bantlarının ayrılması amacıyla yaygın biçimde kullanılmaktadır. Tekniğin temel prensipleri ilk olarak Laemmli (1970) tarafından tanımlanmış olup, günümüzde de protein analizinde standart yöntemlerden biridir. Balık hastalıklarında viral ve bakteriyel etkenlere ait özgül protein profillerinin belirlenmesi, hem tanısal doğrulama hem de patogenez çalışmalarına önemli katkı sağlamaktadır (Cunningham, 2002; Altinok & Kurt, 2003).

Jel elektroforez yöntemleri ayrıca balık parazitlerine ilişkin moleküler çalışmalarda, PCR-RFLP analizleri, genotiplendirme ve popülasyon genetiği araştırmalarında önemli bir yer tutmaktadır. Patojen DNA'sının restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonucu oluşan fragment desenlerinin agaroz jelde analiz edilmesi, benzer türler veya suşlar arasındaki genetik farklılıkların ortaya konmasına olanak sağlamaktadır (Altinok & Kurt, 2003; Cunningham, 2002). Bu durum, özellikle morfolojik olarak birbirine benzeyen patojenlerin ayırt edilmesinde büyük avantaj sağlamaktadır.

Günümüzde jel elektroforez, balık hastalıklarının tanısında tek başına bir yöntem olmaktan ziyade, PCR, RT-PCR,

RFLP, Western blot ve diğer moleküler tanı teknikleriyle entegre şekilde kullanılan bir doğrulama ve karakterizasyon aracıdır. Yöntemin görece düşük maliyetli olması, laboratuvarında kolay uygulanabilmesi ve sonuçların doğrudan görsel olarak değerlendirilebilmesi, elektroforez tekniklerini su ürünleri hastalık tanısında vazgeçilmez kılmaktadır (Sambrook & Russell, 2001; Altınok & Kurt, 2003; Abdelsalam et al., 2023).

2. JEL ELEKTROFOREZİN TEMEL PRENSİPLERİ

Jel elektroforezi, DNA, RNA veya protein gibi biyomoleküllerin elektriksel bir alan altında ayrılması esasına dayanan analitik bir yöntemdir. Moleküller, jel matriksinin gözenekli yapısı boyunca yük ve molekül büyüklüğü gibi fiziksel özelliklerine bağlı olarak farklı hızlarda ilerler. Bu nedenle jel elektroforezi, moleküllerin hem ayrılması hem de karakterize edilmesi için güvenilir ve yaygın bir tekniktir (Sambrook & Russell, 2001).

Elektroforez prensibi, negatif yüklü moleküllerin (özellikle DNA ve RNA) elektrik alanı uygulandığında pozitif yüklü anoda doğru göç etmesine dayanır. DNA ve RNA molekülleri fosfat omurgaları nedeniyle doğal olarak negatif yüklüdür ve jel matriksi içinde boyutlarına göre ayrılır; büyük moleküller daha yavaş, küçük moleküller ise jel içerisinde daha hızlı hareket eder (Hames, 1998). Proteinler ise doğal hâllerleriyle hem pozitif hem negatif yüklü bölgeler içerdiklerinden, SDS-PAGE gibi tekniklerde proteinlerin yükü SDS deterjanı ile homojen şekilde negatif hâle getirilerek ayrılmaları yalnızca molekül büyüklüğüne göre gerçekleşir (Laemmli, 1970).

Elektroforezde kullanılan jel materyali çoğunlukla agaroz veya poliakrilamid yapısındadır. Agaroz jeller, büyük DNA fragmanlarının (100 bp–20 kb) ayrılmasında kullanılırken,

poliakrilamid jeller daha yüksek çözünürlük sağladıkları için küçük DNA parçaları, RNA veya proteinlerin ayrımı için tercih edilmektedir (Sambrook & Russell, 2001). Jel konsantrasyonu, ayrılacak moleküllerin boyutlarına göre seçilir; yüksek agaroz yüzdesi küçük DNA fragmanları için, düşük agaroz yüzdesi ise büyük fragmanlar için uygundur.

Elektroforez cihazı, jel tankı, tampon çözelti ve güç kaynağından oluşur. Tampon çözelti (örn. TBE veya TAE), elektrik akımının iletilmesini sağlar ve jel boyunca sabit bir pH ortamı oluşturarak moleküllerin stabil ilerlemesini sağlar. Molekül hareket hızını etkileyen temel faktörler arasında jel konsantrasyonu, uygulanan voltaj, tampon tipi, molekülün yükü, molekülün konformasyonu ve jelin sıcaklığı yer alır (Hames, 1998; Westermeier, 2016).

Elektroforez sırasında moleküllerin ilerlemesi sonunda jel, etidyum bromür, SYBR Green, Coomassie Blue veya gümüş boyama gibi yöntemlerle boyanarak bantların görünür hâle gelmesi sağlanır. DNA ve RNA genellikle UV transillüminatörde görüntülenirken, protein bantları SDS-PAGE sonrasında boyama işlemi ile ortaya çıkarılır. Bu bantlar daha sonra Western blot gibi ileri analizlerde kullanılabilir (Westermeier, 2016).

Jel elektroforezin temel prensibi, balık hastalıklarında moleküler tanı sürecinin merkezindedir. PCR ürünlerinin doğrulanması, RFLP analizleri, viral ve bakteriyel proteinlerin ayrılması, paraziter genomik çalışmalar ve patojen karakterizasyonu gibi çok sayıda uygulama, bu teknik üzerine yapılandırılmıştır. Dolayısıyla elektroforez, balık hastalıklarının tanılanmasında hem bağımsız bir analiz yöntemi hem de diğer moleküler tekniklerin ayrılmaz bir tamamlayıcısı olarak kritik bir role sahiptir (Cunningham, 2002; Abdelsalam et al., 2023).

2.1. Agaroj Jel Elektrofözezi (DNA/RNA Analizi)

Agaroj jel elektrofözezi, DNA ve RNA moleküllerinin boyutlarına göre ayrılması ve görüntülenmesi amacıyla kullanılan temel laboratuvar tekniklerinden biridir. Balık hastalıklarının tanılanmasında, özellikle PCR ve RT-PCR ürünlerinin doğrulanmasında, patojenlerin genetik materyallerinin analizinde ve genotiplendirme çalışmalarında yaygın biçimde kullanılmaktadır (Sambrook & Russell, 2001; Hames, 1998).

Agaroj, deniz yosunlarından elde edilen doğrusal bir polisakkarittir ve suda çözüldükten sonra soğutularak jel formuna getirilir. Oluşan jel matriksi gözenekli bir yapı içerir ve bu gözeneklerin büyüklüğü, kullanılan agaroj yüzdesine bağlı olarak değişir. Düşük agaroj konsantrasyonları daha büyük DNA fragmentlerinin ayrımına, yüksek konsantrasyonlar ise küçük fragmentlerin ayrımına olanak tanır (Sambrook & Russell, 2001).

Elektroförez sırasında DNA ve RNA, fosfat omurgaları nedeniyle negatif yüklüdür ve elektrik alanı uygulandığında pozitif yüklü anoda doğru göç eder. Moleküllerin jel içindeki hareket hızını belirleyen başlıca faktörler DNA/RNA'nın moleküler boyutu, agaroj jel yüzdesi, uygulanan voltaj, tampon sistemi (TAE veya TBE), jelin sıcaklığı ve iyonik kuvvetidir (Hames, 1998; Westermeier, 2016).

Küçük DNA fragmanları jelin gözeneklerinden daha hızlı geçerken, büyük fragmentler daha yavaş ilerler. Elektroförez tamamlandığında jel, DNA'yı veya RNA'yı görünür kılmak için etidyum bromür, SYBR Safe, GelRed gibi floresan boyalar ile boyanır ve UV transillüminatörde görüntülenir. Böylece patojenlere ait PCR ürünlerinin beklenen büyüklükte olup olmadığı doğrulanır.

Agaroj jel elektrofözezi özellikle balık patojenlerinin tanısında yaygın bir doğrulama aracı olarak kullanılmaktadır. Örneğin *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum*,

Flavobacterium psychrophilum veya *Yersinia ruckeri* gibi bakteriyel ajanlara ait PCR ürünlerinin jel üzerinde görüntülenmesi, enfeksiyonun moleküler düzeyde tespiti için temel bir aşamadır (Ador et al., 2021; Abdelsalam et al., 2023). Ayrıca paraziter etkenlerin (örn. *Ichthyophthirius multifiliis*, *Myxobolus* spp.) tespitinde de PCR sonrası oluşan DNA bantlarının agaroz jelde analiz edilmesi sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir.

Agaroz jel elektroforezi, DNA ve RNA analizlerinde kolay uygulanabilir, düşük maliyetli ve güvenilir bir yöntem olması nedeniyle balık hastalıklarının tanılanmasında temel bir bileşen olmaya devam etmektedir. PCR ve RFLP gibi moleküler tekniklerle birlikte kullanıldığında tanısal doğruluk daha da artmakta, patojenlerin gerek tür düzeyinde gerekse genotip düzeyinde ayrımını mümkün kılmaktadır (Cunningham, 2002).

2.2. SDS-PAGE ile Protein Elektroforezi

SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis), proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılmasını sağlayan en yaygın elektroforetik yöntemdir. Balık hastalıklarının tanılanmasında protein temelli analizler, özellikle viral ve bakteriyel etkenlere ait özgül protein bantlarının belirlenmesi, antijen karakterizasyonu ve Western blot uygulamalarının ön basamağı olarak büyük önem taşır (Laemmli, 1970; Hames, 1998).

