

საქართველოს მთავრობის

დადგენილება №602

2017 წლის 29 დეკემბერი

ქ. თბილისი

**ტექნიკური რეგლამენტის – კარტოფილის მურა 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 მურა სიდამპლის კონტროლის პროცედურები.

**მუხლი 2**

დადგენილება ამოქმედდეს 2018 წლის 1 სექტემბრიდან.

პრემიერ-მინისტრი

გიორგი კვიციანი



## ტექნიკური რეგლამენტი

### კარტოფილის მურა სიდამპლის კონტროლის პროცედურები

#### თავი I

#### მიზანი და ტერმინთა განმარტება

##### მუხლი 1. ზოგადი დებულებები

ტექნიკური რეგლამენტი - კარტოფილის მურა სიდამპლის კონტროლის პროცედურები (შემდგომში - ტექნიკური რეგლამენტი) ადგენს და არეგულირებს საკარანტინო მავნე ორგანიზმის, კარტოფილის მურა სიდამპლის გამომწვევის *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. (*Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith) (შემდგომში - მავნე ორგანიზმი) კონტროლის ფიტოსანიტარიულ ზომებს, საქართველოში მისი შემოჭრისა და გავრცელების პრევენციის მიზნით.

##### მუხლი 2. მიზანი და გამოყენების სფერო

1. ამ ტექნიკური რეგლამენტის მიზანია მავნე ორგანიზმის და მასპინძელი მცენარეების მიმართ ღონისძიებების გატარება, რომლიც გულისხმობს მავნე ორგანიზმის:

ა) ადგილმდებარეობის და გავრცელების დასადგენად სისტემატიური გამოკვლევების ჩატარებას;

ბ) შემოჭრის, შემოტანისა და გავრცელების თავიდან აცილებას;

გ) გამოვლენის შემთხვევაში გავრცელების თავიდან აცილებას და კონტროლს მისი აღმოფხვრის მიზნით.

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

##### მუხლი 3. ტერმინთა განმარტება

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

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

ბ) ნებისმიერი ობიექტი - ნებისმიერი აღჭურვილობა, სატრანსპორტო საშუალება, გემი, საწყობი ან მათი ერთეულები, მათ შორის შესაფუთი მასალა;

გ) *in vitro* - ექსპერიმენტის ტიპი, რომელიც ტარდება ლაბორატორიულ პირობებში ხელოვნურ გარემოში (სინჯარაში ან კოლბაში);

- დ) in situ - ექსპერიმენტის ტიპი, რომელიც საკვლევი ობიექტის ბუნებრივ ან წარმოშობის ადგილზე ტარდება;
- ე) MTNA – მანიტ-ტრიმეთოპრიმ-ნალიდიქსინის მჟავა-ამფოტერიცინის საკვები არე;
- ვ) სუპერნატანტი - ნალექზედა შრე, სითხის ფენა, რომელიც ზემოდან მოექცევა კრისტალიზაციის, ცენტრიფუგირების ან სხვა პროცესის შემდეგ;
- ზ) დასნებოვნება – საქონელში ცოცხალი ორგანიზმის არსებობა, რომელიც წარმოადგენს მცენარის, ან მცენარეული პროდუქტის მავნე ორგანიზმს. დასნებოვნება მოიცავს ინფექციური დაავადების გამომწვევის ორგანიზმში შეღწევის პროცესს;
- თ) მავნე ორგანიზმის შემოჭრა - მავნე ორგანიზმის გადაადგილება იმ ადგილებში სადაც ის ჯერ არ არსებობს, ან არსებობს შეზღუდულად და კონტროლდება ოფიციალურად;
- ი) FAP - Fatty acid profiling – ცხიმოვანი მჟავების პროფილირება;
- კ) YGM – Yeast extract mineral salts medium - მინერალური მარილების არე საფუვრის ექსტრაქტი;
- ლ) PBS - Phosphate Buffered Saline - მარილშემცველი ფოსფატური ბუფერი;
- მ) BSA - ხარის შრატის ალბუმინი;
- ნ) ნგ/მკლ - ნანოგრამი/მიკროლიტრზე;
- ო) თხევადი ნარჩენები - თხევად მდგომარეობაში არსებული ნარჩენები;
- პ) განთავსება - ღონისძიება, რომელიც განსაზღვრულია, მაგრამ არ შემოიფარგლება საქართველოს კანონის „ნარჩენების მართვის კოდექსი“-ს II დანართით;
- ჟ) ინსინერაცია - ნარჩენების თერმული დამუშავება (დაწვა);
- რ) დემარკაცია - საკარანტინო და ბუფერული ზონების საზღვრების დადგენა სხვადასხვა ბარიერებით: სამოვარი, ტყე, გზა, მდინარე და სხვ.; შემოღობვით ან გადახვით და პათოგენის შესახებ ინფორმაციის თვალსაჩინო ადგილზე განთავსებით;
- ს) კლონი (ამონაყარი, ყლორტი) - უჯრედების ჯგუფი, რომელიც წარმოიქმნა ერთი წინაპარი უჯრედის გამრავლების შედეგად. კლონში შემავალი ყველა უჯრედი გენეტიკურად იდენტურია;
- ტ) კლონური სელექცია - ჯიშის საუკეთესო კლონების და კვირტების ვეგეტატიური თაობის გამორჩევა შემდეგი სელექციისათვის;
- უ) სააგენტო - საჯარო სამართლის იურიდიული პირი - სურსათის ეროვნული სააგენტო;

ფ) ლაბორატორია - საჯარო სამართლის იურიდიული პირი - საქართველოს სოფლის მეურნეობის სამინისტროს ლაბორატორია;

ქ) სათესლე მასალა - მცენარე, რომელიც განკუთვნილია დასათესად და არა საკვებად ან გადამამუშავებისათვის;

ღ) ფიტოტრონი - ლაბორატორიული კომპლექსი რეგულირებადი გარემოთი მცენარეთა სხვადასხვა პირობებში ზრდის შესასწავლად;

ყ) UPW - ულტრა სუფთა წყალი;

შ) WD - ანტისხეულის სამუშაო განზავება;

ჩ) ELISA – The enzyme-linked immunosorbent assay - ენზიმდაკავშირებული იმუნოფერმენტული ანალიზი;

ც) v/v – volume (of reagent) per final solution volume - ხსნარის საბოლოო მოცულობაში რეაგენტის მოცულობა;

ძ) w/v (%) – weight/volume percentage concentration - გახსნილი ნივთიერების მასის ფარდობა ხსნარის მოცულობასთან;

წ) g - ფარდობითი ცენტრიფუგირების ძალა;

ჭ) კწე - კოლონია წარმომქმნელი ერთეული;

ხ) bp – base pair - ფუძე წყვილი;

ჯ) rpm - revolutions per minute - ბრუნი წუთში.

ჰ) მასპინძელი მცენარეები - „მავნე ორგანიზმის მასპინძელი მცენარეები“ დანართი N1 - ით განსაზღვრული მცენარეები;

ჰ<sup>1</sup>) ოფიციალური გამოკვლევები - სახელმწიფო ფიტოსანიტარიული კონტროლის დროს გატარებული ან გასატარებელი ღონისძიებები;

ჰ<sup>2</sup>) 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 დადგენილი ტერმინები, თუ ამ ტექნიკური რეგლამენტით სხვაგვარად არ არის დადგენილი.

## თავი II. მავნე ორგანიზმის გამოვლენისთვის გასატარებელი ღონისძიებები

### მუხლი 4. სააგენტოს მიერ ოფიციალური გამოკვლევების ჩატარება

1. ქვეყნის ტერიტორიაზე მასპინძელ მცენარეებზე მავნე ორგანიზმის არსებობის გამოვლენის მიზნით სააგენტოს მიერ უნდა ჩატარდეს ყოველწლიური

კვლევა, ხოლო აღნიშნული კვლევის საფუძველზე - პასუხისმგებელი ორგანოს მიერ ფიტოსანიტარიული რისკის შეფასება. თუ ფიტოსანიტარიული რისკის შეფასებისას მავნე ორგანიზმის გავრცელების რისკი არ დადასტურდება, მასპინძელი მცენარეების გარდა სხვა მცენარე(ებ)ზე, მათ შორის ძალღყურძენასებრთა ოჯახის ველურ მასპინძელ მცენარეებზე, აგრეთვე, მათი გადამამუშავებელი და შესაფუთი საწარმოებიდან გამოსულ თხევად ნარჩენებზე, ასევე სარწყავად გამოყენებულ ზედაპირულ წყლებზე სააგენტოს მიერ ჩატარდება მავნე ორგანიზმის კვლევა, რომლის მასშტაბი განისაზღვრება იდენტიფიცირებული რისკის მიხედვით.

2. საჭიროების შემთხვევაში ოფიციალური გამოკვლევები შესაძლოა ასევე ჩატარდეს ისეთ მასალაზე, როგორცაა ხელოვნური საკვები არე, ნიადაგი და გადამამუშავებელი ან შესაფუთი საწარმოს მყარი ნარჩენები.

3. მავნე ორგანიზმის გამოვლენის მიზნით, მასპინძელი მცენარეების (მავნე ორგანიზმის ბიოლოგიისა და კონკრეტული წარმოების სისტემის გათვალისწინებით) ოფიციალური გამოკვლევები უნდა მოიცავდეს:

ა) სათესლე და სასურსათო კარტოფილის ვიზუალურ შემოწმებას სავეგეტაციო პერიოდში წარმოების ადგილას ან საცავში არსებული კარტოფილის ნიმუშების აღებას;

ბ) სათესლე კარტოფილის, ასევე საჭიროებისამებრ სხვა დანიშნულების მქონე კარტოფილის შემთხვევაში, გამოყენებული უნდა იქნეს ოფიციალური ზედამხედველობით ჩატარებული ლაბორატორიული გამოკვლევა ამ ტექნიკური რეგლამენტის შესაბამისად;

გ) პომიდორის სულ მცირე ვეგეტაციაში მყოფი მცენარეების ვიზუალურ შემოწმებას, რომლებიც განკუთვნილია გადასარგავად;

დ) სხვა მასპინძელი მცენარეების, გარდა მე-2 მუხლის პირველი პუნქტის „3“ ქვეპუნქტში ნახსენები მასპინძელი მცენარეების, სარწყავი წყლის, მათ შორის თხევადი ნარჩენების, გამოკვლევას შესაბამისი მეთოდების გამოყენებით. საჭიროების შემთხვევაში აღებული უნდა იქნეს ნიმუშები ოფიციალური ლაბორატორიული გამოკვლევებისათვის;

ე) სხვა მასალის შემთხვევაში, შესაბამის მეთოდებს;

ვ) ამ პუნქტით ოფიციალური გამოკვლევების განსახორციელებლად განსაზღვრული ინსპექტირების პროცედურების დეტალებს, სამეცნიერო და სტატისტიკურ მონაცემებზე და ორგანიზმის ბიოლოგიაზე დაყრდნობით ასაღები ნიმუშების რაოდენობას, წარმოშობას, სტრატეფიკაციას და აღების ვადებს ადგენს უფლებამოსილი ორგანო.

**მუხლი 5. ბიზნესოპერატორის ვალდებულება. სააგენტოს უფლებამოსილება. შეტყობინება**

1. ბიზნესოპერატორი ვალდებულია კარტოფილის მცენარეებსა და ტუბერებში, ან ალბულ, შენახულ, ან ბაზარზე განთავსებულ ტუბერებში, ან პომიდორში მავნე ორგანიზმის არსებობაზე ექვის გაჩენის, ან მისი არსებობის დადასტურების შემთხვევაში დაუყოვნებლივ აცნობოს სააგენტოს, რომელიც უზრუნველყოფს ნიმუშების აღებას და ლაბორატორიაში წარდგენას გამოკვლევებისათვის.

2. თუ იმპორტირებულ კარტოფილში გამოვლინდა მავნე ორგანიზმი, სააგენტო ვალდებულია დაუყოვნებლივ გაუგზავნოს შეტყობინება ექსპორტიორ ქვეყანას, საქართველოს კანონმდებლობით დადგენილი წესით.

3. ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-4 მუხლით გათვალისწინებული ოფიციალური გამოკვლევის შედეგებში ასახული უნდა იყოს შემდეგი ინფორმაცია:

ა) კარტოფილის გამოკვლევის შემთხვევაში:

ა.ა) სათესლე და სხვა კარტოფილის მოყვანის საშუალო ფართობის შესახებ ჰა-ში;

ა.ბ) სტრატეგიკაციას თესლის კატეგორიის და დანიშნულების მიხედვით თესლის დაყოფის შესახებ, საჭიროების შემთხვევაში რეგიონის მიხედვით;

ა.გ) გამოკვლევების მიზნით აღებული ნიმუშების რაოდენობას და ვადების შესახებ;

ა.დ) საველე პირობებში ვიზუალური შემოწმების რაოდენობის შესახებ;

ა.ე) ტუბერების ვიზუალური შემოწმების რაოდენობის შესახებ (და ნიმუშის ოდენობას);

ბ) გამოკვლევების შემთხვევაში, პროფესიული მოხმარების მიზნით გადარგვისთვის განკუთვნილი, სულ მცირე ვეგეტაციაში მყოფი პომიდვრის ნერგების:

ბ.ა) მიახლოებული მთლიანი რაოდენობის შესახებ;

ბ.ბ) ვიზუალური შემოწმების რაოდენობის შესახებ;

გ) მავნე ორგანიზმის მასპინძელი მცენარეების, გარდა კარტოფილისა და პომიდვრისა, ძალყურძენასებრთა ოჯახის ველური მასპინძელი მცენარეების გამოკვლევის შემთხვევაში:

გ.ა) მცენარის სახეობის შესახებ;

გ.ბ) აღებული ნიმუშების რაოდენობის და ვადების შესახებ;

გ.გ) საჭიროების შემთხვევაში იმ ნიმუშების შესახებ, რომელიც აღებულია ფართობებიდან/ სარწყავი წყლებიდან;

გ.დ) ანალიზების მეთოდის შესახებ;

დ) გადამუშავების და შესაფუთი საწარმოებიდან გამოსული თხევადი ნარჩენების და წყლის გამოკვლევის შემთხვევაში:

დ.ა) აღებული ნიმუშების რაოდენობის და ვადების შესახებ;

დ.ბ) საჭიროების შემთხვევაში იმ ნიმუშების შესახებ, რომელიც აღებულია ფართობებიდან/ სარწყავი წყლებიდან;

დ.გ) ანალიზების მეთოდის შესახებ.

