

საქართველოს მთავრობის

დადგენილება №553

2017 წლის 15 დეკემბერი

ქ. თბილისი

**ტექნიკური რეგლამენტის – კარტოფილის რგოლური სიდამპლის კონტროლის პროცედურების
დამტკიცების თაობაზე**

მუხლი 1

სურსათის/ცხოველის საკვების უვნებლობის, ვეტერინარიისა და მცენარეთა დაცვის კოდექსის 75-ე მუხლის მე-2 ნაწილის, პროდუქტის უსაფრთხოებისა და თავისუფალი მიმოქცევის კოდექსის 56-ე მუხლის პირველი ნაწილისა და 58-ე მუხლის მე-2 ნაწილის საფუძველზე, დამტკიცდეს თანდართული ტექნიკური რეგლამენტი – კარტოფილის რგოლური სიდამპლის კონტროლის პროცედურები.

მუხლი 2

დადგენილება ამოქმედდეს 2018 წლის 1 სექტემბრიდან.

პრემიერ-მინისტრი

გიორგი კვირიკაშვილი



ტექნიკური რეგლამენტი

კარტოფილის რგოლური სიდამპლის კონტროლის პროცედურები

თავი I

მიზანი და ტერმინთა განმარტებები

მუხლი 1. ზოგადი დებულებები

ტექნიკური რეგლამენტი – კარტოფილის რგოლური სიდამპლის კონტროლის პროცედურები (შემდგომში – ტექნიკური რეგლამენტი) ადგენს და არეგულირებს საკარანტინო მავნე ორგანიზმის *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis et al. Ssp. *Sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al. – კარტოფილის რგოლური სიდამპლის (შემდგომში – მავნე ორგანიზმი) გამოძვრის კონტროლის ფიტოსანიტარიულ ზომებს, საქართველოში მისი შემოჭრისა და გავრცელების პრევენციის მიზნით.

მუხლი 2. მიზანი და გამოყენების სფერო

1. ამ ტექნიკური რეგლამენტის მიზანია მავნე ორგანიზმის:

ა) გამოვლენა;

ბ) შემოჭრისა და გავრცელების თავიდან აცილება;

გ) გამოვლენის შემთხვევაში გავრცელების თავიდან აცილება და კონტროლი მისი აღმოფხვრის მიზნით.

2. ამ ტექნიკური რეგლამენტის მოქმედება ვრცელდება იმ ბიზნესოპერატორზე, რომელიც ეწევა სასურსათო და სათესლე კარტოფილის პირველად წარმოებას, გადამუშავებასა და დისტრიბუციას, საქართველოს კანონმდებლობით დადგენილი წესით.

მუხლი 3. გამოყენებული ტერმინები და აბრევიატურები

1. ამ ტექნიკური რეგლამენტის მიზნებისთვის გამოყენებულ ტერმინებსა და აბრევიატურებს აქვთ შემდეგი მნიშვნელობა:

ა) საქონელი – მცენარის, მცენარეული პროდუქტის ან სხვა მასალების სახეობა, რომელიც გადაადგილდება სავაჭრო ან სხვა მიზნებისთვის;

ბ) IF – Immunofluorescence (IF) სპეციფიკური ანტისხეულების გამოყენებაზე დაფუძნებული მეთოდი, რომელიც ქიმიურად არის დაკავშირებული ფლუორესცენტულ საღებავებთან;

გ) პჯრ – პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია;

დ) FISH – Fluorescence in situ hybridization (FISH) ფლუორესცენტული in situ ჰიბრიდიზაცია – ციტოგენეტიკური მეთოდი, რომელიც იყენებს ფლუორესცენტულ ზონდებს, რომლებიც

მხოლოდ მაღალი ხარისხით შეთავსებადი თანმიმდევრობის (კომპლემენტარულ) ქრომოსომებს ბოჭავენ;

ე) ფლუორესცენტული ზონდები – გამოიყენება ცილის მდებარეობის და აქტივაციის დასადგენად, ცილის კომპლექსის ფორმირების იდენტიფიკაციისთვის და მაკრომოლეკულის ფორმის ცვლილებისა და ბიოლოგიური პროცესების ცოცხალ ორგანიზმში (in vivo) მონიტორინგისთვის;

ვ) in vitro – ექსპერიმენტის ტიპი, რომელიც ტარდება ლაბორატორიულ პირობებში ხელოვნურ გარემოში (სინჯარაში ან კოლბაში);

ზ) in situ – ექსპერიმენტის ტიპი, რომელიც გამოსაკვლევ ობიექტის ბუნებრივ ან წარმოშობის ადგილზე ტარდება;

თ) MTNA – მანიტ-ტრიმეთოპრიმ-ნალიდიქსინის მჟავა-ამფოტერიცინის საკვები არე;

ი) სუპერნატანტი – ნალექზედა შრე, სითხის ფენა, რომელიც ზემოდან მოექცევა კრისტალიზაციის, ცენტრიფუგირების ან სხვა პროცესის შემდეგ;

კ) დასნეობვნება – საქონელში ცოცხალი ორგანიზმის არსებობა, რომელიც წარმოადგენს მცენარის, ან მცენარეული პროდუქტის მავნე ორგანიზმს. დასნეობვნება მოიცავს ინფექციური დაავადების გამომწვევის ორგანიზმში შეღწევის პროცესს;

ლ) მავნე ორგანიზმების შემოჭრა – მავნე ორგანიზმის გადაადგილება იმ ადგილებში, სადაც იგი ჯერ არსებობს, ან არსებობს შეზღუდულად და კონტროლდება ოფიციალურად;

მ) FAP - Fatty acid profiling – ცხიმოვანი მჟავების პროფილირება;

ნ) YGM – Yeast extract mineral salts medium – საფუარის ექსტრაქტი –მინერალური მარილების არე;

ო) კწე - კოლონიის წარმოქმნილი ერთეული;

პ) PBS – phosphate buffered saline - ფოსფატის ბუფერული ხსნარი;

ჟ) BSA - ხარის შრატის ალბუმინი;

რ) ნგ/მკლ – ნანოგრამი/მიკროლიტრზე;

ს) თხევადი ნარჩენები – თხევად მდგომარეობაში არსებული ნარჩენები;

ტ) ინსინერაცია – ნარჩენების თერმული დამუშავება (დაწვა);

უ) დემარკაცია – საკარანტინო და ბუფერული ზონების საზღვრების დადგენა სხვადასხვა ბარიერებით: საძოვარი, ტყე, გზა, მდინარე და სხვ.; შემოღობვით ან გადახვნით და პათოგენის შესახებ ინფორმაციის თვალსაჩინო ადგილზე განთავსებით;

ფ) კლონი (ამონაყარი, ყლორტი) – უჯრედების ჯგუფი, რომელიც წარმოიქმნა ერთი წინაპარი უჯრედის გამრავლების შედეგად. კლონში შემავალი ყველა უჯრედი გენეტიკურად იდენტურია;

ქ) კლონური სელექცია – ჯიშის საუკეთესო კლონების და კვირტების ვეგეტატიური თაობის გამორჩევა შემდეგი სელექციისათვის;

ღ) სააგენტო – საჯარო სამართლის იურიდიული პირი – სურსათის ეროვნული სააგენტო;

ყ) სამსახური – საქართველოს ფინანსთა სამინისტროს მმართველობის სფეროში შემავალი საჯარო სამართლის იურიდიული პირი – შემოსავლების სამსახური;

შ) სათესლე მასალა – მცენარე, რომელიც განკუთვნილია დასათესად და არა საკვებად ან გადამუშავებისათვის;

ჩ) ფიტოტრონი – ლაბორატორიული კომპლექსი, რეგულირებადი გარემოთი, მცენარეთა სხვადასხვა პირობებში ზრდის შესასწავლად;

ც) UPW – ულტრა სუფთა წყალი;

ძ) WD – ანტისხეულის სამუშაო განზავება;

წ) g – ფარდობითი ცენტრიფუგირების ძალა;

ჭ) bp – base pair – ფუძე წყვილი;

ხ) ნარჩენების განკარგვა – მავნე ორგანიზმით დასნებოვნებული მასპინძელი მცენარეების ნარჩენების გაუსნებოვნების პროცესი, რომელიც მოიცავს ნარჩენების დამუშავებას ან განადგურებას (დამარხვა, ინსინერაცია).

2. ამ ტექნიკური რეგლამენტის მიზნებისათვის ასევე გამოიყენება სურსათის/ცხოველის საკვების, ვეტერინარიისა და მცენარეთა დაცვის კოდექსით განსაზღვრული ტერმინები, თუ ამ ტექნიკური რეგლამენტით სხვაგვარად არ არის დადგენილი.

მუხლი 4. ოფიციალური გამოკვლევები

1. ქვეყნის ტერიტორიაზე სისტემატურად უნდა ტარდებოდეს ფიტოსანიტარიული სახელმწიფო კონტროლი კარტოფილის (*Solanum tuberosum* L.) ტუბერებსა და ბუჩქებზე მავნე ორგანიზმის არარსებობის დასადგენად.

2. ტუბერების შემთხვევაში, ლაბორატორიული გამოკვლევებისათვის სათესლე და სხვა დანიშნულების მქონე კარტოფილის ნიმუშების აღება უმჯობესია მოხდეს დასაწყობებული პარტიებიდან.

3. აღებული ნიმუშების ლაბორატორიული გამოკვლევა უნდა მოხდეს ამ ტექნიკური რეგლამენტის II თავში და დანართ №1-14-ში მითითებული მეთოდის გამოყენებით.

4. საჭიროების შემთხვევაში, სახელმწიფო კონტროლი სხვა ნიმუშებზე შესაძლოა ჩატარდეს ტუბერების გაჭრის გზით.

5. ბუჩქების გამოკვლევა და ნიმუშების აღება ლაბორატორიაში გასაგზავნად უნდა მოხდეს დანართი №1–14-ში მითითებული მეთოდის გამოყენებით.

6. ფიზიკური და იურიდიული პირების მიმართვის საფუძველზე ლაბორატორიებს შეუძლიათ ნიმუშების აღება, როგორც შენახვის პირობებში, ასევე მოყვანის და რეალიზაციის ადგილებში და მათი შემდგომი ლაბორატორიული გამოკვლევა მავნე ორგანიზმის გამოვლენის მიზნით.

7. ნიმუშების რაოდენობას, წარმოშობას, სტრატეგიკაციას და აღების ვადებს ადგენს უფლებამოსილი ორგანო.

თავი II

ბიზნესოპერატორის ვალდებულება. სააგენტოს უფლებამოსილება და ვალდებულება

მუხლი 5. ბიზნესოპერატორის ვალდებულება

ბიზნესოპერატორი ვალდებულია კარტოფილის მცენარეებსა და ტუბერებში აღებულ, შენახულ, ასევე, ბაზარზე განთავსებულ ტუბერებში მავნე ორგანიზმის არსებობაზე ეჭვის გაჩენის, ან/და მისი არსებობის დადასტურების შემთხვევაში დუყოვნებლივ აცნობოს სააგენტოს.

მუხლი 6. სააგენტოს უფლებამოსილება

1. დასაწყობებულ კარტოფილსა და მცენარეებზე მავნე ორგანიზმის არსებობაზე ინფორმაციის მიღებისას, სააგენტო უზრუნველყოფს შესაბამისი ნიმუშების გაგზავნას ლაბორატორიული გამოკვლევებისთვის, ამ თავის დანართი №1–14-ში მითითებული მეთოდების და 29-ე მუხლის პირველი პუნქტის შესაბამისად. აღნიშნულ შემთხვევაში გამოიყენება ამ ტექნიკური რეგლამენტის 29-ე მუხლის მე-2 პუნქტით დადგენილი მოთხოვნები.

2. ლაბორატორიიდან გამოკვლევების პასუხის მიღებამდე სააგენტომ:

ა) უნდა აკრძალოს იმ პარტიების ან ტვირთების გადაადგილება, საიდანაც მოხდა ნიმუშების აღება. ტვირთის გადაადგილება უნდა მოხდეს მხოლოდ სააგენტოს კონტროლის ქვეშ, იმ პირობებში, რომლითაც უზრუნველყოფილი იქნება მავნე ორგანიზმის გავრცელების იდენტიფიცირებადი რისკის არ არსებობა;

ბ) უნდა განახორციელოს მიკვლევადობა;

გ) საჭიროების შემთხვევაში უნდა გაატაროს დამატებითი პრევენციული ზომები მავნე ორგანიზმის გავრცელების თავიდან ასაცილებლად.

მუხლი 7. სააგენტოს ვალდებულება

1. ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-6 მუხლის პირველი პუნქტით გათვალისწინებული საექვო შემთხვევის დადასტურებამდე ან უარყოფამდე, თუ ვიზუალურად დიაგნოსტირებულია

მავნე ორგანიზმზე საექვო სიმპტომები, ან მავნე ორგანიზმი იდენტიფიცირებულია დადებითი IF ტესტით, როგორც ეს მითითებულია ამ ტექნიკური რეგლამენტის II თავში და დანართ №1-14-ში, ან სხვა შესაბამისი ტესტის შედეგად მიღებულია დადებითი შედეგი, სააგენტო ვალდებულია:

ა) აკრძალოს ისეთი საქონლის ტვირთების ან პარტიების გადატანა, საიდანაც მოხდა ნიმუშების აღება, გარდა მათ მიერ კონტროლირებადი შემთხვევებისა და იმ პირობით, რომ არ არსებობს მავნე ორგანიზმის გავრცელების აშკარა რისკი;

ბ) მიიღოს შესაბამისი ზომები საექვო შემთხვევის წარმოშობის დასადგენად;

გ) მავნე ორგანიზმის გავრცელების თავიდან აცილების მიზნით, მოსალოდნელი რისკის დონის შესაბამისად, მიიღოს შესაბამისი დამატებითი პრევენციული ზომები. აღნიშნული ზომები შესაძლოა მოიცავდეს ყველა დანიშნულების კარტოფილის ტუბერების, ან მცენარეების გადაადგილების სახელმწიფო კონტროლს საექვო შემთხვევასთან დაკავშირებულ ობიექტებზე (ტერიტორიაზე) და მის გარეთ.

2. თუ ამ ტექნიკური რეგლამენტის II თავში და დანართ №1-14-ში მითითებული მეთოდით ჩატარებული ლაბორატორიული გამოკვლევით დადასტურდება მავნე ორგანიზმის არსებობა, ტუბერების, მცენარეების ან მცენარეთა ნაწილების ნიმუშებში, მეცნიერულად დასაბუთებული მეთოდების, მავნე ორგანიზმის ბიოლოგიისა და ქვეყანაში არსებული კარტოფილის წარმოების, მარკეტინგისა და დამუშავების სისტემების გათვალისწინებით, სააგენტო ვალდებულია:

ა) განსაზღვროს დასნეზოვნებული ტუბერები ან მცენარეები, ტვირთი და/ან პარტია, ასევე მანქანა-დანადგარები, სატრანსპორტო საშუალებები, მათი შესანახი ადგილები, და სხვა საგნები, მათ შორის, შესაფუთი მასალები, საიდანაც ნიმუშის აღება მოხდა, საჭიროების შემთხვევაში, წარმოების ადგილ(ებ)ი და ის მიმდვრ(ებ)ი, სადაც მოყვანილი იქნა კარტოფილი;

ბ) ამ ტექნიკური რეგლამენტის 30-ე მუხლის პირველი პუნქტის შესაბამისად, დაადგინოს მოსავლის აღებამდე ან მოსავლის აღების შემდეგ კონტაქტით, ან დასნეზოვნებულად მიჩნეულ პროდუქტთან კონტაქტით, სავარაუდო დასნეზოვნების ხარისხი;

გ) მოახდინოს ამ პუნქტის „ა“ ქვეპუნქტის საფუძველზე დასნეზოვნებულად განსაზღვრული ტერიტორიის დემარკაცია განსაზღვროს ამ პუნქტის „ბ“ ქვეპუნქტის საფუძველზე დადგენილი სავარაუდო დასნეზოვნების ხარისხი და მავნე ორგანიზმის სავარაუდო გავრცელება ამ ტექნიკური რეგლამენტის 32-ე მუხლის მე-2 პუნქტის შესაბამისად.

3. როდესაც არსებობს იმპორტირებული კარტოფილით მავნე ორგანიზმის ქვეყანაში გავრცელების რისკი, სააგენტო ვალდებულია დაუყოვნებლივ გაუზიაროს შეტყობინება იმპორტიორ მხარეს საქართველოს კანონმდებლობით დადგენილი წესით.

4. შეტყობინება გაგზავნილი უნდა იქნეს:

ა) დაუყოვნებლივ, მას შემდეგ, რაც ამ ტექნიკური რეგლამენტის II თავში და დანართ №1–14-ში აღწერილი მეთოდების გამოყენებით, ლაბორატორიული გამოკვლევით დადასტურდება მავნე ორგანიზმის არსებობა. შეტყობინებაში მითითებული უნდა იყოს:

- ა.ა) კარტოფილის პარტიის სახეობა;
- ა.ბ) საჭიროების შემთხვევაში, კარტოფილის თესლის კატეგორია;
- ა.გ) ტვირთის გამგზავნის და მიმღების საკონტაქტო ინფორმაცია;
- ა.დ) კარტოფილის პარტიის მიწოდების თარიღი;
- ა.ე) მიწოდებული კარტოფილის პარტიის მოცულობა;

ბ) მცენარის პასპორტის ასლი ან, საჭიროების შემთხვევაში, სულ მცირე მცენარის პასპორტის ნომერი, მოსავლის მომცვანის ან გამყიდველის სარეგისტრაციო ნომერი ან გაგზავნილი შეტყობინების ასლი;

გ) ყველა გამოკვლევის დასრულების შემდეგ, იმპორტიორ მხარეს თითოეული შემთხვევისთვის დაუყოვნებლივ უნდა მიეწოდოს:

- გ.ა) დასნეზოვნების დადასტურების თარიღი;
- გ.ბ) დასნეზოვნების წყაროს, მისი სავარაუდო გავრცელების და ნიმუშების შესარჩევად ჩატარებული ლაბორატორიული გამოკვლევის თაობაზე მოკლე აღწერილობა;
- გ.გ) ინფორმაცია დასნეზოვნების იდენტიფიცირებული ან სავარაუდო წყაროების შესახებ;
- გ.დ) განსაზღვრული დასნეზოვნების დონის დეტალები, მათ შორის წარმოების ადგილების რაოდენობა და პარტიების მოცულობა, სახეობის და სათესლე კარტოფილის შემთხვევაში, კატეგორიის იდენტიფიკაციით;
- გ.ე) დემარკაციული ზონის შესახებ ინფორმაცია, მათ შორის იმ წარმოების ადგილების რაოდენობა, რომლებიც არ არის მიჩნეული დასნეზოვნებულად, თუმცა შედიან დემარკაციულ ზონაში;
- გ.ვ) გავრცელების არეალთან დაკავშირებული სხვა ინფორმაცია, რომელსაც იმპორტიორი მხარე მოითხოვს.

მუხლი 8. დასნეზოვნებული კარტოფილისადმი დაწესებული მოთხოვნები

1. მავნე ორგანიზმით კარტოფილის დასნეზოვნების შესახებ ეჭვის შემთხვევაში, ნებისმიერმა ფიზიკურმა და იურიდიულმა პირმა უნდა აცნობოს სააგენტოს, რომელიც უზრუნველყოფს ნიმუშების აღებას და შესაბამის ლაბორატორიაში წარდგენას გამოკვლევებისათვის. ლაბორატორიული გამოკვლევა უნდა განხორციელდეს კარტოფილის იმდენ ტუბერზე ან მცენარეზე, რამდენიც საჭირო იქნება ინფექციის თავდაპირველი წყაროსა და დასნეზოვნების სავარაუდო ხარისხის დასადგენად.

2. გამოკვლევის შედეგად, შემდგომში დასნეზოვნების განსაზღვრისთვის დადგინდება მისი სავარაუდო ხარისხი და მოხდება დასნეზოვნებული ზონის დემარკაცია ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-7 მუხლის პირველი პუნქტის შესაბამისად.

3. ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-7 მუხლის პირველი პუნქტის საფუძველზე დასნეზოვნებულად მიჩნეული ტუბერები ან ნარგავები არ უნდა იქნეს დარგული და სააგენტოს და სამსახურის ზედამხედველობის ქვეშ:

ა) უნდა განადგურდეს ან სხვაგვარად იქნეს განკარგული ამ ტექნიკური რეგლამენტის 31-ე მუხლის პირველი პუნქტის შესაბამისად, თუ დადგინდება, რომ არ არსებობს მავნე ორგანიზმის გავრცელების რისკი;

ბ) ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-7 მუხლის პირველი პუნქტის „ბ“ ქვეპუნქტის საფუძველზე დასნეზოვნებულად მიჩნეული ტუბერები ან მცენარეები არ უნდა იქნეს დარგული ამ მუხლის პირველ პუნქტში მითითებული ლაბორატორიული გამოკვლევის შედეგებზე რაიმე გავლენის მოხდენის გარეშე და მათი განკარგვა ან გამოყენება უნდა მოხდეს სააგენტოსა და სამსახურის ზედამხედველობით, ამ ტექნიკური რეგლამენტის 31-ე მუხლის მე-2 პუნქტის შესაბამისად, მავნე ორგანიზმის გავრცელების რისკის არარსებობის დადგენამდე.

4. ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-7 მუხლის პირველი პუნქტის საფუძველზე დასნეზოვნებულად ან სავარაუდოდ დასნეზოვნებულად მიჩნეული მანქანა-დანადგარები, ხელსაწყოები, სატრანსპორტო საშუალებები, გემები, მათი შესანახი ადგილები, ნებისმიერი სხვა საგნები, მათ შორის შესაფუთი მასალები, უნდა გასუფთავდეს და მოხდეს მათი დეზინფექცია, ხოლო თუ ვერ ხერხდება ნებისმიერი სხვა საგნების, მათ შორის შესაფუთი მასალების გასუფთავება და დეზინფექცია, უნდა განადგურდეს ამ ტექნიკური რეგლამენტის 31-ე მუხლის მე-3 პუნქტში მითითებული შესაბამისი ღონისძიებების გამოყენებით. ნებისმიერი ასეთი საგანი, დეზინფექციის შემდეგ, მიიჩნევა სუფთად.

5. ამ მუხლის საფუძველზე გატარებული ზომების დარღვევის გარეშე, ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-7 მუხლის მე-2 პუნქტის „გ“ ქვეპუნქტის შესაბამისად, დემარკაციულ ზონაში გატარებულ იქნეს ამ ტექნიკური რეგლამენტის 32-ე მუხლში მითითებული ღონისძიებები.

მუხლი 9. სათესლე კარტოფილის მოყვანისადმი დაწესებული მოთხოვნები

1. სათესლე კარტოფილი უნდა აკმაყოფილებდეს ამ ტექნიკური რეგლამენტით დადგენილ მოთხოვნებს და გამოყვანილი უნდა იყოს ოფიციალურად დამტკიცებული პროგრამის საფუძველზე მიღებული პროდუქტისგან, რომელიც ამ ტექნიკური რეგლამენტის II თავსა და დანართ №1-14-ში მითითებული ოფიციალურად დადასტურებული მეთოდის გამოყენებით ჩატარებული შემოწმების შედეგად მიჩნეულია ჯანსაღად.