SDS-PAGE'in temel prensibi, proteinlerin SDS deterjanı ile kaplanarak negatif yük kazanmaları ve böylece doğal üç boyutlu yapı farklılıklarının ortadan kaldırılmasıdır. SDS, proteinlerin uzun polipeptit zincirlerine bağlanarak birim uzunluk başına sabit bir negatif yük sağlar. Böylece elektroforez sırasında proteinlerin jel içerisindeki hareketi yalnızca moleküler ağırlığa bağlı hâle gelir (Hames, 1998).

Bu yöntemde kullanılan poliakrilamid jel, agaroz jellere kıyasla daha küçük gözenek yapısına sahiptir ve yüksek çözünürlük sunar. Bu nedenle proteinlerin ve küçük DNA fragmentlerinin ayrılması için idealdir. Poliakrilamid jelin yüzdesi, hedef proteinlerin büyüklüğüne göre seçilir; düşük yüzdeli jeller büyük proteinler için, yüksek yüzdeli jeller ise küçük proteinler için tercih edilir (Westermeyer, 2016).

Balık hastalıklarının tanısında SDS-PAGE özellikle şu amaçlarla kullanılmaktadır (Cunningham, 2002; Altınok & Kurt, 2003):

1. Viral enfeksiyonlarda (örn. IHNV, VHSV, IPNV) virüsün yapısal proteinlerinin ayrımı,
2. Bakteriyel patojenlerde hücre duvarı ve membran proteinlerinin analiz edilmesi,
3. Balık patojenlerine özgü antijenlerin belirlenmesi,
4. Western blot ile özgül antikor yanıtlarının doğrulanması,
5. Toksin veya enzim gibi protein yapıdaki virülens faktörlerinin karakterizasyonu.

Jel elektroforezi sonrasında protein bantlarının görünür hâle gelmesi amacıyla Coomassie Brilliant Blue, Gümüş Boyama veya Western blot gibi yöntemler kullanılır. Western blot analizinde hedef proteinler nitroselüloz veya PVDF membranlara transfer edilerek spesifik antikorlarla tespit edilir. Özellikle viral balık hastalıklarında Western blot, doğru tanı ve doğrulama için standart yöntemlerden biridir (Cunningham, 2002).

SDS-PAGE ayrıca balık bağışıklık yanıtını değerlendirmek amacıyla da kullanılmaktadır. Örneğin, stres, enfeksiyon veya toksin maruziyetine bağlı olarak balıklarda belirli proteinlerin artışı veya azalması jel üzerinde doğrudan gözlemlenebilir. Bu yönüyle SDS-PAGE hem tanısal hem de

araştırma amaçlı balık hastalıkları çalışmalarında çok yönlü bir araçtır.

3. BALIK HASTALIKLARINDA JEL ELEKTROFOREZ KULLANIM ÖRNEKLERİ

Jel elektroforez teknikleri, balık hastalıklarının tanınmasında hem DNA/RNA bazlı moleküler yöntemlerin doğrulanmasında hem de protein temelli analizlerde kritik bir rol oynamaktadır. Aşağıda viral, bakteriyel ve paraziter hastalıklara yönelik jel elektroforez uygulamalarından seçilmiş örnekler sunulmuştur.

3.1. Bakteriyel Balık Hastalıklarında Jel Elektroforez Uygulamaları

Bakteriyel patojenlerin tanısında agaroz jel elektroforezi çoğunlukla PCR ve RFLP ürünlerinin doğrulanmasında kullanılır. Örneğin *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum*, *Edwardsiella tarda*, *Flavobacterium psychrophilum* ve *Yersinia ruckeri* gibi su ürünleri patojenlerinin tür ve suş düzeyinde tespiti, hedef gen bölgelerinin PCR ile amplifiye edilmesi ve agaroz jelde beklenen büyüklükte bantların görülmesiyle sağlanmaktadır (Abdelsalam et al., 2023; Ador et al., 2021).

Bazı bakteriyel patojenlerde RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) analizi ile tür ve suş ayrımı yapılmaktadır. Örneğin *Aeromonas* türlerinin 16S rRNA geninin restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonucu oluşan fragmentlerin agaroz jel elektroforezi ile ayrılması, tür düzeyinde ayırt edici bir yöntemdir (Altinok & Kurt, 2003).

Protein analizi açısından bakıldığında SDS-PAGE, bakteriyel patojenlerin hücre duvarı ve dış membran proteinlerinin karakterizasyonu için sık kullanılan bir yöntemdir. Özellikle streptokok enfeksiyonlarında (örn. *Streptococcus iniae*,

S. agalactiae), SDS-PAGE ile elde edilen protein bant profilleri hem patojenin tanısına hem de virülens faktörlerinin incelenmesine olanak sağlamaktadır (Cunningham, 2002).

3.2. Viral Balık Hastalıklarında Jel Elektroforez Uygulamaları

Balık virüslerinin tanısında elektroforezin en yaygın kullanımı, RT-PCR ürünlerinin agaroz jelde doğrulanmasıdır. Örneğin infeksiyöz hematopoietik nekroz virüsü (IHNV), viral hemorajik septisemi virüsü (VHSV) ve infeksiyöz pankreatik nekroz virüsü (IPNV) gibi RNA virüslerinin tanısında amplifiye edilen viral RNA fragmanları agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmektedir (Munir & Kibenge, 2004; Williamson et al., 1999).

Protein temelli analizlerde SDS-PAGE ve Western blot, viral yapısal proteinlerin ayırt edilmesi ve virüse özgü antijenlerin doğrulanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin IPNV'nin VP2 ve VP3 proteinlerinin SDS-PAGE ile ayrılması ve Western blot ile doğrulanması, laboratuvar tanısında standart bir uygulamadır (Cunningham, 2002).

Ayrıca bazı viral enfeksiyonlarda antiviral yanıtın incelenmesi amacıyla konak balık proteinleri de SDS-PAGE ile analiz edilmektedir. Stress proteinleri, interferon yanıt proteinleri veya inflamatuvar belirteçlerdeki değişiklikler jel üzerinde bant yoğunluğundaki farklarla değerlendirilebilir.

3.3. Paraziter Hastalıklarda Jel Elektroforez Uygulamaları

Paraziter balık hastalıklarının tanısında PCR sonrası agaroz jel elektroforezi önemli bir araçtır. Örneğin *Ichthyophthirius multifiliis* gibi protozoonlara ait 18S rRNA geninin PCR ile çoğaltılması ve jel elektroforezinde 200–300 bp

arası bantların gözlenmesi, enfeksiyonun doğrulanmasını sağlar (Guo et al., 2025).

Benzer şekilde *Myxobolus* ve *Henneguya* gibi Myxozoa üyelerinin tür ayrımı ve genotiplendirilmesinde PCR-RFLP ürünlerinin agaroz jelde ayrılması sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Restriksiyon enzimleri ile kesilen DNA fragmentleri türler arasında karakteristik bant desenleri oluşturur (Altınok & Kurt, 2003).

Protein temelli analizlerde SDS-PAGE, özellikle parazite özgü antijenlerin belirlenmesi ve aşı geliştirme çalışmalarında antijenik proteinlerin ayrılması için kullanılmaktadır. Parazitlerin yüzey proteinleri veya sekrete/eksrete edilen proteinleri SDS-PAGE ile ayrılarak Western blot uygulamalarına temel oluşturur.

4. JEL ELEKTROFOREZ YÖNTEMİNİN AVANTAJ VE DEZAVANTAJLARI

Jel elektroforezi, balık hastalıklarının tanılanmasında moleküler analizlerin doğrulanması, protein profillerinin belirlenmesi ve patojenlerin karakterizasyonu açısından vazgeçilmez bir tekniktir. Bununla birlikte, her bilimsel yöntem gibi belirli güçlü yönleri ve sınırlılıklara sahiptir. Bu bölümde agaroz jel elektroforezi ve SDS-PAGE yöntemlerinin avantajları ile sınırlılıkları bilimsel literatür çerçevesinde değerlendirilmiştir.

4.1. Jel Elektroforez Yöntemlerinin Avantajları

1. Kolay uygulanabilirlik ve düşük maliyet: Agaroz ve poliakrilamid jel elektroforezi, çoğu laboratuvarla kolaylıkla uygulanabilen ve yüksek teknolojik altyapı gerektirmeyen yöntemlerdir. Reaktif ve ekipman maliyetlerinin nispeten düşük olması nedeniyle hem araştırma hem de rutin tanı laboratuvarlarında yaygın

biçimde kullanılır (Sambrook & Russell, 2001; Hames, 1998).

2. Moleküllerin doğrudan görsel analizi: DNA, RNA ve protein bantlarının jel üzerinde doğrudan görüntülenmesi, sonuçların hızlı ve net biçimde değerlendirilmesini sağlar. Özellikle PCR sonrası ürün doğrulaması, agaroz jel elektroforezinin en güçlü kullanım alanlarından biridir (Westermeier, 2016).
3. Yüksek ayırma gücü: Poliakrilamid jeller (SDS-PAGE), proteinlerin yüksek çözünürlükle ayrılmasına olanak tanır. Bu özellik viral ve bakteriyel patojenlerin protein profillerinin belirlenmesi, antijen tespiti ve Western blot hazırlığı için büyük avantaj sunar (Laemmli, 1970; Cunningham, 2002).
4. Çok yönlülük: Jel elektroforezi, balık hastalıklarının tanısında birçok amaçla kullanılabilir. Bunlar PCR ve RT-PCR ürünlerinin doğrulanması, DNA fragman analizi ve RFLP, Suş ve tür düzeyinde genetik ayırım, Proteinlerin ayrılması ve Western blot, Parazit DNA'sının genotiplendirilmesi şeklinde sıralanabilir. Bu çok yönlülük, elektroforezi tanısal süreçlerin temel bileşeni hâline getirmektedir (Altinok & Kurt, 2003).
5. Moleküler biyoloji teknikleriyle entegrasyon: PCR, RT-PCR, RFLP, sekanslama ve Western blot gibi ileri tekniklerle birlikte kullanılabilir. Bu entegrasyon tanısal güvenilirliği artırır (Cunningham, 2002).