## **მუხლი 6. მავნე ორგანიზმის გამოვლენის შემთხვევაში გასატარებელი ღონისძიებები**

1. მავნე ორგანიზმის სავარაუდო არსებობის შემთხვევაში სააგენტომ უნდა უზრუნველყოს მასპინძელი მცენარეების ლაბორატორიული გამოკვლევა, მავნე ორგანიზმის არსებობის უარსაყოფად, ან დასადასტურებლად ოფიციალურად დამტკიცებული მეთოდით. ყველა სხვა შემთხვევაში ნებისმიერი ოფიციალურად დამტკიცებული მეთოდით მავნე ორგანიზმის არსებობის უარსაყოფად, ან დასადასტურებლად. დადასტურების შემთხვევაში გათვალისწინებული უნდა იქნეს ამ მუხლის მე-4 პუნქტის მოთხოვნები.

2. მავნე ორგანიზმის არსებობაზე ეჭვის დადსტურება ან უარყოფა საჭიროა იმ შემთხვევაში, როდესაც:

ა) დიაგნოსტიკურებულია მავნე ორგანიზმის სიმპტომები და სწრაფი სკრინინგ ტესტ(ებ)ის პასუხი დადებითია ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N2-ის შესაბამისად;

ბ) სკრინინგ ტესტ(ებ)ში მიღებულია დადებითი პასუხი ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-15 მუხლის ან/და დანართი N3 - ის შესაბამისად, რა დროსაც სააგენტო:

ბ.ა) კრძალავს მცენარეების და ტუბერების გატანას ყველა ნათესიდან, პარტიიდან, ან ტვირთიდან საიდანაც აღებულ იქნა ნიმუშები, გარდა მისი კონტროლის ქვეშ არსებულისა, რომლიდანაც არ არსებობს მავნე ორგანიზმის გავრცელების იდენტიფიცირებული რისკი;

ბ.ბ) ატარებს ღონისძიებებს სავარაუდო დასნებოვნების წარმომავლობის მიკვლევადობისთვის;

ბ.გ) ადგენს დამატებით პრევენციულ ზომებს პასუხისმგებელი ორგანოს მიერ შეფასებული მავნე ორგანიზმის რისკის დონის მიხედვით, განსაკუთრებით, მასპინძელი მცენარეების წარმოებასთან და სათესლე კარტოფილის პარტიის გადაადგილებასთან დაკავშირებით, გარდა ამ პუნქტის „ბ.ა“ ქვეპუნქტში მითითებულისა, რათა თავიდან იქნეს აცილებული მავნე ორგანიზმის გავრცელება.

3. მასპინძელი მცენარეებისა და ყველა სხვა შემთხვევისათვის, როდესაც სკრინინგ ტესტში იდენტიფიცირებულია დადებითი შედეგი, ამ ტექნიკური რეგლამენტის III თავში მითითებული მეთოდებით გამოკვლევების დასრულებისთანავე შესაბამისად უნდა იქნეს შენახული და დაცული:

ა) ყველა შერჩეული ტუბერი და თუ ეს შესაძლებელია, ყველა აღებული მცენარის ნიმუში. ტუბერების შენახვა შესაძლებელს ხდის საჭიროების შემთხვევაში ჩატარდეს სხვადასხვაგვარი ცდები;

ბ) ნებისმიერი ექსტრაქტის ნარჩენი და სკრინინგისთვის მომზადებული დამატებითი მასალა ისეთი, როგორცაა იმუნოფლოუორესცენტული პრეპარატები;

გ) ყველა შესაბამისი დოკუმენტაცია მითითებული მეთოდის დასრულებამდე.

4. მავნე ორგანიზმის ტესტის დადებითი შედეგის დადასტურების შემთხვევაში, შეტყობინების პროცედურამდე სულ მცირე ერთი თვის განმავლობაში შენახული და დაცული უნდა იქნეს:

ა) ამ პუნქტის „ბ“ ქვეპუნქტში მითითებული მასალები;

ბ) დასნებოვნებული პომიდორის ან ბადრიჯნის მასალა, რომლებიც ინოკულირებულია ტუბერის ან მცენარის ექსტრაქტით სადაც ეს აუცილებელია;

გ) მავნე ორგანიზმის გამოყოფილი კულტურა.

**მუხლი 7. სააგენტოს და პასუხისმგებელი ორგანოს მიერ დასნებოვნების მასშტაბის დადგენა და კლონურად დაკავშირებული სათესლე კარტოფილის მარაგის შემდგომი გამოკვლევა**

მასპინძელ მცენარეებზე გამოიყენება ამ ტექნიკური რეგლამენტის III თავში მოცემული შესაბამისი მეთოდის მიხედვით ჩატარებული ოფიციალური საზედამხედველო ტესტირება, ან სხვა ოფიციალურად დამტკიცებული მეთოდით აღებულ ნიმუშში დადასტურდება მავნე ორგანიზმის არსებობა, სააგენტო და პასუხისმგებელი ორგანო კომპეტენციის შესაბამისად, სამეცნიერო მონაცემებზე დაყრდნობით, მავნე ორგანიზმის ბიოლოგიის, წარმოების, მარკეტინგის და დამუშავების სისტემის გათვალისწინებით, მასპინძელი მცენარეებისათვის:

ა) ატარებენ გამოკვლევას დასნებოვნების მასშტაბის და პირველადი წყარო(ებ)ის გამოვლენის მიზნით ამ პუნქტის „ზ“ ქვეპუნქტის შესაბამისად, ახორციელებენ სულ მცირე, ყველა კლონურად დაკავშირებული სათესლე კარტოფილის მარაგის შემდგომ ტესტირებას ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-6 მუხლის პირველი პუნქტის შესაბამისად;

ბ) დასნებოვნებულად განსაზღვრავენ მასპინძელი მცენარეების ტვირთს და/ან პარტიას, რომლისგანაც აღებული იქნა ნიმუში, ასევე მანქანა-დანადგარებს, ავტომანქანას, ჭურჭელს, საწყობს, ან მის ნაწილებს, ასევე სხვა საგნებს, მათ შორის შესაფუთ მასალას, რომლებსაც კონტაქტი ჰქონდა მასპინძელ მცენარეებთან, საიდანაც აღებული იქნა ნიმუშები. ასევე, საჭიროებისამებრ დასნებოვნებულად განსაზღვრავენ მინდორს, წარმოების ადგილ(ებ)ს, საიდანაც აღებული იქნა ნიმუშები, აგრეთვე დასნებოვნებულად განსაზღვრავენ მინდორს, წარმოების ადგილებს სადაც მოყვანილ იქნა მასპინძელი მცენარეები;



გ) ამ პუნქტის „თ“ ქვეპუნქტით თანახმად ადგენენ შესაძლო დასნებოვნების მასშტაბს მოსავლის აღებამდე, ან მოსავლის აღების შემდეგ წარმოების, ირიგაციის ან მორწყვის დროს, ან აღნიშნულ დასნებოვნებასთან კლონური კავშირის მეშვეობით;

დ) ახდენენ დასნებოვნებული ზონის დემარკაციას ამ პუნქტის „ბ“ ქვეპუნქტის თანახმად, განსაზღვრავენ შესაძლო დასნებოვნების მასშტაბს ამ პუნქტის „გ“ ქვეპუნქტით და მავნე ორგანიზმის შესაძლო გავრცელებას ამ პუნქტის „ი“ ქვეპუნქტის შესაბამისად;

ე) იმ მასპინძელი მცენარეების ნათესების შემთხვევაში, რომლებიც არ განეკუთვნება მასპინძელ მცენარეებს:

ე.ა) ატარებენ გამოკვლევას ამ პუნქტის „ა“ ქვეპუნქტის თანახმად;

ე.ბ) დასნებოვნებულად განსაზღვრავენ მავნე ორგანიზმის იმ მასპინძელ მცენარეს, საიდანაც აღებული იქნა ნიმუში;

ე.გ) მასპინძელი მცენარეების წარმოებისას ადგენენ შესაძლო დასნებოვნებას და ახდენენ ზონის დემარკაციას ამ პუნქტის „გ“ და „დ“ ქვეპუნქტების გათვალისწინებით;

ვ) ატარებენ გამოკვლევას ზედაპირული წყლების (მათ შორის, თხევადი ნარჩენების, მცენარის მასალის საწარმოო დამუშავების ან დაფასოება-დახარისხების ობიექტებიდან) და ძალყურძენისებრთა ოჯახის ველური მასპინძელი მცენარეების შემთხვევაში. როდესაც მასპინძელი მცენარეების წარმოება ზედაპირული წყლების გამოყენებით ირიგაციისას, მორწყვისას, ან დატბორვისას დაკავშირებულია რისკთან, ამ შემთხვევაში:

ვ.ა) დასნებოვნების მასშტაბის დადგენის მიზნით, ახორციელებენ ზედაპირული წყლების ნიმუშების და ძალყურძენისებრთა ოჯახის ველური მასპინძელი მცენარეების (მათი არსებობის შემთხვევაში) შესწავლას შესაბამის დროს, ოფიციალური გამოკვლევის ჩათვლით;

ვ.ბ) ამ პუნქტის „ა“ ქვეპუნქტით გათვალისწინებული გამოკვლევის საფუძველზე შესაბამისი მასშტაბით დასნებოვნებულად აცხადებენ ზედაპირულ წყლებს, საიდანაც აღებული იქნა ნიმუშ(ებ)ი;

ვ.გ) ადგენენ ზედაპირული წყლების შესაძლო დასნებოვნებას და ახდენენ ზონის დემარკაციას ამ პუნქტის „ვ.ბ“ ქვეპუნქტის შესაბამისად და მავნე ორგანიზმის შესაძლო გავრცელებას ამ მუხლის „ბ“ ქვეპუნქტის თანახმად;

ზ) სათესლე კარტოფილის მარაგის შემდგომი გამოკვლევა უნდა ჩატარდეს:

ზ.ა) წარმოების ადგილზე;

ზ.ა.ა) სადაც იზრდება ან იზრდებოდა კარტოფილი, რომელიც კლონურად დაკავშირებულია მავნე ორგანიზმით დასნებოვნებულ კარტოფილთან;

ზ.ა.ბ) სადაც იზრდება ან იზრდებოდა პომიდორი, რომელიც მოყვანილია იმავე ადგილას, სადაც მოყვანილია მავნე ორგანიზმით დასნებოვნებული პომიდორი;

ზ.ა.გ) სადაც იზრდებოდა ან იზრდება კარტოფილი ან პომიდორი, რომლებიც მავნე ორგანიზმის სავარაუდო გამოვლენის გამო მოყვანილი იქნა ოფიციალური კონტროლის ქვეშ;

ზ.ა.დ) სადაც იზრდებოდა ან იზრდება კარტოფილი, რომელიც კლონურად დაკავშირებულია მავნე ორგანიზმით დასნებოვნებულ ადგილზე მოყვანილ კარტოფილთან;

ზ.ა.ე) სადაც კარტოფილი ან პომიდორი იზრდება მავნე ორგანიზმით დასნებოვნებული წარმოების ადგილის მახლობლად, რომლებზეც კონტრაქტორის მიერ გამოყენებულია დაქირავებული ტექნიკა და აღჭურვილობა;

ზ.ა.ვ) საიდანაც აღებული ზედაპირულ წყლები გამოიყენება სარწყავად ან შესასხურებლად და რომელზეც დადასტურებულია ან საექვოა მავნე ორგანიზმის არსებობა;

ზ.ა.ზ) სადაც ირიგაციისა და მორწყვისათვის გამოიყენება ზედაპირული წყლები, იმავე წყაროდან, რომლითაც ირწყვება მავნე ორგანიზმით დასნებოვნებული ან დასნებოვნებაზე საექვო წარმოების ადგილები;

ზ.ა.თ) რომელიც დატბორილია ან დაიტბორა ზედაპირული წყლებით, რომლებშიც დადასტურებულია ან საექვოა მავნე ორგანიზმის არსებობა;

ზ.ბ) სადაც სარწყავად ან შესასხურებლად გამოყენებულმა ზედაპირულმა წყლებმა, დატბორა წარმოების ის ადგილ(ებ)ი, რომელზეც დადასტურდა მავნე ორგანიზმით დასნებოვნება;