2. ამ მუხლის პირველ პუნქტში მითითებული შემოწმება უნდა განხორციელდეს:

ა) იმ შემთხვევებში, როდესაც დასნეზოვნება გავლენას ახდენს სათესლე კარტოფილზე (კარტოფილის წარმოებაზე), კლონური სელექციის საწყის მცენარეებზე;

ბ) სხვა შემთხვევებში, კლონური სელექციის საწყის მცენარეებზე ან ძირითადი სათესლე კარტოფილის საშუალო ნიმუშზე ან განვითარების ადრეულ სტადიებზე.

მუხლი 10. მოთხოვნები სამეცნიერო-კვლევითი და სელექციური საქმიანობისადმი

აკრძალულია მავნე ორგანიზმის კულტურის ფლობა და გადაადგილება, გარდა სამეცნიერო-კვლევითი და სელექციური საქმიანობისთვის განკუთვნილი მავნე ორგანიზმის კულტურისა.

თავი III

მავნე ორგანიზმის დიაგნოსტიკა, გამოვლენა, იდენტიფიკაცია

მუხლი 11. მავნე ორგანიზმის შემოწმების პროცედურები

შემოწმების პროცედურები დადგენილია ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართ №1-3-ში, რომელიც ითვალისწინებს მავნე ორგანიზმის:

- ა) დიაგნოსტიკას კარტოფილის ტუბერებსა და მცენარეებში;
- ბ) გამოვლენას კარტოფილის ტუბერებსა და მცენარეების ნიმუშებში;
- გ) იდენტიფიკაციას.

მუხლი 12. ზოგადი მოთხოვნები

1. ვინაიდან დიაგნოსტიკური პროტოკოლები ითვალისწინებს საკარანტინო მავნე ორგანიზმის გამოვლენას და მავნე ორგანიზმის სიცოცხლისუნარიანი კულტურების, როგორც საკონტროლო მასალების, გამოყენებას, აუცილებელია პროცედურები შესრულდეს საკარანტინო პირობების შესაბამისად, სადაც უზრუნველყოფილი იქნება ნარჩენების სათანადოდ განკარგვა. ასევე, აუცილებელია პროცედურები შესრულდეს სააგენტოს თანხმობის საფუძველზე.

2. ტესტირების პარამეტრებმა უნდა უზრუნველყონ მავნე ორგანიზმის დონის თანმიმდევრული და განმეორებითი გამოვლენა შერჩეული მეთოდებით დადგენილ დროში.

3. დადებითი კონტროლის ზუსტი მომზადება სავალდებულოა.

4. დიაგნოსტიკური პროტოკოლით მოთხოვნილი პარამეტრების შესაბამისად ჩატარებული შემოწმება ასევე გულისხმობს მოწყობილობის სწორ ინსტალაციას, ტექნიკურ მომსახურებასა და დაკალიბრებას, ასევე რეაგენტების ყურადღებით დამუშავებას, შენახვას და ნიმუშების ურთიერთდაბინძურების თავიდან ასაცილებლად ყველა საჭირო ზომის მიღებას, მაგ., დადებითი კონტროლის გამიჯვნა სატესტო ნიმუშებიდან.

5. დაცული უნდა იქნეს ეტიკეტირებასთან და დოკუმენტურად გაფორმებასთან დაკავშირებული საქართველოს კანონმდებლობით დადგენილი მოთხოვნები.

6. თუ პირველი სკრინინგ-ტესტი (IF ან პჯრ /FISH) დადებითია, ასეთ შემთხვევაში მავნე ორგანიზმით დასნეობვნების რისკი დიდია, შესაბამისად აუცილებელია მეორე სკრინინგ-

ტესტის ჩატარება. თუ მეორე სკრინინგ-ტესტის შედეგიც დადებითი აღმოჩნდება, მაშინ საექვო შემთხვევა დასტურდება და გამოკვლევა ექვემდებარება ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი №1-ის მიხედვით გაგრძელებას. თუ მეორე სკრინინგ-ტესტის შედეგი უარყოფითია, ასეთ შემთხვევაში ითვლება, რომ ნიმუში არ არის მავნე ორგანიზმით დასნებოვნებული.

7. დადებითი IF ტესტი განისაზღვრება დადებითი IF მონაცემებით, რასაც ადასტურებს მეორე სკრინინგ-ტესტი (პჯრ/FISH).

8. ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-7 მუხლის პირველ პუნქტში მითითებული მავნე ორგანიზმის დადასტურებული არსებობა გულისხმობს მავნე ორგანიზმის სუფთა კულტურის გამოყოფას და იდენტიფიკაციას პათოგენობის დადასტურებასთან ერთად.

მუხლი 13. მავნე ორგანიზმის სიმპტომების მქონე კარტოფილის ტუბერებსა და მცენარეებში ორგანიზმის გამოვლენა და იდენტიფიკაცია

მავნე ორგანიზმის სიმპტომების მქონე კარტოფილის ტუბერებსა და მცენარეებში მავნე ორგანიზმის გამოვლენა მოიცავს:

ა) მავნე ორგანიზმისთვის დამახასიათებელი ტიპური, ან საექვო სიმპტომების მქონე კარტოფილის ტუბერებსა და ნარგავებში მავნე ორგანიზმის გამოკვლევის პროცედურას, რომელიც ითვალისწინებს სწრაფ სკრინინგ-ტესტს, დასნებოვნებული ჭურჭელ-ბოჭკოვანი ქსოვილიდან დაავადების გამომწვევი მავნე ორგანიზმის სადიაგნოსტიკო საკვებ არეზე გამოყოფას;

ბ) დადებითი შედეგის შემთხვევაში, მავნე ორგანიზმის კულტურის იდენტიფიკაციას.

მუხლი 14. უსიმპტომო კარტოფილის ტუბერების ნიმუშებში მავნე ორგანიზმის გამოვლენა და იდენტიფიკაცია

უსიმპტომო კარტოფილის ტუბერების ნიმუშების შემოწმების მიზანია ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი №2-№3-ის მიხედვით მავნე ორგანიზმის გამოვლენა და იდენტიფიკაცია. სხვადასხვა ბიოლოგიური პრინციპის მიხედვით ჩატარებული სულ მცირე ორი სკრინინგ-ტესტის შედეგად მიღებულ დადებით პასუხს უნდა ემატებოდეს პათოგენის გამოყოფა, რასაც, **ტიპური კოლონიების** გამოყოფის შემთხვევაში, მოსდევს მავნე ორგანიზმის სუფთა კულტურის იდენტიფიკაცია და დადასტურება. მხოლოდ ერთი სკრინინგ-ტესტის დადებითი შედეგი საკმარისი არ იქნება იმისთვის, რომ ნიმუში ჩაითვალოს დაავადების გამომწვევი მავნე ორგანიზმის მატარებლად. სკრინინგის და გამოყოფის ტესტები უნდა ჩატარდეს რესუსპენზირებული ნალექის 10^3 -დან 10^4 -მდე უჯრედი/მლ-ში განზავებაში, რომელიც ტესტის თითოეულ კომპლექტში შეტანილია დადებითი კონტროლის სახით.

თავი IV

ნიმუშის მომზადება

მუხლი 15. კარტოფილის ტუბერების ნიმუშის მომზადება

1. სტანდარტული ნიმუშისთვის საჭიროა 200 ტუბერი ერთ ტესტზე. უფრო ინტენსიური გამოკვლევისთვის საჭიროა ჩატარდეს რამდენიმე ტესტი, თითოეული ტესტისთვის 200 ტუბერით. სტანდარტული ნიმუშისთვის უფრო მეტი რაოდენობის ტუბერის აღება გამოიწვევს შედეგების ინტერპრეტაციის გართულებას, თუმცა, ტუბერების შეზღუდული რაოდენობის შემთხვევაში პროცედურა შეიძლება ჩატარდეს 200-ზე ნაკლებ რაოდენობაზე.

2. მავნე ორგანიზმის გამოვლენის მეთოდების ვალიდაცია ეფუძნება 200 ტუბერის შემცველი ნიმუშის გამოკვლევას.

3. კარტოფილის ექსტრაქტის გამოყენება შესაძლებელია კარტოფილის მურა სიდამპლის (*Ralstonia solanacearum*) იდენტიფიცირებისთვის.

4. ნიმუშის მომზადებამდე კარტოფილის ტუბერების წინასწარი დამუშავებისას:

ა) ტუბერები ირეცხება შესაბამისი სადეზინფექციო საშუალებების (ქლორის ნაერთები – პჰრ ტესტის ჩატარების შემთხვევაში სხვა შესაძლო პათოგენების დნმ-ის მოსაშორებლად), ხოლო ნიმუშების ტესტირებებს შორის – სარეცხი საშუალებების გამოყენებით. ტუბერები შრება ჰაერზე. გარეცხვის პროცედურა განსაკუთრებით სასარგებლოა (თუმცა არა აუცილებელი) იმ ნიმუშების შემთხვევაში, რომლებშიც არის დიდი რაოდენობით ნიადაგი და ასევე, პჰრ ტესტის ან პირდაპირი გამოყოფის პროცედურის ჩატარებისას;

ბ) სტერილური დანით ყველა კარტოფილს უნდა მოსცილდეს კანი ტუბერთან სტოლონის მიერთების ადგილას ისე, რომ გამოჩნდეს ჭურჭელ-ბოჭკოვანი ქსოვილი. ჭურჭელ-ბოჭკოვანი ქსოვილის პატარა ნაწილი ფრთხილად უნდა ამოიჭრას და მაქსიმალურად მოსცილდეს არაბოჭკოვანი ქსოვილი;

გ) მავნე ორგანიზმის ნიშნების მქონე ტუბერები უნდა განცალკევდეს და ცალკე იქნეს გამოკვლეული;

დ) თუ ტუბერთან სტოლონის მიერთების ადგილას ტუბერის გადაჭრისას გამოვლინდა რგოლური სიდამპლის სავარაუდო სიმპტომი, ტუბერი უნდა დათვალიერდეს ვიზუალურად და გადაჭრილი ზედაპირის გასაშრობად შენახულ იქნეს ოთახის ტემპერატურაზე 2 დღის განმავლობაში და გამოკვლევის დასრულებამდე – კარანტინის პირობებში (4 -10°C-ზე). სტანდარტული ნიმუშის ყველა ტუბერი (მათ შორის საექვო სიმპტომების მქონე) შენახულ უნდა იქნეს ამ ტექნიკური რეგლამენტის 29-ე მუხლის შესაბამისად;

ე) ამოჭრილი ჭურჭელ-ბოჭკოვანი ქსოვილი უნდა შეგროვდეს კონტეინერში, რომლიც დახურული ან/და დალუქული უნდა იყოს (კონტეინერების ხელახლა გამოყენების შემთხვევაში, საჭიროა მათი სათანადოდ დეზინფექცია ქლორის ნაერთების საშუალებით). უმჯობესია მათი დამუშავება მოხდეს დაუყოვნებლივ. თუ ეს არ ხერხდება, ისინი შენახულ უნდა იქნეს მაცივარ-კონტეინერში, ბუფერის დამატების გარეშე, არაუმეტეს 72 საათის განმავლობაში, ან ოთახის ტემპერატურაზე, არაუმეტეს 24 სთ-ისა. ნიმუშის შენახვის პერიოდში მისმა გამოშრობამ და საპროფიტების განვითარებამ შესაძლოა შეაფერხოს მავნე ორგანიზმის გამომწვევი ბაქტერიის გამოვლენა;

ვ) ამოჭრილი ქსოვილი უნდა დამუშავდეს ქვემოთ მოცემული ერთ-ერთი პროცედურის გამოყენებით, კერძოდ:

ვ.ა) ქსოვილი უნდა დაიფაროს საკმარისი მოცულობის (დაახლოებით 40 მლ) საექსტრაქციო ბუფერით ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი №8-ის შესაბამისად და მოთავსებულ იქნეს როტაციულ სანჯღრეველაზე (50 -100 ბრუნი წუთში) ოთხი საათის განმავლობაში, არაუმეტეს 24°C ტემპერატურისა, ან გაყინულ იქნეს 16-24 სთ- ის განმავლობაში;

ვ.ბ) ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი №8-ის შესაბამისად მოხდეს ქსოვილის ჰომოგენიზაცია საკმარისი მოცულობის (დაახლოებით 40მლ) საექსტრაქციო ბუფერში, ბლენდერით, ან მოხდეს დაქუცმაცება საექსტრაქციო პარკში (Bioreba, ზომა 150 მმ X250მმ, სტერილური) რეზინის ჩაქუჩის გამოყენებით;

ზ) ბლენდერის საშუალებით ნიმუშების ჰომოგენიზაციის შემთხვევაში ნიმუშების ურთიერთდაბინძურების მაღალი რისკის თავიდან ასაცილებლად მიღებულ უნდა იქნეს შესაბამისი წინასწარი ზომები, რათა არ წარმოიქმნას აეროზოლი, ან არ მოხდეს გაჟონვა ექსტრაქციის პროცესის დროს. თითოეული ნიმუშისთვის გამოყენებულ უნდა იქნეს ახლად გასტერილებული ჭურჭელი და დანები. პჯრ ტესტის ჩატარების შემთხვევაში, უნდა გამოირიცხოს დნმ-ის გადატანის შესაძლებლობა კონტეინერებზე ან დამაქუცმაცებელ აპარატებზე. პჯრ ტესტირებისას რეკომენდებულია ერთჯერად პაკეტებში დაქუცმაცება და ერთჯერადი მოხმარების სინჯარების გამოყენება;

თ) სუპერნატანტი უნდა გადაიღვაროს. იმ შემთხვევაში, თუ სითხე ზედმეტად მღვრიეა, საჭიროა დაცენტრიფუგირდეს დაბალი სიჩქარით (არაუმეტეს 180 ბრუნი 10 წუთის განმავლობაში, 4-10°C ტემპერატურაზე), ან გაიფილტროს ვაკუუმით (40-100 მკლ). ფილტრი დამატებით უნდა იქნეს გარეცხილი (10 მლ) საექსტრაქციო ბუფერით ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი №8-ის შესაბამისად;

ი) ბაქტერიული ფრაქციის კონცენტრირება უნდა მოხდეს ცენტრიფუგირების გზით 7 000 ბრუნი 15 წუთის განმავლობაში (ან 10 000 ბრუნი 10 წუთის განმავლობაში) 4-დან 10°C ტემპერატურაზე. წარმოქმნილი სუპერნატანტი ფრთხილად უნდა გადაიღვაროს, ისე რომ სინჯარის ფსკერს არ მოსცილდეს ნალექი;

კ) ნალექის რესუსპენდირება უნდა მოხდეს 1,5 მლ ბუფერში ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი №8-ის შესაბამისად 500 მკლ გამოყენებულ უნდა იქნეს მავნე ორგანიზმის ტესტისთვის, 500 მკლ *Ralstonia solanacearum*-ის ტესტისთვის და 500 მკლ შენახულ იქნეს, როგორც ეტალონური მასალა. 500 მკლ ეტალონურ მასალას და დარჩენილ სატესტო ალიქვოტს უნდა დაემატოს სტერილური გლიცერინი ისე, რომ მისი საბოლოო კონცენტრაცია იყოს 10-25% (v/v), შეინჯღრეს და შენახულ იქნეს -16 - 24°C ტემპერატურაზე (კვირების განმავლობაში) ან -68°C – -86°C ტემპერატურაზე (თვეების განმავლობაში). ტესტის ალიქვოტები ტესტის მიმდინარეობისას შენახული უნდა იქნეს 4-10°C ტემპერატურაზე. განმეორებითი გაყინვა და გაღობა რეკომენდებული არ არის. ტრანსპორტირების შემთხვევაში ექსტრაქტი უნდა მოთავსდეს მაცივარყუთში და მიწოდებულ იქნეს 24-48 საათის განმავლობაში;

ლ) სავალდებულოა, რომ მავნე ორგანიზმის დადებითი კონტროლი და ნიმუშები დამუშავდეს ერთმანეთისგან დამოუკიდებლად, რათა თავიდან იქნეს აცილებული დაბინძურება. აღნიშნული ასევე ვრცელდება IF ტესტის მიკროსკოპულ პრეპარატებზე და ყველა სხვა ტესტზე.

მუხლი 16. კარტოფილის მცენარეების ნიმუშის მომზადება

1. ლატენტური მავნე ორგანიზმის გამოსავლენად რეკომენდებულია შერეული ნიმუშების შემოწმება. აღნიშნული პროცედურა ტარდება 200 ცალამდე ღეროს ნაწილის შერეული ნიმუშით (გამოკვლევების ჩატარება უნდა ეფუძნებოდეს გამოსაკვლევ მცენარეების პოპულაციის საშუალო ნიმუშის შერჩევას).

2. სუფთა დეზინფიცირებული დანით, თითოეული მცენარის ღეროს ფუძესთან, ნიადაგის ზედაპირის დონეზე უნდა ამოიჭრას 1-დან 2-სანტიმეტრამდე სეგმენტი.

3. 70%-იანი ეთანოლის საშუალებით დეზინფიცირება უნდა გაუკეთდეს ღეროს სეგმენტებს და დაუყოვნებლივ შემშრალდეს ფილტრის ქაღალდით.

4. ღეროს სეგმენტები უნდა შეგროვდეს დახურულ სტერილურ კონტეინერში ნიმუშის აღების შესაბამისი პროცედურების დაცვით.

5. ღეროს სეგმენტები უნდა დამუშავდეს ქვემოთ მოცემული ერთ-ერთი პროცედურის გამოყენებით:

ა) სეგმენტები დაფარული უნდა იქნეს ექსტრაქციის ბუფერის საკმარისი მოცულობით (დაახლოებით 40 მლ) ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი №8-ის შესაბამისად და შეინჯღრეს როტაციული სანჯღრეველას გამოყენებით (50-100 ბრ/წთ) 4 საათის განმავლობაში არაუმეტეს 24°C ტემპერატურისა, ან 16-24 საათის განმავლობაში შენახულ იქნეს მაცივარში;

ბ) დაუყოვნებლივ დაქუცმაცდეს საექსტრაქციო პარკში (მაგ., Stomacher ან Bioreba) რეზინის ჩაქურჩის ან შესაბამისი დამქუცმაცებელი აპარატის გამოყენებით. თუ ეს შეუძლებელია, ღეროს ნაწილები შენახულ უნდა იქნეს მაცივარში არაუმეტეს 72 საათისა, ან ოთახის ტემპერატურაზე არაუმეტეს 24 საათის განმავლობაში;

გ) 15 წუთის დაყოვნების შემდეგ სუპერნატანტი უნდა იქნეს მოცილებული;

დ) ექსტრაქტის ან ბაქტერიული ფრაქციის შემდგომი გასუფთავება არ არის ყოველთვის აუცილებელი, თუმცა აღნიშნულის გაკეთება შესაძლებელია ფილტრაციით ან/და ცენტრიფუგირების გზით, როგორც ეს მითითებულია ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-15 მუხლის მე-4 პუნქტის „თ – კ“ ქვეპუნქტებში;

ე) განუზავებელი ან კონცენტრირებული ნიმუშის ექსტრაქტი უნდა გაიყოს ორ თანაბარ ნაწილად. გამოკვლევის დროს, ერთი ნაწილი შენახული უნდა იქნეს 4-10°C ტემპერატურაზე, ხოლო მეორე ნაწილი 10-25% (v/v) სტერილური გლიცერინით -16-დან -24°C ტემპერატურაზე (რამდენიმე კვირა) ან -68°C – -86°C ტემპერატურაზე (თვეების განმავლობაში) შემდგომი გამოკვლევის საჭიროების შემთხვევაში.

მუხლი 17. IF ტესტის მეთოდით მავნე ორგანიზმის გამოვლენა

1. რეკომენდებულია IF ტესტის, როგორც ძირითადი სკრინინგ ტესტის გამოყენება საჭირო ზღვარის დადგენაში მისი სანდოობის გამო.

2. იმ შემთხვევაში, თუ IF ტესტი გამოიყენება, როგორც ძირითადი სკრინინგ ტესტი და მიღებული შედეგები დადებითია, აუცილებელია პჯრ ან FISH ტესტის, როგორც მეორე სკრინინგ ტესტის, ჩატარება. იმ შემთხვევაში, თუ IF ტესტი გამოყენებულია როგორც მეორე სკრინინგ ტესტი და მიღებული მონაცემები დადებითია, მაშინ ანალიზის დასასრულებლად საჭიროა გამოკვლევა გაგრძელდეს ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი №1-3-ის შესაბამისად.

3. IF ტესტის, როგორც ძირითადი სკრინინგ ტესტის გამოყენების შემთხვევაში, აუცილებელია პოლიკლონური ანტისხეულის გამოყენება. თუ პოლიკლონური ანტისხეულის გამოყენებით IF ტესტის შედეგი დადებითია, ნიმუშის შემდგომი გამოკვლევა მონოკლონური ანტისხეულით იქნება უფრო ზუსტი (სპეციფიკური), თუმცა ამავდროულად ნაკლებად მგრძნობიარე.

4. გამოყენებული უნდა იქნეს მავნე ორგანიზმის ეტალონური შტამის ანტისხეულები. ტიტრის განსაზღვრა რეკომენდებულია ანტისხეულების ყოველი ახალი სერიისთვის. ტიტრი განისაზღვრება, როგორც მაქსიმალური, როდესაც გამოყენებულია შესაბამისი ფლოუორესცენციული იზოტიოცინატის (FITC) კონიუგატი მწარმოებლის რეკომენდაციების შესაბამისად და მავნე ორგანიზმის ჰომოლოგიური შტამის $10^5 - 10^6$ უჯრედი/მლ სუსპენზიის ტესტი იძლევა ოპტიმალურ რეაქციას. დაუმუშავებელი მონოკლონური ან პოლიკლონური ანტისხეულების IF ტიტრი უნდა იყოს სულ მცირე 1:2000. ტესტირებისთვის გამოიყენება ვალიდირებული ანტისხეულები მათი სამუშაო განზავებები უნდა იყოს ტიტრის ტოლი ან მასთან მიახლოებული.

5. ტესტი უნდა ჩატარდეს ახლად მომზადებული ნიმუშის ექსტრაქტებზე. საჭიროების შემთხვევაში, ტესტის წარმატებით შესრულება შესაძლებელია იმ ექსტრაქტებზეც, რომლებიც ინახება გლიცერინში $-68^{\circ}\text{C} - -86^{\circ}\text{C}$ ტემპერატურაზე. გლიცერინის მოცილება ნიმუშიდან შესაძლებელია 1 მლ დასალექი ბუფერის დამატებით ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი №9-ის შესაბამისად, ხელახლა დაცენტრიფუგირებით 7000 g 15 წუთით და საბოლოოდ მისი გახსნით დასალექი ბუფერის იმავე მოცულობაში. ხშირად ეს პროცედურა არ არის საჭირო, განსაკუთრებით იმ შემთხვევაში, თუ ნიმუშის პრეპარატი სასაგნე მინაზე ალზე გატარებით არის დაფიქსირებული.

6. ცალკე მზადდება დადებითი კონტროლის პრეპარატები მავნე ორგანიზმის ჰომოლოგიური შტამიდან, ან ნებისმიერი სხვა ეტალონური შტამიდან, რომელიც სუსპენდირებულია კარტოფილის ექსტრაქტში ამ ტექნიკური რეგლამენტის 30-ე მუხლის შესაბამისად.

7. თუ შესაძლებელია, ანალოგიური კონტროლის სახით, იმავე სასაგნე მინაზე გამოყენებული უნდა იქნეს ბუნებრივად დასნებოვნებული ქსოვილი (რომელიც ინახება ლიოფილიზირებული ან გაყინული -16°C -დან -24°C -მდე ტემპერატურაზე).