4.2. Jel Elektroforez Yöntemlerinin Sınırlılıkları

1. Düşük duyarlılık: Agaroz jel elektroforezi, çok düşük konsantrasyondaki DNA/RNA'yı tespit etmekte sınırlıdır. Bu nedenle düşük yükte patojen varlığının doğrulanması için tek başına yeterli olmayabilir (Westermeier, 2016).

Fluorofor boyalar duyarlılığı artırsa da qPCR kadar hassas değildir.

2. Nitel veri sunar (kantitatif değildir): Jel elektroforez genellikle sadece var/yok şeklinde nitel bilgi sunar. Bant yoğunluğu kabaca miktara işaret etse de kantitatif değerlendirmelerde güvenilir değildir (Hames, 1998). Bu nedenle viral yük, bakteri yoğunluğu gibi ölçümler için qPCR gibi teknikler gereklidir.
3. Protein analizlerinde spesifiklik sınırlıdır: SDS-PAGE proteinleri boyutlarına göre ayırır, ancak spesifik protein tanımlaması yapamaz. Bu nedenle özgül antijen doğrulaması için Western blot gibi ek yöntemler gereklidir (Cunningham, 2002).
4. Poliakrilamid toksisitesi: Poliakrilamid jel hazırlanmasında kullanılan akrilamid nörotoksik bir maddedir ve dikkatli işlem gerektirir (Westermeier, 2016). Bu, SDS-PAGE'in laboratuvar güvenliği açısından sınırlayıcı bir yönüdür.
5. Büyük DNA fragmanlarının çözünürlüğü sınırlıdır: Agaroz jeller, özellikle çok büyük DNA fragmanlarını (>20 kb) ayırtırmakta yeterli değildir. Bu tür analizler için pulse-field gel electrophoresis (PFGE) gibi özel tekniklere ihtiyaç duyulur (Sambrook & Russell, 2001).
6. Sonuçların yorumlanması deneyim gerektirir: Bant paternlerinin doğru yorumlanması, hatalı yükleme, jelde diffüzyon, yanlış voltaj veya aşırı ısınma gibi teknik sorunlar deneyimsiz personel için hatalara yol açabilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Jel elektroforez yöntemleri, balık hastalıklarının tanılanmasında hem DNA/RNA hem de protein temelli

analizlerin ayrılmaz bir parçası hâline gelmiştir. Agaroz jel elektroforezi, PCR ve RT-PCR ürünlerinin doğrulanması, RFLP analizleri ve patojenlerin genetik düzeyde ayrımı için hızlı, güvenilir ve düşük maliyetli bir araç sunmaktadır. SDS-PAGE ise viral ve bakteriyel patojenlere ait proteinlerin ayrılması, antijenik yapıların karakterizasyonu ve Western blot uygulamalarının temelini oluşturan yüksek çözünürlüklü bir teknik olarak balık hastalıklarının tanısında önemli bir yere sahiptir. Bu iki yöntemin bir arada kullanılması, balık patojenlerinin hem genetik hem de protein düzeyinde çok boyutlu olarak değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır.

Günümüzde jel elektroforez yöntemleri çoğunlukla PCR, qPCR, RT-PCR, RFLP, Western blot ve diğer moleküler tanı teknikleri ile entegre kullanılmakta; böylece tanısal doğruluk ve güvenilirlik artırılmaktadır. Bununla birlikte elektroforez tekniklerinin duyarlılık sınırları, nitel veri sunmaları ve ileri analizler için ek yöntemler gerektirmeleri, özellikle modern moleküler tanı yaklaşımlarında dikkat edilmesi gereken sınırlılıklardır. Yine de hem araştırma laboratuvarlarında hem de rutin tanı birimlerinde elektroforez, maliyet etkinliği ve pratik uygulanabilirliği sayesinde vazgeçilmez bir araç olmayı sürdürmektedir.

Balık hastalıklarının tanılanmasında elektroforez yöntemlerinin daha etkin kullanılabilmesi için aşağıdaki öneriler dikkate alınmalıdır:

1. Elektroforez, PCR ve diğer moleküler tanı teknikleriyle birlikte kullanılmalıdır. Tanısal doğruluğun artırılması için agaroz jel elektroforezi mutlaka PCR ürünlerinin rutin doğrulama adımı olarak uygulanmalıdır.
2. Kantitatif analiz gerektiren durumlarda elektroforez tek başına kullanılmamalıdır. Viral yük, bakteri yoğunluğu

gibi ölçümler için qPCR veya dijital PCR gibi ileri tekniklere başvurulmalıdır.

3. Protein bazlı tanılarda SDS-PAGE ve Western blot birlikte kullanılmalıdır. SDS-PAGE tek başına spesifik protein tespiti sağlayamayacağından antijen doğrulaması Western blot ile desteklenmelidir.
4. Paraziter hastalıklarda PCR-RFLP ile jel elektroforez kombinasyonu tercih edilmelidir. Morfolojik olarak benzer türlerin ayırımında genetik bant desenleri yüksek çözünürlük sağlar.
5. Laboratuvar güvenliği ihmal edilmemelidir. Akrilamid toksik bir madde olduğundan SDS-PAGE jel hazırlığında gerekli güvenlik önlemleri alınmalıdır.
6. Jel görüntüleme ve bant analizi deneyimli personel tarafından yapılmalıdır. Hatalı yükleme, jel difüzyonu veya yanlış voltaj uygulamaları sonuçların güvenilirliğini olumsuz etkileyebilir.

Sonuç olarak jel elektroforez, balık hastalıklarının tanılanmasında uzun yıllardır kullanılan, etkinliği kanıtlanmış, moleküler tanı süreçlerinin temel yapı taşlarından biri olmaya devam eden güçlü bir laboratuvar yöntemidir. Gelişen moleküler tanı teknikleriyle uyumlu şekilde kullanıldığında hem pratik hem de bilimsel açıdan yüksek değer sunmaktadır.

KAYNAKÇA

- Abdelsalam, M., Elgendy, M. Y., Elfadadny, M. R., Ali, S. S., Sherif, A. H., & Abolghait, S. K. (2023). A review of molecular diagnoses of bacterial fish diseases. *Aquaculture International*, 31(1), 417–434. doi:10.1007/s10499-022-00983-8
- Ador, M. A. A., Haque, M. S., Paul, S. I., Chakma, J., Ehsan, R., & Rahman, A. (2021). Potential application of PCR based molecular methods in fish pathogen identification: A review. *Aquaculture Studies*, 22(1), Article 621.
- Altinok, İ., & Kurt, İ. (2003). Molecular diagnosis of fish diseases: A review. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 3(2), 131–138.
- Cunningham, C. O. (2002). Molecular diagnosis of fish and shellfish diseases: Present status and potential use in disease control. *Aquaculture*, 206(1–2), 21–35. doi:10.1016/S0044-8486(01)00717-8
- Guo, S.-Q., Fu, Y.-W., Hou, T.-L., Huang, S.-L., & Zhang, Q.-Z. (2025). Establishment and application of TaqMan probe-based quantitative real-time PCR for rapid detection and quantification of *Ichthyophthirius multifiliis* in farming environments and fish tissues. *Veterinary Parasitology*, 334, 110381. doi:10.1016/j.vetpar.2024.110381
- Hames, B. D. (1998). *Gel electrophoresis of proteins: A practical approach*. Oxford University Press.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. doi:10.1038/227680a0
- Munir, K., & Kibenge, F. S. B. (2004). Detection of infectious salmon anaemia virus by real-time RT-PCR. *Journal of*

Virological Methods, 117(1), 37–47.
doi:10.1016/j.jviromet.2003.11.020

Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Westermeier, R. (2016). *Electrophoresis in practice: A guide to methods and applications of DNA and protein separations*. Wiley-VCH.

Williams, K., Blake, S., Sweeney, A., Singer, J. T., & Nicholson, B. L. (1999). Multiplex reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three fish viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(12), 4139–4141.
doi:10.1128/jcm.37.12.4139-4141.1999

BALIK HASTALIKLARININ TANILANMASINDA POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR) KULLANIMI

Serpil MİŞE YONAR¹

M. Enis YONAR²

1. GİRİŞ

Balık yetiştiriciliği, dünya çapında artan tüketim talepleri, çevresel baskılar ve biyolojik risklerin çoğalmasıyla birlikte sürekli bir gelişim içerisinde. Bu büyüme beraberinde bir yandan üretim kapasitesini artırırken, diğer yandan da yoğun kültür koşulları, taşımacılık, stres faktörleri ve patojenlerin yayılması gibi ciddi zorlukları gündeme getirmiştir. Özellikle su ürünleri sektöründe, görünürde sağlıklı görünen bireylerin taşıyıcı olması, enfeksiyonların sessizce yayılması ve klasik tanı yöntemlerinin çoğu kez geç kalması, verim kayıplarının, ekonomik zararın ve çevresel olumsuz etkilerin artmasına yol açmaktadır. Bu bağlamda, hastalık yönetiminin etkinliği; erken, doğru ve güvenilir tanı ile doğrudan ilişkilidir.

Geleneksel yöntemler, serolojik analizler, mikroskopik inceleme, patolojik bulgular ya da kültürleme birçok durumda yeterli kalmaktadır ancak özellikle latent enfeksiyonlarda, düşük biyoyüklü etkenlerde veya kültürlemesi zor ajanlarda sınırlamalara sahiptir. Örneğin klasik kültür teknikleri haftalar sürebilirken, baskın olmayan enfeksiyonlarda negatif sonuç

¹ Prof. Dr. Fırat Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, ORCID: 0000-0003-2736-5731.