თ) საკითხები, რომლებიც უნდა იქნეს გათვალისწინებული სავარაუდო დასნებოვნების ხარისხის განსაზღვრისას, ამ პუნქტის „გ“ და „ვ.გ“ ქვექვეპუნქტების შესაბამისად მოიცავს:

თ.ა) მასპინძელ მცენარეებს, რომლებიც გაზრდილია ამ პუნქტის „ბ“ ქვეპუნქტის თანახმად დასნებოვნებულად მიჩნეული წარმოების ადგილზე;

თ.ბ) წარმოების ადგილ(ებ)ს ამ პუნქტის „ბ“ ქვეპუნქტის შესაბამისად დასნებოვნებულად განსაზღვრულ მასპინძელ მცენარეებს და იმ ადგილებს, სადაც გამოიყენება დაქირავებული მოწყობილობა- დანადგარები;

თ.გ) მასპინძელ მცენარეებს, რომლებიც გაზრდილია ამ პუნქტის „თ.ბ“ ქვეპუნქტში მითითებული წარმოების ადგილებში, ან შესაბამისად, დასნებოვნებულად მიჩნეული მასპინძელი მცენარეები იმყოფებოდა წარმოების ადგილზე;

თ.დ) შენობა-ნაგებობას, რომლებიც გადაამუშავებენ ამ პუნქტის „თ.ბ“ ქვეპუნქტში მითითებულ წარმოების ადგილებში მოყვანილ მასპინძელ მცენარეებს;

თ.ე) ნებისმიერ მანქანა-დანადგარებს, სატრანსპორტო საშუალებას, გემს, საწყობს ან მის ერთეულებს, და სხვა ნებისმიერ ობიექტს, მათ შორის შესაფუთ მასალას, რომელიც შესაძლოა შეხებაში მოვიდეს ამ პუნქტის „ბ“ ქვეპუნქტის საფუძველზე დასნებოვნებულად მიჩნეულ მასპინძელ მცენარეებთან;

თ.ვ) მასპინძელი მცენარე, რომელიც შენახული, ან შეხებაში იყო „თ.დ“ ქვეპუნქტში მითითებულ შენობა-ნაგებობასთან ან ობიექტებთან, ამგვარი შენობა-ნაგებობის ან ობიექტების გასუფთავებამდე და დეზინფექციამდე;

თ.ზ) ამ პუნქტის „ა“ ქვეპუნქტის საფუძველზე გამოკვლევისა და ტესტირების შედეგად, კარტოფილის შემთხვევაში, იმ ტუბერებს ან მცენარეებს, რომლებიც კლონურად არიან დაკავშირებულნი და პომიდვრის შემთხვევაში, იმ მცენარეებს, რომელთაც იგივე წყარო აქვთ, რაც ამ პუნქტის „ბ“ ქვეპუნქტის შესაბამისად დასნებოვნებულად მიჩნეულ მასპინძელ მცენარეებს, მიუხედავად იმისა, რომ ტესტირებით არ გამოუვლინდათ მავნე ორგანიზმის არსებობა, მაინც არსებობს დასნებოვნების რისკი კლონური კავშირის მეშვეობით. იდენტიფიკაციისთვის სხვადასხვა ტესტები შეიძლება ჩატარდეს დასნებოვნებულ და კლონურად დაკავშირებულ ტუბერებს ან მცენარეებს;

თ.თ) ამ პუნქტის „თ.კ“ ქვეპუნქტში მითითებული მცენარეების წარმოების ადგილებს;

თ.ი) მასპინძელი მცენარეების წარმოების ადგილ(ებ)ს, სადაც ამ პუნქტის „ვ.გ“ ქვეპუნქტის შესაბამისად დასნებოვნებულად მიჩნეული წყალი გამოიყენება მოსარწყავად ან შესასხურებლად;

თ.კ) მასპინძელ მცენარეებს, რომელთა წარმოების ადგილ(ებ)ი დაიტბორა დასნებოვნებულად მიჩნეული ზედაპირული წყლით;

ი) ამ პუნქტის „დ“ და „ვ.გ“ ქვეპუნქტების საფუძველზე სავარაუდო გავრცელების განსაზღვრისას განსახილველი საკითხები მოიცავს:

ი.ა) ამ პუნქტის „დ“ ქვეპუნქტის შემთხვევაში:

ი.ა.ა) მასპინძელი მცენარეების სიახლოვეს სხვა წარმოების ადგილებს;

ი.ა.ბ) სათესლე კარტოფილის მარაგების საერთო წარმოებას და გამოყენებას;

ი.ა.გ) წარმოების ადგილებს, სადაც გამოიყენება ზედაპირული წყალი მასპინძელი მცენარეების მოსარწყავად ან შესასხურებლად, იმ შემთხვევაში როდესაც არსებობს ან არსებობდა ამ პუნქტის „ბ“ ქვეპუნქტის შესაბამისად, დასნებოვნებულად მიჩნეული წარმოების ადგილის ზედაპირული წყლით ჩამორეცხვის ან დატბორვის რისკი;

ი.ბ) ამ პუნქტის „ე.გ“ ვეპუნქტის საფუძველზე დასნებოვნებულად მიჩნეული ზედაპირული წყლის შემთხვევაში:

ი.ბ.ა) წარმოების ადგილებს, სადაც იწარმოება მასპინძელი მცენარეები, ან რომლებიც დასნებოვნებულად განსაზღვრული ზედაპირული წყლით დატბორვის რისკის ქვეშაა;

ი.ბ.ბ) ნებისმიერ განცალკევებულ სარწყავ აუზს, რომელიც ასოცირდება დასნებოვნებულად მიჩნეულ ზედაპირულ წყალთან;

ი.ბ.გ) დასნებოვნებულად მიჩნეულ ზედაპირულ წყალს, რომელთან დაკავშირებით მხედველობაში უნდა იქნეს მიღებული დასნებოვნებულად მიჩნეული წყლის მიმართულება, დინების სიჩქარე და ველური solanaceous-ის მასპინძელი მცენარეების არსებობა.

### **მუხლი 8. დასნებოვნებულად ან სავარაუდოდ დასნებოვნებულად მიჩნეული მასპინძელი მცენარეების და ნებისმიერი ობიექტის მიმართ დემარკაციულ ზონაში გასატარებელი ღონისძიებები**

1. სააგენტომ უნდა უზრუნველყოს, რომ ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-7 მუხლის „ბ“ ქვეპუნქტით დასნებოვნებულად მიჩნეული მასპინძელი მცენარეების დარგვაზე დაწესდეს კონტროლი და მხოლოდ სააგენტოს თანხმობით მოხდეს მათი დარგვა. ამ მუხლის მე-5 პუნქტის „გ.ა“ ქვეპუნქტის თანახმად დადგენილია, რომ არ არსებობს მავნე ორგანიზმის გავრცელების იდენტიფიცირებული რისკი.

2. ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-7 მუხლის „გ“ და „ვ.გ“ ქვეპუნქტებით სავარაუდოდ დასნებოვნებულად მიჩნეული მასპინძელი მცენარეები, მათ შორის ის მასპინძელი მცენარეები, რომელთა მიმართ იდენტიფიცირებულია რისკი, რადგან მოყვანილია სავარაუდოდ დასნებოვნებულად მიჩნეულ ადგილზე, არ უნდა დაირგას და სააგენტოს მეთვალყურეობის ქვეშ უნდა განხორციელდეს შესაბამისი გამოყენება, ან ნაგავსაყრელზე განთავსება ამ მუხლის მე-6 პუნქტის შესაბამისად ისე, რომ თავიდან იქნეს აცილებული მავნე ორგანიზმის გავრცელების რისკი.

3. ნებისმიერი ობიექტი, რომელიც ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-7 მუხლის „ბ“ ქვეპუნქტით განსაზღვრულია, როგორც დასნებოვნებული, ან ამავე მუხლის „გ“ და „ვ.გ“ ქვეპუნქტების მიხედვით სავარაუდოდ დასნებოვნებული, უნდა განადგურდეს ან გასუფთავდეს ამ მუხლის მე-7 პუნქტში მითითებული გაუსნებოვნების შესაბამისი მეთოდების მიხედვით. გასუფთავების შემდეგ აღნიშნული ნებისმიერი ობიექტები აღარ ჩაითვლება დასნებოვნებულად.

4. სააგენტომ უნდა უზრუნველყოს, რომ ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-7 მუხლის „დ“ და „ვ.გ“ ქვეპუნქტების თანახმად, დემარკაციულ ზონაში გატარდეს ამ მუხლის მე-8 პუნქტში მითითებული ღონისძიებები.

5. ამ მუხლის პირველი პუნქტის თანახმად დასნებოვნებულად მიჩნეული მცენარეები:

ა) ცხოველთა საკვებად შესაძლებელია გამოყენებული იქნეს თერმული დამუშავების შემდეგ, იმგვარად რომ არ შეიქმნას მავნე ორგანიზმის გავრცელების რისკი;

ბ) უნდა გადაიყაროს ნარჩენებისთვის ოფიციალურად გამოყოფილ ადგილას, სადაც არ არსებობს მავნე ორგანიზმის გარემოში გავრცელების იდენტიფიცირებული რისკი. სასოფლო-სამეურნეო მიწაში გაჟონვის ან წყლის რესურსებთან კონტაქტის მეშვეობით, რომელიც შესაძლოა გამოყენებული იქნეს სასოფლო-სამეურნეო მიწის მორწყვის მიზნით;

გ) უნდა განადგურდეს ინსინერაციით ან უნდა დამუშავდეს გადამამუშავებელ ქარხანაში, რომელსაც გააჩნია:

გ.ა) ოფიციალურად დადასტურებული ნარჩენების განკარგვისათვისთვის გამოყოფილი საშუალებები, სადაც დადგენილია, რომ არ არსებობს მავნე ორგანიზმის გავრცელების იდენტიფიცირებული რისკი;

გ.ბ) სულ მცირე, მოძრავი სატრანსპორტო საშუალებების გასასუფთავებელი და სადეზინფექციო საშუალებები, იმ შემთხვევაში თუ დადგენილია, რომ არ არსებობს მავნე ორგანიზმის გავრცელების იდენტიფიცირებული რისკი. ნებისმიერი ნარჩენის განკარგვა უნდა განხორციელდეს ამ მუხლის მე-9 პუნქტში განსაზღვრული მეთოდების შესაბამისად.

6. ამ მუხლის მე-2 პუნქტის თანახმად დასნებოვნებულად მიჩნეული მასპინძელი მცენარეების სათანადო გამოყენება ან განკარგვა უნდა მოხდეს უფლებამოსილი ორგანოების კონტროლის ქვეშ, ერთმანეთთან კომუნიკაციის და ნებისმიერ დროს მუდმივი კონტროლის მეშვეობით. აღნიშნულზე თანხმობა უნდა იქნეს მიღებული იმ პასუხისმგებელი კომპეტენტური უწყებისგან, სადაც უნდა განხორციელდეს კარტოფილის დაფასოება-დახარისხება ან დამუშავება ნარჩენების განკარგვის მოთხოვნათა შესაბამისად:

ა) კარტოფილის ტუბერების შემთხვევაში:

ა.ა) პირდაპირი მოხმარებისთვის განკუთვნილი კარტოფილისთვის გამოიყენება ნარჩენების განკარგვის საშუალებებით აღჭურვილი მოწყობილობები, რომლებიც განკუთვნილია სპეციალურად გამოყოფილ ადგილზე კარტოფილის შესაფუთად. დარგვისთვის განკუთვნილი კარტოფილის განკარგვა შესაძლებელია იმავე ადგილზე, თუ აღნიშნული განკარგვა ხორციელდება განცალკევებით, ან გასუფთავებისა და დეზინფექციის შემდეგ;

ა.ბ) კარტოფილი, რომელიც გამოიზნულია სამრეწველო გადამამუშავებისთვის და ნარჩენების განკარგვის, მოძრავი სატრანსპორტო საშუალებების გასასუფთავებელი და სადეზინფექციო საშუალებების სისტემით აღჭურვილი გადამამუშავებელი ქარხნისათვის პირდაპირ და მყისიერად მისაწოდებლად;

ა.გ) სხვა სახის გამოყენება ან განკარგვა უნდა განხორციელდეს მხოლოდ სააგენტოს თანხმობით იმ შემთხვევაში თუ არ არსებობს მავნე ორგანიზმის გავრცელების იდენტიფიცირებული რისკი;

ბ) მცენარის სხვა ნაწილების, მათ შორის ღეროსა და ფოთლის ნაწილებისთვის:

ბ.ა) განადგურება;

ბ.ბ) სხვა სახის გამოყენება და განკარგვა უნდა განხორციელდეს სააგენტოს თანხმობით, იმ პირობით თუ არ არსებობს მავნე ორგანიზმის გავრცელების იდენტიფიცირებული რისკი.

7. ამ მუხლის მე-3 პუნქტში მითითებული ნებისმიერი ობიექტისათვის უნდა გამოყენებულ იქნეს გაუსნებოვნების შესაბამისი მეთოდები და აუცილებლობის შემთხვევაში მოხდეს დეზინფექცია სააგენტოს ზედამხედველობით ისე, რომ აღარ არსებობდეს მავნე ორგანიზმის გავრცელების იდენტიფიცირებული რისკი.

8. ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-7 მუხლის „გ“ და „დ“ ქვეპუნქტებით დადგენილი დემარკაციული ზონის შიგნით, ამავე მუხლის „ბ“ ქვეპუნქტით დასნებოვნებულად მიჩნეულ ნაკვეთში ან წარმოების ადგილებში ღონისძიებების გატარებისას:

ა) დასნებოვნებულად განსაზღვრიდან სულ მცირე 4 სავეგეტაციო პერიოდის განმავლობაში უნდა:

ა.ა) გატარდეს სათანადო ზომები ნაგერალა კარტოფილის და პომიდორის, ასევე სხვა მასპინძელი მცენარეების, მათ შორის ძალღყურძენასებრთა ოჯახის სარეველა მცენარეების მოსაცილებლად;

ა.ბ) არ უნდა იქნეს დარგული: კარტოფილის ტუბერები, მცენარეები ან დაითესოს ნამდვილი თესლი; პომიდორის მცენარეები და თესლები, სხვა მასპინძელი მცენარეები, Brassica-ს სახეობის მცენარეები, რომელთა შემთხვევაშიც არსებობს მავნე ორგანიზმის გადარჩენის იდენტიფიცირებული რისკი; კულტურები, რომელთა საშუალებით არსებობს მავნე ორგანიზმის გავრცელების იდენტიფიცირებული რისკი;

ა.გ) მხედველობაში უნდა იქნეს მიღებული მავნე ორგანიზმის ბიოლოგია;

ა.დ) 4 სავეგეტაციო წლის გასვლის შემდეგ, კარტოფილის ან პომიდორის მოყვანისას, თუ ნაკვეთის ინსპექტირებით დადასტურდება, რომ ნაკვეთი თავისუფალია ნაგერალა კარტოფილისა და პომიდორის მცენარეებისგან, ასევე და სხვა მასპინძელი მცენარეებისგან, მათ შორის ძალღყურძენასებრთა ოჯახის სარეველა მცენარეებისგან, მოყვანამდე სულ მცირე ორი სავეგეტაციო პერიოდის განმავლობაში;

ა.ე) ამ პუნქტის „ა.დ“ ქვეპუნქტში მითითებული ოთხი სავეგეტაციო პერიოდის განმავლობაში კარტოფილის შემთხვევაში, მხოლოდ სასურსათე კარტოფილის წარმოებაა დასაშვები. პომიდორისა და კარტოფილის შემთხვევაში, მოსავლის აღების შემდეგ კარტოფილის ტუბერებს და პომიდორის ნაყოფებს მოყვანის პერიოდში მიღებული პომიდორის ნაყოფებს უნდა ჩაუტარდეს გამოკვლევები ამ ტექნიკური რეგლამენტის III თავში ასახული პროცედურების შესაბამისად;

ა.ვ) ამ პუნქტში განსაზღვრული პირობების დაცვის შემდეგ, კარტოფილისა და პომიდორის სავეგეტაციო პერიოდში, თუ გადაწყდა სათესლე კარტოფილის მოყვანა, თესლბრუნვის ორწლიანი ციკლის შემდეგ სააგენტომ უნდა განახორციელოს სახელმწიფო კონტროლი;

ა.ზ) დასნებოვნების გამოვლენიდან 5 წლის განმავლობაში:

ა.ზ.ა) სათანადო ზომები უნდა იქნეს გატარებული ნაგერალა კარტოფილისა და პომიდვრის, ასევე სხვა მასპინძელი მცენარეების, მათ შორის *Solanaceous* სარეველების მოსაცილებლად;

ა.ზ.ბ) ნაკვეთი სამი წლის განმავლობაში არ უნდა დაიხნას და დაითესოს, ან დაითესოს მარცვლოვანი კულტურები, რისკის იდენტიფიცირების გათვალისწინებით, ან უნდა იქნეს გამოყენებული ინტენსიურ საძოვრად, ან ხშირად გაითიბოს მინიმალურ დონემდე, შესაძლებელია იმ არამასპინძელი მცენარის სათესლე ბალახის მოყვანა ზედიზედ ორი წლის განმავლობაში, რომელთათვისაც არ არსებობს მავნე ორგანიზმის გადარჩენისა და გავრცელების რისკი;

ა.ზ.გ) ამ პუნქტის „ა.თ.ბ“ ქვეპუნქტში მითითებული პერიოდის გავლის შემდეგ, პომიდვრის ან კარტოფილის მოყვანის პირველ სეზონზე, თუ სახელმწიფო კონტროლის შედეგად დადასტურდა, რომ ნაკვეთი თავისუფალია ნაგერალა კარტოფილისა და პომიდვრისგან, ასევე სხვა მასპინძელი მცენარეებისგან, მათ შორის ძალყურძენასებრთა ოჯახის სარეველებისგან, დათესვამდე სულ მცირე ზედიზედ ორი წლის განმავლობაში:

ა.ზ.გ.ა) დასაშვებია სათესლე და სასურსათო კარტოფილის მოყვანა;

ა.ზ.გ.ბ) აღებული მოსავლის კარტოფილის გორგლები ან პომიდვრის მცენარეები, გამოკვლეული უნდა იქნეს დანართი N3-ში მოცემული პროცედურების შესაბამისად;

ბ) დასნებოვნებულად განსაზღვრულ სხვა მინდვრებში, რომელთა დაკავშირებითაც სააგენტო დარწმუნდება, რომ ნაგერალა კარტოფილის და პომიდვრის მცენარეების ან მავნე ორგანიზმის სხვა მასპინძელი მცენარეების, მათ შორის ძალყურძენასებრთა ოჯახის სარეველების არსებობის რისკი აღმოფხვრილია:

ბ.ა) დასნებოვნების დადგენიდან მომდევნო წელს არ უნდა დაითესოს კარტოფილის ტუბერები, მცენარეები და ნამდვილი თესლი, ან მავნე ორგანიზმის სხვა მასპინძელი მცენარეები;

ბ.ბ) კარტოფილის სერტიფიცირებული თესლი შეიძლება დაითესოს მხოლოდ სასურსათო კარტოფილის მოყვანის მიზნით;

ბ.დ) პომიდვრის მოყვანა შესაძლებელია, მხოლოდ სასურსათე პროდუქტად საქართველოს კანონმდებლობით განსაზღვრული სერტიფიცირებული თესლის გამოყენებით;

გ) დასნებოვნების დადგენიდან მომდევნო სავეგეტაციო პერიოდში:

გ.ა) კარტოფილის დათესვისას გამოყენებული უნდა იქნეს მხოლოდ სერტიფიცირებული სათესლე კარტოფილი ან კარტოფილი, რომელიც ლაბორატორიულად შემოწმდა მავნე ორგანიზმის არ არსებობაზე და რომელიც მოყვანილი იყო იმ წარმოების ადგილებში, რომლებზეც განხორციელდა სახელმწიფო კონტროლი გარდა ამ პუნქტის „ა“ ქვეპუნქტში მითითებული სათესლე ან სასურსათე დანიშნულების მქონე წარმოების ადგილისა. კარტოფილი შეიძლება დაითესოს როგორც სათესლე, ისე სასურსათე დანიშნულების კარტოფილის მისაღებად;

გ.ბ) პომიდვრის მოყვანისას გამოყენებულ უნდა იქნეს ჩითილები, რომლებიც მიღებულია სერტიფიცირებული თესლისგან, ან ვეგეტატიურად გამრავლების შემთხვევაში გამოყენებული უნდა იყოს ჩითილები, რომლებიც გამოყვანილია იმ თესლისგან, რომლის წარმოების ადგილსაც ჩაუტარდა ოფიციალური კონტროლი, გარდა ამ პუნქტის „ა“ ქვეპუნქტში მითითებული მცენარეების (ჩითილების) ან ნაყოფის წარმოების ადგილისა. პომიდვრის მოყვანა შესაძლებელია როგორც მცენარეების, ისე ნაყოფის წარმოების მიზნით;

დ) დასნებოვნებულად განსაზღვრიდან მომდევნო სულ მცირე მე-3 სავეგეტაციო პერიოდში:

დ.ა) უნდა დაითესოს მხოლოდ სერტიფიცირებული სათესლე კარტოფილი ან კარტოფილი, რომელიც მიღებულია სერტიფიცირებული სათესლე კარტოფილიდან და მოყვანილი იყო იმ წარმოების ადგილებში, რომლებზეც განხორციელდა სახელმწიფო კონტროლი ამგვარად მიღებული კარტოფილი შეიძლება დაითესოს როგორც სათესლე, ისე სასურსათე დანიშნულების კარტოფილის მისაღებად;

დ.ბ) პომიდვრის მოყვანისას გამოყენებულ უნდა იქნეს ჩითილები, რომლებიც მიღებულია საქართველოს კანონმდებლობის მოთხოვნათა შესაბამისი თესლისგან, ან პომიდვრისგან, რომელიც მოყვანილია ოფიციალური კონტროლის ქვეშ ამგვარად მიღებული პომიდვრის მცენარეებისგან, როგორც მცენარეების, ასევე ნაყოფის წარმოების მიზნით;

დ.გ) თითოეული სავეგეტაციო პერიოდის განმავლობაში უნდა გატარდეს ღონისძიებები ნაგერალა კარტოფილის და მავნე ორგანიზმის სხვა მასპინძელი მცენარეების (ასეთის არსებობის შემთხვევაში), მათ შორის სარეველების მოსაცილებლად. უნდა განხორციელდეს სახელმწიფო კონტროლი კულტურების წარმოების ადგილებში და კარტოფილის მიღებულ მოსავალს უნდა ჩაუტარდეს ლაბორატორიული გამოკვლევები ამ ტექნიკური რეგლამენტის III თავში განსაზღვრული დეტალური პროცედურის შესაბამისად;

ე) ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-7 მუხლის „ბ“ ქვეპუნქტით განსაზღვრული დაბინძურების გამოვლენისთანავე და პირველივე მომდევნო სავეგეტაციო პერიოდში:

ე.ა) წარმოების ადგილზე არსებული ან კარტოფილისა და პომიდვრის წარმოებისას გამოყენებული ყველა ტექნიკა და საწყობი უნდა გასუფთავდეს და საჭიროების შემთხვევაში ჩაუტარდეს გაუსნებოვნება ამ მუხლის მე-7 პუნქტით განსაზღვრული მეთოდების შესაბამისად;

ე.ბ) ორგანიზმების გავრცელების პრევენციის მიზნით უნდა განხორციელდეს სააგენტოს მხრიდან ირიგაციისა და მორწყვის კონტროლი, მათი აკრძალვის ჩათვლით;

ვ) დასნებოვნებულად მიჩნეულ წარმოების ადგილზე დასაშვებია სუბსტრატის მთლიანად გამოცვლა, რა დროსაც:

ვ.ა) კარტოფილის ტუბერები, მცენარეები ან ნამდვილი თესლები, ან მავნე



ორგანიზმის სხვა მასპინძელ მცენარეები, მათ შორის პომიდვრის მცენარეები და თესლები არ უდა იქნენ კულტივირებული, სანამ წარმოების ადგილები არ დაექვემდებარება სააგენტოს მიერ კონტროლის ქვეშ მავნე ორგანიზმის განადგურებას და ყველა მასპინძელი მცენარეების მოცილების ზომებს, სულ მცირე სუბსტრატის მთლიანად გამოცვლას, ხოლო სადაც შესაძლებელია, უნდა მოხდეს სუბსტრატის და ყველა ხელსაწყო გაუსნებოვნება, რის შედეგადაც შესაძლებელია სააგენტოს მიერ გაიცეს მითითება კარტოფილისა და პომიდვრის მოყვანაზე;

ვ.ბ) კარტოფილის წარმოებისას უნდა გამოყენებულ იქნეს კარტოფილის სერტიფიცირებული თესლი ან გამოკვლეული ნედლეულიდან მიღებული მცირე ზომის ტუბერები ან მიკრო მცენარეები;

ვ.გ) პომიდვრის წარმოებისათვის, გამოყენებულ უნდა იქნეს თესლი, რომელიც შეესაბამება საქართველოს კანონმდებლობის მოთხოვნებს ან ვეგეტატიური გამრავლებისთვის გამოყენებულ უნდა იქნეს ამგვარი თესლის გამოყენებით მიღებული პომიდვრის მცენარეები (ჩითილები), რომლებიც მოყვანილია ოფიციალური კონტროლით;

ვ.დ) მავნე ორგანიზმის გავრცელების პრევენციისთვის სააგენტოს მხრიდან კონტროლი უნდა დაწესდეს ირიგაციაზე და მორწყვის სისტემებზე, მათი აკრძალვის ჩათვლით;

ზ) დემარკირებულ ზონაში სააგენტო უფლებამოსილია:

ზ.ა) დასწრებოვნების დადგენისთანავე, მოითხოვოს, რომ წარმოების ადგილზე, კარტოფილისა და პომიდვრის წარმოებაში ჩართული ყველა ხელსაწყო-დანადგარისა და საწყოების გასუფთავება-დეზინფექცია ჩატარდეს ამ მუხლის მე-3 პუნქტის შესაბამისად;

ზ.ბ) მავნე ორგანიზმის დადგენისთანავე და სულ მცირე 3 სავეგეტაციო პერიოდის განმავლობაში:

ზ.ბ.ა) განახორციელოს სახელმწიფო კონტროლი, წარმოების ადგილებში კარტოფილის ტუბერების და პომიდვრის მოყვანაზე, შენახვაზე, დახარისხებაზე, დაფასობაზე და სხვა მსგავს საუმაოებზე, ასევე ტექნიკასა და მათ მფლობელებზე, რომლებიც დაქირავებულნი არიან კარტოფილისა და პომიდვრის წარმოებისათვის;