8. უარყოფითი კონტროლის სახით შესაძლებელია, წინა ტესტირებისას უარყოფითად მიჩნეული ნიმუშის ექსტრაქტის ალიკვოტების გამოყენება.

9. სასურველია გამოყენებულ იქნეს მიკროსკოპის 10-ფოსოიანი სასაგნე მინა, რომლის თითოეული ფოსოს დიამეტრი იქნება სულ მცირე 6 მმ.

10. საკონტროლო მასალის ანალიზი (ტესტირება) კეთდება გამოსაცდელი ნიმუშ(ებ)ის იდენტიურად.

11. ტესტისთვის ნიმუშის პრეპარატები მზადდება ჩამოთვლილთაგან ერთ-ერთი პროცედურის შესაბამისად:

ა) სახამებლის შედარებით მცირე რაოდენობის შემცველი ნალექისთვის 1/100 განზავების კარტოფილის რესუსპენდირებული ექსტრაქტის განსაზღვრული მოცულობა (სასაგნე მინის 6 მმ დიამეტრის მქონე ფოსოსთვის საკმარისია 15 მკლ, უფრო დიდი ფოსოს შემთხვევაში შეარჩიეთ შესაბამისი რაოდენობა) პიპეტით თავსდება სასაგნე მინის პირველ ფოსოში. შემდეგ განზავებული ექსტრაქტის (1/1) იგივე მოცულობები შეაქვთ ერთ ხაზზე მოთავსებულ დანარჩენ ფოსოებში. ფოსოების მეორე რიგი შესაძლოა გამოყენებული იქნეს განმეორებისთვის, ან მეორე ნიმუშისთვის, ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი №4-ის შესაბამისად;

ბ) სხვა ტიპის ნალექებისთვის დასაღეპ ბუფერში მზადდება რესუსპენდირებული ნალექის დეციმალური განზავებები (1/10 და 1/100). რესუსპენდირებული ექსტრაქტის და თითოეული განზავების განსაზღვრული მოცულობა (სასაგნე მინის 6 მმ დიამეტრის მქონე ფოსოსთვის საკმარისია 15 მკლ. უფრო დიდი ფოსოს შემთხვევაში შეარჩიეთ შესაბამისი რაოდენობა) პიპეტით თავსდება სასაგნე მინის ფოსოებში. ფოსოების მეორე რიგი შესაძლოა გამოყენებული იქნეს განმეორებისთვის, ან მეორე ნიმუშისთვის, ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი №5-ის შესაბამისად.

12. სასაგნე მინაზე დატანილი წვეთები შრება ოთახის ან 40-45°C ტემპერატურაზე. სასაგნე მინაზე ბაქტერიული უჯრედების ფიქსაცია უნდა მოხდეს გაცხელებით (15 წთ. 60°C ტემპერატურაზე), 95%-იანი ეთანოლით ალზე გატარებით, ან ანტისხეულების მომწოდებლის მიერ მითითებული ინსტრუქციების შესაბამისად.

13. საჭიროების შემთხვევაში, ფიქსირებული პრეპარატების შენახვა შესაძლებელია გაყინულ მდგომარეობაში, მშრალ ყუთში იმ მინიმალური დროის (მაქსიმუმ 3 თვე) განმავლობაში, რაც საჭიროა შემდგომ ტესტირებამდე.

14. IF პროცედურა მოიცავს:

ა) ამ მუხლის მე-3 პუნქტის შესაბამისად, ტესტის პრეპარატისთვის მზადდება IF ბუფერში ანტისხეულის ორჯერადი განზავებების სერია. პირველ ფოსოს ტიტრი უნდა ჰქონდეს 1/2 (T/2), დანარჩენებს -1/4 (T/4), 1/2 (T/2), ტიტრი (T) და ორმაგი ტიტრი (2T);

ბ) ამ მუხლის მე-2 პუნქტის შესაბამისად, ტესტის პრეპარატის დასამზადებლად IF ბუფერში მზადდება ანტისხეულის სამუშაო განზავება (WD), რომელიც ზეგავლენას ახდენს სპეციფიურობაზე;

გ) პრეპარატები თავსდება ტენიან ქაღალდზე. თითოეული საცდელი ფოსო მთლიანად იფარება ანტისხეულის განზავებებით. თითოეულ საცდელ ფოსოში შეტანილი ანტისხეულის მოცულობა სულ მცირე უნდა უტოლდებოდეს გამოყენებული ექსტრაქტის მოცულობას;

დ) ანტისხეულების მომწოდებლებისგან კონკრეტული ინსტრუქციების არ არსებობის შემთხვევაში უნდა განხორციელდეს შემდგომი პროცედურა;

ე) პრეპარატების ინკუბაცია ხდება ტენიან ქაღალდზე, დახურულ მდგომარეობაში 30 წუთის განმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე (18-25°C);

ვ) თითოეული სასაგნე მინიდან წვეთები უნდა ჩამოიფერთხოს და კარგად ჩამოირეცხოს IF ბუფერით. გაირეცხოს 5 წუთის განმავლობაში IF ბუფერ-Tween-ში ჩადირვით ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი №8-ის მიხედვით, ხოლო შემდგომ 5 წუთი - IF ბუფერში. არ უნდა მოხდეს აეროზოლის წარმოქმნა ან წვეთის გადატანა, რათა თავიდან იქნეს აცილებული ჯვარედინი დასნეობონება. ზედმეტი სისველე უნდა მოსცილდეს ფილტრის ქაღალდით;

ზ) პრეპარატები თავსდება ტენიან ქაღალდზე. ტიტრის განსაზღვრის მიზნით სასაგნე მინის თითოეული ფოსო უნდა დაიფაროს განზავებული FITC-ის კონიუგატით. თითოეულ ფოსოსთვის გამოყენებული კონიუგატის მოცულობა, უნდა უტოლდებოდეს გამოყენებული ანტისხეულის მოცულობას;

თ) პრეპარატების ინკუბაცია უნდა მოხდეს ტენიან ქაღალდზე, დახურულ მდგომარეობაში 30 წუთი, ოთახის ტემპერატურაზე (18-25°C);

ი) სასაგნე მინაზე კონიუგატის წვეთები უნდა შეინჯღრეს და კარგად ჩამოირეცხოს ამ პუნქტის „ვ“ ქვეპუნქტის მიხედვით და ფრთხილად მოსცილდეს ზედმეტი სისველე;

კ) ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი №8-ის შესაბამისად 5-10 მკლ 0,1 მოლი ფოსფატური ბუფერი გლიცერინით ან კომერციული, გაუფერულების საწინააღმდეგო სითხე შეიტანება თითოეულ ფოსოში და დაეფარება საფარი მინა.

მუხლი 18. IF ტესტის მონაცემების წაკითხვა

1. IF ტესტის მონაცემების წასაკითხად გამოსაკვლევი პრეპარატები მოწმდება ეპიფლუორესცენტულ მიკროსკოპზე, რომელსაც აქვს FITC-ის შესაბამისი წამკითხველი ფილტრები, 500-დან 1000-მდე გადიდებაზე, იმერსიული ზეთის ან წყლის გამოყენებით. ფოსო მოწმდება მართი კუთხით გადამკვეთი ორი დიამეტრის და პერიმეტრის გასწვრივ. ნიმუშებში, რომლებიც საერთოდ არ ავლენენ, ან ავლენენ მცირე რაოდენობით უჯრედებს, დაკვირვება უნდა მოხდეს სულ მცირე 40 გადიდებაზე.

2. პირველ რიგში მოწმდება სასაგნე მინა დადებითი კონტროლით. უჯრედები უნდა იყოს ძლიერ ფლუორესცენტული და მთლიანად შეღებილი ანტისხეულის განსაზღვრულ ტიტრზე ან

სამუშაო განზავებაზე. თუ შედეგა არადადამაკმაყოფილებელია IF ტესტი ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-17 მუხლის 1-9 პუნქტების თანახმად უნდა გამეორდეს.

3. პრეპარატების გამოსაკვლევ ფოსოში დაკვირვება ხდება მავნე ორგანიზმისთვის დამახასიათებელი მორფოლოგიური ნიშნების მქონე, ძლიერ ფლუორესცენტულ უჯრედებზე. ანტისხეულის ერთსა და იმავე განზავებაზე, ფლუორესცენციის ინტენსიობა უნდა იყოს დადებითი კონტროლის შტამის ეკვივალენტური ან უფრო ძლიერი. არასრულად შეღებილი ან სუსტი ფლუორესცენციის მქონე უჯრედები უნდა იქნეს იგნორირებული.

4. თუ არსებობს დასწებოვნების ეჭვი, აუცილებელია ტესტის გამეორება. კერძოდ, როდესაც ყველა პრეპარატი აჩვენებს დადებით უჯრედებს ბუფერის დაბინძურების გამო, ან დადებითი ნიმუშები გამოვლენილია (გამოსაკვლევ ფოსოს გარეთ) სასაგნე მინაზე.

5. არსებობს იმუნოფლუორესცენციის ტესტის სპეციფიკისთვის დამახასიათებელი რამდენიმე პრობლემა. ატიპური მორფოლოგიის მქონე ფლუორესცენტული უჯრედების ფონური პოპულაცია და ზომით და მორფოლოგიით მავნე ორგანიზმის მსგავსი, ჯვარედინი რეაქციის მქონე საპროფიტული ბაქტერიები, შესაძლოა გამოვლინდნენ კარტოფილის ტუბერთან სტოლონის მიერთების ადგილიდან აღებული ქსოვილის და ღეროს სეგმენტის ნალექებში.

6. ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-17 მუხლის შესაბამისად, ანტისხეულების ტიტრზე ან სამუშაო განზავებაში გათვალისწინებულ უნდა იქნეს მხოლოდ ტიპური ზომისა და მორფოლოგიის მქონე ფლუორესცენტული უჯრედები.

მუხლი 19. IF ტესტის შედეგების ინტერპრეტაცია

1. თუ დაფიქსირდა დამახასიათებელი მორფოლოგიის მქონე ძლიერ ფლუორესცენტული უჯრედები, უნდა შეფასდეს **ტიპური** უჯრედების საშუალო რაოდენობა მიკროსკოპის მხედველობის თითოეულ არეში და გამოთვლილ იქნეს **ტიპური** უჯრედების რაოდენობა გახსნილი ნალექის ერთ მლ-ში ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი №9-ის შესაბამისად.

2. IF ტესტის შედეგი დადებითია ნიმუშებისთვის, რომლებიც გახსნილი ნალექის ერთ მლ-ში შეიცავენ სულ მცირე 5×10^3 ტიპურ უჯრედს. ეს ნიმუში ითვლება პოტენციურად დაბინძურებულად და შესაბამისად, საჭიროა შემდგომი შემოწმების ჩატარება.

3. IF ტესტის შედეგები უარყოფითია იმ ნიმუშებისთვის, რომლებშიც გახსნილი ნალექის ერთ მლ-ში უჯრედების რაოდენობა 5×10^3 -ზე ნაკლებია. ამ შემთხვევაში ნიმუში ითვლება უარყოფითად და განმეორებითი შემოწმება საჭიროა აღარ არის.

მუხლი 20. FISH ტესტის მეთოდი

1. როდესაც FISH ტესტი გამოიყენება, როგორც პირველი სკრინინგ-ტესტი და ის აღმოჩნდება დადებითი, ამ შემთხვევაში IF ტესტი უნდა ჩატარდეს, როგორც მეორე სავალდებულო სკრინინგ-ტესტი. როდესაც FISH ტესტი გამოიყენება, როგორც მეორე სკრინინგ-ტესტი და აღმოჩნდება დადებითი, დიაგნოსტიკის დასრულების მიზნით აუცილებელია

გამოკვლევა გაგრძელდეს სქემის მიხედვით ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი №1-3-ის შესაბამისად.

2. გამოყენებულ უნდა იქნეს მავნე ორგანიზმისათვის სპეციფიკური ოლიგო-ზონდები ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი №12-ის შესაბამისად. აღნიშნული მეთოდის გამოყენებამ უნდა უზრუნველყოს უარყოფითად მიჩნეული ნიმუშის ექსტრაქტებზე დამატებული სულ მცირე 10^3 - 10^4 უჯრედი/მლ-ზე მავნე ორგანიზმის უჯრედების აღმოჩენა.

3. პროცედურა რეკომენდებულია ჩატარდეს ახლად მომზადებული ნიმუშის ექსტრაქტზე, თუმცა შესაძლებელია ასევე წარმატებით ჩატარდეს იმ ნიმუშის ექსტრაქტზეც, რომელიც ინახება გლიცერინში -16°C -დან -24°C , ან -68°C -დან -86°C - მდე ტემპერატურაზე.

4. უარყოფითი კონტროლისათვის გამოიყენება იმ ნიმუშის ექსტრაქტის ალიკვოტები, რომელმაც წინასწარი შემოწმებით უარყოფითი შედეგი აჩვენა მავნე ორგანიზმის არსებობაზე.

5. დადებითი კონტროლისთვის 0,01მოლი ფოსფატის ბუფერში 3-5 დღის კულტურიდან მზადდება მავნე ორგანიზმის 10^5 - 10^6 უჯრედი/მლ -ზე სუსპენზიები (მაგ.: შტამი NCPPB 4053, ან PD 406) ამ ტექნიკური რეგლამენტის 28-ე მუხლის შესაბამისად.

6. ცალკე მზადდება კარტოფილის ექსტრაქტში გახსნილი ჰომოლოგიური შტამის ან მავნე ორგანიზმის ნებისმიერი სხვა ეტალონური შტამის დადებითი კონტროლის პრეპარატები, ამ ტექნიკური რეგლამენტის 28-ე მუხლის შესაბამისად.

7. FITC-ით მონიშნული ეუბაქტერიული ოლიგო-ზონდების გამოყენება იძლევა ჰიბრიდიზაციის პროცესის კონტროლის საშუალებას, რამდენადაც ის ღებავს ნიმუშში არსებულ ყველა ეუბაქტერიას.

8. საკონტროლო მასალების ტესტირება ხდება საგამოცდო ნიმუშის იდენტურად.

მუხლი 21. კარტოფილის ექსტრაქტის ფიქსაცია

კარტოფილის ექსტრაქტის ფიქსაციისას:

ა) საფიქსაციო ხსნარი მზადდება ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი №12-ის შესაბამისად;

ბ) თითოეული ნიმუშის 100 მკლ ექსტრაქტი პიპეტირებით გადაიტანება ეპენდორფის სინჯარაში და დაცენტრიფუგირდება რვა წუთი 7 000 გ -ზე;

გ) სუპერნატანტი სცილდება და ნალექი იხსნება 500 მკლ საფიქსაციო ხსნარში (რომელიც მომზადებულია გამოყენებამდე არაუმეტეს 24 საათით ადრე). შენჯღრევა ხდება ვორტექსზე და ინკუბირდება მთელი ღამით 4°C ტემპერატურაზე, ალტერნატიული მეთოდის სახით დასაფიქსირებლად შეიძლება გამოყენებული იყოს 96%-იანი ეთანოლი. ამისთვის, ნიმუშის ექსტრაქტის ნალექი იხსნება 50 მკლ 0.01M ფოსფატის ბუფერში და 50 მკლ 96%-იან ეთანოლში. შენჯღრევა ხდება ვორტექსზე და ინკუბირდება მთელი ღამით 4°C ტემპერატურაზე 30-60 წუთი;

დ) ცენტრიფუგირდება 8 წუთი 7 000 გ-ზე, სცილდება სუპერნატანტი და ხელახლა იხსნება ნალექი 75 მკლ 0.01მოლი ფოსფატის ბუფერში ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი №8-ის მოთხოვნათა შესაბამისად;

ე) საფიქსაციო ხსნარის 16 მკლ ეწვეთება მულტიტესტის სუფთა სასაგნე მინაზე, როგორც ეს ნაჩვენებია ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი №6-ში. თითოეულ სასაგნე მინაზე დაიტანება ორი სხვადასხვა განუზავებელი ნიმუში და 10 მკლ გამოიყენება 1:100 განზავების მოსამზადებლად (0,01M ფოსფატურ ბუფერში). ნიმუშის დარჩენილი რაოდენობის (49 მკლ) შენახვა შესაძლებელია -20°C ტემპერატურაზე 96%-იანი ეთანოლის 1 მოცულობის დამატების შემდეგ. იმ შემთხვევაში, თუ საჭირო გახდება FISH ტესტის გამოცდები, სცილდება ეთანოლი ცენტრიფუგირებით და ემატება 0,01M ფოსფატური ბუფერის იგივე მოცულობა (შენჯღრევა ხდება ვორტექსზე);

ვ) პრეპარატები შრება ჰაერზე (ან პრეპარატის საშრობით 37°C ტემპერატურაზე) და ფიქსირდება ალზე გატარებით. ამ ეტაპზე შესაძლებელია პროცედურის შეწყვეტა და ჰიბრიდიზაციის მომდევნო დღეს გაგრძელება. პრეპარატები შენახული უნდა იყოს დამტკერვისგან დაცულ ადგილას და გაშრეს ოთახის ტემპერატურაზე.

მუხლი 22. პრე-ჰიბრიდიზაცია და ჰიბრიდიზაცია

1. მზადდება 10 მგ ლისოზიმის შემცველობის ხსნარი (Sigma L-6876) 10 მლ ბუფერში (100 ml Tris-HCl, 50 მმოლი EDTA, pH8.0). ხსნარის შენახვა შესაძლებელია, თუმცა გაყინული მდგომარეობიდან გაღობა უნდა მოხდეს მხოლოდ ერთხელ. თითოეული ნიმუშის ფოსო იფარება 50 მკლ ლისოზიმის ხსნარით. ინკუბაცია უნდა მოხდეს 10 წუთი ოთახის ტემპერატურაზე. შემდეგ, პრეპარატები, მხოლოდ ერთხელ, თავსდება დემინერალიზებულ წყალში და შრება ფილტრის ქაღალდით.

2. ლისოზიმის ნაცვლად თითოეულ ფოსოში შეიძლება დაემატოს 50 მკლ პროტეინაზა K 40-400 მკგ/ მლ ბუფერში (20 mM Tris-HCl, 2 მმოლი CaCl₂, pH 7,4) და შენახულ იქნეს 37°C ტემპერატურაზე 30 წუთი.

3. პრეპარატის ფოსოები შრება 50%, 80% და 96%-იანი ეთანოლით მოცემული თანმიმდევრობით, თითოეულით ერთი წუთის განმავლობაში. შტატივში მოთავსებული პრეპარატები შრება ჰაერზე.

4. მზადდება საინკუბაციო ნოტიო კამერა: ჰერმეტიკულად დახურული ყუთის ძირზე ეფინება 1 x საჰიბრიდიზაციო ნარევი დასველებული ქსოვილი ან ფილტრის ქაღალდი. ყუთი წინასწარი ინკუბაციისათვის თავსდება ჰიბრიდიზაციის ლუმელში 55°C ტემპერატურაზე სულ მცირე 10 წუთი.

5. ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართის №13-ის შესაბამისად მზადდება საჰიბრიდიზაციო ხსნარი, თითოეული პრეპარატისთვის (საჭირო) 45 მკლ-ის ანგარიშით და წინასწარი ინკუბაციისათვის თავსდება ჰიბრიდიზაციის ლუმელში 55°C ტემპერატურაზე 5 წუთი.

6. პრეპარატები თავსდება ცხელ თასზე 45°C ტემპერატურაზე და დაიტანება 10-10 მკლ ჰიბრიდიზაციის ხსნარი პლანშეტ(ებ)ის ოთხივე ფოსოში.

7. თითოეული პრეპარატისთვის გამოიყენება ორი საფარი მინა (24×24 მმ) (არ უნდა შეჰყვეს ჰაერი). პრეპარატები თავსდება წინასწარ გამთბარ ნოტიო კამერაში და მთელი ღამით რჩება ღუმელში 55°C ტემპერატურაზე სიბნელეში ჰიბრიდიზაციისთვის.

8. მზადდება სამი საზომი ჭიქა: ერთი 1 ლ ულტრა სუფთა წყლით (UPW), მეორე 1 ლ $1 \times$ საჰიბრიდიზაციო ნარევით (334 მლ $3 \times$ საჰიბრიდიზაციო ნარევი და 666 მლ ულტრა სუფთა წყალი (UPW)), ხოლო მესამე 1 ლ. $1/2 \times$ საჰიბრიდიზაციო ნარევით (167 მლ $3 \times$ საჰიბრიდიზაციო ნარევი და 833 მლ ულტრა სუფთა წყალი (UPW)). თითოეულ მათგანს უკეთდება წინასწარი ინკუბაცია 55°C ტემპერატურაზე წყლის აბაზანაში.

9. პრეპარატებს სცილდება საფარი მინები და თავსდება შტატივში.

10. ზონდების ზედმეტი ნარჩენების მოსაცილებლად თავსდება საზომ ჭიქაში, რომელშიც ასხია $1 \times$ საჰიბრიდიზაციო ნარევი და უკეთდება ინკუბაცია 55°C ტემპერატურაზე, 15 წუთი.

11. შტატივი გადააქვთ $1/2 \times$ საჰიბრიდიზაციო ნარევის გასარეცხ ხსნარში და აჩერებენ 15 წუთის განმავლობაში.

12. პრეპარატებს ძალიან ცოტა ხნით უშვებენ ულტრა სუფთა წყალში (UPW) და ათავსებენ ფილტრის ქაღალდზე. ზედმეტი სითხის მოსაცილებლად ფრთხილად აფარებენ ფილტრის ქაღალდს. პიპეტით აწვეთებენ 5-10 მკლ გაუფერულების საწინააღმდეგო სითხეს (მაგ.: Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA ან სხვა მსგავსი) თითოეულ ფოსოზე და პრეპარატს მთლიანად აფარებენ დიდ საფარ მინას (24×60 მმ).

მუხლი 23. FISH ტესტის მონაცემების წაკითხვა

1. პლანშეტები დაუყოვნებლივ უნდა დათვალიერდეს იმერსიული ზეთის ქვეშ ეპიფლუორესცენტული მიკროსკოპით 630 ან 1000 \times გადიდებაზე. ფილტრით, რომელიც შეესაბამება ფლუორესცენტულ იზოთიოცინატს (FITC) ნიმუშში არსებული ეუბაქტერიული უჯრედები (მათ შორის მეტი წილი გრამუარყოფითი უჯრედებისა) იღებება ფლუორესცენტულ მწვანედ. ტეტრამეთილროდამინ-5-იზოთიოცინატის ფილტრის გამოყენებით Cy3-ით შეღებილი მავნე ორგანიზმის უჯრედები იღებენ ფლუორესცენტულ წითელ შეფერილობას. უჯრედის მორფოლოგია ედრება დადებითი კონტროლის უჯრედებს. უჯრედები უნდა იყოს ძლიერ ფლუორესცენტული და მთლიანად შეღებილი. არასრული შეღებვის შემთხვევაში FISH ტესტი ამ ტექნიკური რეგლამენტის 27-ე მუხლის მე-15 პუნქტის შესაბამისად უნდა იქნეს გამეორებული. ფოსო მოწმდება მართი კუთხით გადამკვეთი ორი დიამეტრის და პერიმეტრის გასწვრივ. ნიმუშებში, რომლებიც საერთოდ არ ავლენენ ან ავლენენ მცირე რაოდენობით უჯრედებს, დაკვირვება უნდა მოხდეს მიკროსკოპის სულ მცირე 40 მხედველობის არეზე.