² Prof. Dr. Fırat Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, ORCID: 0000-0001-9519-4247.

vermesi yanılığa sebep olabilir. Bu nedenle, son yıllarda moleküler biyoteknolojik yaklaşımlar özellikle ön plana çıkmıştır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) tabanlı teknikler, çok küçük miktardaki genetik materyali amplifiye edebilme kapasitesi sayesinde, yüksek duyarlılık ve özgüllük ile tanı koyabilme imkânı sunmaktadır. PCR ve türevleri, bakteriyel, viral, paraziter ya da mantar kökenli balık patojenlerinin tanısında hem laboratuvar hem saha koşullarında yaygın biçimde kullanılmaktadır (Ador vd., 2021; Abdelsalam vd., 2023).

Bu araştırmada; balık hastalıklarının tanılanmasında kullanılan PCR metodolojilerine genel bakış sunulması, spesifik balık patojenlerine ilişkin moleküler tanı uygulamaları, PCR'ın avantajları ve sınırlılıklarının ele alınması, son olarak da yeni nesil moleküler tekniklerin (örneğin real-time PCR, eDNA analizleri, metagenomik yaklaşımlar) su ürünleri sağlık yönetimindeki rolü tartışılacaktır. Böylece su ürünleri yetiştiriciliğinde modern tanı tekniklerinin teorik temelleri, uygulama potansiyeli ve saha uygulamaları konusunda kapsamlı bir bakış açısı kazandırılmış olunacaktır.

2. PCR YÖNTEMİ VE TEMEL İLKELERİ

PCR, ilk kez Kary Mullis tarafından 1983 yılında geliştirilmiş ve moleküler biyoloji alanında devrim yaratan bir DNA çoğaltma tekniği olarak tanımlanmıştır (Mullis, 1990). PCR'ın temel çalışma prensibi, bir DNA dizisinin in vitro ortamda seçici olarak milyonlarca kopyaya çıkarılmasına dayanır. Bu yöntem, başlangıç materyali çok düşük miktarda olsa bile hedef DNA dizisinin üstel biçimde çoğaltılmasına olanak sağlar. Böylece PCR, özellikle klasik tanı yöntemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda yüksek duyarlılıkla tanı koyma imkânı sunar (Saiki vd., 1988).

PCR denatürasyon, primer bağlanması (annealing) ve uzama (extension) olmak üzere üç aşamalı bir döngü yapısı üzerine kuruludur. Denatürasyon aşamasında DNA 94–95 °C’de tek iplikli hâle gelir. Ardından annealing aşamasında primerler yaklaşık 50–65 °C aralığında hedef bölgeye bağlanır. Son aşama olan uzamada ise 68–72 °C’de DNA polimeraz enzimi yeni DNA zincirini sentezler (Lorenz, 2012). Bu üç aşamanın 25–40 kez tekrarlanması, hedef DNA’nın milyonlarca kopyaya ulaşmasını sağlar.

PCR reaksiyonunun başarıyla yürütülebilmesi için DNA polimeraz, özgül primerler, dNTP’ler, magnezyum iyonu (Mg^{2+}) içeren tamponlar ve uygun kalite-dezenfeksiyon koşullarında izole edilmiş şablon DNA gereklidir. İlk PCR çalışmalarında kullanılan Taq DNA polimeraz, yüksek sıcaklıklara dayanıklı olması nedeniyle PCR’ın pratikleşmesinde kritik bir rol oynamıştır (Mullis, 1990). DNA polimerazın yüksek sıcaklıkta işlevini sürdürebilmesi, her döngüde enzimin yeniden eklenmesi ihtiyacını ortadan kaldırmış ve yöntemin yaygınlaşmasını sağlamıştır.

PCR zamanla gelişerek farklı varyantların ortaya çıkmasına yol açmıştır. Nested PCR daha yüksek duyarlılık sunarken; multiplex PCR, tek reaksiyonda birden fazla patojenin eş zamanlı tespit edilmesine olanak verir. Reverse transcriptase PCR (RT-PCR) RNA virüslerinin (IPNV, VHSV, KHV) tanısında vazgeçilmezdir. Real-time PCR (qPCR) ise amplifikasyonun eşzamanlı izlenmesini sağlayarak yalnızca patojenin varlığını değil, aynı zamanda viral veya bakteriyel yükü de nicel olarak belirleyebilme avantajı sunar (Mackay vd., 2002). Bu özellikler, PCR’ı özellikle su ürünleri yetiştiriciliğinde bakteriyel, viral ve paraziter etkenlerin tanısında temel bir araç haline getirmiştir (Jaies vd., 2024).

2.1. PCR'nin Temel Aşamaları

PCR, belirli bir DNA bölgesinin kontrollü sıcaklık değişimleri altında tekrar eden döngülerle çoğaltılmasını sağlayan bir moleküler biyoloji yöntemidir. PCR aşamalarının doğru şekilde optimize edilmesi, amplifikasyonun özgüllüğü ve verimliliği açısından kritik öneme sahiptir (Saiki vd., 1988; Lorenz, 2012).

Denatürasyon aşaması, çift iplikli DNA'nın 94–95 °C'de tek iplikli hâle getirildiği adımdır. Yüksek sıcaklık, DNA iplikleri arasındaki hidrojen bağlarını kırarak primerlerin bağlanacağı hedef bölgelerin açılmasını sağlar. İlk döngüde genellikle daha uzun süren bir başlangıç denatürasyonu uygulanır. Yetersiz denatürasyon, çift ipliklerin tam açılmamasına ve amplifikasyon veriminin düşmesine yol açabilir (Lorenz, 2012).

İkinci aşama olan annealing, primerlerin tek iplikli DNA üzerine bağlandığı adımdır. Bu aşama genellikle 50–65 °C sıcaklık aralığında gerçekleşir ve primerlerin erime sıcaklığına (T_m) göre optimize edilir. Annealing sıcaklığı PCR'ın özgüllüğünü belirleyen en önemli faktörlerden biridir; düşük sıcaklık non-spesifik bağlanmaya yol açabilirken, yüksek sıcaklık primer bağlanmasını engelleyebilir (Saiki vd., 1988). Balık hastalıklarında kullanılan PCR protokollerinde annealing sıcaklığı, patojenler arası genetik benzerlik nedeniyle özellikle hassas şekilde belirlenmelidir (Jaies vd., 2024).

Üçüncü aşama olan uzama (extension), DNA polimerazın primerin ucundan başlayarak yeni DNA zincirini sentezlediği adımdır. Taq DNA polimeraz için optimum sıcaklık yaklaşık 72 °C'dir. Uzama süresi, hedef DNA bölgesinin uzunluğuna bağlı olarak genellikle 1 kb başına bir dakika olacak şekilde ayarlanır. Uzama aşamasının doğru ayarlanması, tam uzunlukta ve yüksek miktarda PCR ürünü elde edilmesi açısından temel öneme sahiptir (Mullis, 1990; Lorenz, 2012).

Bu üç aşama bir döngü oluşturur ve tipik bir PCR reaksiyonu 25–40 döngü arasında gerçekleştirilir. Son olarak, reaksiyonlarda tamamlanmamış DNA zincirlerinin sentezini tamamlamak amacıyla genellikle 72 °C’de birkaç dakikalık bir final extension uygulanır. PCR’ın döngüsel yapısı, başlangıçta çok düşük miktarda bulunan DNA dizisinin bile üstel şekilde çoğaltılmasını mümkün kılar, bu da yöntemi özellikle balık patojenlerinin erken ve duyarlı tanısı için vazgeçilmez kılmaktadır (Mackay vd., 2002; Jaies vd., 2024).

2.2. PCR Varyantları

2.2.1. Real-Time PCR (qPCR)

Real-Time PCR, amplifikasyonun floresan işaretleyiciler aracılığıyla eş zamanlı olarak izlenmesini sağlayan bir yöntemdir. Mackay ve arkadaşlarının (2002) belirttiği üzere qPCR hem duyarlılık hem de özgüllük açısından klasik PCR’ın ötesine geçmekte, ayrıca Ct değerleri üzerinden kantitatif değerlendirme yapılmasına imkân tanımaktadır. Bu nedenle qPCR günümüzde tanı, gen ekspresyon analizi ve kantitatif ölçümlerde yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.2.2. Nested PCR

Nested PCR, iki aşamalı bir amplifikasyon yapısı içerir. İlk aşamada geniş bir hedef bölge amplifiye edilir; ikinci aşamada ise bu bölgenin iç kısmına bağlanan yeni primerler kullanılır. Lorenz (2012), nested PCR’ın düşük kopya sayılı hedeflerin tespitinde duyarlılığı önemli ölçüde artırdığını ve non-spesifik amplifikasyonu azalttığını vurgulamaktadır. Bu yönüyle nested PCR, özellikle zor hedeflerde yüksek duyarlılık sağlar.

2.2.3. Multipleks PCR

Multipleks PCR, aynı reaksiyon tüpünde birden fazla primer setinin kullanılmasıyla birden çok hedef dizinin eş zamanlı amplifikasyonuna olanak tanır. Lorenz (2012), multiplex

PCR'ın zaman ve maliyet tasarrufu sağladığını, ancak primerler arası uyumun bu yöntem için kritik olduğunu belirtmektedir. Bu teknik özellikle çoklu gen analizi ve tarama çalışmalarında önemli avantaj sağlar (Türe vd., 2012).

2.2.4. Dijital PCR (dPCR)

Dijital PCR, DNA'nın çok sayıda küçük hacme bölündüğü ve her bölmenin pozitif/negatif olarak değerlendirildiği ileri bir kantitatif yöntemdir. Huggett ve Whale (2013), dPCR'ın çok düşük kopya sayılarının mutlak kantitasyonunda son derece hassas olduğunu bildirmektedir. Ct değerine ihtiyaç duymadan doğrudan kantitatif sonuç vermesi bu yöntemi modern moleküler biyolojinin en güçlü araçlarından biri yapmaktadır.