ზ.ბ.ბ) ამ ზონაში ყველა სახის კარტოფილისა და პომიდვრის მოყვანისთვის გამოყენებულ იქნეს მხოლოდ სერტიფიცირებული თესლი ან თესლი, რომელიც მოყვანილია ოფიციალური კონტროლის პირობებში. ლაბორატორიულად შემოწმდეს მოსავლის აღების შემდეგ სათესლე კარტოფილი, რომელიც მოყვანილია ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-7 მუხლის „გ“ ქვეპუნქტის თანახმად, სავარაუდოდ დასწრებოვნებულად მიჩნეულ წარმოების ადგილებში;

ზ.ბ.გ) დემარკაციული ზონის ფარგლებში ყველა წარმოების ადგილებში მოყვანილი და დასაწყობებული სათესლე კარტოფილის დახარისხება, დაფასობა და სხვა საჭირო მანიპულაციები განხორციელდეს განცალკევებულად სასურსათე კარტოფილისგან, ან გაწმენდა, ან საჭიროების შემთხვევაში, გაუსნებოვნება

განხორციელდეს სათესლე და სასურსათო კარტოფილის მარაგების დახარისხების, დაფასოების, სხვა საჭირო მანიპულაციების და დასაწყობებას შორის მონაკვეთში;

ზ.ბ.დ) პომიდვრის მოყვანისას გამოყენებული საქართველოს კანონმდებლობის მოთხოვნათა შესაბამისი თესლი ან ვეგეტატიური გამრავლებისთვის გამოყენებულ იქნეს ამგვარი თესლიდან გამოყვანილი პომიდვრის მცენარეები (ჩითილები), რომლებიც მოყვანილია სააგენტოს კონტროლის ქვეშ დემარკაციული ზონის შიგნით;

ზ.ბ.ე) განახორციელოს ოფიციალური გამოკვლევა ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-4 მუხლის პირველი პუნქტის შესაბამისად;

თ) თუ ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-7 მუხლის „ვ.ბ“ ქვეპუნქტის შესაბამისად, ზედაპირული წყლები დასნებოვნებული აღმოჩნდა ან მასში შესაძლებელია მავნე ორგანიზმის სავარაუდო გავრცელება:

თ.ა) უნდა განხორციელდეს ყოველწლიური სახელმწიფო კონტროლი ზედაპირული წყლებისა და საჭიროების შემთხვევაში სათანადო წყლებიდან (solanaceous) მასპინძელი მცენარეების ნიმუშების აღებით შესაბამისი მეთოდების გამოყენებით, რომლებიც მოცემულია ამ ტექნიკური რეგლამენტის III თავში;

თ.ბ) უნდა განხორციელდეს საირიგაციო და სარწყავი სისტემების კონტროლი, მავნე ორგანიზმის პრევენციის მიზნით, დასნებოვნებულად მიჩნეული წყლით, მასპინძელი მცენარეების და თუ საჭიროა, სხვა მასპინძელი მცენარეების, ირიგაციისა და მორწყვის აკრძალვის ჩათვლით. ეს აკრძალვა შეიძლება გადაიხედოს სახელმწიფო კონტროლის შედეგებიდან გამომდინარე და თუ სააგენტო დარწმუნდება, რომ ზედაპირული წყლები აღარ არის მავნე ორგანიზმით დაბინძურებული. აკრძალვას დაქვემდებარებული წყლის გამოყენება შეიძლება ნებადართულ იქნეს მხოლოდ მასპინძელი მცენარეების ირიგაციისა და მოსარწყავად იმ შემთხვევაში თუ, გამოყენებულ იქნება ოფიციალურად ნებადართული მეთოდი, რომელიც წყალს ამორებს მავნე ორგანიზმს და აღკვეთს მის გავრცელებას;

თ.გ) თხევადი ნარჩენების მავნე ორგანიზმით დაბინძურების არსებობის შემთხვევაში, სააგენტომ უნდა უზრუნველყოს კონტროლი მყარი და თხევადი ნარჩენების განკარგვაზე, რომელიც მიღებულია მასპინძელი მცენარეების სამრეწველო გადამამუშავების ან დაფასოება-დახარისხების შედეგად;

ი) საჭიროების შემთხვევაში, უნდა განხორციელდეს ყველა სათესლე კარტოფილის ჩანაცვლება დროის შესაბამის პერიოდში.

9. ნარჩენების განკარგვის მეთოდები უნდა შეირჩეს ისე, რომ შესაძლებელი იყოს მავნე ორგანიზმის გავრცელების იდენტიფიცირებული რისკის თავიდან აცილება. კერძოდ:

ა) კარტოფილისა და პომიდვრის ნარჩენების (მათ შორის დაწუნებული კარტოფილი, ნაფცქვენი და პომიდორი) და მათთან დაკავშირებული ნებისმიერი სხვა სახის მყარი ნარჩენების (მათ შორის ნიადაგი, ქვები და სხვა სახის ნივთიერებები) განკარგვისას უნდა:

ა.ა) მოხდეს მათი გადაყრა ნარჩენებისათვის ოფიციალურად გამოყოფილ ადგილას, სადაც არ არსებობს მავნე ორგანიზმის გარემოში შეღწევის იდენტიფიცირებული რისკი. სასოფლო-სამეურნეო მიწაში გაჟონვის ან წყლის

რესურსებთან კონტაქტის მეშვეობით, რომელიც შესაძლოა გამოყენებული იქნეს სასოფლო-სამეურნეო მიწის მორწყვის მიზნით;

ა.ბ) განადგურდეს ინსინერაციის გზით;

ა.გ) განადგურდეს სხვა ზომებით, იმ შემთხვევაში თუ დადგენილია, რომ არ არსებობს მავნე ორგანიზმის გავრცელების იდენტიფიცირებული რისკი. აღნიშნული ზომების შესახებ უნდა ეცნობოს სააგენტოს;

ბ) განხორციელდეს მყარი ნივთიერებების შემცველი თხევადი ნარჩენის გაფილტვრა ან სხვა სახის პროცესი უნდა განხორციელდეს ამგვარი ნივთიერებების მოცილების მიზნით. აღნიშნული მიზნით. მყარი ნარჩენების განკარგვა უნდა განხორციელდეს ამ პუნქტის „ა“ ქვეპუნქტის შესაბამისად, ხოლო თხევადი ნარჩენები უნდა:

ბ.ა) გაცხელდეს სულ მცირე 60°C-მდე მთლიანი მოცულობით, განკარგვამდე სულ მცირე 30 წუთით ადრე;

ბ.ბ) მოხდეს სხვაგვარად განკარგვა, იმ პირობით, რომ არ არსებობს ნარჩენების სასოფლო-სამეურნეო მიწასთან, ან წყლის რესურსებთან (რომელიც შესაძლოა გამოყენებული იქნეს სასოფლო-სამეურნეო მიწის მოსარწყავად) კონტაქტის იდენტიფიცირებული რისკები. დეტალების შესახებ ინფორმაცია უნდა მიეწოდოს სააგენტოს;

გ) ამ პუნქტში ასახული ნარჩენების განკარგვის მეთოდები ასევე ეხება მავნე ორგანიზმით დაბინძურებული პარტიის დამუშავებასთან, განკარგვასთან და გადამუშავებასთან დაკავშირებულ ნარჩენებს.

## **მუხლი 9. სათესლე კარტოფილის მოყვანისადმი დაწესებული მოთხოვნები**

1. სათესლე კარტოფილი უნდა აკმაყოფილებდეს ამ ტექნიკური რეგლამენტით დადგენილ მოთხოვნებს და წარმოებული უნდა იყოს ოფიციალურად დამტკიცებული პროგრამის საფუძველზე მოყვანილი კარტოფილიდან, რომელიც ამ ტექნიკური რეგლამენტის III თავში მითითებული მეთოდის გამოყენებით ჩატარებული შემოწმების შედეგად მიჩნეულია ჯანსაღად.

2. შემოწმება უნდა განხორციელდეს:

ა) თუ არ დადგინდება კლონური კავშირი, განვითარების ადრეულ სტადიებზე, მათ შორის კლონური სელექციის საწყის მცენარეებზე ან ძირითადი სათესლე კარტოფილის კლონზე;

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

## **მუხლი 10. მოთხოვნები სამეცნიერო-კვლევითი და სელექციური საქმიანობისადმი**

აკრძალულია მავნე ორგანიზმის კულტურის ფლობა, შენახვა და გადაადგილება,

გარდა სამეცნიერო-კვლევითი და სელექციური საქმიანობისთვის განკუთვნილი მავნე ორგანიზმის კულტურისა.

### თავი III

#### მავნე ორგანიზმის დიაგნოსტიკა, გამოვლენა, იდენტიფიკაცია

##### მუხლი 11. შემოწმების პროცედურები

შემოწმების პროცედურები ითვალისწინებს:

- ა) მავნე ორგანიზმის დიაგნოსტიკას კარტოფილის ტუბერებსა და მცენარეებში;
- ბ) მავნე ორგანიზმის გამოვლენას კარტოფილის ტუბერებსა და მცენარეების ნიმუშებში;
- გ) მავნე ორგანიზმის 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 შესაბამისად განკარგვა. ასევე აუცილებელია პროცედურები შესრულდეს სააგენტოს მიერ გაცემული შესაბამისი თანხმობის საფუძველზე.

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

3. დადებითი კონტროლის ზუსტი მომზადება სავალდებულოა.

4. 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, დადებითი კონტროლის გამიჯვნა სატესტო ნიმუშებიდან.

5. ადმინისტრაციული და სხვა სახის, კერძოდ, ეტიკეტირებასთან და დოკუმენტურად გაფორმებასთან დაკავშირებული შეცდომების თავიდან ასაცილებლად ამოქმედებული უნდა იქნეს ხარისხის კონტროლის სტანდარტები.

6. ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-6 მუხლის მე-2 პუნქტში მითითებული საექვო შემთხვევა გულისხმობს ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N2-ში მოცემულ ნიმუშთან დაკავშირებით ჩატარებულ დიაგნოსტიკის ტესტებში, ან სკრინინგ-ტესტებში მიღებულ დადებით შედეგებს. პირველი დადებითი სკრინინგ-

ტესტი (IF, პჯრ/FISH, შერჩევითი გამოყოფა) უნდა დადასტურდეს განსხვავებულ ბიოლოგიურ პრინციპებზე დაფუძნებული მეორე სკრინინგ ტესტით.

7. თუ პირველი სკრინინგ-ტესტი დადებითია, ასეთ შემთხვევაში მავნე ორგანიზმით დასნეობვების რისკი დიდია, შესაბამისად აუცილებელია მეორე სკრინინგ-ტესტის ჩატარება. თუ მეორე სკრინინგ-ტესტის შედეგიც დადებითი აღმოჩნდება, მაშინ საეჭვო შემთხვევა დასტურდება და გამოკვლევა ექვემდებარება ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N2-ის მიხედვით გაგრძელებას. თუ მეორე სკრინინგ-ტესტის შედეგი უარყოფითია, ასეთ შემთხვევაში ითვლება, რომ ნიმუში არ არის მავნე ორგანიზმით დასნეობვებული.

8. მავნე ორგანიზმის დადასტურებული არსებობა გულისხმობს მავნე ორგანიზმის სუფთა კულტურის გამოყოფას და იდენტიფიკაციას პათოგენობის დადასტურებასთან ერთად.

**მუხლი 13. მავნე ორგანიზმის სიმპტომების მქონე კარტოფილის ტუბერებში, კარტოფილში, პომიდორში ან სხვა მასპინძელ მცენარეებში ორგანიზმის გამოვლენა და იდენტიფიკაცია**

მავნე ორგანიზმის სიმპტომების მქონე კარტოფილის ტუბერებსა და მცენარეებში მავნე ორგანიზმის გამოვლენა ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N2-ის თანახმად მოიცავს:

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

ბ) დადებითი შედეგის შემთხვევაში, მავნე ორგანიზმის კულტურის იდენტიფიკაციას.

#### თავი IV

**მავნე ორგანიზმის სიმპტომების მქონე კარტოფილის ტუბერებში და კარტოფილში, პომიდორში ან სხვა მასპინძელ მცენარეებში მავნე ორგანიზმის გამოვლენის დეტალური მეთოდები**

**მუხლი 14. სწრაფი სკრინინგ ტესტები**

1. სწრაფი სკრინინგ ტესტები საშუალებას იძლევა, დაისვას სავარაუდო დიაგნოზი, მაგრამ არა არსებითი. გამოყენებული უნდა იქნეს ქვემოთ მოცემული ერთი ან რამდენიმე დამტკიცებული ტესტი:

ა) ღეროს გამტარობის ტესტი ამ ტექნიკური რეგლამენტის 25-ე მუხლის პირველი პუნქტის შესაბამისად;

ბ) პოლი-ფ-ჰიდროქსიბუტირატის (PHB) გრანულების გამოვლენის ტესტი ამ

ტექნიკური რეგლამენტის 25-ე მუხლის მე-2 პუნქტის შესაბამისად;

გ) სეროლოგიური აგლუტინაციის ტესტი ამ ტექნიკური რეგლამენტის 25-ე მუხლის მე-3 პუნქტის შესაბამისად;

დ) სხვა ტესტები.