2. პრეპარატების გამოსაკვლევ ფოსოში აკვირდებიან მავნე ორგანიზმისთვის დამახასიათებელი მორფოლოგიური ნიშნების მქონე, ძლიერ ფლუორესცენტულ უჯრედებს. ანტისხეულის ერთსა და იმავე განზავებაზე, ფლუორესცენციის ინტენსიობა უნდა იყოს

დადებითი კონტროლის შტამის ეკვივალენტური ან უფრო ძლიერი. არასრულად შეღებილი ან სუსტი ფლუორესცენციის მქონე უჯრედები უნდა იქნეს იგნორირებული.

3. თუ არსებობს დასნებოვნებასთან დაკავშირებული ეჭვი, აუცილებელია ტესტის გამეორება. კერძოდ, ეს შესაძლოა იყოს ისეთი შემთხვევები, როდესაც მომზადებული ყველა პრეპარატი აჩვენებს დადებით შედეგს ბუფერის დაბინძურების გამო, ან დადებითი ნიმუშები გამოვლენილია გამოსაკვლევი არის გარეთ სასაგნე მინაზე.

4. არსებობს FISH ტესტის სპეციფიკისთვის დამახასიათებელი რამდენიმე პრობლემა. კერძოდ, ატიპური მორფოლოგიის მქონე ფლუორესცენტული უჯრედების ფონური პოპულაცია, აგრეთვე ზომითა და მორფოლოგიით მავნე ორგანიზმის მსგავსი საპროფიტული ბაქტერიები, რომლებიც შესაძლოა გამოვლინდნენ (IF ტესტთან შედარებით ბევრად ნაკლებ შემთხვევებში) კარტოფილის ტუბერთან სტოლონის მიერთების ადგილიდან აღებული ქსოვილის და ღეროს სეგმენტის ნალექებში.

5. გათვალისწინებულ უნდა იქნეს მხოლოდ **ტიპური** ზომისა და მორფოლოგიის მქონე ფლუორესცენტული უჯრედები, როგორც ეს მითითებულია ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-17 მუხლში.

მუხლი 24. FISH ტესტის შედეგების ინტერპრეტაცია

1. FISH ტესტის შედეგები ვალიდურია, თუ ყველა დადებით კონტროლში FITC ფილტრის საშუალებით გამოვლინდება მავნე ორგანიზმისთვის **ტიპური** ზომის და მორფოლოგიის მქონე მკვეთრი, მწვანე ფლუორესცენტული უჯრედები, ხოლო როდამინის ფილტრის საშუალებით კი მკვეთრი, წითელი ფლუორესცენტული უჯრედები, მაშინ როცა, უარყოფით კონტროლში არცერთი არ გამოვლინდება. იმ შემთხვევაში, თუ გამოვლინდა დამახასიათებელი მორფოლოგიის ძლიერ ფლუორესცენტული უჯრედები, გამოთვლილ უნდა იქნეს ტიპური უჯრედების საშუალო რაოდენობა მიკროსკოპის მხედველობის თითოეული არესათვის და გამოთვლება ტიპური უჯრედების რაოდენობა გახსნილი ნალექის ყოველი მლ-თვის ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი №10-ის შესაბამისად. ნიმუშები, რომლებიც გახსნილი ნალექის ერთ მლ-ში შეიცავენ სულ მცირე 5×10^3 ტიპურ უჯრედს ითვლებიან პოტენციურად დასნებოვნებულად. შესაბამისად, აუცილებელია შემდგომი შემოწმების ჩატარება. ტესტის შედეგები უარყოფითია იმ ნიმუშებისთვის, რომლებშიც გახსნილი ნალექის ერთ მლ-ში **ტიპური** უჯრედების რაოდენობა 5×10^3 -ზე ნაკლებია.

2. FISH ტესტის შედეგი უარყოფითია, თუ როდამინის ფილტრით გამოსაცდელ ნიმუშში არ გამოვლინდა ზომით და მორფოლოგიით მავნე ორგანიზმის მსგავსი ძლიერი წითელი ფლუორესცენციის მქონე უჯრედები, მაშინ, როცა აღნიშნული ფილტრის გამოყენებით ტიპური ძლიერი წითლად ფლუორესცენტული უჯრედები ფიქსირდება დადებით კონტროლის პრეპარატებში.

მუხლი 25. პჯრ ტესტი

1. თუ პჯრ ტესტის, როგორც ძირითადი სკრინინგ ტესტის გამოყენების შემთხვევაში, მიღებული იქნა დადებითი შედეგი, აუცილებელია IF ტესტის, როგორც მეორე სავალდებულო სკრინინგ ტესტის ჩატარება. ხოლო პჯრ ტესტის, როგორც მეორე სკრინინგ ტესტის გამოყენების შემთხვევაში, თუ მიღებული იქნა დადებითი შედეგი, საბოლოო დიაგნოზისათვის აუცილებელია გამოკვლევა გაგრძელდეს ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართ №1-3-ის შესაბამისად.

2. პჯრ მეთოდით შესაძლებელი უნდა იყოს უარყოფითი ნიმუშის ექსტრაქტისთვის დამატებული 10^3 - 10^4 უჯრედი/მლ მავნე ორგანიზმის გამოვლენა. სპეციფიურობისა და მგრძნობელობის მაქსიმალური დონის მისაღწევად შესაძლოა საჭირო გახდეს მეთოდის ოპტიმიზაცია ყველა ლაბორატორიაში.

3. გამოყენებული უნდა იქნეს ვალიდირებული პჯრ რეაგენტები და პროტოკოლები. სასურველია გამოყენებული იქნეს მეთოდი, რომელიც ითვალისწინებს შიდა კონტროლს.

4. დაცული უნდა იყოს შესაბამისი ნორმები, რათა თავიდან იქნეს აცილებული ნიმუშის დასნებოვნება სამიზნე დნმ-ით. პჯრ ტესტი უნდა ჩატარდეს გამოცდილი და კვალიფიციური პერსონალის მიერ, სპეციალურად აღჭურვილი მოლეკულური ბიოლოგიის ლაბორატორიებში, რათა თავიდან იქნეს აცილებული სამიზნე დნმ-ით დასნებოვნების ალბათობა.

5. უარყოფითი კონტროლები (დნმ-ის ექსტრაქციისთვის და პჯრ პროცედურებისთვის) ყოველთვის უნდა მომზადდეს ბოლო ეტაპზე, დნმ-ით დასნებოვნების ალბათობის შესამოწმებლად.

6. პჯრ ტესტში გათვალისწინებული უნდა იყოს შემდეგი უარყოფითი კონტროლები:

ა) ნიმუშის ექსტრაქტი, რომელიც ადრე გამოცდილი იყო მავნე ორგანიზმზე და აჩვენა უარყოფითი შედეგი;

ბ) ბუფერული ხსნარების კონტროლები, რომლებიც გამოიყენება ბაქტერიისა და ნიმუშის დნმ-ის ექსტრაქციისთვის;

გ) პჯრ სარეაქციო ნარევი.

7. პჯრ ტესტში გათვალისწინებული უნდა იყოს შემდეგი დადებითი კონტროლები:

ა) ალიკვოტების რესუსპენდირებული ნალექები, რომლებშიც დამტებული იყო მავნე ორგანიზმის ამ ტექნიკური რეგლამენტის 28-ე მუხლის მიხედვით;

ბ) მავნე ორგანიზმის ვირულენტული იზოლატის სუსპენზია 10^6 უჯრედი/მლ წყალში (მაგ: NCPPB 2140 ან NCPPB 4053);

გ) თუ შესაძლებელია, პჯრ ტესტში გამოყენებული უნდა იყოს აგრეთვე დადებითი საკონტროლო ნიმუშებიდან გამოყოფილი დნმ.

8. დასნებოვნების ალბათობის თავიდან აცილების მიზნით, დადებითი კონტროლების მომზადება რეკომენდირებულია საანალიზო ნიმუშებისაგან იზოლირებულ გარემოში.

9. ნიმუშის ექსტრაქტები შეძლებისდაგვარად სუფთა უნდა იყოს ნიადაგის ნარჩენებისგან. გარკვეულ შემთხვევებში, პჯრ მეთოდების გამოყენებისას, რეკომენდებულია ექსტრაქცია მოხდეს გარეცხილი კარტოფილიდან.

მუხლი 26. დნმ-ის გასუფთავების მეთოდები

1. დნმ-ს გასუფთავებისათვის გამოიყენება დადებითი და უარყოფითი საკონტროლო ნიმუშები.

2. საკონტროლო ნიმუშები მზადდება გამოსაკვლევი ნიმუშების იდენტურად.

3. არსებობს სხვადასხვა მეთოდი, რომელიც სამიზნე დნმ-ის გასუფთავების საშუალებას იძლევა ნიმუშის სხვადასხვა რთული სუბსტრატებიდან. მათი მეშვეობით შესაძლებელია პჯრ და სხვა ფერმენტული რეაქციების ინჰიბიტორების მოშორება და სამიზნე დნმ-ის კონცენტრირება ნიმუშის ექსტრაქტში. მოცემული მეთოდი ოპტიმიზირებულია ვალიდირებულ პჯრ მეთოდთან გამოსაყენებლად. დნმ-ს გასუფთავება ეფუძნება შემდეგ მეთოდებს:

ა) მეთოდი პასტრიკის მიხედვით (Patrik (2000)) მოიცავს შემდეგ პროცედურებს :

ა.ა) 1,5 მლ-იან ეპენდორფის სინჯარაში გადააქვთ 220 მკლ ლიზისის ბუფერი (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]);

ა.ბ) ამატებენ 100 მკლ ნიმუშის ექსტრაქტს და ათავსებენ თერმობლოკში ან წყლის აბაზანაში 95°C ტემპერატურაზე 10 წუთის განმავლობაში;

ა.გ) სინჯარას ყინულზე ათავსებენ ხუთი წუთის განმავლობაში;

ა.დ) უმატებენ 80 მკლ ლიზოზიმის კონცენტრულ ხსნარს (ლიზოზიმი 50 მგ/მლ 10 mM Tris HCl [pH 8,0]) და უკეთებენ ინკუბაციას 37°C ტემპერატურაზე 30 წუთის განმავლობაში;

ა.ე) უმატებენ 220 მკლ Easy-DNA® -ის ხსნარს A (Invitrogen), შეანჯღრევენ კარგად ვორტექსზე და უკეთებენ ინკუბაციას 65°C ტემპერატურაზე 30 წუთის განმავლობაში;

ა.ვ) უმატებენ 100 მკლ Easy-DNA® -ის ხსნარს B (Invitrogen), ძლიერად შეანჯღრევენ ვორტექსზე, სანამ ნალექი თავისუფლად არ იმოძრავეს სინჯარაში და ნიმუში არ გახდება ერთგვაროვნად ბლანტი;

ა.ზ) უმატებენ 500 მკლ ქლოროფორმს და შეანჯღრევენ ვორტექსზე, სანამ შემცირდება სიბლანტე და ნარევი გახდება ერთგვაროვანი;

ა.თ) დააცენტრიფუგირებენ 15 000 გ-ზე 20 წუთის განმავლობაში 4°C ტემპერატურაზე ფაზების დასაყოფად და ინტერფაზის მისაღებად;

ა.ი) ზედა ფაზა გადააქვთ ეპენდორფის სუფთა სინჯარაში;

ა.კ) ამატებენ 1 მლ აბსოლუტურ (100%) ეთანოლს (-20°C), მცირე ხნით შეანჯღრევენ ვორტექსზე და აჩერებენ ყინულზე 10 წუთის განმავლობაში;

ა.ლ) დააცენტრიფუგირებენ 15 000 გ-ზე 20 წუთის განმავლობაში 4°C ტემპერატურაზე და მოაცილებენ ეთანოლს, ისე, რომ არ დააზიანონ ეპენდორფის სინჯარის კედელზე წარმოქმნილი ნალექი;

ა.მ) უმატებენ 500 მკლ 80%-იანი ეთანოლს (-20°C) და ფრთხილად გადაატრიალ-გადმოატრიალებენ სინჯარას;

ა.ნ) დააცენტრიფუგირებენ 15 000 გ-ზე 10 წუთის განმავლობაში 4°C ტემპერატურაზე, მოაცილებენ ეთანოლს ისე, რომ არ დააზიანონ ეპენდორფის სინჯარის კედელზე წარმოქმნილი ნალექი;

ა.ო) ეპენდორფის სინჯარის კედელზე წარმოქმნილი ნალექის ამრობენ ჰაერზე ან DNA speed vac - აპარატში;

ა.პ) ნალექს ხსნიან 100 მკლ სტერილურ ულტრა სუფთა წყალში (UPW) და აჩერებენ ოთახის ტემპერატურაზე სულ მცირე 20 წუთის განმავლობაში;

ა.ჟ) ინახავენ -20°C -ზე, პჯრ ანალიზისთვის საჭიროებისამებრ;

ა.რ) წარმოქმნილი თეთრი ნალექის დასაღვსად დააცენტრიფუგირებენ დაბალ სიჩქარეზე და პჯრ ანალიზისთვის გამოიყენებენ 5 მკლ სუპერნატანტს, რომელიც შეიცავს დნმ-ს.

4. დნმ-ის გამოსაყოფად შეიძლება სხვა მეთოდების (მაგ: Qiagen DNeasy Plant Kit) გამოყენებაც, იმ შემთხვევაში, თუ გამოცდილია მათი ეფექტურობა და ის დამაკმაყოფილებელია პათოგენის 10^3 - 10^4 უჯრედი/მლ შემცველი საკონტროლო ნიმუშებიდან დნმ-ის გასასუფთავებლად.

5. პჯრ ტესტის დროს:

ა) გამოსაცდელი და საკონტროლო ნიმუშები პჯრ ანალიზისთვის მზადდება ვალიდირებული პროტოკოლის შესაბამისად ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი №11-ის შესაბამისად. მზადდება ნიმუშის დნმ ექსტრაქტის დეციმალური განზავება (1:10-თან განზავება ულტრა სუფთა წყალში (UPW));

ბ) პროტოკოლის შესაბამისად, დასნებოვნებისგან სუფთა გარემოში მზადდება შესაბამისი პჯრ რეაქციის ნარევი ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი №11-ის შესაბამისად. ვალიდირებული პჯრ პროტოკოლი წარმოადგენს მულტიპლექს რეაქციას, რომელიც ასევე ითვალისწინებს შიდა პჯრ კონტროლს;

გ) სტერილურ პჯრ სინჯარებში ყოველ 25 მკლ პჯრ რეაქციაზე უმატებენ 5 მკლ დნმ ექსტრაქტს;

დ) ანალიზში რთავენ უარყოფითი კონტროლის ნიმუშს, რომელიც შეიცავს მხოლოდ პჯრ სარეაქციო ნარევს და ნიმუშის ნაცვლად დამატებულ ულტრა სუფთა წყალს (UPW);

ე) პჯრ სინჯარები თავსდება იმავე თერმოციკლერში, რომელიც გამოყენებული იყო წინასწარი ტესტირებისათვის და აქვს შესაბამისად ოპტიმიზირებული პჯრ პროგრამა ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი №11-ის შესაბამისად.

6. პჯრ პროდუქტის ანალიზისას:

ა) პჯრ ამპლიფიკაციის შედეგად მიღებული ფრაგმენტების დაყოფა ხდება აგაროზის გელში ელექტროფორეზის მეთოდით. ყოველი ნიმუშისთვის იღებენ სულ მცირე 12 მკლ ამპლიფიცირებული დნმ-ის სარეაქციო ნარევს, უმატებენ 3 მკლ დამტან ბუფერს ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი №11-ის შესაბამისად და დაიტანენ 2,0 % (w/v) აგაროზის გელზე, რომელიც მომზადებულია ტრის-აცეტატი-EDTA (TAE) ბუფერში. ელექტროფორეზს უშვებენ გელის ყოველ სმ-ზე 5-8 ვოლტის გაანგარიშებით. გამოიყენება შესაბამისი დნმ-ის მარკერი, მაგ.: 100 bp-ს ლადერი;

ბ) დნმ ფრაგმენტების ბენდების ვიზუალიზაციისათვის გელს ღებავენ ეთიდიუმის ბრომიდში (0,5 მგ/ლ) 30–45 წუთის განმავლობაში. გასაკუთრებული სიფრთხილეა საჭირო ეთიდიუმის ბრომიდთან მუშაობისას, რადგან ის წარმოადგენს ძლიერ მუტაგენს;

გ) განსაზღვრული ზომის ამპლიფიცირებული ფრაგმენტების ვიზუალიზაციისათვის შედეგები გელს ათავსებენ ულტრაიისფერი გამოსხივების (UV) ტრანსილუმინატორზე (მაგ: $\lambda=302$ ნმ) ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი №11 -ის შესაბამისად და იღებენ ფოტოს;

დ) ყველა ახალ შედეგთან/შემთხვევასთან დაკავშირებით, პჯრ ამპლიფიცირებული ფრაგმენტების ავთენტურობა ამოწმებენ დარჩენილი ამპლიფიცირებული დნმ-ის ნიმუშებზე რესტრიქტაზული ფერმენტების მოქმედებით. შესაბამისი ფერმენტისა და ბუფერის გათვალისწინებით, ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი №11-ის შესაბამისად ახდენენ მათ ინკუბირებას ოპტიმალურ ტემპერატურაზე, ოპტიმალური დროით. რესტრიქტაზული ფერმენტების მოქმედებით დაჭრილი ფრაგმენტების ვიზუალიზაციისათვის კვლავ იყენებენ ელექტროფორეზის მეთოდს. ეთიდიუმის ბრომიდით შეღებილი აგაროზის გელს ათავსებენ ულტრაიისფერი გამოსხივების (UV) ტრანსილუმინატორზე და ადარებენ რესტრიქტაზული ფერმენტების მოქმედებით დაჭრილი გამოსაცდელი ნიმუშის ფრაგმენტებს დაჭრილ და დაუჭრელ დადებით კონტროლს.

7. პჯრ ტესტის შედეგების ინტერპრეტაცია ხდება შემდეგ შემთხვევებში:

ა) პჯრ ტესტის შედეგი უარყოფითია, თუ გამოსაცდელ ნიმუშში არ გამოვლინდება მოსალოდნელი ზომის, მავნე ორგანიზმისათვის სპეციფიკური პჯრ ამპლიფიცირებული ფრაგმენტები, მაშინ როცა დადებითი კონტროლის ყველა ნიმუშში ეს ფრაგმენტი ფიქსირდება (მულტიფლექ პჯრ რეაქციის შემთხვევაში, რომელიც ითვალისწინებს მცენარის სპეციფიურ შიდა კონტროლის პრაიმერებს, გამოსაცდელ ნიმუშში უნდა მოხდეს მოსალოდნელი ზომის მეორე პჯრ რეაქციის პროდუქტების ამპლიფიცირება);

ბ) პჯრ ტესტის შედეგი დადებითია, თუ გამოსაცდელი ნიმუში აჩვენებს მოსალოდნელი ზომის მავნე ორგანიზმის სპეციფიურ პჯრ ამპლიფიცირებულ და რესტრიქციულ ფრაგმენტებს

(საჭიროების შემთხვევაში), მაშინ როცა უარყოფითი კონტროლის ნიმუშებში არ მომხდარა ამპლიფიცირება. დადებითი პასუხის დადასტურება შესაძლებელია პჯრ ტესტის გამეორებით, რისთვისაც გამოყენებული უნდა იყოს სხვა პრაიმერების წყვილი ამ თავის 27-ე მუხლის მე-14 პუნქტის შესაბამისად;

გ) პჯრ ინჰიბირებას ადგილი აქვს იმ შემთხვევაში, თუ მოსალოდნელი ზომის ამპლიფიცირებული ფრაგმენტი აჩვენა დადებითმა კონტროლმა, რომელიც შეიცავს მავნე ორგანიზმს წყალში, ხოლო იმ დადებითმა კონტროლმა, რომელიც შეიცავს მავნე ორგანიზმს კარტოფილის ექსტრაქტში, აჩვენა უარყოფითი შედეგი. შიდა კონტროლის მქონე მულტიფლექს პჯრ პროტოკოლების შემთხვევაში, თუ ორი ამპლიკონიდან არცერთის ამპლიფიცირება არ მოხდა, ეს მიუთითებს რეაქციის ინჰიბირებაზე;

დ) მოსალოდნელი ზომის ამპლიფიცირებული ფრაგმენტის დაფიქსირება ერთი ან მეტი უარყოფითი კონტროლის ნიმუშში მიუთითებს ნიმუშის დაბინძურებაზე.

8. ბიოლოგიური ანალიზის მეთოდით:

ა) წინასწარი ტესტირების შედეგად შესაძლებელი უნდა იყოს უარყოფითი ნიმუშის ექსტრაქტისთვის დამატებული სიცოცხლისუნარიანი $10^3 - 10^4$ კწე მავნე ორგანიზმის გამოვლენა (28-ე მუხლის საფუძველზე);

ბ) მაქსიმალური მგრძნობელობის გამოსავლენად სასურველია გამოყენებულ იქნეს ახლად მომზადებული ნიმუშის ექსტრაქტი, ზრდისთვის ოპტიმალური პირობების დროს. აღნიშნულის მიუხედავად, მეთოდის წარმატებით გამოყენება შესაძლებელია იმ ექსტრაქტებთან მიმართებაში, რომლებიც ინახება გლიცერინში -68°C -დან -86°C -მდე ტემპერატურაზე;

გ) ბადრიჯნის ზოგიერთი სახეობა წარმოადგენს საუკეთესო საშუალებას მავნე ორგანიზმის სელექტიური გამდიდრებისთვის სიმპტომების არარსებობის შემთხვევაშიც კი. იგი ასევე უზრუნველყოფს მასპინძელ-მცენარეზე დადასტურების ტესტის ჩატარებას. ბადრიჯნის ზოგიერთი სახეობა წარმოადგენს საუკეთესო სელექტიურ გამდიდრებულ არეს უსიმპტომო მავნე ორგანიზმის ზრდისთვისაც;

დ) ზრდის პირობები უნდა იყოს ოპტიმალური, რათა შემცირდეს ტესტის მცდარი უარყოფითი შედეგების მიღების რისკი;

ე) რესუსპენდირებული ნალექის დარჩენილი სატესტო ალიქვოტი ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-16 მუხლის მე-4 პუნქტის ან მე-17 მუხლის მე-3 პუნქტის შესაბამისად უნდა გადანაწილდეს ბადრიჯნის მცენარეებს შორის ამ ტექნიკური რეგლამენტის 26-ე მუხლის მე-7 პუნქტის „გ“ ქვეპუნქტის ან მე-8 პუნქტის „ა“ ქვეპუნქტის მიხედვით. გამოიყენება მხოლოდ მე-2 მე-3 ფაზის ფოთლები, მესამე ნამდვილი ფოთლების სრულ გაშლამდე. რესუსპენდირებული ნალექის სრულყოფილად გამოყენებისა და ეფექტური ინოკულაციის უზრუნველსაყოფად ქვემოთ მოყვანილი პროცედურებისთვის ნიმუშში საჭიროა 15-დან 25-მდე ბადრიჯანი ყოველ ნიმუშზე;

ვ) ტურგორული წნევის შესამცირებლად, ინოკულაციამდე ორი-სამი დღის განმავლობაში ბადრიჯანი არ უნდა მოირწყას.