2.2.5. Hot-Start PCR

Hot-Start PCR, polimerazın reaksiyonun başlangıcında inaktif olduğu ve yalnızca yüksek sıcaklıkla aktive edildiği bir yöntemdir. Bu yaklaşım, primer-dimer oluşumunu ve düşük sıcaklıkta görülebilecek non-spesifik bağlanmaları azaltır (Lorenz, 2012). Bu sayede PCR özgüllüğü ve verimi artmaktadır.

2.2.6. Touchdown PCR

Touchdown PCR'da annealing sıcaklığı yüksek bir değerle başlar ve döngüler ilerledikçe kademeli olarak düşürülür. Lorenz (2012), bu yöntemin özgüllüğü artırırken aynı zamanda verimi de optimize ettiğini belirtmiştir. Özellikle zorlu primer tasarımlarında yaygın biçimde kullanılmaktadır.

2.2.7. LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification)

LAMP, PCR'dan farklı olarak sabit sıcaklıkta (60–65 °C) çalışan izotermal bir amplifikasyon yöntemidir. Notomi ve arkadaşları (2000), LAMP'ın hızlı, yüksek verimli ve termal döngü cihazı gerektirmeyen bir yöntem olduğunu rapor

etmişlerdir. Sahada kullanılabilirliği ve hızlı sonuç vermesi bu yöntemi mobil tanı sistemlerinde önemli bir seçenek hâline getirmiştir.

2.2.8. High-Fidelity PCR

High-Fidelity PCR, hata oranı düşük olan yüksek doğruluklu polimerazların (örneğin Pfu, Phusion) kullanıldığı bir PCR türüdür. Lorenz (2012), bu enzimlerin doğruluk oranının Taq polimeraza göre çok daha yüksek olduğunu ve klonlama ile dizileme gibi hata toleransı düşük uygulamalarda tercih edildiğini vurgulamaktadır.

2.3. PCR'ın Avantajları ve Sınırlılıkları

PCR, moleküler biyolojide devrim niteliğinde bir yöntem olarak kabul edilmekte ve balık hastalıklarının tanısında modern su ürünleri sağlığının temel araçlarından biri olarak kullanılmaktadır. Yöntem; yüksek duyarlılık, özgüllük ve hız gibi belirgin avantajlara sahip olmakla birlikte, doğru uygulanmadığında çeşitli teknik sınırlılıklar da içermektedir. Bu nedenle PCR'ın avantajlarının ve sınırlamalarının doğru şekilde değerlendirilmesi, balık hastalıkları tanı protokollerinin etkinliği açısından kritik öneme sahiptir.

2.3.1. PCR'ın Avantajları

PCR'ın en önemli avantajı yüksek duyarlılığıdır. Yöntem, hedef DNA'nın 2.3.23.çok düşük kopya sayılarını bile tespit edebilmekte, hatta bazı durumlarda tek bir hücreden elde edilen DNA amplifiye edilebilmektedir. Mackay ve arkadaşları (2002), real-time PCR'ın özellikle viral etkenlerde düşük yoğunluklu enfeksiyonların erken dönemde güvenilir şekilde belirlenmesine olanak sağladığını vurgulamıştır.

Bir diğer önemli avantaj yüksek özgüllüktür. Primerlerin patojene özgü bölgeleri hedeflemesi sayesinde PCR, morfolojik olarak benzer türleri ayırt edebilmekte ve yanlış tanı olasılığını

azaltmaktadır. Bu özellik, özellikle *Aeromonas*, *Flavobacterium* ve *Myxobolus* gibi türler arası benzerliğin yüksek olduğu patojen gruplarında kritik rol oynamaktadır (Jaies vd., 2024).

PCR'ın hızlı sonuç verme kapasitesi de tanıda büyük kolaylık sağlar. Klasik kültürleme yöntemleri günler veya haftalar sürebilirken PCR ile birkaç saat içinde sonuç elde edilebilmektedir. OIE (2021), özellikle akut mortalitelerin yaşandığı viral salgınlarda PCR'ın hızlı tanı imkânı sayesinde kontrol önlemlerinin zamanında uygulanabildiğini bildirmektedir.

PCR aynı zamanda genetik karakterizasyon, genotiplendirme, virülens belirteçlerinin analizi, antibiyotik direnç genlerinin tespiti ve epidemiyolojik sürveyans gibi ileri uygulamalarda da kullanılarak balık hastalıklarının araştırılmasında çok yönlü bir araç görevi görmektedir. Bu çok amaçlı kullanım kapasitesi, PCR'ı diğer tanı yöntemlerinden ayıran önemli bir avantajdır (Jaies vd., 2024).

2.3.2. PCR'ın Sınırlılıkları

PCR her ne kadar son derece güçlü bir teknik olsa da bazı sınırlılıkları bulunmaktadır. En önemli sınırlılıklardan biri kontaminasyona duyarlılıktır. Huggett ve Whale (2013), PCR'ın düşük DNA kopyalarını bile amplifiye edebilme kapasitesinin, çevresel DNA kontaminasyonunu yanlış pozitif sonuçlara dönüştürebileceğini ve bu nedenle dikkatli laboratuvar uygulamalarının zorunlu olduğunu belirtmiştir.

Bir diğer önemli sınırlılık inhibitör maddelerin varlığıdır. Balık dokuları, mukus, bağırsak içeriği ve çevresel su örnekleri, DNA polimeraz aktivitesini baskılayan inhibitörler içerebilir. Mackay ve arkadaşları (2002), özellikle su ve doku örneklerinde PCR başarısızlığının en yaygın nedenlerinden birinin inhibitör varlığı olduğunu rapor etmiştir. Bu nedenle DNA izolasyon protokollerinin doğru uygulanması büyük önem taşır.

PCR'ın başka bir sınırlılığı yalnızca hedef DNA'nın varlığını göstermesi, ancak enfeksiyonun aktif olup olmadığını ayırt edememesidir. Ölü patojenlere ait DNA'nın da tespit edilebilmesi, bazı durumlarda biyolojik açıdan yanlış yorumlamalara yol açabilir (OIE, 2021). Bu nedenle aktif enfeksiyonun değerlendirilmesi gerektiğinde PCR sonuçları klinik bulgular ve histopatolojik incelemelerle birlikte yorumlanmalıdır.

Ayrıca PCR, primer tasarımına bağımlı bir tekniktir. Yanlış tasarlanmış primerler özgüllüğü azaltabilir, yanlış negatif ya da yanlış pozitif sonuçlara yol açabilir. Primer bölgelerindeki mutasyonlar da hedef patojenin tespit edilmesini engelleyebilir (Lorenz, 2012). Bu durum özellikle hızlı mutasyon geçiren RNA virüslerinde dikkat edilmesi gereken bir konudur.

PCR ayrıca niteliksel bir yöntem olup, klasik PCR ile yalnızca DNA'nın varlığı tespit edilir; enfeksiyon yoğunluğu hakkında bilgi vermez. Bu sınırlılık real-time PCR (qPCR) gibi kantitatif tekniklerle aşılabilmektedir (Mackay vd., 2002).

2.4. PCR Optimizasyonu ve Sık Karşılaşılan Hatalar

PCR, yüksek duyarlılığa sahip bir moleküler tanı yöntemi olup, doğru optimize edilmediğinde yanlış negatif, yanlış pozitif veya non-spesifik amplifikasyon gibi çeşitli sorunlara yol açabilir. PCR reaksiyonunun verimliliği primer tasarımı, enzim seçimi, iyon konsantrasyonu ve döngü sıcaklıkları gibi birçok parametreye bağlıdır. Bu nedenle PCR optimizasyonu, güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar için kritik öneme sahiptir (Lorenz, 2012).

PCR'ın özgüllüğünü belirleyen en temel unsur primer tasarımıdır. Uygun primerler genellikle 18–25 baz uzunluğunda olur, % 40 – 60 oranında GC içeriğine sahiptir ve saç tokası yapıları, primer-dimer veya heterodimer oluşumuna yol açabilecek tamamlayıcı diziler bulundurmaz. Primerlerin benzer

erime sıcaklıklarına (T_m) sahip olması özgül bağlanmayı güçlendirir. Primer tasarımıındaki küçük hataların bile amplifikasyonun tamamen başarısız olmasına yol açabileceği bilinmektedir (Lorenz, 2012).

Mg^{2+} , DNA polimeraz aktivitesi için gerekli bir kofaktördür. Mg^{2+} konsantrasyonu düşük olduğunda amplifikasyon verimi azalırken, yüksek olduğunda non-spesifik ürün oluşumu artmaktadır. Bu nedenle Mg^{2+} miktarının optimize edilmesi PCR reaksiyonunun başarısında belirleyicidir (Lorenz, 2012).

Annealing sıcaklığı, primerlerin hedef DNA'ya bağlanmasını sağlayan kritik bir parametredir. Saiki ve arkadaşları (1988), annealing sıcaklığının özgüllük üzerinde en büyük etkiye sahip faktör olduğunu belirtmiştir. Düşük annealing sıcaklıkları non-spesifik bağlanmalara yol açarken, yüksek sıcaklıklar primer bağlanmasını engelleyebilir ve amplifikasyon başarısız olur.

PCR'da kullanılan polimeraz türü de sonuçları doğrudan etkiler. Taq polimeraz rutin çalışmalar için yaygın olarak kullanılırken, hata oranı daha düşük olan high-fidelity enzimler (örneğin Pfu veya Phusion) klonlama ve dizileme gibi doğruluk gerektiren uygulamalarda tercih edilmektedir. Enzim seçimi yapılırken hedef DNA uzunluğu, istenen doğruluk düzeyi ve numune kalitesi dikkate alınmalıdır (Lorenz, 2012).