2. შემდგომი შესაბამისი სწრაფი სკრინინგ ტესტები მოიცავს:

ა) IF ტესტს ამ ტექნიკური რეგლამენტის 25-ე მუხლის მე-5 პუნქტის შესაბამისად;

ბ) FISH ტესტს ამ ტექნიკური რეგლამენტის 25-ე მუხლის მე-11 პუნქტის შესაბამისად;

გ) ELISA ტესტებს ამ ტექნიკური რეგლამენტის 25-ე მუხლის მე-14 პუნქტის შესაბამისად და პჯრ ტესტს ამ ტექნიკური რეგლამენტის 25-ე მუხლის მე-6-მე-10 პუნქტების შესაბამისად.

### **მუხლი 15. მავნე ორგანიზმის გამოყოფის პროცედურები**

მავნე ორგანიზმის გამოყოფის პროცედურების ჩატარებისას:

ა) კარტოფილის ტუბერებში ჭურჭელ-ბოჭკოვანი ქსოვილიდან ხდება გამონადენის, ან გაუფერულებული ქსოვილის ნაწილის, ან კარტოფილის, პომიდვრის, ან სხვა ჭკნობის პროცესში მყოფი მასპინძელი მცენარის ღეროს ჭურჭელ-ბოჭკოვანი ქსოვილის ნაწილის ამოღება. თავსდება მცირე რაოდენობის სტერილურ გამობდილ წყალში ან 50 მოლი ფოსფატურ ბუფერში ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N9-ის შესაბამისად და დაყოვნება ხდება 5-10 წუთი;

ბ) მზადება სუსპენზიის ათჯერადი განზავების ხსნარების სერია;

გ) 50-100 მკლ სუსპენზია გადაიტანება და განზავდება ძირითად საკვებ არეში (NA, YPGA ან SPA; და/ან Kelman-ის ტეტრაზოლიუმის არეში და/ან დადასტურებულ სელექტიურ არეში (SMSA), რომელიც შემდგომ ითესება პეტრის თასზე მარყუჟის ან შპატელის გამოყენებით. შესაძლებელია ცალკე მომზადდეს დადებითი კონტროლი მავნე ორგანიზმის ბიოვარი 2-ის განზავებული უჯრედების სუსპენზიით;

დ) თასების ინკუბაცია ხდება 2-6 დღის განმავლობაში 28°C ტემპერატურაზე, შესაბამის საკვებ არეებზე;

დ.ა) ძირითად საკვებ არეზე მავნე ორგანიზმის ვირულენტური ფორმა წარმოქმნის მარგალიტისფერ-მოთეთრო შეფერილობის ბრტყელ, უწესრიგო და თხევად კოლონიებს, ხშირად დამახასიათებელი რგოლით ცენტრში. მავნე ორგანიზმის ავირულენტური ფორმები ქმნიან მცირე ზომის მრგვალ, არათხევად კოლონიებს, რომლებიც მთლიანად მოთეთრო-კრემისფერი შეფერილობისაა;

დ.ბ) კელმანის ტეტრაზოლიუმის და SMSA საკვებ არეებზე მავნე ორგანიზმის ვირულენტური ფორმები წარმოქმნიან კოლონიებს სისხლისფერი წითელი რგოლით. ავირულენტური ფორმები კი წარმოქმნიან მცირე ზომის მრგვალ, არათხევად,

მთლიანად მუქი წითელი ფერის კოლონიებს.

### **მუხლი 16. მავნე ორგანიზმის საიდენტიფიკაციო ტესტები**

1. მავნე ორგანიზმის იდენტიფიკაციის დადასტურება ხდება სხვადასხვა ბიოლოგიურ პრინციპებზე დაფუძნებული სულ მცირე ორი ტესტის გამოყენებით.

2. საჭიროების შემთხვევაში ყოველი ტესტისთვის გამოიყენება შესაბამისი სახელმძღვანელო ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N11-ის შესაბამისად.

3. მავნე ორგანიზმის საიდენტიფიკაციო ტესტები მოცემულია ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N12-ში და მოიცავს:

ა) კვებითი და ფერმენტული იდენტიფიკაციის ტესტს, რომლის დროსაც განისაზღვრება ის ფენოტიპები, რომლებიც ზოგადად არის, ან არ არის მავნე ორგანიზმში წარმოდგენილი Lelliott და Stead (1987), Klement et al. (1990), Schaad (2001) მეთოდების თანახმად;

ბ) IF ტესტს;

გ) ELISA ტესტს;

დ) პჯრ ტესტს;

ე) FISH ტესტს;

ვ) ცხიმოვანი მჟავების დახასიათებას (FAP);

ზ) შტამის დახასიათების მეთოდებს:

ზ.ა) Biovar-ის დადგენას;

ზ.ბ) გენომური ფინგერპრინტინგს;

თ) პჯრ მეთოდებს.

### **მუხლი 17. მავნე ორგანიზმის დადასტურების ტესტი**

1. პათოგენობის ტესტი უნდა ჩატარდეს მავნე ორგანიზმის დიაგნოზის საბოლოო დადასტურების და კულტურის ვირულენტობის შეფასების მიზნით, რომელიც იდენტიფიცირებულია, როგორც მავნე ორგანიზმი.

2. მზადდება  $10^6$  უჯრედი/მლ ინოკულუმი იზოლატის 24-48 საათიანი კულტურიდან და მავნე ორგანიზმის შესაბამისი დადებითი კონტროლიდან (e.g. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857).

3. ხდება პომიდვრის ან ბადრიჯნის 5-10 ჩითილის ინოკულაცია მესამე ნამდვილი ფოთლის ფაზაში ამ ტექნიკური რეგლამენტის 25-ე მუხლის მე-16 პუნქტის შესაბამისად.

4. ინკუბაცია ტარდება ორი კვირის განმავლობაში 25 - 28 °C ტემპერატურაზე და მაღალი ფარდობითი ტენიანობის პირობებში შესაბამისი მორწყვით, რათა თავიდან იქნეს აცილებული ჭარბი ტენიანობა და გამოშრობით გამოწვეული სტრესი. სუფთა კულტურებით გამოწვეული ტიპური ჭკნობა უნდა დაფიქსირდეს დაახლოებით 14 დღის განმავლობაში. თუ აღნიშნული პერიოდის შემდეგ სიმპტომები არ შეინიშნება,

მაშინ კულტურა ვერ დადასტურდება, როგორც მავნე ორგანიზმის პათოგენური ფორმა.

5. დაკვირვება ხდება ჭკნობის და/ან ეპინასტიის, ქლოროზის და ზრდის შეფერხების სიმპტომებზე.

6. მავნე ორგანიზმის გამოყოფა ხდება სიმპტომატური მცენარეებიდან, ღეროს ნაწილის ამოჭრით ინოკულაციის წერტილიდან დაახლოებით 2 სმ-ის ზემოთ, ღეროს ნაწილის მოცილებით. ღეროს ნაწილი ქუცმაცდება და ყოვნიდება მცირე მოცულობის სტერილურ წყალში ან 50 მკლ ფოსფატის ბუფერში, სუსპენზიიდან გამოყოფა ხდება შესაფერის საკვებ არეზე განზავების გადატანით ან დაიტანება შტრიხების სახით. მავნე ორგანიზმის გამოყოფა ხდება სუსპენზიიდან განზავებით შესაბამის საკვებ არეზე. უმჯობესია სელექტიური საკვები არის გამოყენება. ინკუბაცია უნდა მოხდეს 48-72 საათის განმავლობაში 28°C-ზე და დაკვირვება ჩატარდეს მავნე ორგანიზმის ტიპური კოლონიების ფორმირებაზე.

## თავი V

### მავნე ორგანიზმის გამოვლენის და იდენტიფიკაციის მეთოდები

**მუხლი 18.** უსიმპტომო კარტოფილის ტუბერების ნიმუშებში, კარტოფილში, პომიდორში ან სხვა მასპინძელ მცენარეებში მავნე ორგანიზმის გამოვლენა და იდენტიფიკაცია

1. უსიმპტომო კარტოფილის ტუბერების ნიმუშების შემოწმების მიზანია მავნე ორგანიზმის გამოვლენა და იდენტიფიკაცია ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N3-ის შესაბამისად. სხვადასხვა ბიოლოგიური პრინციპების მიხედვით ჩატარებულ სულ მცირე ორი სკრინინგ-ტესტის შედეგად მიღებულ დადებით პასუხს უნდა ემატებოდეს მავნე ორგანიზმის 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.

2. უსიმპტომო კარტოფილში, პომიდორში ან სხვა მასპინძელ მცენარეებში მავნე ორგანიზმის გამოვლენა და იდენტიფიკაცია ხორციელდება ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N4-ის შესაბამისად.

**მუხლი 19.** უსიმპტომო კარტოფილის ტუბერებში მავნე ორგანიზმის გამოვლენის და იდენტიფიკაციის მეთოდები

1. სტანდარტული ნიმუშისთვის საჭიროა 200 ტუბერი ერთ ტესტზე. უფრო



ინტენსიური გამოკვლევისთვის საჭიროა ჩატარდეს რამდენიმე ტესტი, თითოეული ტესტისთვის 200 ტუბერთი. 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 ასევე შესაძლებელია კარტოფილის რგოლური სიდამპლის *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* გამოსავლენად.

4. ნიმუშის მომზადებამდე კარტოფილის ტუბერების წინასწარი დამუშავების დროს:

ა) მავნე ორგანიზმის პოპულაციის გამრავლების ხელშეწყობის მიზნით, ნიმუშების ინკუბაცია ხდება 25 - 30 °C-ზე, ტესტირებამდე არაუმეტეს ორი კვირის განმავლობაში;

ბ) ტუბერები ირეცხება შესაბამისი სადეზინფექციო საშუალებების (ქლორის ნაერთები - პჯრ 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 ნიმუშებისათვის, რომლებშიც არის დიდი რაოდენობით ნიადაგი. ასევე პჯრ ტესტის, ან პირდაპირი გამოყოფის პროცედურის ჩატარებისას;

გ) 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;

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

ე) თუ ტუბერთან სტოლონის მიერთების ადგილას ტუბერის გადაჭრისას გამოვლინდა მავნე ორგანიზმის სავარაუდო სიმპტომი, ტუბერი უნდა დათვალიერდეს ვიზუალურად, გადაჭრილი ზედაპირის გასაშრობად (სუბერიზაციისათვის) შენახულ იქნეს ოთახის ტემპერატურაზე 2 დღის განმავლობაში და შენახულ იქნეს გამოკვლევის დასრულებამდე - კარანტინის პირობებში (4 -10°C-ზე). სტანდარტული ნიმუშის ყველა ტუბერი (მათ შორის საექვო სიმპტომების მქონე) შენახულ უნდა იქნეს ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N11-ის მოთხოვნათა შესაბამისად;

ვ) ამოჭრილი ჭურჭელ-ბოჭკოვანი ქსოვილი უნდა შეგროვდეს ერთჯერადად კონტეინერში, რომელიც უნდა იხურებოდეს ან/და ილუქებოდეს (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, არა უმეტეს 72 საათისა, ან ოთახის ტემპერატურაზე, არაუმეტეს 24 საათისა. ნიმუშის შენახვის პერიოდში მისმა გამოშრობამ და საპროფიტების განვითარებამ შესაძლოა შეაფერხოს მავნე ორგანიზმის გამოვლენა.

5. ამოჭრილი ქსოვილი უნდა დამუშავდეს ქვემოთ მოცემული ერთ-ერთი პროცედურის გამოყენებით, კერძოდ:

ა) ქსოვილი უნდა დაიფაროს საკმარისი მოცულობის (დაახლოებით 40 მლ) საექსტრაქციო ბუფერით ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N9-ის შესაბამისად და მოთავსებულ იქნეს როტაციულ სანჯღრეველაზე (50 -100 ბრუნი წუთში) ოთხი საათის განმავლობაში, არაუმეტეს 24°C ტემპერატურისა, ან შენახულ იქნეს მაცივარში 16-24 სთ-ის განმავლობაში;

ბ) მოხდეს ქსოვილის ჰომოგენიზაცია საკმარისი მოცულობის (დაახლოებით 40 მლ) საექსტრაქციო ბუფერში დაბლენდერებით, ან მოხდეს დაქუცმაცება საექსტრაქციო პარკში (Bioreba, ზომა 150 მმ X250მმ, სტერილური) რეზინის ჩაქუჩის დამაქუცმაცებელი მოწყობილობის (მაგ. Homex) გამოყენებით.

6. 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.

7. სუპერნატანტი უნდა გადაიღვაროს. იმ შემთხვევაში, თუ სითხე ზედმეტად მღვრია, საჭიროა დაცენტრიფუგირდეს დაბალი სიჩქარით (არა უმეტეს 180g 10 წთ-ის განმავლობაში, 4-10°C ტემპერატურაზე), ან გაიფილტროს ვაკუუმით (40-100 მკლ). ფილტრი დამატებით უნდა იქნეს გარეცხილი (10 მლ) საექსტრაქციო ბუფერით ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N9-ის მოთხოვნათა გათვალისწინებით.

8. ბაქტერიული ფრაქციის კონცენტრირება უნდა მოხდეს ცენტრიფუგირების გზით 7 000 g-ზე 15 წთ-ის განმავლობაში (ან 10 000 g 10 წთ-ის განმავლობაში) 4-დან 10°C ტემპერატურაზე. წარმოქმნილი სუპერნატანტი ფრთხილად უნდა გადაიღვაროს, ისე რომ სინჯარის ფსკერს არ მოსცილდეს ნალექი.