9. დასერვის მეთოდით ინოკულაცია ხდება შემდეგნაირად:

ა) მცენარეს იჭერენ ორი თითით და რესუსპენდირებულ ნალექს პიპეტით აწვეთებენ (დაახლოებით 5-10 მკლ) ღეროზე ლებანფოთოლსა და პირველ ფოთოლს შორის;

ბ) სტერილური ლანცეტის გამოიყენებით დიაგონალურად გადასერენ ღეროს დაახლოებით 1,0 სმ სიგრძეზე და ღეროს სისქის 2/3 სიღრმეზე. ჩაჭრას იწყებენ სუსპენზიის წვეთის მოთავსების ადგილიდან;

გ) დასერილ ადგილს შპრიცის საშუალებით ფარავენ სტერილური ვაზელინით.

10. ჩხვლეტით ინოკულაციის შემთხვევაში:

ა) ბადრიჯნის ღეროს ინოკულაცია ხდება კანქვეშა ინექციისთვის განკუთვნილი ნემსის (არა ნაკლებ 23 G) გამოყენებით ჩანასახოვანი ფოთოლაკის ოდნავ ზემოთ. ნიმუში გადანაწილდება ბადრიჯნის მცენარეებს შორის;

ბ) დადებითი კონტროლის სახით, 5 მცენარეს ასნებოვნებენ წყლიანი სუსპენზიით, რომელიც შეიცავს მავნე ორგანიზმის კულტურას 10^5 - 10^6 უჯრედი/მლ, ხოლო იმ შემთხვევაში, როდესაც ეს შესაძლებელია, ბუნებრივად დაინფიცირებული კარტოფილის ტუბერების ექსტრაქტით ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-18 მუხლის შესაბამისად, იგივე ინოკულაციის გამოყენებით;

გ) უარყოფითი კონტროლისთვის, 5 მცენარეში შეჰყავთ სტერილური ნალექის ბუფერი ამ ტექნიკური რეგლამენტის 28-ე მუხლის მე-7 პუნქტის ან/და მე-8 პუნქტის შესაბამისად დასნებოვნების იმავე მეთოდების გამოყენებით;

დ) მცენარეები საინკუბაციოდ უნდა მოთავსდეს კარანტინის პირობებში 4 კვირამდე, $18-24^{\circ}\text{C}$ ტემპერატურაზე. ინკუბაციის პერიოდში შენარჩუნებულ უნდა იქნეს ოპტიმალური განათება და მაღალი ტენიანობა (70-80%) და ჭკნობის თავიდან ასაცილებლად უზრუნველყოფილ იქნეს სარწყავი წყლით. მავნე ორგანიზმის უჯრედები კვდებიან 30°C -ზე მაღალ ტემპერატურაზე, ოპტიმალური ტემპერატურაა 21°C . დაბინძურების თავიდან ასაცილებლად, დადებითი და უარყოფითი საკონტროლო ნიმუშები ინახება ერთმანეთისგან გამიჯნულ ადგილებზე სათბურში, ან ფიტოტრონში. თუ სივრცე შეზღუდულია, დამუშავების დროს უზრუნველყოფილი უნდა იქნეს მათი ერთმანეთისგან მკაცრად გამიჯვნა. იმ შემთხვევაში, როდესაც სხვადასხვა ნიმუშების მცენარეები ინკუბაციის პერიოდში ერთმანეთთან ახლოს იმყოფებიან, ისინი ერთმანეთისგან უნდა განცალკევდნენ სპეციალური ეკრანებით. ჯვარედინი დასნებოვნების თავიდან ასაცილებლად საჭიროა დიდი სიფრთხილე ფერტილიზაციის, მორწყვის, ინსექტიკრების ან სხვა მანიპულაციების ჩატარებისას. აუცილებელია თავიდან იქნეს აცილებული სათბურებსა და ფიტოტრონებში მწერების არსებობა, რამდენადაც არის ბაქტერიების ერთი ნიმუშიდან მეორეზე გადატანის რისკი;

ე) ერთი კვირის შემდეგ, რეგულარულად ხდება მცენარეების დათვალიერება გამოვლენილი სიმპტომების იდენტიფიკაციისთვის. აღირიცხება გამოვლენილი სიმპტომების მქონე მცენარეები. მავნე ორგანიზმი იწვევს ბადრიჯნის ფოთლების ჭკნობას, რაც თავდაპირველად გამოიხატება ფოთლის კიდეებსა და ძარღვთაშუა ქსოვილების მოდუნებაში. დამჭკნარი ქსოვილის შეფერილობა თავდაპირველად შესაძლოა იყოს მუქი მწვანე, ან ჭრელი, თუმცა საბოლოო დანეკროზებამდე უფერულდება. ძარღვთაშუა ჭკნობა ხშირ შემთხვევებში ფოთოლზე ცხიმოვანი წყლულების სახით ვლინდება. ნეკროზულ ქსოვილს ხშირად ღია ყვითელი ფერის კიდეები აქვს, თუმცა ეს ყოველთვის არ იწვევს მცენარეების დაღუპვას. რაც უფრო გვიან ვლინდება სიმპტომები, მით მეტია მცენარის გადარჩენის შანსი. მცენარეებს შეუძლიათ ინფექციის დამარცხება. ბადრიჯნის ახალგაზრდა მცენარეები ბევრად უფრო მგრძნობიარენი არიან მავნე ორგანიზმის დაბალი პოპულაციების მიმართ, ვიდრე ზრდასრული მცენარეები. შესაბამისად გამოკვლევისთვის აუცილებელია გამოყენებულ იქნეს მცენარეები, რომლებიც არიან ფოთლის განვითარების მესამე ფაზაში ან ამ ფაზამდე უფრო ადრე;

ვ) ჭკნობა ასევე შესაძლებელია გამოწვეული იყოს ტუბერის ქსოვილში არსებული სხვა ბაქტერიების და სოკოების პოპულაციების მიერ. მათ შორის: *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* და *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *Erwinia chrysanthemi*, *Phoma exigua* var. *foveata*, ისევე როგორც საპროფიტული ბაქტერიების მრავალი პოპულაცია. კერძოდ, *Erwinia chrysanthemi* -ის მიერ გამოწვეული ფოთლის ჭკნობის სიმპტომები ძალიან ჰგავს მავნე ორგანიზმის მიერ გამოწვეულ სიმპტომებს. *Erwinia chrysanthemi*-ის შემთხვევაში ერთადერთი განსხვავებაა ღეროს გაშავება. მავნე ორგანიზმით გამოწვეული ჭკნობისგან განსხვავებით, სხვა სახის ჭკნობის შემთხვევაში ადგილი აქვს ფოთლების და მთლიანი მცენარის სწრაფ ჭკნობას. ასევე შესაძლებელია გამოყენებულ იქნეს გრამის წესით შეღებვის მეთოდი: აღნიშნული ტესტით შესაძლებელი იქნება მავნე ორგანიზმის განსხვავება *Erwinia* spp.-გან;

ზ) ბადრიჯანში სიმპტომების გამოვლენისთანავე აუცილებელია ხელმეორედ განხორციელდეს პათოგენის გამოყოფა, მცენარის დამჭკნარი ფოთლის ან ღეროს ქსოვილიდან ბადრიჯნის ფოთლების და ღეროების ზედაპირი დეზინფექციის მიზნით უნდა გაიწმინდოს 70%-იანი ეთანოლით;

თ) ტარდება IF ან პჯრ ტესტი ბადრიჯნის გამონაწვლილზე და გამოყოფენ მავნე ორგანიზმს შესაბამის (სელექტიურ) არეზე ამ ტექნიკური რეგლამენტის 27-ე მუხლის პირველი – მე-6 პუნქტების შესაბამისად. ასევე, შესაძლებელია ჩატარდეს გრამის წესით შეღებვა. ახდენენ მავნე ორგანიზმის საექვო იზოლატის სუფთა კულტურების იდენტიფიცირებას და ადასტურებენ მათ პათოგენობას ამ ტექნიკური რეგლამენტის 27-ე მუხლის მე-11 პუნქტის და პათოგენობის დამადასტურებელი ტესტების მოთხოვნათა შესაბამისად;

ი) გარკვეულ გარემოებებში, კერძოდ მაშინ, როდესაც ზრდის პირობები არ არის ოპტიმალური, მავნე ორგანიზმი ბადრიჯნში შეიძლება ლატენტურ მდგომარეობაში იმყოფებოდეს 4-კვირიანი საინკუბაციო პერიოდის გასვლის შემდეგაც კი. თუ 4-კვირიანი ინკუბაციის შემდეგ დაავადების სიმპტომები არ გამოვლინდება, თითოეული საცდელი მცენარის ღეროს ინოკულაციის ადგილიდან 1 სმ-ით ზემოთ იღებენ საშუალო ნიმუშს და

ატარებენ IF/პჯრ ტესტს. დადებითი პასუხის შემთხვევაში, აუცილებელია (შესაბამის) სელექტიურ არეზე პათოგენის ხელმეორედ გამოყოფა ამ ტექნიკური რეგლამენტის 27-ე მუხლით გათვალისწინებული პროცედურის შემდეგ. უნდა მოხდეს მავნე ორგანიზმის საექვო იზოლატების სუფთა კულტურების იდენტიფიცირება და დასასტურდეს მათი პათოგენობა ამ ტექნიკური რეგლამენტის 27-ე მუხლის მე-11 და მე-16 პუნქტების შესაბამისად.

11. ბიოლოგიური ანალიზის შედეგების ინტერპრეტაცია ხდება, როდესაც:

ა) ბიოლოგიური ანალიზის შედეგები მისაღებია, თუ დადებითი კონტროლის მცენარეებში გამოვლენილია დაავადების ტიპური სიმპტომები, შესაძლებელია აღნიშნული მცენარეებიდან ბაქტერიის ხელმეორედ გამოყოფა, ხოლო უარყოფით კონტროლზე სიმპტომები არ ვლინდება;

ბ) ბიოლოგიური ანალიზის შედეგები უარყოფითია, თუ სატესტე მცენარეები არ არიან დასნებოვნებული მავნე ორგანიზმით, იმ პირობით, რომ აღნიშნული ბაქტერია გამოვლენილია დადებით კონტროლში;

გ) ბიოლოგიური ანალიზის შედეგები დადებითია, თუ საცდელი მცენარეები დასნებოვნებულია მავნე ორგანიზმით.

მუხლი 27. მავნე ორგანიზმის გამოყოფა

1. მავნე ორგანიზმის დიაგნოსტიკა დასრულებულად ითვლება მხოლოდ იმ შემთხვევაში, თუ ამ მუხლის მე-11 და მე-18 პუნქტების შესაბამისად, მავნე ორგანიზმი გამოყოფილი და იდენტიფიცირებული იქნება შემდგომი პათოგენობის ტესტის დადასტურებით. მიუხედავად იმისა, რომ მავნე ორგანიზმი ძნელად იზოლირებადია, მისი გამოყოფა შესაძლებელია სიმპტომატური ქსოვილიდან.

2. მავნე ორგანიზმი შესაძლებელია დაითრგუნოს სწრაფად მზარდი საპროფიტული ბაქტერიებით, რაც ართულებს პირდაპირ გამოყოფას ტუბერიდან, ან ღეროს ქსოვილიდან ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-15 მუხლის მე-4 პუნქტის „კ“ ქვეპუნქტის ან/და მე-16 მუხლის მე-3 პუნქტის შესაბამისად. თუმცა შესაძლებელია ტუბერთან სტოლონის მიერთების ადგილიდან აღებული ქსოვილიდან, ან ღეროდან მავნე ორგანიზმის პირდაპირი გამოყოფა სელექტიური არეების და შესაბამისი განზავებების გამოყენებით.

3. გამოყოფა უნდა განხორციელდეს კარტოფილის ყველა სიმპტომატური ტუბერიდან ან ღეროდან, აგრეთვე უსიმპტომო ბადრიჯნის მცენარეებიდან, რომელთა საშუალო ნიმუშზე ჩატარებულმა IF/პჯრ ტესტმა აჩვენა დადებითი შედეგი ამ ტექნიკური რეგლამენტის 28-ე მუხლის მე-8 პუნქტის შესაბამისად. საჭიროების შემთხვევაში, უნდა განხორციელდეს ბადრიჯნის ღეროების დანაწევრება, როგორც ეს მითითებულია ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-15 მუხლის მე-4 პუნქტის „ზ“ ქვეპუნქტში.

4. დადებითი კონტროლის შემთხვევაში მზადდება 10^6 კწე/მლ მავნე ორგანიზმის სუსპენზიის ათჯერადი განზავებები (მაგ: NCPPB 4053 ან PD 406). დაბინძურების თავიდან ასაცილებლად, დადებითი კონტროლის ნიმუშები მზადდება გამოსაკვლევი ნიმუშებისგან განცალკევებულად.

5. თითოეული ახლად მომზადებული სელექტიური არის ვარგისიანობა აუცილებლად უნდა შემოწმდეს პათოგენური კულტურის ზრდის უნარზე მანამ, სანამ ის გამოყენებულ იქნება გამოსაკვლევი ნიმუშებისთვის.

6. საკონტროლო მასალების გამოკვლევა ხდება იმავე პროცედურის მიხედვით, რომელიც გამოიყენება ნიმუშებთან მიმართებაში.

7. სელექტიური დათესვისას:

ა) კარტოფილის ნიმუშის სუსპენზიის ან ბადრიჯნის ექსტრაქტის 100 მკლ ალიკვოტიდან მზადდება ათჯერადი განზავებები კონცენტრირებული ექსტრაქტის ბუფერში ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი №8-ის შესაბამისად;

ბ) კარტოფილის განუზავებელი ექსტრაქტიდან მავნე ორგანიზმის გამოყოფა, არ ხორციელდება მისი ზრდა-განვითარების სირთულის და საპროფიტების კონკურენციის გამო. ვინაიდან დასნებოვნებულ ქსოვილებში ბაქტერია ჩვეულებრივ არსებობს მაღალი პოპულაციის სახით, საპროფიტების შემცირება შესაძლებელია განზავების გზით, მავნე ორგანიზმის შენარჩუნებამდე. გამომდინარე აქედან, რეკომენდებულია ყოველი ნიმუშის 1/100-დან 1/10 000-მდე განზავებიდან 100 მკლ-ის დათესვა MTNA არეზე ან NCP-88 არეზე ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი №10-ის შესაბამისად, (თუ გამოიყენება 90 მმ დიამეტრის პეტრის თასები, ხოლო განსხვავებული მოცულობის თასისთვის შეირჩევა შესაბამისი მოცულობა);

გ) ალტერნატიულ გზას წარმოადგენს კარტოფილის სუსპენზიის 100 მკლ ალიკვოტის განაწილება შპატელის საშუალებით აგარის პირველ თასზე, შემდგომ შპატელით გადატანა მეორე აგარიან თასზე. იგივე პროცედურა მეორდება მესამე აგარიან თასზე, რაც უზრუნველყოფს განზავების მეთოდით თესვის ეფექტს შპატელის მეშვეობით;

დ) პეტრის თასები ინკუბირდება სიბნელეში 21°C -23°C ტემპერატურაზე;

ე) პეტრის თასების პირველადი დათვალიერება, რომელიც გულისხმობს მის შედარებას საკონტროლო თასებთან და მავნე ორგანიზმის მსგავსი კოლონიების დათვლას დათესვიდან 3, 5, 6, 7 და 10 დღის შემდეგ;

ვ) მავნე ორგანიზმის მსგავსი კოლონიების გადათესვა უნდა განხორციელდეს YGM არეზე ბადრიჯნის ინოკულაციის ან/და შემდგომი იდენტიფიკაციისთვის. აღნიშნული უნდა განხორციელდეს პეტრის ჯამებზე მიკროორგანიზმების გადაზრდამდე, სასურველია სამი-ხუთი დღის შემდეგ;

ზ) მავნე ორგანიზმის მსგავსი კოლონიების გადათესვა შემდეგი საკვები არეებიდან ერთ-ერთზე ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი №10-ის მოთხოვნათა გათვალისწინებით:

ზ.ა) საკვები აგარი დექსტროზით (მხოლოდ გადათესვისთვის);

ზ.ბ) აგარი საფუარით, პეპტონით და გლუკოზით;

ზ.გ) აგარი საფუარის ექსტრაქტით და მინერალური მარილებით;

ზ.დ) ინკუბირება ხდება 21°C - 24°C ტემპერატურაზე დაახლოებით 10 დღის განმავლობაში;

ზ.ე) მავნე ორგანიზმი არის ძნელად-მზარდი, როგორც წესი 10 დღის განმავლობაში წარმოქმნის წერტილოვან, კრემისფერ, გუმბათისებრ კოლონიებს.

8. გასუფთავების მიზნით ხელახლა გადათესვისას:

ა) ზრდის ტემპი უმჯობესდება. ტიპური კოლონიები არის მოთეთრო-კრემისფერი ან სპილოსძვლისფერი, იშვიათად ყვითელი, მომრგვალებული, გლუვი, ამოზურცული, ამოზურცულ-გუმბათისებრი, თხევად-ლორწოვანი, მთლიანი კიდეებით და მეტწილად 1-3 მმ დიამეტრის;

ბ) გრამის წესით შეღებვა ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი №14-ის შესაბამისად ხელს უწყობს შემდგომი გამოკვლევებისთვის კოლონიების შერჩევას;

გ) სავარაუდო კულტურების იდენტიფიცირება ხდება ამ მუხლის მე-11 პუნქტის და პათოგენურობის ტესტი ტარდება ამ მუხლის მე-16 პუნქტის მოთხოვნათა გათვალისწინებით.

9. მავნე ორგანიზმის იზოლატების იდენტიფიკაციისას:

ა) მავნე ორგანიზმის იზოლატების სავარაუდო სუფთა კულტურების იდენტიფიკაცია ხდება სულ მცირე შემდეგი ორი ტესტის გამოყენებით, რომლებიც სხვადასხვა ბიოლოგიურ მეთოდებს ეფუძნებიან;

ბ) თითოეული ტესტისთვის, საჭიროების შემთხვევაში, გამოიყენება ცნობილი რეფერენტული შტამები.

10. ფიზიოლოგიურ-ბიოქიმიური საიდენტიფიკაციო ტესტებით:

ა) Lelliott და Stead (1987), Klement et al. (1990), Schaad (2001), Anonymous (1987) მეთოდების შესაბამისად განსაზღვრული უნდა იქნეს ფენოტიპური თვისებები, რომლებიც გააჩნია ან არ გააჩნია მავნე ორგანიზმს;

ბ) ყველა საკვები არის ინკუბირება უნდა მოხდეს 21°C ტემპერატურაზე და შემოწმდეს ექვსი დღის შემდეგ. თუ არ დაფიქსირდება მავნე ორგანიზმის ზრდა, ინკუბირება უნდა გაგრძელდეს დაახლოებით 20 დღის განმავლობაში;

გ) ყველა ტესტში უნდა იქნეს ჩართული მავნე ორგანიზმის კონტროლი. ფიზიოლოგიურ-ბიოქიმიური ტესტები უნდა მომზადდეს საკვებ აგარზე გადათესილი ინოკულუმის გამოყენებით. მორფოლოგიური თვისებების შედარებები უნდა განხორციელდეს დექსტროზიან საკვებ აგარზე განვითარებული კულტურებიდან;

დ) ტესტები და მოსალოდნელი შედეგი მოცემულია ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი №7-ში.

11. IF ტესტის თანახმად:

ა) მზადდება დაახლოებით 10^6 უჯრედი/მლ სუსპენზია IF ბუფერში ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი №8-ის შესაბამისად;

ბ) მზადდება შესაბამისი ანტიშრატის ორჯერადი განზავების სერია;

გ) გამოიყენება IF პროცედურა ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-17 მუხლის 1-9 პუნქტების შესაბამისად;

დ) ტესტის შედეგი დადებითია, თუ კულტურის IF ტიტრი დადებითი კონტროლის ტიტრის ეკვივალენტურია.

12. პჯრ ტესტის დროს:

ა) ულტრა სუფა წყალში (UPW) მზადდება დაახლოებით 10^6 უჯრედი/მლ სუსპენზია;

ბ) 100 მკლ უჯრედის სუსპენზიას ათბობენ დახურულ სინჯარებში თერმობლოკში ან წყლის აბაზანაში 100°C ტემპერატურაზე ოთხი წუთის განმავლობაში. საჭიროების შემთხვევაში, დამატებით ახლად მომზადებული NaOH-ის 0,05M საბოლოო კონცენტრაცია შეიძლება დაეხმაროს უჯრედების ლიზისს. ამის შემდეგ, საჭიროების და მიხედვით, ნიმუშების შენახვა ხდება -16°C -დან -24°C -მდე ტემპერატურაზე;

გ) მავნე ორგანიზმის სპეციფიკური ამპლიკონების ამპლიფიცირების მიზნით გამოიყენება შესაბამისი პჯრ პროცედურები (მაგ.: Pastrik, 2000; იხ. ამ დანართის ნაწილი N4; Li და de Boer, 1995; Mills et al., 1997; Pastrik და Rainey, 1999; Scaad et al., 1999);

დ) მავნე ორგანიზმის იდენტიფიკაცია დადებითია, თუ პჯრ ამპლიკონების ზომა და რესტრიქციული ფრაგმენტების სიგრძის პოლიმორფიზმი ისეთივეა, როგორც დადებითი კონტროლის შტამის.

13. FISH ტესტის დროს:

ა) ულტრა სუფთა წყალში (UPW) მზადდება დაახლოებით 10^6 უჯრედი/მლ-ზე სუსპენზია;

ბ) გამოიყენება FISH-ის პროცედურა ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-20 მუხლის შესაბამისად;

გ) ტესტის შედეგი დადებითია, თუ კულტურიდან და დადებითი კონტროლიდან მიღებული რეაქციები მსგავსია.

14. FAP ტესტი (ცხიმოვანი მჟავას პროფილი) დროს:

ა) კულტურა უნდა გაიზარდოს ტრიპტიკაზა სოიოს აგარზე 72 საათის განმავლობაში 21°C -ზე ($\pm 1^{\circ}$);

ბ) გამოიყენება შესაბამის FAP-ის პროცედურა (Janse, 1991; Stead 1992);

გ) FAP ტესტის დადებითი შედეგები მიიღება იმ შემთხვევაში, თუ სავარაუდო კულტურის მახასიათებლები დადებითი კონტროლის მონაცემების იდენტურია. დამახასიათებელი

ცხიმოვანი მჟავები: 15:1 Anteiso A, 15:0 Iso 15:0 Anteiso, 16:0 Iso 16:0 და 17:0 Anteiso, რაც მავნე ორგანიზმის მაღალი არსებობის მაჩვენებელია. სხვა გვარები, როგორიცაა: *Curtobacterium*, *Arthrobacter* და *Micrococcus* ასევე შეიცავს ზოგიერთ აღნიშნულ მჟავას, მიუხედავად ამისა 15:1 Anteiso A აღნიშნულ ბაქტერიებში წარმოადგენს იშვიათ მჟავას, მაგრამ გვხვდება ყველა *Clavibacter* spp-ში დაახლოებით 1-დან 5%-მდე ფარგლებში. მავნე ორგანიზმში აღნიშნული მჟავის მაჩვენებელი შეადგენს დაახლოებით 5%.

15. ბოქს- პჯრ-ს დროს:

ა) ულტრა სუფა წყალში (UPW) მზადდება სუსპენზია დაახლოებით 10^6 უჯრედი/მლ;

ბ) ტესტი ტარდება პროცედურის შესაბამისად (Smith et al., 2001).