PCR döngü sayısı genellikle 25–40 arasında seçilmektedir. Döngü sayısının fazla olması primer-dimer ve non-spesifik ürün oluşumuna yol açabilir. Döngü sayısının yetersiz olması ise zayıf bant oluşumuna neden olur. Döngü sayısı ile verim arasındaki bu ilişki Mackay ve arkadaşları (2002) tarafından detaylı şekilde ele alınmıştır.

PCR sırasında karşılaşılan hatalar arasında en yaygın olanlarından biri non-spesifik ürün ve primer-dimer oluşumdur.

Bu durum çoğunlukla düşük annealing sıcaklığı, yüksek Mg^{2+} miktarı veya primerlerin uygunsuz tasarlanmasından kaynaklanır. Hot-Start PCR enzimlerinin kullanılması ve sıcaklık optimizasyonu non-spesifik amplifikasyon riskini azaltmaktadır (Lorenz, 2012).

Yanlış negatif sonuçlar ise genellikle DNA izolasyonunda inhibitör maddelerin kalması, şablon DNA'nın yetersizliği veya primerlerin hedef diziyi tanımaması gibi nedenlerle ortaya çıkar. Mackay ve arkadaşları (2002) özellikle biyolojik numunelerde inhibitör varlığının PCR başarısızlığının başlıca nedenlerinden biri olduğunu vurgulamıştır.

Yanlış pozitif sonuçlar çoğunlukla kontaminasyon kaynaklıdır. Aerosoller, önceki PCR ürünlerinin laboratuvar ortamına karışması veya steril olmayan çalışma koşulları yanlış pozitif etkilere yol açabilir. Huggett ve Whale (2013), özellikle qPCR ve dPCR gibi yüksek duyarlılıklı yöntemlerde kontaminasyon önlemlerinin zorunlu olduğunu bildirmiştir.

Ek olarak, DNA'nın yanlış saklama koşullarında bozunması veya tekrar eden dondurup-çözme işlemleri nedeniyle DNA degradasyonu görülür ve bu durum amplifikasyon verimini düşürür. Zayıf veya hiç oluşmayan bantlar, düşük primer konsantrasyonu, yetersiz Mg^{2+} miktarı veya uzama süresinin kısa olması gibi nedenlerle ilişkilendirilebilir.

Sonuç olarak PCR optimizasyonu; primer tasarımı, Mg^{2+} konsantrasyonu, enzim seçimi ve sıcaklık döngülerinin dikkatlice ayarlanmasıyla sağlanır. Bu parametreler doğru optimize edilmediğinde PCR'ın yüksek duyarlılığı bir dezavantaj haline gelerek çeşitli hatalar ortaya çıkabilir. Ancak uygun optimizasyon stratejileri ile PCR modern moleküler biyolojinin en güvenilir yöntemlerinden biri olmaya devam etmektedir.

3. BALIK HASTALIKLARI VE PCR'IN KULLANIM ALANLARI

Su ürünleri yetiştiriciliğinin küresel ölçekte hızla büyümesi, balık hastalıklarının erken dönemde doğru şekilde tanınmasını daha da önemli hâle getirmiştir. Bakteriyel, viral, paraziter ve mantar kaynaklı patojenlerin çoğu, klinik belirti göstermeden popülasyonda yayılım gösterebilmekte; bu durum ekonomik kayıplara, mortalite artışına ve yetiştiricilik performansında ciddi düşüşlere yol açmaktadır. Bu nedenle balık hastalıklarının tanısında hızlı, duyarlı ve özgül moleküler yöntemlere olan ihtiyaç gün geçtikçe artmaktadır. PCR, bu gereksinimi karşılayan en etkili tekniklerden biri olarak kabul edilmektedir (Mackay vd., 2002; Jaies vd., 2024).

PCR, balık patojenlerinin genomik materyallerinin düşük yoğunluklarda bile tespit edilebilmesini sağlayan yüksek duyarlılıklı bir yöntemdir. Jaies vd. (2024), PCR'ın özellikle latent enfeksiyonların erken saptanmasında klasik yöntemlere göre çok daha üstün olduğunu ve kültürle üretilmeyen ya da zor üretilen patojenlerin tanısında vazgeçilmez hâle geldiğini belirtmektedir. Patojenlerin çoğunun fenotipik olarak benzer belirtiler oluşturmaması, morfolojik ya da kültür temelli tanı yöntemlerinin yetersiz kalmasına yol açmaktadır. PCR ise patojenlere özgü gen bölgelerini hedef alarak yüksek özgüllükle sonuç verebilmekte, böylece yanlış tanı riskini en aza indirmektedir (Mackay vd., 2002).

Viral enfeksiyonlar birçok balık türünde yaygın ve yıkıcı etkiler gösterebilmektedir. Örneğin koi herpesvirüsü (KHV), viral hemorajik septisemi virüsü (VHSV), enfeksiyöz hematopoietik nekroz virüsü (IHNV) ve ipomaviruslar gibi RNA ve DNA virüslerinin tanısında RT-PCR ve konvansiyonel PCR protokollerinin temel yöntemler arasında yer aldığı bildirilmiştir (OIE, 2021). Viral patojenlerin hızlı yayılımı dikkate alındığında,

PCR'ın yüksek duyarlılığı sayesinde hastalığın erken aşamada tespit edilmesi, karantina ve kontrol önlemlerinin zamanında uygulanmasına olanak sağlamaktadır.

Bakteriyel hastalıklar da kültürlenme yöntemlerinin sınırlılıkları nedeniyle çoğu zaman moleküler tekniklerle doğrulanmaktadır. *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium columnare*, *Yersinia ruckeri*, *Edwardsiella tarda*, *Renibacterium salmoninarum* gibi önemli balık bakterilerinin tanısında PCR temelli yöntemlerin yaygın kullanımı literatürde geniş yer bulmuştur (Zhang vd., 2014). Özellikle yavaş üreyen bakteriyel etkenlerde PCR, tanı süresini günlerden saatlere indirerek avantaj sağlamaktadır.

Paraziter hastalıklar, geleneksel mikroskopik inceleme ile tanı konulabilse de düşük yoğunluklu enfeksiyonlarda gözden kaçabilmektedir. *Myxobolus*, *Ichthyophthirius multifiliis*, *Tetracapsuloides bryosalmonae* gibi parazitlerin teşhisinde PCR, konak içinde az sayıdaki parazit DNA'sının bile tespit edilmesine olanak tanımaktadır (Jaies vd., 2024). Bu durum özellikle asemptomatik taşıyıcı bireylerin belirlenmesi açısından önemlidir.

PCR'ın balık hastalıklarındaki kullanım alanları yalnızca tanı ile sınırlı değildir. Moleküler teknikler; patojenlerin genetik karakterizasyonu, virülens faktörlerinin belirlenmesi, enfeksiyon döngüsünün izlenmesi, hastalık kontrol stratejilerinin geliştirilmesi ve epidemiyolojik sürveyans çalışmalarında da yaygın olarak kullanılmaktadır (Mackay vd., 2002). Patojenlerin su kolonunda, biyofilm yapılarında veya balık yemlerinde varlığının tespit edilmesi, işletme hijyeninin değerlendirilmesi ve biyogüvenlik protokollerinin etkinliğinin izlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Sonuç olarak PCR, balık hastalıklarının hızlı ve güvenilir şekilde tanılanmasında modern su ürünleri yetiştiriciliğinin temel

tekniklerinden biri haline gelmiştir. Yüksek duyarlılık, özgüllük ve hız gibi avantajları sayesinde PCR, hastalık kontrolü ve su ürünleri yönetiminde vazgeçilmez bir araç haline gelmiş, balık sağlığı çalışmalarında standart bir yöntem olarak benimsenmiştir.

3.1. Balıklarda Bakteriyel Hastalıklar ve PCR

Bakteriyel enfeksiyonlar su ürünleri yetiştiriciliğinde en yaygın görülen hastalık gruplarından biridir ve mortalite, büyüme geriliği, sekonder enfeksiyonlar ve ekonomik kayıplarla ilişkilidir. Pek çok bakteriyel etken, klasik kültürleme ve biyokimyasal tanı yöntemleri ile doğrulanabilmekle birlikte, hızlı yayılım, düşük düzeyli enfeksiyonlar ve fenotipik benzerlikler nedeniyle tanıda kesinlik sağlanması çoğu zaman güçleşmektedir. Bu nedenle moleküler tanı yöntemleri, özellikle PCR tabanlı yaklaşımlar, bakteriyel balık patojenlerinin hızlı, özgül ve duyarlı şekilde tespit edilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Mata vd., 2004).

Geleneksel kültürleme yöntemleri, bazı balık bakterilerinin yavaş üremesi veya özel besiyerleri gerektirmesi nedeniyle sınırlı kalabilmektedir. Örneğin *Renibacterium salmoninarum*, 2–6 haftalık inkübasyon süresi gerektirdiği için klasik yöntemlerle tanısı oldukça gecikebilmektedir. PCR ise bu bakterinin özgül DNA bölgelerini hedefleyerek birkaç saat içinde tanı koyabilmektedir (Jaies vd., 2024). Benzer şekilde *Edwardsiella tarda*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Aeromonas salmonicida* ve *Yersinia ruckeri* gibi bakterilerde PCR'ın hızlı tanı için standart yöntem haline geldiği belirtilmiştir (Zhang vd., 2014; OIE, 2021).