9. ნალექის რესუსპენდირება უნდა მოხდეს 1,5 მლ ბუფერში ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N9-ის შესაბამისად. 500 მკლ გამოყენებულ უნდა იქნეს მავნე ორგანიზმის ტესტისთვის, 500 მკლ *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* 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 შენახულ უნდა იქნას 4-10°C ტემპერატურაზე. განმეორებითი გაყინვა და გაღობა რეკომენდებული არ არის. ტრანსპორტირების შემთხვევაში, ექსტრაქტი უნდა მოთავსდეს მაცივარყუთში და მიწოდებულ იქნეს 24-48 სთ-ის განმავლობაში.

10. 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.

11. ტესტირებისას გამოიყენება:

ა) სელექტიური გამოყოფა;

ბ) IF ტესტი;

გ) პჯრ ტესტი ;

დ) FISH ტესტი;

ე) ELISA ტესტი;

ვ) ბიოლოგიური ტესტი.

**მუხლი 20. უსიმპტომო კარტოფილის, პომიდორის ან სხვა მასპინძელი მცენარეების ნიმუშებში მავნე ორგანიზმის გამოვლენის და იდენტიფიკაციის მეთოდები**

1. ნიმუშის მომზადებისას:

ა) მავნე ორგანიზმის ლატენტური პოპულაციის გამოვლენის მიზნით, რეკომენდებულია შერეული ნიმუშების ტესტირება. პროცედურის გამოყენება შესაძლებელია დაახლოებით 200 ტუბერისაგან შედგენილი შერეული ნიმუშების შემთხვევაში. გამოსაკვლევად აღებულ უნდა იქნეს მცენარის პოპულაციის საშუალო სტატისტიკური ნიმუში;

ბ) 1 ან 2 სმ. ღეროს ნაწილები თავსდება დახურულ სტერილურ კონტეინერში ნიმუშების აღების შემდეგი პროცედურების შესაბამისად:

ბ.ა) პომიდორის ჩითილების შემთხვევაში, თითოეული ღეროს ძირიდან, ზუსტად ნიადაგის დონეზე, სუფთა დეზინფიცირებული დანით ამოიჭრება 1 სმ სეგმენტი. მთავარი ღეროს განშტოების ზემოთ მცენარიდან სცილდება ყველაზე ქვემოთ არსებული ყლორტი. თითოეული ყლორტის ქვედა ნაწილიდან ამოიჭრება 1 სმ სეგმენტი;

ბ.ბ) სხვა მასპინძელი მცენარეების შემთხვევაში, სუფთა დეზინფიცირებული დანით ან ბალის მაკრატლით, თითოეული ღეროს ძირზე ზუსტად ნიადაგის დონეზე, ამოიჭრება 1 სმ სეგმენტი. *S. dulcamara*-ის ან სხვა მასპინძელი მცენარის შემთხვევაში,

რომლებიც წყალში იზრდებიან, ამოიჭრება წყალქვეშა განთავსებული ღეროს ან წყალქვეშ განთავსებული სტოლონის 1-2 სმ სეგმენტი;

ბ.გ) კონკრეტული ადგილის ნიმუშების აღებისას რეკომენდებულია, თითოეული პოტენციური მასპინძელი სარეველა მცენარის ნიმუშის აღების ადგილზე აღებულ იქნეს სულ მცირე 10 მცენარის საშუალო ნიმუში. მავნე ორგანიზმის გამოვლენა ყველაზე სარწმუნო იქნება გვიან გაზაფხულზე, ზაფხულში და შემოდგომაზე, თუმცა, მრავალწლიანი *Solanum dulcamara*-ის შემთხვევაში, რომელიც წყალში იზრდება, ბუნებრივი ინფექციების გამოვლენა მთელი წლის მანძილზე შესაძლებელია. ცნობილ მასპინძელ მცენარეებს წარმოადგენენ: ნაგერალა კარტოფილის მცენარე, *Solanum dulcamara*, *S. nigrum*, *Datura stramonium* და Solanaceae-ს ოჯახის სხვა წარმომადგენლები. აგრეთვე მასპინძელ მცენარეებს მიეკუთვნება *Pelargonium* spp. და *Portulaca oleracea*. მავნე ორგანიზმის ბიოვარი 2/რასა 3 პოპულაციის პოტენციურ წყაროს განსაზღვრულ გარემო პირობებში შეიძლება წარმოადგენდეს ფესვები, და/ან რიზოსფერო ზოგიერთი ევროპული სარეველა მცენარის: *Atriplex hastata*, *Bidens pilosa*, *Cerastium glomeratum*, *Chenopodium album*, *Eupatorium cannabinum*, *Galinsoga parviflora*, *Ranunculus scleratus*, *Rorippa* spp, *Rumex* sp., *Silene alba*, *S. nutans.*, *Tussilago farfara* და *Urtica dioica*.

2. შესაძლოა განხორციელდეს შინაგანი სიმპტომების ვიზუალური შემოწმება. ღეროების სიმპტომური ნაწილების გამოკვლევა უნდა ჩატარდეს სხვა ნიმუშებისაგან იზოლირებულად.

3. ღეროს ნაწილების დეზინფექცია ხდება 70% ეთანოლით და დაუყოვნებლივ შრება ფილტრის ქაღალდზე. შემდეგ ღეროს ნაწილები მუშავდება ქვემოთ მოცემული პროცედურებიდან ერთ-ერთის გამოყენებით:

ა) ღეროს ნაწილები იფარება საკმარისი რაოდენობის (დაახლოებით 40 მლ) ექსტრაქტის ბუფერული ხსნარით ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N9 -ის მიხედვით და თავსდება როტაციულ სანჯღრეველაზე (50 - 100 rpm) ოთხი საათის განმავლობაში 24 °C-ზე დაბალ ტემპერატურაზე ან 16 - 24 საათის განმავლობაში თავსდება მაცივარში;

ბ) ღეროს ნაწილები შესაბამისი რაოდენობის საექსტრაქციო ბუფერთან ერთად ქუცმაცდება სპეციალურ მაცივრაციის პარკებში (*Stomacher* ან *Bioreba*) რეზინის ჩაქუჩის ან დამაქუშავებელი მოწყობილობის (*Homex*) გამოყენებით. თუ ეს შეუძლებელია, ღეროს ნაწილები შენახულ უნდა იქნეს მაცივარში არაუმეტეს 72 საათისა, ან არაუმეტეს 24 საათისა ოთახის ტემპერატურაზე.

4. ექსტრაქტი 15 წუთის დგომის შემდეგ იფილტრება.

5. ჩვეულებრივ ექსტრაქტის შემდგომი გასუფთავება ან ბაქტერიული ფრაქციის კონცენტრირება არ არის საჭირო, თუმცა ეს შესაძლებელია გაფილტვრით და/ან ცენტრიფუგირებით.

6. სუფთა ან კონცენტრირებული ნიმუშის ექსტრაქტი იყოფა ორ თანაბარ ნაწილად. ტესტირების დროს, პირველი ნახევარი ინახება 4-10°C ტემპერატურაზე, ხოლო მეორე ნახევარი 10 - 25 % (v/v) სტერილურ გლიცერინთან ერთად -16 - -24 °C ტემპერატურაზე (კვირები) ან - 68 - -86 °C ტემპერატურაზე (თვე) იმ შემთხვევაში, თუ საჭიროა დამატებითი ტესტირება.

7. ტესტირებისას გამოიყენება:

ა) სელექტიური გამოყოფა;

ბ) IF ტესტი;

გ) პჯრ ტესტი;

დ) FISH ტესტი;

ე) ELISA ტესტი;

ვ) ბიოლოგიური ტესტი.

## თავი VI

### მავნე ორგანიზმის წყალში გამოვლენისა და იდენტიფიკაციის მეთოდები

#### მუხლი 21. მავნე ორგანიზმის წყალში გამოვლენა და იდენტიფიკაცია

მავნე ორგანიზმის წყალში გამოვლენა და იდენტიფიკაცია ხორციელდება ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N5-ის შესაბამისად.

#### მუხლი 22. პრე-ჰიბრიდიზაცია და ჰიბრიდიზაცია

1. ზედაპირული წყლის ნიმუშში მავნე ორგანიზმის გამოვლენა ხორციელდება ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N 5-ის შესაბამისად, რომელიც შესაძლებელია, ასევე გამოყენებულ იქნეს კარტოფილის დამუშავების შემდგომი და საკანალიზაციო წყლების ნიმუშების ტესტირებისთვის. თუმცა, მნიშვნელოვანია აღინიშნოს, რომ მავნე ორგანიზმის გამოვლენის მოსალოდნელი მგრძნობელობა განსხვავებულია სუბსტრატის მიხედვით. გამოყოფის ტესტის სიზუსტეზე გავლენას ახდენს კონკურენტული საპროფიტური ბაქტერია, რომლის მაჩვენებელი ზოგადად უფრო მაღალია კარტოფილის დასამუშავებლად გამოყენებულ და საკანალიზაციო წყლების ნიმუშებში, ვიდრე ზედაპირული წყლის ნიმუშებში. ვინაიდან, ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N5-ის თანახმად შესაძლებელია ერთ ლიტრ ზედაპირულ წყალში ისეთი მცირე რაოდენობის გამოვლენა, როგორცაა  $10^3$  უჯრედი, კარტოფილის დამუშავების შემდგომი ან საკანალიზაციო წყლების ნიმუშებში გამოვლენის მგრძნობელობა მნიშვნელოვნად დაბალი უნდა იყოს. ამიტომ, რეკომენდებულია ჩამდინარე წყლების ტესტირება გაწმენდითი ღონისძიებების (დალექვა ან/და გაფილტვრა) შემდეგ რა დროსაც საპროფიტური ბაქტერიის პოპულაცია მცირდება. უარყოფითი შედეგების მიღების შემთხვევაში გათვალისწინებული უნდა იქნეს მგრძნობელობის ზღვარი. ვინაიდან ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N5-ში ასახული სქემა წარმატებით გამოიყენება

ზედაპირულ წყლების კვლევაში მავნე ორგანიზმის არსებობის ან არარსებობის დადგენად. ამ კვლევებისათვის მიღებული მგრძობელობის ზღვარი გათვალისწინებული უნდა იყოს აგრეთვე კარტოფილის დამუშავების შემდგომი და საკანალიზაციო წყლების კვლევებისას.

2. ნიმუშის მომზადებისას:

ა) ზედაპირულ წყალში მავნე ორგანიზმის გამოვლენა ყველაზე საიმედოა გვიან გაზაფხულზე, ზაფხულში და შემოდგომაზე, როდესაც წყლის ტემპერატურა 15 °C -ს აღემატება;

ბ) ამ პუნქტის „ა“ ქვეპუნქტში აღნიშნულ პერიოდში სხვადასხვა დროს განმეორებითი ნიმუშების აღება კონკრეტულ ადგილებზე გაზრდის გამოვლენის საიმედოობას კლიმატის გავლენის ეფექტის შემცირებით;

გ) მხედველობაში უნდა იქნეს მიღებული უხვი ნალექის გავლენა და დინების გეოგრაფიული მიმართულება, რამაც შეიძლება გავლენა იქონიოს გარემოში მავნე ორგანიზმის კონცენტრაციაზე;

დ) ზედაპირული წყლის ნიმუშები აღებულ უნდა იქნეს მასპინძელი მცენარეების სიახლოვეს, ასეთის არსებობის შემთხვევაში.

3. წყლის ნიმუშები აღებულ უნდა იქნეს ნიმუშების ასაღებად შერჩეულ ადგილებში, ერთჯერადი სტერილური სინჯარებით ან ბოთლებით, შეძლებისდაგვარად ნაპირიდან 2 მ-ის დაშორებით და ზედაპირიდან 30 სმ-ის სიღრმეზე. კარტოფილის დასამუშავებლად გამოყენებულ და საკანალიზაციო წყლების შემთხვევაში ნიმუშები აიღება წყლის გამოშვების ადგილზე. ნიმუშების აღების შერჩეულ თითოეულ ადგილზე რეკომენდირებულია დაახლოებით 500 მლ ნიმუშის აღება. მცირე მოცულობის ნიმუშების შემთხვევაში თითოეული შერჩეული ადგილისათვის ნიმუშის აღება ხდება სამჯერ, თითოეული ნიმუშისთვის 2 გამეორება. თითოეული ქვენიმუშის მოცულობა უნდა იყოს სულ მცირე 30 მლ.

4. ნიმუშების ტრანსპორტირება დასაშვებია გრილ შავ კონტეინერებში (4 - 10 °C), ტესტირება უნდა განხორციელდეს 24 საათის განმავლობაში.