16. პათოგენობის დამადასტურებელი ტესტი:კწე

ა) უნდა ჩატარდეს მავნე ორგანიზმის დიაგნოზის საბოლოოდ დასადასტურებლად და მავნე ორგანიზმად იდენტიფიცირებული კულტურების ვირულენტობის შესაფასებლად, ამისათვის:

ა.ა) მზადდება დაახლოებით 10^6 უჯრედის ინოკულუმი 1 მლ-ზე გამოსაკვლევი იზოლატის 3 დღის კულტურებიდან და მავნე ორგანიზმის შესაბამისი დადებითი კონტროლის შტამიდან;

ა.ბ) მოხდება 5-10 ცალი, 3 ფოთლის ფაზის, ახალგაზრდა ბადრიჯნის მცენარეების ღეროების ინოკულაცია ამ ტექნიკური რეგლამენტის 28-ე მუხლის მე-7 პუნქტის ან მე-8 პუნქტის შესაბამისად;

ბ) ინკუბირება ხდება $18-24^{\circ}\text{C}$ -ზე შესაბამისად განათებულ, მაღალი ფარდებითი ტენიანობით და საკმარისი რაოდენობის წყლით უზრუნველყოფილ ადგილას, რათა თავიდან იქნეს აცილებული წყლით დატბორვა, ან გამოშრობა ამ ტექნიკური რეგლამენტის 26-ე მუხლის მე-8 პუნქტის „დ“ ქვეპუნქტის თანახმად. სუფთა კულტურებით ტიპური ჭკნობის ნიშნები მიიღება ორი კვირის განმავლობაში, ხოლო ის მცენარეები რომლებიც ამ ტექნიკური რეგლამენტის 26-ე მუხლის მე-8 პუნქტის „ე - ვ“ ქვეპუნქტების შესაბამისად, აღნიშნული პერიოდის შემდეგ არ ავლენენ სიმპტომებს, დაახლოებით სამი კვირის განმავლობაში უნდა მოთავსდნენ ბადრიჯნის ზრდისთვის ხელსაყრელ ტემპერატურულ პირობებში საინკუბაციოდ (თუმცა არაუმეტეს 25°C ტემპერატურისა) ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N13-ის შესაბამისად. თუ სამი კვირის გასვლის შემდეგად სიმპტომები არ გამოვლინდება, ჩაითვლება, რომ კულტურა არ წარმოადგენს მავნე ორგანიზმის პათოგენურ ფორმას;

გ) სიმპტომატური მცენარის ღეროს ნაწილს ამოჭრიან ინოკულაციის ადგილიდან 2სმ ზემოთ. დააქუცმაცებენ და დააყოვნებენ სტერილური, დისტილირებული წყლის მცირე რაოდენობაში ან 50 მმოლი ფოსფატის ბუფერში ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი №8-ის მიხედვით. სუსპენზიის განზავებებიდან გამოყოფას ახდენენ MTNA და YPGA -ზე განთესვით (შპატელით) ან შტრიხით (მარყუქით, ზიგზაგისებური თესვა). ინკუბაციას ახდენენ 3-5 დღის განმავლობაში $21-23^{\circ}\text{C}$ -ზე და აკვირდებიან მავნე ორგანიზმისთვის ტიპური კოლონიების ფორმირებას.

მუხლი 28. დადებითი და უარყოფითი კონტროლების მომზადება ძირითადი სკრინინგ-ტესტებისთვის – პჯრ/IF და FISH

1. მზადდება მავნე ორგანიზმის ვირულენტური შტამის 72 საათიანი კულტურა (NCPPB 4053 ან PD 406) MTNA საკვებ არეზე და იხსნება 10 მლმოლი ფოსფატის ბუფერში ისე, რომ უჯრედის სიმჭიდროვე იყოს დაახლოებით $1-2 \times 10^8$ კწე/მლ. ჩვეულებრივ ეს მიიღწევა მსუბუქად შემღვრეული სუსპენზიით, რომლის ოპტიკური სიმკვრივე 600 ნმ-ზე არის 0,20.
2. მავნე ორგანიზმისგან სუფთა კარტოფილის თეთრკანიანი ჯიშის 200 ტუბერი იჭრება ბოლო ტუბერთან სტოლონის მიერთების ადგილზე.
3. ტუბერთან სტოლონის მიერთების ადგილები უნდა დამუშავდეს ჩვეულებრივ და ნალექი გაიხსნას 10 მლ-ში.
4. მზადდება 10 ცალ სტერილური 1,5 მლ-იან მიკროსინჯარა რესუსპენდირებული ნალექის 900 მკლ -ით.
5. მავნე ორგანიზმის 100 მკლ სუსპენზია გადაიტანება პირველ მიკროსინჯარაში და დაავორტექსებენ.
6. მზადდება დეციმოლურ განზავებებს შემდგომ ხუთ მიკროსინჯარაში.
7. ექვსი დასნებოვნებული მიკროსინჯარა გამოიყენება დადებით კონტროლებად, ხოლო ოთხი დაუსნებოვნებელი მიკროსინჯარა, როგორც უარყოფითი კონტროლი. სინჯარებს უკეთდება შესაბამისი ეტიკეტრება.
8. 1,5 მლ-იან სტერილურ მიკროსინჯარებში მზადდება 100 მკლ ალიქვოტები. ამგვარად მიიღება თითოეული საკონტროლო ნიმუშის ცხრა განმეორება. გამოყენებამდე ინახება -16°C -დან -24°C -მდე ტემპერატურაზე.
9. მომზადებულ საკონტროლო ნიმუშებში მავნე ორგანიზმის არსებობა და რაოდენობა დასტურდება IF ტესტით.
10. დნმ-ის ექსტრაქცია პჯრ ტესტისთვის კეთდება თითოეული სერიის საგამოცდო ნიმუშების ანალიზის პარალელურად.
11. IF და FISH ტესტის შემთხვევაში, დადებითი და უარყოფითი საკონტროლო ნიმუშების ანალიზი კეთდება თითოეული სერიის საგამოცდო ნიმუშების ანალიზის პარალელურად.
12. IF, FISH და პჯრ ტესტების შემთხვევაში მავნე ორგანიზმი უნდა გამოვლინდეს მხოლოდ სულ მცირე 10^6 და 10^4 უჯრედი/მლ განზავების დადებით კონტროლებში და საერთოდ არ უნდა გამოვლინდეს უარყოფით კონტროლებში.
13. ტესტების ჩასატარებლად საჭირო ბუფერები მოცემულია ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი №8-ში.

მუხლი 29. სკრინინგტესტის დადებითი შედეგის დადასტურების ან უარყოფის შემთხვევაში მავნე ორგანიზმის მიმართ განსახორციელებელი პროცედურები

1. თითოეულ საექვო შემთხვევაში, როცა ამ ტექნიკური რეგლამენტის II თავში და დანართი №1-14-ში მითითებული მეთოდების შესაბამისად ჩატარებული სკრინინგტესტის შედეგად გამოვლინდება დადებითი შედეგი და საჭიროებს აღნიშნული მეთოდებით დადასტურებას ან უარყოფას, უნდა მოხდეს:

ა) ნიმუშად აღებული ყველა ტუბერის და/ან ნიმუშად აღებული ყველა მცენარის შენახვა;

ბ) ექსტრაქტის ნებისმიერი ნარჩენის და სკრინინგის ტესტისთვის დამატებით მომზადებული მასალის, მაგ., იმუნოფლოუორესცენტული პეპარატების შენახვა;

გ) ყველა შესაბამისი დოკუმენტის შენახვა;

დ) ამ ტექნიკური რეგლამენტის II თავში და დანართი №1-14-ში მითითებული მეთოდების დასრულებამდე შენახვა და შესაბამისი კონსერვაცია;

ე) ტუბერების შენახვა საჭიროების შემთხვევაში იძლევა სხვადასხვა ტესტების ჩატარების შესაძლებლობას.

2. მავნე ორგანიზმის არსებობის თაობაზე დადებითი დადასტურების შეტყობინებიდან სულ მცირე ერთ თვის ვადაში უნდა მოხდეს ამ მუხლის პირველ პუნქტში მითითებული მასალების, კარტოფილის ტუბერის, ან მცენარის ექსტრაქტით ინოკულირებული, ინფიცირებული ბადრიჯნის ნიმუშის და მავნე ორგანიზმიდან გამოყოფილი კულტურის შენახვა და შესაბამისი კონსერვაცია.

მუხლი 30. სავარაუდო დასნეზოვნების ხარისხის და სავარაუდო გავრცელების განსაზღვრისას განსახილველი ფიტოსანიტარიული რეგულირებადი ობიექტები

1. ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-7 მუხლის პირველი პუნქტის „ბ“ ქვეპუნქტის საფუძველზე სავარაუდო დასნეზოვნების ხარისხის განსაზღვრისას განსახილველი ფიტოსანიტარიული რეგულირებადი ობიექტები მოიცავს:

ა) ტუბერებს ან მცენარეებს, რომლებიც მოყვანილია ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-7 მუხლის პირველი პუნქტის „ა“ ქვეპუნქტის საფუძველზე დასნეზოვნებულად განსაზღვრულ მონიშნულ ტერიტორიაზე;

ბ) იმ წარმოების ადგილებს, რომელსაც გარკვეული კავშირის აქვს ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-7 მუხლის პირველი პუნქტის „ა“ ქვეპუნქტის საფუძველზე დასნეზოვნებულად მიჩნეულ ტუბერებთან, ან მცენარეებთან, მათ შორის იმ ადგილებს, სადაც პირდაპირ (უშუალოდ), ან საერთო კონტრაქტორის მეშვეობით გამოიყენება მოწყობილობა და დანადგარები;

გ) ტუბერებს ან მცენარეებს, რომლებიც მოყვანილია ამ მუხლის პირველი პუნქტის „ბ“ ქვეპუნქტში მითითებული წარმოების ადგილებში, ან წარმოდგენილია ასეთ წარმოების

ადგილებში იმ პერიოდის განმავლობაში, როდესაც ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-7 მუხლის პირველი პუნქტის „ა“ ქვეპუნქტის საფუძველზე დასნეზოვნებულად მიჩნეული ტუბერები, ან მცენარეები არსებობდა ამ მუხლის პირველი პუნქტის „ბ“ ქვეპუნქტში მითითებულ წარმოების ადგილებზე;

დ) შენობა-ნაგებობებს, რომლებიც ამუშავებენ ამ მუხლის პირველი პუნქტის „ბ“ ქვეპუნქტში მითითებულ წარმოების ადგილებში მოყვანილ კარტოფილს;

ე) ნებისმიერ მანქანა-დანადგარებს, სატრანსპორტო საშუალებას, გემს, საწყობს ან მის ერთეულებს, და სხვა ნებისმიერ საგანს, მათ შორის შესაფუთ მასალას, რომელიც შესაძლოა შეხებაში მოვიდეს ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-7 მუხლის პირველი პუნქტის „ა“ ქვეპუნქტის საფუძველზე დასნეზოვნებულად მიჩნეულ ტუბერებთან, ან მცენარეებთან;

ვ) ნებისმიერ ტუბერს, ან მცენარეს, რომელიც შენახულია, ან შეხებაშია ამ მუხლის პირველი პუნქტის „ე“ ქვეპუნქტში მითითებულ სტრუქტურებთან, ან ობიექტებთან ამგვარი სტრუქტურების ან ობიექტების გასუფთავებამდე და დეზინფექციამდე;

ზ) ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-8 მუხლის საფუძველზე ტესტირების შედეგად, იმ ტუბერებს ან მცენარეებს, რომელთაც კლონური კავშირი აქვთ ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-7 მუხლის პირველი პუნქტის „ა“ ქვეპუნქტის საფუძველზე დასნეზოვნებულად მიჩნეულ ტუბერებთან, ან მცენარეებთან და რომლებიც, მიუხედავად იმისა, რომ ტესტირებით არ გამოვლინდა მათში მავნე ორგანიზმის არსებობა, შესაძლოა დასნეზოვნებული იყვნენ კლონური კავშირის მეშვეობით;

თ) ტუბერების, ან მცენარეების წარმოების ადგილებს.

2. ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-7 მუხლის პირველი პუნქტის „ა“ ქვეპუნქტის საფუძველზე სავარაუდო გავრცელების განსაზღვრისას განსახილველი ფიტოსანიტარიული რეგულირებადი ობიექტები მოიცავს:

ა) წარმოების სხვა ადგილებს რომელთა სიახლოვეს, სადაც იზრდება კარტოფილი ან სხვა მასპინძელი მცენარე;

ბ) სათესლე კარტოფილის მარაგების საერთო წარმოებას და გამოყენებას.

თავი V

ნარჩენების განკარგვა

მუხლი 31. ნარჩენების განკარგვა. ობიექტების გასუფთავება და დეზინფექცია

1. მავნე ორგანიზმის გავრცელების რისკის პრევენციის მიზნით ნარჩენების განკარგვა უნდა მოხდეს ქვემოთ მოცემული შემდეგი ღონისძიებების გატარებით:

ა) ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-7 მუხლის პირველი პუნქტის „ა“ ქვეპუნქტის საფუძველზე დასნებოვნებულად მიჩნეული ტუბერები, ან ნარგავები არ უნდა იქნეს დარგული და მათი განკარგვა უნდა მოხდეს შესაბამისი ორგანოების ზედამხედველობით;

ბ) ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-7 მუხლის პირველი პუნქტის „ბ“ ქვეპუნქტის საფუძველზე დასნებოვნებულად მიჩნეული ტუბერები, ან ნარგავები არ უნდა იქნეს დარგული და ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-8 მუხლში მითითებული შემოწმების შედეგებზე რაიმე გავლენის მოხდენის გარეშე, შესაბამისი ოფიციალური ორგანოების ზედამხედველობით, მოხდეს მათი სათანადოდ განკარგვა ან გამოყენება, რათა დადგინდეს მავნე ორგანიზმის გავრცელების რისკის არარსებობა;

გ) კარტოფილის დასნებოვნებული ტუბერები ისე უნდა დამუშავდეს თერმულად, რომ არ არსებობდეს მავნე ორგანიზმის გადარჩენების რისკი და გამოყენებულ იქნეს ცხოველის საკვებად;

დ) კარტოფილის ნარჩენების, მათ შორის წუნდებული კარტოფილის, ნაფცქვენის და კარტოფილის სხვა ნებისმიერი მყარი ნარჩენის, მათ შორის მიწის, ქვის და სხვა ნარჩენების განკარგვის დროს, ნარჩენები გატანილი უნდა იქნეს სპეციალურად ნარჩენებისთვის განკუთვნილ ადგილას, იმგვარად, რომ არ არსებობდეს ნარჩენების დაკარგვის და გარემოში გაბნევის რისკი. მოხდეს მათი დამარხვა, რომლის დროსაც არ იარსებებს გარემოში მავნე ორგანიზმის გავრცელების რისკი, მაგ: სასოფლო-სამეურნეო დანიშნულების ნიადაგში გაჟონვა;

ე) უნდა მოხდეს ნარჩენების ინსინერაცია, და ნარჩენების საწარმოო გადამუშავება, რაც ითვალისწინებს:

ე.ა) გადასამუშველ საწარმოში ნარჩენების პირდაპირი და დაუყოვნებლივი მიწოდების უზრუნველყოფას ნარჩენების განსაკარგი დანადგარებით, რომელთა გამოყენებისას არ იარსებებს მავნე ორგანიზმის გავრცელების რისკი;

ე.ბ) საწარმოდან გამავალი სატრანსპორტო საშუალებების გაწმენდასა და დეზინფექციას;

ვ) შესაძლებელია ასევე სხვა ზომების გამოყენებით, თუ დადგენილია, რომ არ იარსებებს მავნე ორგანიზმის გავრცელების რისკი. რის შესახებაც დაუყოვნებლივ უნდა ეცნობოს სააგენტოს.

2. თხევადი ნარჩენები, რომლებიც შეცავენ მყარ ნარჩენებს, გატანამდე უნდა იქნეს გაფილტრული, რაც ითვალისწინებს მყარი ნარჩენების ამოღებას სათანადო პროცედურების გამოყენებით. აღნიშნული ნარჩენების განკარგვა უნდა მოხდეს ამ მუხლის პირველი პუნქტის „ბ“ ქვეპუნქტის შესაბამისად.

3. თხევადი ნარჩენების განკარგვა უნდა მოხდეს შემდეგი ღონისძიებების გატარებით:

ა) გატანამდე ის უნდა გაცხელდეს 30°C ტემპერატურაზე, სულ მცირე 30 წუთის განმავლობაში;

ბ) განკარგული უნდა იქნეს იმგვარად, რომ გამოირიცხოს სასოფლო-სამეურნეო დანიშნულების ნიადაგში ნარჩენების გავრცელების რისკი. დეტალური ინფორმაცია უნდა ეცნობოს სააგენტოს.

4. ამ მუხლში აღწერილი პროცედურები ასევე ვრცელდება კარტოფილის დასნეზოვნებული პარტიების დამუშავების, განკარგვის და წარმოების შედეგად მიღებულ ნარჩენებზე.

5. კონტროლის უზრუნველყოფის მიზნით, სააგენტოს თანხმობის საფუძველზე, კარტოფილის შეფუთვა, ან ნარჩენების განკარგვა, კარტოფილის ტუბერების, ან მცენარეების შესაბამისი გამოყენება ან განკარგვა ითვალისწინებს:

ა) იმ კარტოფილის სასურსათო სახით გამოყენებას, რომელიც განკუთვნილია მოხმარებისთვის, დაფასოებულია და მზად არის პირდაპირ მისაწოდებლად, და ხელახლა დაფასობის გარეშე გამოსაყენებლად ისეთ ადგილას, რომელიც აღჭურვილია ნარჩენების განკარგვის შესაბამისი მოწყობილობებით. დასარგავად განკუთვნილი კარტოფილის დამუშავება შესაძლებელია მხოლოდ ერთსა და იმავე ადგილას, ან მისი გასუფთავების და დეზინფექციის შემდეგ;

ბ) იმ კარტოფილის სასურსათო სახით გამოყენებას, რომელიც განკუთვნილია საწარმოო დამუშავებისა და ნარჩენების განკარგვის სათანადო მოწყობილობებით აღჭურვილი გადამამუშავებელი საწარმოსათვის პირდაპირ და დაუყოვნებლივ მისაწოდებლად. ეს საწარმო ასევე აღჭურვილი უნდა იქნეს სულ მცირე ამ ადგილიდან გამოსული სატრანსპორტო საშუალებების გაწმენდა-დეზინფექციის სისტემით;

გ) სხვაგვარ გამოყენებას ან განკარგავას, იმ პირობით, თუ დადგენილია, რომ არ არსებობს მავნე ორგანიზმის გავრცელების რისკი, რაც პასუხისმგებელი ორგანოების მიერ უნდა იქნეს დადასტურებული.

6. ფიტოსანიტარიული რეგულირებადი ობიექტის გასუფთავებისა და დეზინფექციის მიზნით:

ა) ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-7 მუხლის პირველი პუნქტის „ა“ ქვეპუნქტის საფუძველზე დასნეზოვნებულად, ან ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-7 მუხლის პირველი პუნქტის „ბ“ ქვეპუნქტის საფუძველზე სავარაუდოდ დასნეზოვნებულად მიჩნეული ნებისმიერი სხვა ფიტოსანიტარიული რეგულირებადი ობიექტები, მათ შორის შესაფუთი მასალები, უნდა განადგურდეს (დამარხვა, ინსინერაცია), ხოლო მანქანა-დანადგარები, სატრანსპორტო საშუალებები, გემები, მათი შესანახი ადგილები, უნდა გასუფთავდეს და მოხდეს მათი დეზინფექცია;

ბ) დეზინფექციის შემდეგ, ნებისმიერი ფიტოსანიტარიული რეგულირებადი ობიექტი მოიჩნევა სუფთად.

მუხლი 32. დემარკაციულ ზონაში გასატარებელი ღონისძიებები

1. ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-7 მუხლის საფუძველზე სააგენტოს მიერ დასნებოვნებულად მიჩნეული ტერიტორია ცხადდება დასნებოვნების ზონად და ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-8 მუხლის მე-2 პუნქტის საფუძველზე ხდება მისი დემარკაცია.