Aeromonas hydrophila, balıklarda sepsisemi, yüzgeç çürüklüğü ve deri lezyonları ile seyreden yaygın bir bakteriyel patojendir. Bu türün tanısında PCR, özellikle aeromonadların fenotipik olarak benzer olması nedeniyle yüksek özgüllük sağlamaktadır. Mackay ve arkadaşları (2002), PCR'ın düşük

bakteri yüklerinde bile hedef DNA'yı tespit ederek erken tanı olanağı sunduğunu bildirmiş ve kültür temelli yaklaşımlara kıyasla önemli avantajlar sağladığını vurgulamıştır.

Flavobacterium columnare, sütçü balıklar da dahil olmak üzere birçok türde kolon hastalığına neden olan önemli bir bakteridir. Klasik tanı çoğu zaman mikroskopik görüntüye ve kültür özelliklerine dayanır; ancak türler arası morfolojik benzerlikler nedeniyle kesin tanı PCR temelli yöntemlerle doğrulanmaktadır. Jaies vd. (2024), *F. columnare*'nin spesifik 16S rRNA bölgelerinin PCR ile hedeflenmesi sayesinde düşük yoğunluklu enfeksiyonların bile güvenilir şekilde saptanabildiğini rapor etmiştir.

Yersinia ruckeri, kızıl ağız hastalığına neden olan önemli bir Gram-negatif bakteridir. Klinik belirtiler çoğu zaman stres, düşük oksijen veya diğer çevresel faktörlerle karışabileceği için tanı zordur. Bu nedenle PCR, özellikle taşıyıcı balıklarda düşük seviyeli enfeksiyonların saptanmasında kritik rol oynamaktadır (OIE, 2021).

PCR aynı zamanda bakteriyel patojenlerin virülens faktörlerinin belirlenmesi, antibiyotik direnç genlerinin tespiti ve epidemiyolojik izleme çalışmalarında da yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin *Aeromonas* türlerinde hemolizin, elastaz ve aerolizin genlerinin, *Edwardsiella tarda*'da ise invazyon ve toksin genlerinin PCR ile incelenmesi, enfeksiyonun patogenezi anlamada büyük önem taşımaktadır (Jaies vd., 2024).

Balıklarda bakteriyel hastalıkların hızlı ve doğru tanınması, yetiştiricilik işletmelerinde hastalık yönetimi açısından hayati öneme sahiptir. PCR, patojenlerin genomik materyalini çok düşük kopya sayılarında bile tespit edebilmesi, hızlı sonuç vermesi ve yüksek özgüllüğü ile modern balık sağlığı çalışmalarında standart tanı yöntemlerinden biri haline gelmiştir.

3.2. Balıklarda Viral Hastalıklar ve PCR

Viral enfeksiyonlar su ürünleri yetiştiriciliğinde en yıkıcı sonuçlara yol açan hastalık gruplarından biridir. Balıklarda görülen pek çok viral patojen, hızlı bulaşma potansiyeline sahip olup kısa sürede yüksek mortalite oranlarına neden olabilmektedir. Viral enfeksiyonların kültür veya klasik tanı yöntemleriyle doğrulanması çoğu zaman zor olduğundan, PCR tabanlı teknikler günümüzde viral balık hastalıklarının tanısında altın standart yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir (OIE, 2021; Mackay vd., 2002; Munir ve Kibenge, 2004).

Koi herpesvirüsü (KHV), sazan ve koi yetiştiriciliğinde ciddi ekonomik kayıplara neden olan bir DNA virüsüdür. Bu virüsün in vitro olarak üretiminin zor olması ve klinik belirtilerinin bazı bakteriyel hastalıklarla karışabilmesi nedeniyle PCR hızlı ve güvenilir bir tanı sağlamaktadır. OIE (2021), KHV tanısında özellikle real-time PCR ve nested PCR protokollerinin yüksek duyarlılık nedeniyle tercih edildiğini bildirmektedir.

Viral Hemorajik Septisemi Virüsü (VHSV) ve Enfeksiyöz Hematopoyetik Nekroz Virüsü (IHNV) gibi RNA virüsleri ise salmonid türlerinde yaygın olarak görülmektedir. Bu virüslerin tanısında RT-PCR temel yöntem haline gelmiştir (Williams vd., 1999). Mackay ve arkadaşları (2002), RT-PCR'ın RNA virüslerinin erken ve düşük yoğunluklu enfeksiyonlarını bile güvenilir şekilde tespit edebildiğini vurgulamıştır. Viral gen bölgelerinin özgül primerlerle taranması, enfeksiyonun asemptomatik dönemde bile belirlenmesine imkân tanımaktadır.

İrido virüsler, nodaviruslar ve tilapia lake virus (TiLV) gibi diğer önemli viral etkenlerde de PCR, epidemiyolojik çalışmalar, taşıyıcıların belirlenmesi ve virüs yükünün kantitatif ölçümü gibi farklı amaçlarla kullanılmaktadır. Jaies vd. (2024), özellikle nodavirus enfeksiyonlarının larval balıklarda çok hızlı

seyretmesi nedeniyle real-time PCR ile hızlı teşhisin kritik olduğunu belirtmiştir.

Sonuç olarak PCR, viral balık hastalıklarının tanısında yüksek duyarlılık, özgüllük ve hız gibi avantajlarıyla modern balık sağlığı çalışmalarının temel bileşenlerinden biri hâline gelmiş, klasik tanı yöntemleriyle karşılaştırıldığında çok daha etkin ve güvenilir bir teknik olarak öne çıkmıştır (Williams vd., 1999; Munir ve Kibenge, 2004).

3.3. Balıklarda Paraziter Hastalıklar ve PCR

Balıklarda paraziter enfeksiyonlar hem kültür balıkçılığı hem de doğal populasyonlar üzerinde ciddi etkiler oluşturabilmektedir. Parazit yoğunluğunun düşük olduğu, doku içinde yerleşmiş veya kronik enfeksiyon durumlarında mikroskopik yöntemler çoğu zaman yetersiz kalmakta; bu nedenle PCR tabanlı tanı yöntemleri yüksek duyarlılıkları sayesinde paraziter hastalıkların tespitinde yaygın şekilde kullanılmaktadır (Jaies vd., 2024).

Myxozoan parazitler (örneğin *Myxobolus*, *Henneguya*, *Kudoa* türleri), histolojik incelemeyle zor saptanabilen ve balıklarda geniş bir klinik tablo oluşturabilen önemli bir parazit grubudur. Bu organizmaların kesin tanısı çoğu zaman yalnızca moleküler yöntemlerle yapılabilmektedir. Jaies vd. (2024), *Myxobolus cerebralis* gibi türlerin PCR ile 18S rRNA bölgelerinin hedeflenmesi sayesinde düşük yoğunluklu enfeksiyonların bile güvenilir şekilde tespit edildiğini bildirmiştir.

Ichthyophthirius multifiliis, akvaryum ve yetiştiricilik balıklarında en yaygın parazitlerden biridir. Mikroskopik tanı genellikle mümkün olsa da erken dönemlerde parazitin düşük yoğunlukta olması yanlış negatif sonuçlara yol açabilir. PCR temelli yöntemler, özellikle çevresel DNA (eDNA) analizleriyle,

su örneklerinden bile parazitin genomik materyalini tespit edebilir hâle gelmiştir (OIE, 2021; Guo vd., 2025).

Tetracapsuloides bryosalmonae, salmonidlerde proliferatif böbrek hastalığına yol açan önemli bir parazittir. Bu parazitin konak ve çevresel döngüsünün karmaşık olması nedeniyle PCR, hem enfekte balıklarda hem de sucul ortamdaki arakonaklarda tespit amacıyla kullanılmaktadır. Mackay ve arkadaşları (2002), bu tür parazitlerde Real-Time PCR'ın, enfeksiyon şiddetinin kantitatif olarak ölçümünde değerli bilgiler sağladığını belirtmektedir.

PCR aynı zamanda paraziter türlerin genotiplendirilmesi, yayılım dinamiklerinin izlenmesi, konak-parazit ilişkilerinin belirlenmesi ve epidemiyolojik sürveyans gibi çalışmalarda da geniş kullanım alanına sahiptir. Parazitlerin yaşam döngülerindeki farklı gelişim evrelerinde dahi DNA tespiti yapılabilmesi, bu tekniğin biyolojik araştırmalar açısından büyük avantaj sunduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak PCR, paraziter balık hastalıklarının tanısında hem duyarlılığı hem de uygulama kapsamının genişliği nedeniyle vazgeçilmez bir araçtır; klasik yöntemlerle tespit edilemeyen düşük yoğunluklu enfeksiyonların belirlenmesinde önemli bir tamamlayıcı yöntem olarak kullanılmaktadır.

3.4. Balıklarda Mantar Hastalıkları ve PCR

Mantar enfeksiyonları (mycosis) özellikle tatlı su balıklarında önemli mortalite nedenleri arasında yer almakta ve çoğu zaman stres, kötü su kalitesi, mekanik yaralanmalar veya immün baskılanma sonrası gelişmektedir. Balıklarda en sık görülen mantar etkenleri arasında *Saprolegnia* spp., *Achlya* spp., *Aphanomyces invadans* ve *Branchiomyces* spp. yer almaktadır. Bu patojenlerin klasik tanısı çoğunlukla mikroskopik incelemeye dayanmakla birlikte, birçok türün morfolojik benzerliği nedeniyle kesin tanı çoğu zaman güçtür. Bu nedenle PCR temelli moleküler

yöntemler, mantar enfeksiyonlarının güvenilir şekilde doğrulanmasında yaygın bir araç hâline gelmiştir (Jaies vd., 2024).

Özellikle *Saprolegnia* ve *Achlya* türlerinin mikroskopik olarak ayırt edilmesi zor olduğundan, 18S rRNA ve ITS gen bölgelerinin hedeflendiği PCR protokolleri literatürde sıkça kullanılmaktadır. Jaies vd. (2024), *Saprolegnia parasitica* gibi türlerin PCR ile hem balık dokularından hem de çevresel numunelerden yüksek duyarlılıkla tespit edilebildiğini belirtmektedir. Bu yöntem, kültürlenme ihtiyacını ortadan kaldırdığı için tanı süresini de önemli ölçüde kısaltmaktadır.

Bir diğer önemli mantar hastalığı olan epizootik ülseratif sendrom (EUS), *Aphanomyces invadans* tarafından oluşturulur ve özellikle Asya ve Avustralya’da geniş tür yelpazesinde salgınlara neden olmuştur. OIE (2021), EUS tanısında PCR’ın temel yöntem olduğunu, patojenin ITS bölgesini hedefleyen PCR kitlerinin en güvenilir sonuçları verdiğini bildirmektedir.

Branchiomyces sanguinis gibi solungaç nekrozu oluşturan mantar etkenlerinde de PCR’ın önemi artmaktadır. Mikroskopik tanı çoğu zaman geç döneme ait olduğundan, PCR ile solungaç dokusundan patojen DNA’sının erken dönemde tespit edilebilmesi hem tedavi hem de biyogüvenlik açısından kritik rol oynamaktadır.

PCR ayrıca mantar patojenlerinin genetik çeşitliliğinin belirlenmesi, coğrafi köken analizleri, salgın izleme, çevresel DNA (eDNA) temelli izleme gibi ileri düzey su ürünleri sağlığı çalışmalarında da etkin şekilde kullanılmaktadır (Mackay vd., 2002).

Sonuç olarak, mantar hastalıklarında PCR hem tanıyı hızlandıran hem de tür düzeyinde ayırım yapmayı mümkün kılan bir teknik olarak balık sağlığı uygulamalarında standart araçlardan biri hâline gelmiştir.

3.5. PCR'ın Balık Hastalıklarındaki Örnek Uygulamaları

PCR'ın balık hastalıklarında kullanım alanı yalnızca belirli patojenlerin tespit edilmesiyle sınırlı değildir. Günümüzde PCR, balık sağlığı yönetiminin birçok bileşenini kapsayan geniş bir uygulama alanına sahiptir. Jaies vd. (2024), PCR'ın balık hastalıkları alanında temel kullanım örneklerini erken tanı, taşıyıcı bireylerin tespiti, patojen yayılımının izlenmesi ve epidemiyolojik sürveyans olmak üzere dört ana başlık altında toplamaktadır.

Erken tanı, özellikle viral ve paraziter hastalıklarda kritik öneme sahiptir. Örneğin *VHSV*, *IHN* ve *KHV* için geliştirilen RT-PCR ve real-time PCR protokolleri, mortalite ortaya çıkmadan önce enfekte bireylerin belirlenmesini mümkün kılmaktadır (OIE, 2021). Bu sayede karantina ve eradikasyon stratejileri daha etkin bir şekilde uygulanabilmektedir.

Bir diğer önemli uygulama, taşıyıcı balıkların belirlenmesidir. *Aeromonas*, *Edwardsiella*, *Renibacterium* ve *Flavobacterium* gibi bakteriyel patojenler birçok balık türünde subklinik taşıyıcılık oluşturabilir. PCR, düşük bakteri yükünde bile DNA tespiti yapabildiği için bu tür bireylerin saptanmasında kültür yöntemlerine kıyasla çok daha avantajlıdır (Zhang vd., 2014; Mackay vd., 2002).

PCR aynı zamanda çevresel DNA (eDNA) analizi ile su kolonu, filtre yatakları veya biyofilm örneklerinden patojen varlığını belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. Bu yöntem özellikle paraziter patojenlerin (örn. *Ichthyophthirius*, *Myxobolus*) çevresel yayılımının izlenmesinde etkili bir araçtır (Jaies vd., 2024).

Kantitatif PCR (qPCR) ise enfeksiyon şiddetinin ölçülmesi, patojen yükünün kantitatif takibi ve tedavi etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. OIE

(2021), qPCR'ın özellikle TiLV, nodaviruslar ve bakteri yükü analizlerinde önemli bilgiler sağladığını vurgulamaktadır.

Son olarak PCR, balık hastalıkları araştırmalarında gen alt tiplerinin belirlenmesi, mutasyon analizi, virülens genlerinin incelenmesi, tedaviye direnç genlerinin tespiti gibi ileri moleküler çalışmaların merkezinde yer almaktadır. Bu yönüyle PCR yalnızca tanı değil, aynı zamanda balık sağlığı araştırmalarının gelişiminde temel bir bilimsel araçtır.

4. SONUÇ

Balık hastalıklarının hızlı, doğru ve güvenilir biçimde tanınması; su ürünleri yetiştiriciliğinde biyogüvenlik uygulamalarının güçlendirilmesi, kayıpların azaltılması ve sürdürülebilir üretimin sağlanması açısından kritik bir gerekliliktir. Moleküler biyoteknolojinin sunduğu imkânlar içerisinde PCR, yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü sayesinde modern balık sağlığı yönetiminin temel tanı araçlarından biri haline gelmiştir. Viral, bakteriyel, paraziter ve mantar kaynaklı pek çok patojende klasik yöntemlerle tanının güç olduğu veya geciktiği durumlarda PCR tabanlı teknikler, hastalığın erken safhada belirlenmesine ve hızlı müdahale edilmesine olanak tanımaktadır.

PCR yönteminin sadece tanısal amaçlarla değil, aynı zamanda epidemiyolojik çalışmalar, patojenlerin genetik çeşitliliğinin belirlenmesi, virülens faktörlerinin analizi ve çevresel izlemede de geniş bir kullanım alanına sahip olduğu görülmektedir. Bu çok yönlülük, PCR'ı balık hastalıkları araştırmalarında vazgeçilmez bir yöntem konumuna taşımıştır. Bununla birlikte PCR'ın yüksek performansının doğru yorumlanabilmesi, yöntemsel sınırlılıkların örneğin kontaminasyon riski, inhibitör etkisi, primer tasarım hataları ve

aktif enfeksiyonun DNA tespitiyle karıştırılması gibi durumların göz önünde bulundurulmasını gerektirir.

KAYNAKÇA

- Abdelsalam, M., Elgendy, M. Y., Elfadadny, M. R., Ali, S. S., Sherif, A. H., & Abolghait, S. K. (2023). A review of molecular diagnoses of bacterial fish diseases. *Aquaculture International*, 31(1), 417–434. doi:10.1007/s10499-022-00983-8
- Ador, M. A. A., Haque, M. S., Paul, S. I., Chakma, J., Ehsan, R., & Rahman, A. (2021). Potential application of PCR based molecular methods in fish pathogen identification: A review. *Aquaculture Studies*, 22(1). Retrieved from <https://www.aquast.org/abstract.php?lang=en&id=525>
- Guo, S.-Q., Fu, Y.-W., Hou, T.-L., Huang, S.-L., & Zhang, Q.-Z. (2025). Establishment and application of TaqMan probe-based quantitative real-time PCR for rapid detection and quantification of *Ichthyophthirius multifiliis* in farming environments and fish tissues. *Veterinary Parasitology*, 334, 110381. doi:10.1016/j.vetpar.2024.110381
- Huggett, J. F., & Whale, A. (2013). Digital PCR as a novel technology and its potential implications for molecular diagnostics. *Clinical Chemistry*, 59(12), 1691–1693. doi:10.1373/clinchem.2013.211045
- Jaies, I., Shah, F. A., Qadiri, S. S. N., Qayoom, I., Bhat, B. A., Dar, S. A., & Bhat, F. A. (2024). Immunological and molecular diagnostic techniques in fish health: Present and future prospectus. *Molecular Biology Reports*, 51(1), 551. doi:10.1007/s11033-024-09344-5
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*, e3998. doi:10.3791/3998

- Mackay, I. M., Arden, K. E., & Nitsche, A. (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*, 30(6), 1292–1305. doi:10.1093/nar/30.6.1292
- Mata, A., Gibello, A., Casamayor, A., Blanco, M., Domínguez, L., & Fernández-Garayzábal, J. (2004). Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water streptococcosis in fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5), 3183–3187. doi:10.1128/AEM.70.5.3183-3187.2004
- Mullis, K. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), 56–65.
- Munir, K., & Kibenge, F. S. B. (2004). Detection of infectious salmon anaemia virus by real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 117(1), 37–47. doi:10.1016/j.jviromet.2003.11.020
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., ... Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487–491. doi:10.1126/science.2448875
- Türe, M., Eroğlu, O., & Aksakal, E. (2012). Molecular genetic markers for fish diseases and their usage. *Aquaculture Studies*, 12(3), 8–17.
- Williams, K., Blake, S., Sweeney, A., Singer, J. T., & Nicholson, B. L. (1999). Multiplex reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three fish viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(12), 4139–4141. doi:10.1128/jcm.37.12.4139-4141.1999
- World Organisation for Animal Health (OIE). (2021). Manual of diagnostic tests for aquatic animals. Retrieved from <https://www.woah.org>

Zhang, D. F., Zhang, Q. Q., & Li, A. H. (2014). Development of a multiplex PCR assay for rapid and simultaneous detection of four genera of fish pathogenic bacteria. Letters in Applied Microbiology, 59(5), 471–478. doi:10.1111/lam.12303

**TÜRKİYE VE DÜNYADA
VETERİNER SU ÜRÜNLERİ VE HASTALIKLARI**

yaz
yayınları

YAZ Yayınları
M.İhtisas OSB Mah. 4A Cad. No:3/3
İscehisar / AFYONKARAHİSAR
Tel : (0 531) 880 92 99
yazyayinlari@gmail.com • www.yazyayinlari.com