2. დემარკაციული ზონის ფარგლებში ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-8 მუხლის მე-5 პუნქტის შესაბამისად, უნდა გატარდეს შემდეგი ღონისძიებები:

ა) ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-7 მუხლის პირველი პუნქტის „ა“ ქვეპუნქტის საფუძველზე დასნებოვნების დადგენიდან სულ მცირე სამი წლის განმავლობაში, დასნებოვნებულად მიჩნეულ წარმოების ადგილებში, ნაკვეთებში:

ა.ა) აღმოფხვრილი უნდა იქნეს ნაგერალა კარტოფილი და მავნე ორგანიზმის სხვა ბუნებრივი მასპინძელი მცენარეები;

ა.ბ) არ უნდა იქნეს დარგული მავნე ორგანიზმის გავრცელების რისკის მქონე კარტოფილის ტუბერები, მცენარეები, ნამდვილი თესლი, მავნე ორგანიზმის სხვა ბუნებრივი მასპინძელი მცენარეები, ან კულტურები, რომელთათვისაც არსებობს მავნე ორგანიზმის გავრცელების რისკი;

ბ) თუ დათესვამდე ორი წლის განმავლობაში ჩატარებული ოფიციალური შემოწმებებით დადგენილია, რომ კარტოფილის მოყვანის პირველ სავეგეტაციო პერიოდში, ნაკვეთში არ არსებობს ნაგერალა კარტოფილი და მავნე ორგანიზმის სხვა მასპინძელი მცენარეები, ნებადართულია მხოლოდ სასურსათო კარტოფილის წარმოება. მოსავლის აღების დროს მოყვანილი ტუბერები შემოწმებული უნდა იქნეს ამ ტექნიკური რეგლამენტის II თავში და დანართი N1-14-ში მითითებული პროცედურის შესაბამისად, სათესლე კარტოფილის მოყვანის მიზნით, სულ მცირე ორი წლის განმავლობაში დაცული უნდა იქნეს თესლბრუნვა, ნებადართული უნდა იყოს კარტოფილის დათესვა მხოლოდ სათესელე, ან სასურსათო მიზნით და აუცილებელია ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-4 მუხლის პირველ პუნქტში მითითებული ოფიციალური გამოკვლევის ჩატარება;

გ) დასნებოვნების დადგენიდან ოთხი წლის განმავლობაში:

გ.ა) აუცილებელია ზომების მიღება, რათა მოცილებული იქნეს ნაგერალა კარტოფილი და მავნე ორგანიზმის სხვა მასპინძელი მცენარეები;

გ.ბ) აუცილებელია განისაზღვროს ნაკვეთი, რომელიც გამოყენებული უნდა იქნეს ან მუდმივ სამოვრად, ან დაუმუშავებელი მიწის ფორმით;

გ.გ) ამ მუხლის მე-2 პუნქტის „ე“ ქვეპუნქტში მითითებული პერიოდის შემდეგ სასოფლო-სამეურნეო სამუშაოების პირველი სეზონის დროს და იმ პირობით, თუ დათესვამდე ორი წლის განმავლობაში ჩატარებული ოფიციალური კვლევით დადგინდება, რომ ნაკვეთში არ არსებობს ნაგერალა კარტოფილი და მავნე ორგანიზმის სხვა მასპინძელი მცენარეები, ნებადართულია მხოლოდ სათესელე ან სასურსათო კარტოფილის წარმოება, ხოლო აღებული კარტოფილი შემოწმებული უნდა იქნეს ამ ტექნიკური რეგლამენტის II თავში და დანართი N1- 14-ში მითითებული პროცედურების შესაბამისად;

დ) კარტოფილის წარმოებისას დასნეზოვნებული ადგილის ყველა სხვა ნაკვეთზე და იმ პირობით, თუ პასუხისმგებელი ოფიციალური ორგანოები ადასტურებენ, რომ აღმოფხვრილია ნაგერალა კარტოფილი და მავნე ორგანიზმის მასპინძელი მცენარეების არსებობის რისკი:

დ.ა) დასნეზოვნების განსაზღვრის შემდგომ, კარტოფილის კულტივირების წელს, დაუშვებელია კარტოფილის ტუბერების, მცენარეების ან ნამდვილი სათესლე კარტოფილის, ან მავნე ორგანიზმის მასპინძელი მცენარეების დარგვა;

დ.ბ) სერტიფიცირებული სათესლე კარტოფილის დათესვა დასაშვებია მხოლოდ სასურსათო კარტოფილის წარმოების მიზნით;

დ.გ) დასნეზოვნების განსაზღვრის შემდგომ, კულტივირების მეორე წელს, დასაშვებია მხოლოდ სათესლე კარტოფილის დათესვა, ან სასურსათო კარტოფილის წარმოების მიზნით, მხოლოდ სერტიფიცირებული თესლის დათესვა, ან მავნე ორგანიზმის არარსებობაზე ოფიციალურად შემოწმებული და ოფიციალური კონტროლის ქვეშ მოყვანილი სათესლე კარტოფილის დათესვა, რომელიც ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-6 მუხლის პირველ პუნქტში მითითებული ადგილების გარდა სხვა წარმოების ადგილებშია მოყვანილი;

დ.დ) დასნეზოვნების განსაზღვრის შემდგომ, სულ მცირე კულტივირების მესამე წელს, ნებადართულია მხოლოდ სათესლე, ან სასურსათო წარმოების მიზნით, დარგული იქნეს, ან სერტიფიცირებული სათესლე კარტოფილი, ან მხოლოდ სერტიფიცირებული სათესლე კარტოფილიდან ოფიციალური ზედამხედველობის ქვეშ მოყვანილი სათესლე კარტოფილი;

დ.ე) ამ პუნქტის „ბ“, „დ“, „ე“, „ვ“ ქვეპუნქტებში მითითებული კულტივირების თითოეულ წელს, აუცილებელია მიღებული იქნეს შესაბამისი ზომები ნაგერალა კარტოფილის, ან მავნე ორგანიზმის მასპინძელი მცენარეების (თუ ასეთი არსებობს) მოსაშორებლად და ასევე აუცილებელია ყოველი ნაკვეთიდან აღებული კარტოფილის ოფიციალური შემოწმების განხორციელება ამ ტექნიკური რეგლამენტის II თავში და დანართი №1– 14-ში მითითებული პროცედურის შესაბამისად;

ე) ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-7 მუხლის პირველი პუნქტის „ა“ ქვეპუნქტის საფუძველზე დასნეზოვნების დადგენისთანავე და კულტივირების პირველ წელს, წარმოების ადგილებზე და კარტოფილის წარმოების დროს გამოყენებული ყველა მანქანა-დანადგარები და შესანახი ობიექტები გაწმენდილი და დეზინფიცირებული უნდა იყოს შესაბამისი მეთოდების გამოყენებით, როგორც მითითებულია ამ მუხლის მე-2 პუნქტში;

ვ) დახურული გრუნტის ყოველ საწარმოო ერთეულში, სადაც შესაძლებელია ზრდის სუბსტრატის მთლიანად შეცვლა:

ვ.ა) კარტოფილის არავითარი ტუბერი, მცენარე თუ თესლი არ უნდა დაირგოს და დაითესოს მანამ, სანამ არ ჩატარდება მავნე ორგანიზმის გამოსავლენი ღონისძიებები, არ იქნება მოცილებული ყველა მცენარეული მასალა, მათ შორის, სულ მცირე, მთლიანად არ შეიცვლება სუბსტრატი, გასუფთავდება ყოველი საწარმოო ერთეული, ყველა ხელსაწყო და პასუხისმგებელი პირების მიერ არ იქნება ნებადართული კარტოფილის წარმოებისათვის;

ვ.ბ) კარტოფილის წარმოება უნდა მოხდეს სერტიფიცირებული სათესლე კარტოფილისგან, ან შემოწმებული ტუბერებიდან მიღებული მინი-ტუბერებისგან, ან მიკრო მცენარეებისგან.

3.დემარკაციული ზონის ფარგლებში, ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-6 მუხლის პირველი პუნქტით განსაზღვრული ზომების დაურღვევლად:

ა) დასნეზოვნების განსაზღვრისთანავე, დაუყოვნებლივ უნდა მოხდეს კარტოფილის წარმოებისას გამოყენებული ყველა მანქანა-დანადგარების და შესანახი მოწყობილობების სათანადოდ გაწმენდა და დეზინფექცია შესაბამისი მეთოდების გამოყენებით;

ბ) დასნეზოვნების განსაზღვრისთანავე და სულ მცირე კულტივირების სამი წლის განმავლობაში:

ბ.ა) პასუხისმგებელი ორგანოების მიერ უზრუნველყოფილი უნდა იქნეს კარტოფილის ტუბერების მოსაყვანი, შესანახი ან დასამუშავებელი შენობა-ნაგებობების, აგრეთვე კარტოფილის წარმოებისას კონტრაქტის შესაბამისად გამოყენებული მანქანა-დანადგარების და შენობა-ნაგებობის ზედამხედველობა;

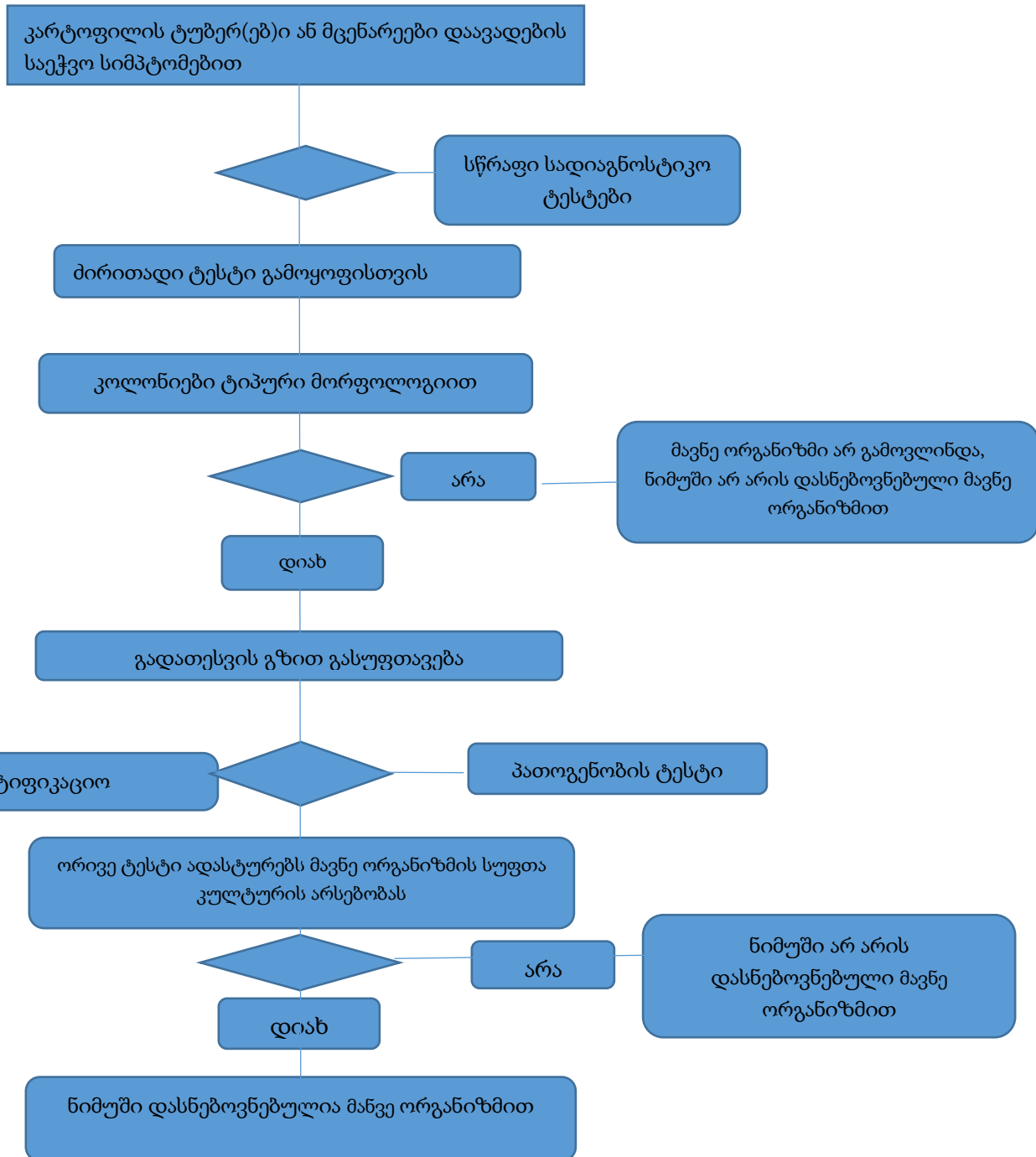
ბ.ბ) დათესილი, ან დარგული უნდა იქნეს მხოლოდ ოფიციალური კონტროლის ქვეშ მყოფი ზონის ფარგლებში მოყვანილი სერტიფიცირებული სათესლე კარტოფილი ან თესლი და ასევე შემოწმებული უნდა იქნეს ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-7 მუხლის პირველი პუნქტის „ბ“ ქვეპუნქტის საფუძველზე სავარაუდოდ დასნეზოვნებულად განსაზღვრულ წარმოების ადგილებში მოყვანილი სათესლე კარტოფილი;

ბ.გ) აუცილებელი მოთხოვნაა დაცული ზონის ფარგლებში არსებულ ყველა შენობა-ნაგებობებში მოყვანილი სათესლე კარტოფილის სათითაოდ გაწმენდა, ან სათესლე და სასურსათო მარაგების დამუშავებისას გასუფთავების და დეზინფექციის სისტემის უზრუნველყოფა;

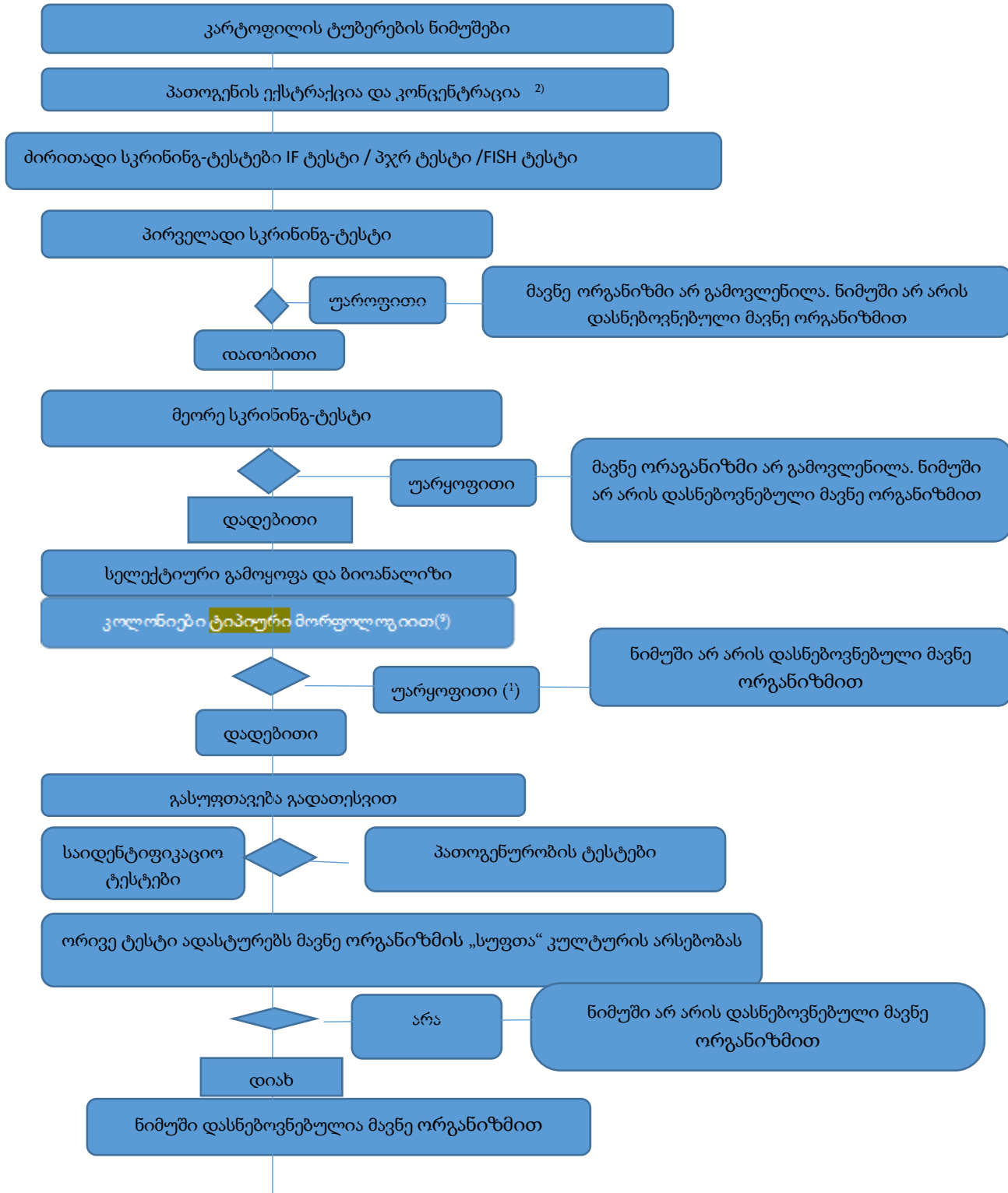
ბ.დ) უნდა განხორციელებულ იქნეს ოფიციალური გამოკვლევა ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-4 მუხლის პირველი პუნქტის შესაბამისად;

გ) საჭიროების შემთხვევაში საჭირო დროის განმავლობაში უნდა შეიქმნას პროგრამა სათესლე კარტოფილის მთლიანი მარაგების შეცვლასთან დაკავშირებით.

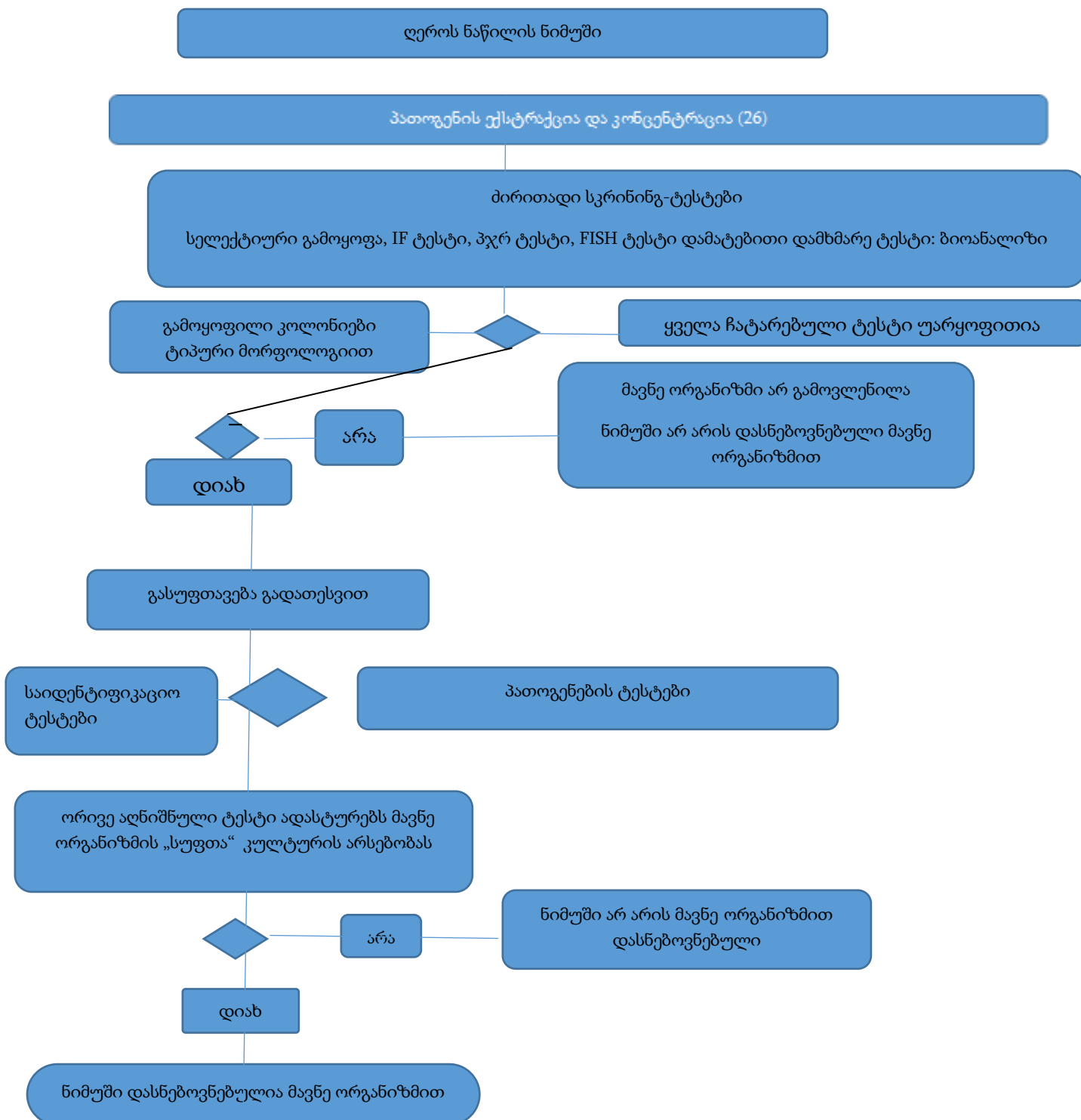
მავნე ორგანიზმის სიმპტომების მექონე კარტოფილის ტუბერებისა და მცენარეების ნიმუშებში
მავნე ორგანიზმის გამოვლენა და იდენტიფიკაცია













უსიმპტომო კარტოფილის ტუბერების ნიმუშებში მავნე ორგანიზმის გამოვლენა და
იდენტიფიკაცია













უსიმპტომო კარტოფილის მცენარეების ნიმუშებში მავნე ორგანიზმის გამოვლენა და
იდენტიფიკაცია



სატესტო პრეპარატის მომზადება
რესუსპენზირებადი ნალექის განზავება

რესუსპენზირებადი ნალექის განზავება	/100 1/1 1/1 1/1 1/1
(T=ტიტრი)	T/2 T/4 T/2 T 2T - ანტიშრატის/ანტისხეულის ორმაგი განზავება
ნიმუში 1	 1  2  3  4  5
ნიმუში 1-ის ან ნიმუში 2-ის ასლი	 6  7  8  9  10

საცდელი პლანშეტის მომზადება
ანტიშრატის/ანტისხეულის სამუშაო განზავება

ნიმუში 1	 1  2  3  4  5
ნიმუში 1-ის ან ნიმუში 2-ის ასლი	 6  7  8  9  10

ფოსოების განლაგება FISH-ის პრეპარატისათვის

ნიმუში 1

ცარიელი

ცარიელი

ცარიელი

ნიმუში 2



ფოსო 1

ფოსო 2

ფოსო 3

ფოსო 4

ფოსო 5

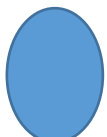
ნიმუში 1

ცარიელი

ცარიელი

ცარიელი

ნიმუში 2



ფოსო 6

ფოსო 7

ფოსო 8

ფოსო 9

ფოსო 10

საფარი მინა 1

საფარი მინა 2

ტესტები მოსალოდნელი შედეგით

N	ტესტები	მოსალოდნელი შედეგი
ა	ოქსიდაცია/ფერმენტაციის (O/F) ტესტი	ინერტული ან სუსტად ოქსიდაციური
ბ	ოქსიდაზური აქტივობა	-
გ	ზრდა 37° C ტემპერატურაზე	-
დ	ურეაზული აქტივობა	-
ე	ესკულინის ჰიდროლიზი	+
ვ	სახამებლის ჰიდროლიზი	- ან სუსტი
ზ	7% NaCl-ის მიმართ ტოლერანტობა	-
თ	ინდოლის წარმოქმნა	-
ი	კატალაზური ქტივობა	+

კ	H ₂ S წარმოქმნა	-
ლ	ციტრატის უტილიზაცია	-
მ	ჟელატინის გათხევადება	-
ნ	მჟავას წარმოქმნა გლიცერინიდან	-
ო	მჟავას წარმოქმნა ლაქტოზიდან	-
პ	მჟავას წარმოქმნა სალიცინიდან	-
ჟ	გრამის წესით შეღებვა	+

დანართი №8

ტესტირებისათვის საჭირო ბუფერები

გაუხსნელი სტერილური ბუფერების შენახვა შესაძლებელია ერთი წლის განმავლობაში.

1. ბუფერები ექსტრაქციის პროცედურებისთვის:

ა) საექსტრაქციო ბუფერი (50 mM ფოსფატის ბუფერი, pH 7.0) - გამოიყენება მცენარის ქსოვილებიდან ბაქტერიების ექსტრაქციისთვის ჰომოგენიზაციის ან შენჯღრევის გზით.

საექსტრაქციო ბუფერი (50 mM ფოსფატის ბუფერი, pH 7.0)

ა	Na ₂ HPO ₄ (უწყლო)	4,26 გ
ბ	KH ₂ PO ₄	2,72 გ
გ	გამოხდილი წყალი	1,00 ლ

ა.ა) რეაგენტები იხსნება, მოწმდება pH და სტერილდება ავტოკლავში 121° C ტემპერატურაზე 15 წუთი;

ა.ბ) შესაძლოა საჭირო გახდეს შემდეგი დამატებითი რეაგენტები:

დამატებითი რეაგენტები

	დასახელება	გამოყენების მიზანი	რაოდენობა (ერთ ლიტრზე)
ა	Lubrol ფანტელები	დეფლოკულანტი ⁽¹⁾	0,5 გ
ბ	DC აქაფების საწინააღმდეგო სილიკონი	აქაფების საწინააღმდეგო საშუალება ⁽¹⁾	0,1 მლ
გ	ნატრიუმის პიროფოსფატი	ანტიოქსიდანტი	1,0 გ

დ	პოლივინილპიროლიდონი - 40000 (PVP-40)	პჯრ ინჰიბიტორების შემზოქავი	50 გ
---	---	--------------------------------	------

(¹) ჰომოგენიზაციით ექსტრაქციის მეთოდისთვის.

ბ) დამლექავი ბუფერი (10 mM ფოსფატის ბუფერი, pH 7,2)

აღნიშნული ბუფერი გამოიყენება ცენტრიფუგირების გზით დალექილი კარტოფილის ტუბერის ქსოვილის ექსტრაქტების ხელახლა გასახსნელად და გასაზავებლად.

დამლექავი ბუფერი (10 mM ფოსფატის ბუფერი, pH 7,2)

ა	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2,7 გ
ბ	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,4 გ
გ	გამოხდილი წყალი	1,00 ლ

ბ.ა) ხდება რეაგენტები, შეამოწმეთ pH და გაასტერილეთ ავტოკლავში 121° C ტემპერატურაზე 15 წუთი;

2. ბუფერები IF ტესტისთვის:

ა) IF ბუფერი (10 mM ნატრიუმის ფოსფატური ბუფერი (PBS), pH 7,2.) გამოიყენება ანტისხეულების გასახსნელად:

IF ბუფერი (10 mM PBS, pH 7,2)

ა	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2 \text{O}$	2,7 გ
ბ	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2 \text{O}$	0,4 გ
გ	NaCl	8,0 გ
დ	გამოხდილი წყალი	1,00 ლ

ა.ა) რეაგენტები იხსნება, მოწმდება pH და სტერილდება ავტოკლავში 121° C ტემპერატურაზე 15 წუთი;

ბ) IF ბუფერი - „Tween“ - გამოიყენება სასაგნე მინიების გასარეცხად. IF ბუფერს ემატება 0,1%-იანი „Tween“ 20;

გ) ფოსფატის ბუფერი გლიცერინით, pH 7,6 - გამოიყენება, როგორც IF სასაგნე მინებზე ჰისტოლოგიური გარემოს სითხე ფლუორესცენციის გაზრდის მიზნით.

ფოსფატის ბუფერი გლიცერინით (pH 7,6)

ა	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2 \text{O}$	3,2 გ
ბ	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2 \text{O}$	0,15 გ
გ	გლიცერინი	50 მლ
დ	გამოხდილი წყალი	100 მლ

არსებობს კომერციული, ფლუორესცენციის გამზრდელი ჰისტოლოგიური გარემოს ხსნარები. მაგ., Vectashield® (Vector Laboratories) ან Citifluor ® (Leica).

დანართი №9

დასნეზვნების დონის განსაზღვრა IF და FISH ტესტებში

1. ტიპური ფლუორესცენტული უჯრედების საშუალო რაოდენობის გამოთვლა ხდება თითოეულ მხედველობის არეში (C).
2. ტიპური ფლუორესცენტული უჯრედების რაოდენობის გამოთვლა ხდება მიკროსკოპის პრეპარატის თითოეულ გამოსაკვლევ არეალში (C);

$$C=c \times S/s$$

სადაც S = მიკროსკოპის მრავალფოსოიანი სასაგნე მინის ფოსოს ფართობი;

s = ობიექტივის ხედვის არის ფართობი;

$$s=\pi i^2/4G^2K^2$$

სადაც i = მხედველობის არის კოეფიციენტი (ოკულარის ტიპის მიხედვით)მერყეობს 8-დან 24-მდე)

K = მილის კოეფიციენტი (1 ან 1,25)

G = ობიექტივის გადიდება (100x, 40x და ა.შ).

3. ტიპური ფლუორესცენტული უჯრედების რაოდენობა გამოითვლება გახსნილი ნალექის ყოველ მლ-ზე (N)

$$N = C \times 1\,000/y \times F$$

სადაც y = თითოეულ ფოსოში გახსნილი ნალექის მოცულობა

F = გახსნილი ნალექის განზავების კოეფიციენტი

დანართი №10

საკვები არეები მავნე ორგანიზმის გამოყოფისა და კულტივირებისათვის

1. მავნე ორგანიზმის გამოყოფისა და კულტივირებისათვის ძირითადად გამოიყენება შემდეგი საკვები არეები:

ა) საკვები აგარი:

ა	საკვები აგარი (Difco)	23,0 გ
ბ	გამოხდილი წყალი	1,0 ლ

ა.ა) იხსნება ინგრედიენტები და სტერილდება ავტოკლავში 121° C ტემპერატურაზე 15 წუთის განმავლობაში;

ბ) საკვები აგარი დექსტროზით:

Difco ბაქტო საკვები აგარი, რომელიც შეიცავს 1% D (+) გლუკოზას (მონოჰიდრატი) სტერილდება ავტოკლავში 115°C-ზე 20 წთ-ის განმავლობაში;

გ) YPGA -აგარი (აგარი საფუვრის ექსტრაქტით, პეპტონით, გლუკოზით):

ა	საფუვრის ექსტრაქტი (Difco)	5,0 გ
ბ	ბაქტო-პეპტონ (Difco)	5,0 გ
გ	D (+) გლუკოზა (მონოჰიდრატი)	10,0 გ
დ	ბაქტო-აგარი (Difco)	15,0 გ
ე	გამოხდილი წყალი	1,0 ლ

გ.ა) იხსნება ინგრედიენტები და სტერილდება ავტოკლავში 121° C ტემპერატურაზე 15 წუთის განმავლობაში;

დ) YGM -აგარი (აგარი საფუარის ექსტრაქტით და მინერალური მარილებით):

ა	ბაქტო-საფუარის ექსტრაქტი (Difco)	2,0 გ
ბ	D (+) გლუკოზა (მონოჰიდრატი)	2,5 გ
გ	K ₂ HPO ₄	0, 25 გ
დ	KH ₂ PO ₄	0, 25 გ

ე	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 გ
ვ	MgSO ₄ ·H ₂ O	0,015 გ
ზ	NaCl	0,05 გ
თ	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,005 გ
ი	ბაქტო-აგარი (Difco)	18 გ
კ	გამოხდილი წყალი	1,0 ლ

დ.ა) იხსნება ინგრედიენტები და 0,5 ლ მოცულობის საკვები არე სტერილდება ავტოკლავში 115 °C ტემპერატურაზე 20 წუთის განმავლობაში;

2. ვალიდირებულ სელექტიურ საკვებ არეებს მიეკუთვნება:

ა) MTNA საკვები არე (თუ სხვაგვარად არ არის მითითებული ყველა კომპონენტი მიღებულია BDH-დან):

ა	საფუარის ექსტრაქტი (Difco)	2,0 გ
ბ	მანიტი	2,5 გ
გ	K ₂ HPO ₄	0,25 გ
დ	KH ₂ PO ₄	0,25 გ
ე	NaCl	0,05 გ
ვ	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1გ
ზ	MnSO ₄ ·H ₂ O	0,015 გ
თ	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,005გ
ი	აგარი (Oxoid №1)	16,0 გ
კ	გამოხდილი წყალი	1,0 ლ

ა.ა) იხსნება ინგრედიენტები, pH მიიყვანება 7,2 -მდე, სტერილდება ავტოკლავში 121°C ტემპერატურაზე 20 წუთის განმავლობაში. 50°C-მდე გაგრილების შემდეგ, ემატება ანტიბიოტიკები: ტრიმეთოპრიმი 0,06 გ ნალიდიქსინის მჟავა 0,002 გ, ამფოტერიცინი B 0,01 გ.

ა.ბ) ანტიბიოტიკის ხსნარები: ტრიმეტოპრიმი (სიგმა) და ნალიდიქსინის მჟავა (სიგმა) (ორივე 5 მგ/მლ) 96% მეთანოლში, ამფოტერიცინი B (სიგმა) (1 mg/ml) დიმეთილ სულფოქსიდში. ანტიბიოტიკის ხსნარები სტერილდება ფილტრაციით;

ა.ბ) შენიშვნა: ძირითადი საკვები არეების გამოყენების ვადაა 3 თვე. ანტიბიოტიკების დამატების შემდეგ, მაცივარში შენახვის შემთხვევაში, გამოყენების ვადა იქნება 1 თვე;

ბ) NCP-88 საკვები არე:

ა	საკვები აგარი (Difco)	23 გ
ბ	საფუარის ექსტრაქტი (Difco)	2 გ
გ	D-მანიტი	5 გ
დ	K ₂ HPO ₄	2 გ
ე	KH ₂ PO ₄	0,5გ
ვ	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25გ
ზ	გამოხდილი წყალი	1,0 ლ

ბ.ა) იხსნება ინგრედიენტები, pH მიიყვანება 7,2-მდე, სტერილდება ავტოკლავში 50°C-მდე გაგრილების შემდეგ, ემატება ანტიბიოტიკები: პოლიმიქსინ B სულფატი(Sigma) 0,003 გ, ნალიდიქსინის მჟავა (Sigma) 0,008 გ, ციკლოპექსიმიდი (Sigma) B 0,2 გ;

ბ.ბ) ანტიბიოტიკები საბაზისო ხსნარში იხსნება შემდეგი სახით: ნალიდიქსინის მჟავა 0,01 M NaOH, ციკლოპექსიმიდი 50 % -იან ეთანოლში, პოლიმიქსინ B სულფატი გამოხდილ წყალში. ანტიბიოტიკის ხსნარები სტერილდება ფილტრაციით;

ბ.გ) შენიშვნა: ძირითადი საკვები არეების გამოყენების ვადაა 3 თვე. ანტიბიოტიკების დამატების შემდეგ, მაცივარში შენახვის შემთხვევაში გამოყენების ვადა იქნება 1 თვე.

დანართი №11

ვალიდირებული პჯრ პროტოკოლი და რეაგენტები

1. შენიშვნა:

- ა) წინასწარი ტესტირებთ შესაძლებელი უნდა იყოს ნიმუშის ექსტრაქტში მავნე ორგანიზმის სულ მცირე 10³-10⁴ უჯრედი/მლ-ში გამოვლენა;
- ბ) წინასწარმა ტესტმა ასევე არ უნდა აჩვენოს საექვო დადებითი შედეგები შერჩეული ბაქტერიული შტამების პანელზე.

2. მულტიფლექს პჯრ (Multiplex PCR) პროტოკოლი პჯრ შიდა კონტროლით (Patrik, 2000)

ა) ოლიგონუკლეოტიდური პრაიმერი:

ა.ა)	პირდაპირი პრაიმერი PSA-1	5'- ctc ctt gtg ggg tgg gaa aa -3'
ა.ბ)	შებრუნებული პრაიმერი PSA-R	5'- tac tga gat gtt tca ctt ccc c -3'
ა.გ)	პირდაპირი პრაიმერი NS-7-F	5'- gag gca ata aca ggt ctg tga tgc -3'
ა.დ)	შებრუნებული პრაიმერი NS-8-R	5'- tcc gca ggt tca cct acg ga -3'

ა.ე) მავნე ორგანიზმის მატრიცული დნმ-დან ამპლიფიცირებული ფრაგმენტების მოსალოდნელი ზომა = 502 bp (PSA-პრაიმერების წყვილი);

ა.ვ) 18 rRNA შიდა პჯრ კონტროლიდან ამპლიფიცირებული ფრაგმენტების მოსალოდნელი ზომა = 377 bp (NS-პრაიმერების წყვილი).

ბ) პჯრ სარეაქციო ნარევი:

№	რეაგენტი	რაოდენობა თითოეულ რეაქციაზე	საბოლოო კონცენტრაცია
ბ.ა)	სტერილური UPW	15,725 მკლ	
ბ.ბ)	10 x პჯრ ბუფერი ⁽¹⁾ (15 mM MgCl ₂)	2,5 მკლ	1x (1,5 mM MgCl ₂)
ბ.გ)	BSA (ფრაქცია V) (10 %)	0,25 მკლ	0,1 %
ბ.დ)	d-nTP ნარევი (20 mM)	0,125 მკლ	0,1 მმოლი
ბ.ე)	PSA-1 (10 μM)	0,5 მკლ	0,2 მკლ
ბ.ვ)	პრაიმერი PSA-R (10 μM)	0,5 მკლ	0,2 მკმოლი
ბ.ზ)	პრაიმერი NS-7-F (10 μM) ⁽²⁾	0,1 მკლ	0,04 მკმოლი
ბ.თ)	პრაიმერი NS-8-R (10 μM) ⁽²⁾	0,1 მკლ	0,04 მკმოლი
ბ.ი)	Taq-პოლიმერაზა (5 ერთეული/მკლ) ⁽¹⁾	0,2 მკლ	1,0 ერთეული
ბ.კ)	ნიმუშის მოცულობა	5,0 მკლ	
ბ.ლ)	სულ მოცულობა	25,0 მკლ	

⁽¹⁾ მეთოდები ვალიდირებულია Perkin Elmer (AmpliTaq ან Gold) and Gibco BRL. ფირმის Taq-პოლიმერაზას გამოყენებით.

⁽²⁾ NS-7 F და NS-8 R პრაიმერების კონცენტრაცია ოპტიმიზირებულია კარტოფილის ტუბერის ქსოვილიდან ექსტრაქციისთვის ჰომოგენიზაციის, ხოლო დნმ-ის გამოსაყოფსად პატრიკის (Patrik (2000)) მეთოდის გამოყენების შემთხვევაში. რეაგენტების კონცენტრაციების რეოპტიმიზაცია იქნება საჭირო თუ ექსტრაქციისთვის გამოყენებული იქნება შენჯღრევა ან დნმ-ის გამოყოფის სხვა მეთოდები.

გ) პჯრ რეაქციის პირობები: გაუშვით შემდეგი პროგრამა:

ციკლი	გ.ა)	3 წთ. 95°C ტემპერატურაზე (მატრიცული დნმ-ის დენატურაცია)
10 ციკლი	გ.ბ)	1 წთ. 95°C ტემპერატურაზე (მატრიცული დნმ-ის დენატურაცია);
	გ.გ)	1 წთ. 64 °C ტემპერატურაზე (პრაიმერების შელღობა)
	გ.დ)	1 წთ. 72 °C ტემპერატურაზე (ასლის ელონგაცია)
25 ციკლი	გ.ე)	30 წმ. 95°C ტემპერატურაზე (მატრიცული დნმ-ის დენატურაცია);
	გ.ვ)	30 წმ. 62 °C ტემპერატურაზე (პრაიმერების შელღობა)
	გ.ზ)	1 წთ. 72 °C ტემპერატურაზე (ასლის ელონგაცია)
1 ციკლი	გ.თ)	5 წთ 72 °C ტემპერატურა (საბოლოო ელონგაცია)
	გ.ი)	ლოდინი 4 °C ტემპერატურა.

დ) შენიშვნა: მოცემული პროგრამა ოპტიმიზირებულია MJ Research PTC 200 თერმოციკლერისთვის.

ე) ამპლიფიცირებული ფრაგმენტების რესტრიქციული ანალიზი.

მავნე ორგანიზმის დნმ-ის ამპლიფიცირებული ფრაგმენტები, 37°C ტემპერატურაზე 30 წთ-ის განმავლობაში ფერმენტი *Bgl* II -ის მოქმედებით, აჩვენებს რესტრიქციული ფრაგმენტების სიგრძის პოლიმორფიზმს. ინკუბაციის შემდეგ იძლევა სხვადასვა სიგრძის რესტრიქციულ ფრაგმენტებს. მავნე ორგანიზმის სპეციფიკური რესტრიქციული ფრაგმენტების ზომა უნდა იყოს 282 bp და 220 bp ზომის.

3. დამტანი (ლოადინგ) ბუფერის მომზადება

ა)	ბრომფენოლის ლურჯი (10% - დედა ხსნარი)	
ა.ა)	ბრომფენოლის ლურჯი	5 გ
ა.ბ)	გამოხდილი წყალი (ორმ გამოხდილი)	50 მლ
ბ)	დამტანი ბუფერი	
ბ.ა)	გლიცერინი (86 %)	3,5 მლ
ბ.ბ)	ბრომფენოლის ლურჯი (5.1)	300 მკლ
ბ.გ)	გამოხდილი წყალი (ორმ გამოხდილი)	6,2 მლ

10 X ტრის აცეტატ EDTA ბუფერი (TAE), pH 8,0

ა)	ტრის ბუფერი	48,4 გ
ბ)	ყინულოვანი ძმარმჟავა	11,42 მლ
გ)	EDTA (ორჯანაცვლებული ნატრიუმის მარილი)	3,72 გ
დ)	გამოხდილი წყალი	1,00 ლ

გამოყენებამდე გაანზავეთ 1x -მდე

არსებობს ასევე კომერციული პროდუქციის სახით (მაგ., Invitrogen, ან სხვა მსგავსი).

დანართი №12

FISH ტესტისთვის ვალიდირებული რეაგენტები

1. ოლიგო ზონდი

ა)	მავნე ორგანიზმისთვის სპეციფიკური ზონდი CMS-CY3-01:	5'- ttg cgg ggc gca cat ctc tgc acg -3'
ბ)	არასპეციფიკური ეუბაქტერიული ზონდი EUB-338-FITC:	5'- gct gcc tcc cgt agg agt -3'

2. საფიქსაციო ხსნარი

ა) **გაფრთხილება!** საფიქსაციო ხსნარი შეიცავს პარაფორმალდეჰიდს, რომელიც მომწამვლელია. უნდა გამოყენებულ იქნეს ხელთათმანები. არ შეიძლება შესუნთქვა. რეკომენდებულია ამწოვ კარადაში მუშაობა.

ბ) 9 მლ ულტრა სუფთა წყალი (UPW) თბება დაახლოებით 60°C ტემპერატურაზე და ემატება 0,4 გ პარაფორმალდეჰიდი. პარაფორმალდეჰიდი იხსნება 5 წვეთი 1N NaOH -ის ხსნარის დამატებით და მაგნიტურ სანჯღრევლაზე მორევით;

გ) 1 მლ 0.1 M ფოსფატის ბუფერის (PB; pH 7.0) და 5 წვეთი 1 N HCl —ის დამატებით დაიყვანება pH 7.0- მდე. pH მოწმდება ინდიკატორის ქაღალდით და საჭიროების შემთხვევაში რეგულირდება HCl ან NaOH -ის დამატებით;

დ) **გაფრთხილება!** არ გამოიყენება pH-მეტრი პარაფორმალდეჰიდის შემცველი ხსნარებისთვის!

ე) ხსნარი იფილტრება $0.22\ \mu\text{m}$ ზომის მემბრანის ფილტრით და გამოყენებამდე ინახება სუფთა ადგილას 4°C ტემპერატურაზე;

ვ) შენიშვნა: ალტერნატიული საფიქსაციო ხსნარია: 96%-იანი ეთანოლი.

3. 3 x საჰიბრიდიზაციო ნარევი

ა)	NaCl	2,7 მოლი
ბ)	Tris-HCl	60 მმოლი (pH 7,4)
გ)	EDTA (გაფილტვრით გასტერილებულ და ავტოკლავირებული)	15 მმოლი

საჭიროებისამებრ განზავება ხდება 1 x -მდე

4. ჰიბრიდიზაციის ხსნარი.

ა)	1 x საჰიბრიდიზაციო ნარევი	
ბ)	ნატრიუმის დოდეცილ სულფატი (SDS)	0,01 %
გ)	ზონდი EUB 338	5 ნგ/მკლ
დ)	ზონდი CMSCY301	5 ნგ/მკლ

ჰიბრიდიზაციის ხსნარი მზადდება ცხრილში მითითებული გამოთვლების შესაბამისად. თითოეული სასაგნე მინისთვის (ორი ნიმუში, თვითოეული თავისი განმეორებით) საჭიროა 90 მკლ ჰიბრიდიზაციის ხსნარი.

5. ჰიბრიდიზაციის ნარევის მოსამზადებლად საჭირო რეაგენტების რაოდენობა

	საჭირო რეაგენტები:	2 სასაგნე მინა	8 სასაგნე მინა
ა)	სტერილური UPW	50,1	200,4
ბ)	3x საჰიბრიდიზაციო ნარევი	30,0	120,0
გ)	1 % SDS	0,9	3,6
დ)	ზონდი EUB 338 (100 ნგ/მკლ)	4,5	18,0

ე)	ზონდი CMSCY301 (100 ნგ/მკლ)	4,5	18,0
ვ)	მთლიანი მოცულობა (მკლ)	90,0	360,0

სინათლისადმი მგრძნობიარე ოლიგო-ზონდების შემცველი ყველა ხსნარი ინახება ბნელ ადგილას -20°C ტემპერატურაზე. ხმარებისას უნდა მორიდებულ იქნეს მზის სხივებს ან ელექტროგანათებას.

6. 0,1 M ფოსფატის ბუფერი, pH 7,0

ა)	Na_2HPO_4	8,52 გ
ბ)	KH_2PO_4	5,44 გ
გ)	გამოხდილი წყალი	1,00 ლ

იხსნება რეაგენტები, მოწმდება pH და სტერილდება ავტოკლავირებით 121°C ტემპერატურაზე 15 წთ -ით.

დანართი №13

ბადრიჯნის კულტურა

1. ბადრიჯანი (*Solanum melongena*):

ა) ითესება პასტერიზებულ სათესლე კომპოსტში. ჩითილი კარგად განვითარებული ჩანასახოვანი ფოთლებით (10 – 14 დღე) უნდა გადაირგას პასტერიზებულ ნიადაგში;

ბ) უნდა იქნეს მოყვანილი სათბურში შემდეგ პირობებში:

ბ.ა)	დღის ხანგრძლივობა:	14 საათი, ან ნორმალური დღის ხანგრძლივობა;
ბ.ბ)	ტემპერატურა:	დღე: $21 - 24^{\circ}\text{C}$ ღამე: 15°C
ბ.გ)	ბადრიჯნის მიმდებარე ჯიშები:	„Black Beauty“, „Long Tom“, „Rima“, „Balsas“

შეღებვა გრამის წესით
(მოდიფიცირებული ჰაკერის მიერ)
(Doetsch, 1981)

1. კრისტალური იისფერი ხსნარი

ა)	იხსნება 2 გ კრისტალური იისფერი	20 მლ 95%-იან ეთანოლში;
ბ)	იხსნება 0,8 გ ამონიუმის ოქსალატი	80 მლ გამოხდილ წყალში;

ორივე ხსნარი შეერევა

2. ლუგოლის ხსნარი

ა)	იოდი	1 გ
ბ)	კალიუმის იოდიდი	2 გ
გ)	გამოხდილი წყალი	300 მლ

მყარი ნივთიერებები როდინში ერთად იფხვნება სანაყით. ემატება წყალი და გახსნის მიზნით მორევა ხდება დახურულ კონტეინერში.

3. საფრანინის ხსნარი კონტრასტული შეღებვისთვის

ა)	ძირითადი ხსნარი:	საფრანინი O 95% ეთანოლი	2,5 გ 100 მლ
ბ)	შეერევა და ინახება.	განზავება ხდება პროპორციით:	1:10

4. შეღებვის პროცედურა:

- ა) მზადდება ნაცხები, შრება ჰაერზე და ფიქსირდება ალზე;
- ბ) სასაგნე მინა ჩაიდირება კრისტალური იისფერის ხსნარში 1 წთ-ის განმავლობაში;
- გ) ირეცხება გამდინარე ონკანის წყლით;
- დ) ჩაიდირება ლუგოლის ხსნარში 1 წთ-ის განმავლობაში;
- ე) ირეცხება გამდინარე ონკანის წყლით და შრება ფილტრის ქაღალდით;
- ვ) გაუფერულება ხდება 95%-იანი ეთანოლის დაწვეთებით ფერის მოშორებამდე, ან 30 წმ-ის განმავლობაში ჩერდება ეთილის სპირტში და ხდება დაფერთხვა;
- ზ) ირეცხება გამდინარე ონკანის წყლით და შრება ფილტრის ქაღალდით;

ზ) საფრანგის ხსნარში ხდება ჩაძირვა 10 წმ-ის განმავლობაში;

თ) ირეცხება გამდინარე ონკანის წყლით და შრება ფილტრის ქაღალდით.

ამ პროცედურის შედეგად გრამდადებითი ბაქტერიები შეიღებება მოლურჯო-იისფრად, ხოლო გრამუარყოფითი ბაქტერიები – მოვარდისფრო-წითლად.