5. საჭიროების შემთხვევაში შესაძლებელია ბაქტერიული ფრაქციის კონცენტრირება ქვემოთ მოცემულთაგან ერთ-ერთი მეთოდის გამოყენებით:

ა) 30-50 მლ ქვენიმუშების ცენტრიფუგირება ხდება 10 000 გ ძალით 10 წუთის განმავლობაში (ან 7 000 გ ძალით 15 წუთის განმავლობაში), სასურველია 4 - 10 °C ტემპერატურაზე, უნდა გადაიღვაროს სუპერნატანტი, ნალექი კი უნდა გაიხსნას 1 მლ დამლექ ბუფერში;

ბ) მემბრანით გაფილტვრა (ფორების მინიმალური ზომა 0,45 მკმ), რის შემდეგაც ხდება ფილტრის გარეცხვა 5-10 მლ დამლექი ბუფერით. ეს მეთოდი მოსახერხებელია წყლის უფრო დიდი მოცულობის შემთხვევაში, რომელიც საპროფიტების ნაკლებ რაოდენობას შეიცავს;

გ) კონცენტრირება არ არის რეკომენდებული კარტოფილის გადამუშავების შედეგად აღებულ ნიმუშებში ან კანალიზაციის ჩამდინარე წყლების ნიმუშებში კონკურენტული საპროფიტული ბაქტერიების მაღალი პოპულაციების გამო, რომელიც შეაფერხებს მავნე ორგანიზმის გამოვლენას.

## თავი VII

### მავნე ორგანიზმის ნიადაგში გამოვლენისა და იდენტიფიკაციის მეთოდები.

#### მუხლი 23. მავნე ორგანიზმის ნიადაგში გამოვლენა და იდენტიფიკაცია

მავნე ორგანიზმის ნიადაგში გამოვლენა და იდენტიფიკაცია ხორციელდება ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N6-ის შესაბამისად.

#### მუხლი 24. მავნე ორგანიზმის ნიადაგში გამოვლენისა და იდენტიფიკაციის მეთოდები

1. ნიადაგის ნიმუშში მავნე ორგანიზმის ვალიდური გამოვლენა ხორციელდება ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N6-ის შესაბამისად, რომელიც შესაძლებელია ასევე გამოყენებულ იქნეს გადამუშავებული კარტოფილის მყარ ნარჩენებზე ან საკანალიზაციო ნალექზე. თუმცა, უნდა აღინიშნოს, რომ ეს მეთოდები არასაკმარისად ზუსტია იმისათვის, რომ უზრუნველყოს მავნე ორგანიზმის დაბალი და/ან არათანაბრად განაწილებული პოპულაციების გამოვლენა, ბუნებრივად დაბინძურებული აღნიშნული სუბსტრატების ნიმუშებში.

2. ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N6-ის თანახმად ტესტის მგრძნობელობის ფარგლები გათვალისწინებული უნდა იქნეს მიღებული უარყოფითი შედეგების სანდოობის შეფასებისას. ნიადაგში ან შლამში, აგრეთვე მინდვრის ნიადაგში მავნე ორგანიზმის არსებობის/არარსებობის დამდგენი ყველაზე სანდო ტესტია მიმღებიანი მასპინძელი მცენარის დარგვა და მასზე ინფექციის გამოვლენის მონიტორინგი, თუმცა ამ მეთოდით დაბინძურების დაბალი დონის შემთხვევაში რთულია მავნე ორგანიზმის გამოვლენა.

3. ნიმუშის მომზადებისას:

ა) მინდვრის ნიადაგის ნიმუშის აღება უნდა განხორციელდეს სტანდარტული პრინციპების შესაბამისად, რომელიც გამოიყენება ნემატოდების ნიმუშის აღებისას. 0,3 ჰა-ზე 10 -20 სმ-ის სიღრმეზე (ან 7x7 მეტრი ნაკვეთი) 60 ადგილიდან აიღება ნიადაგის 0,5-დან 1კგ-მდე ნიმუში. თუ არსებობს ეჭვი მავნე ორგანიზმის შესახებ, ნიმუშის ასაღები ადგილების რაოდენობა 0,3 ჰა-ზე გაიზრდება 120-მდე. ტესტირების წინ ნიმუშების ტემპერატურა უნდა იყოს 12-15 °C. კარტოფილის გადამუშავებული ნარჩენების და საკანალიზაციო ნალექის შემთხვევაში აღებულ უნდა იქნეს საშუალო ნიმუშის 1 კგ. ტესტირების წინ თითოეული ნიმუში კარგად უნდა აირიოს;

ბ) მიწის ან ნალექის 10-25 გ ქვენუმუშის დისპერსირება ხდება როტაციული სანჯღრეველათი 60-150 მლ ექსტრაქტის ბუფერში დაახლოებით 2 სთ-ის განმავლობაში;

გ) ტესტირების განმავლობაში სუსპენზია თავსდება 4 °C -ზე.

4. ტესტირება უნდა ჩატარდეს ამ ტექნიკურ რეგლამენტის დანართი N7,8,11,12,13,14,15-ში აღწერილი ტესტების შესაბამისად.

### **მუხლი 25. მავნე ორგანიზმის გამოვლენისა და დიაგნოსტიკის ტესტები**

1. ღეროს ბაქტერიული გამონადენის ტესტის გამოყენებისას კარტოფილის, პომიდორის ან სხვა მასპინძელი მცენარეების ღეროების ჭკნობის დროს მავნე ორგანიზმის არსებობის დასადგენად ღერო უშუალოდ უნდა გადაიჭრას ნიადაგის დონეზე. გადანაჭერი თავსდება სუფთა წყლით სავსე სინჯარაში. გადაჭრილი ჭურჭელბოჭკოვანი ქსოვილიდან ბაქტერიული გამონადენის ძაფების სპონტანურ გავრცელებაზე დაკვირვება ხდება რამდენიმე წუთის შემდეგ.

2. პოლი-β-ჰიდროქსიბუტირატის გრანულების დასადგენად:

ა) მზადდება ბაქტერიული გამონადენის ნაცხის პრეპარატი, დასნებოვნებული ქსოვილიდან ან 48 საათიანი კულტურიდან, რომელიც გაზრდილია YPGA ან SPA საკვებ არეზე;

ბ) მზადდება მავნე ორგანიზმის შტამის ბიოვარი 2-ის დადებითი კონტროლის ნაცხი და საჭიროების შემთხვევაში უარყოფითი კონტროლის ნაცხი, რომელიც ცნობილია, როგორც PHB უარყოფითი sp;

გ) შრება ჰაერზე და თითოეული პრეპარატის ქვედა ზედაპირი სწრაფად თავსდება ალის თავზე ნაცხის დასაფიქსირებლად;

დ) შტამი მზადდება ნილის ლურჯის ან სუდანის შავის გამოყენებით და შესწავლა ხდება მიკროსკოპის ქვეშ;

ე) ნილის ლურჯის ტესტირებისას:

ე.ა) სასაგნე მინაზე ეწვეთება ნილის ლურჯი A-ს 1%-იანი წყალხსნარი და 10 წთ-ის განმავლობაში ინკუბირდება 55 °C ტემპერატურაზე;

ე.ბ) საღებავი იწრიტება, ირეცხება გამდინარე ონკანის წყალში, ზედმეტი სითხე შორდება ფილტრის ქაღალდით;

ე.გ) ნაცხიან სასაგნე მინაზე ეწვეთება ძმარმჟავას 8%-იანი წყალხსნარი და ინკუბირდება გარემოს ტემპერატურაზე ერთი წთ-ის განმავლობაში;

ე.დ) მცირე ხნით ირეცხება ონკანის გამდინარე წყალში. ზედმეტი სითხე შორდება ფილტრის ქაღალდით;

ე.ე) ხელახლა სველდება წყლის წვეთით და ეფარება საფარი მინა;

ე.ვ) შეღებილი ნაცხის შემოწმება ხდება 450 ნმ ეპიფლუოროსცენტული მიკროსკოპით 600-დან 1000-მდე გადიდებაზე იმერსიულ ზეთში, ან წყალში;

ე.ზ) მოწმდება PHB გრანულების კაშკაშა ნარინჯისფერი ფლუორესცენცია. ასევე ჩვეულებრივი განათების პირობებში მოწმდება, არის თუ არა უჯრედშორისი გრანულები და უჯრედის მორფოლოგია მავნე ორგანიზმისთვის დამახასიათებელი;

ვ) სუდანის შვის ტესტისას:

ვ.ა) თითოეული პრეპარატი თავსდება 70 % ეთანოლის სპირტში 0,3 % სუდანის შვის B ხსნარით და ინკუბირდება 10 წუთის განმავლობაში გარემოს



ტემპერატურაზე;

ვ.ბ) საღებავი იწრიტება, ირეცხება გამდინარე ონკანის წყალში, ზედმეტი სითხე შორდება ფილტრის ქაღალდით;

ვ.გ) პრეპარატი თავსდება ქსილოლში და შრება ფილტრის ქაღალდზე. ქსილოლი მავნე ნივთიერებაა, დაცული უნდა იქნეს უსაფრთხოების სათანადო ზომები. სამუშაო უნდა შესრულდეს ამწოვ კარადაში;

ვ.დ) პრეპარატი სველდება 0,5 % w/v საფრანინის წყალხსნარით და ყოვნიდება 10 წამის განმავლობაში გარემოს ტემპერატურაზე. საფრანინი მავნე ნივთიერებაა, დაცული უნდა იქნეს უსაფრთხოების სათანადო ზომები. სამუშაო უნდა შესრულდეს ამწოვ კარადაში;

ვ.ე) პრეპარატი მცირე ხნით ირეცხება ონკანის გამდინარე წყალში. ზედმეტი სითხე შორდება ფილტრის ქაღალდით და ეფარება საფარი მინა;

ვ.ვ) შეღებილი ნაცხის დათვალიერება ხდება სინათლის მიკროსკოპით x 1000

ტრანსმისიული განათებით იმერსიული ზეთის გამოყენებით;

ვ.ზ) მოწმდება PHB გრანულების ლურჯ-შავი შეფერილობა მავნე ორგანიზმის მოვარდისფროდ შეღებილ უჯრედის კედლებში.

3. სეროლოგიური აგლუტინაციის ტესტის გამოყენებისას მავნე ორგანიზმის უჯრედების აგლუტინაცია ბაქტერიულ გამონადენში ან სიმპტომური ქსოვილის ექსტრაქტებში ყველაზე კარგად ჩანს ვალიდური ანტისხეულების გამოყენებისას, რომელიც მარკირებულია შესაბამისი ფერადი მარკერებით, როგორცაა, წითელი *Staphylococcus aureus*-ის უჯრედები, ან შეღებილი ლატექსის ნაწილები. თუ გამოიყენება კომერციულად ხელმისაწვდომი კომპლექტი, ხელმძღვანელობენ მწარმოებლების ინსტრუქციის შესაბამისად. სხვა შემთხვევაში სრულდება შემდეგი პროცედურები:

ა) მარკირებული ანტისხეულის სუსპენზიის წვეთები და ბაქტერიული გამონადენში ერთმანეთს ერევა მრავალფოსფორიანი პლანშეტის სასაგნე მინაზე;

ბ) მზადდება მავნე ორგანიზმის ბიოვარ 2-ის და ჰეტეროგენური შტამის დადებითი და უარყოფითი კონტროლები;

გ) აგლუტინაციაზე დაკვირვება ხდება დადებით ნიმუშებში ფრთხილი შერევის შემდეგ 15 წმ-ის განმავლობაში.

4. სელექციური გამოყოფისას გამოიყენება შემდეგი მეთოდები:

ა) სელექციური კულტივირება, რომლის დროსაც გამოიყენება შესაბამისად ვალიდური სელექციური საკვები არე, როგორცაა SMSA, საჭიროა ყურადღებით დაკვირვება, რათა მოხდეს საკვებ არეზე განვითარებული მავნე ორგანიზმის და სხვა ბაქტერიული კოლონიების განსხვავება. გარდა ამისა, მავნე ორგანიზმის კოლონიებმა შესაძლოა აჩვენონ ატიპური მორფოლოგია თუ პეტრის თასები გადატვირთულია ან წარმოდგენილია ანტაგონისტური ბაქტერია. იმ შემთხვევაში თუ არსებობს კონკურენციის ან ანტაგონიზმის ეჭვი, ნიმუში უნდა იქნეს ხელახლა გამოკვლეული

განსხვავებული ტესტით. ამ მეთოდით გამოვლენის მაღალი მგრძობელობა მოსალოდნელია ახლად მომზადებული ნიმუშის გამოიყენებისას. თუმცა ამ მეთოდის გამოყენება, აგრეთვე შესაძლებელია იმ ექსტრაქტზე, რომელიც ინახება გლიცერინში  $-68^{\circ}\text{C}$  -დან  $-86^{\circ}\text{C}$  -მდე ტემპერატურაზე. დადებით კონტროლად მზადდება მავნე ორგანიზმის (NCPPB 4156=PD 2762=CFBP 3857) ბიოვარ 2-ის ვირულენტური შტამის  $10^6$  cfu მლ-ში სუსპენზიისგან მეთადი განზავებები. შესაძლო დაბინძურებისათვის ტავიდან ასაცილებლად დადებითი კონტროლი მზადდება სატესტო ნიმუშებისგან განცალკევებით. ყოველი ახლად მომზადებული სელექტიური საკვები არისთვის, მისი შესაბამისობა მავნე ორგანიზმის ზრდისთვის უნდა შემოწმებული იქნეს სანამ ის გამოყენებულ იქნება დადგენილი ნიმუშების გამოსაკვლევად. საკონტროლო მასალის გამოკვლევა ხდება ნიმუშების გამოკვლევის მსგავსად. ამასთან:

ა.ა) განზავება ტარდება შესაბამისი მეთოდოლოგიით, იმის უზრუნველსაყოფად, რომ საპროფიტული კოლონიის წარმომქმნელი პოპულაციები განზავებულია. ნიმუშის ექსტრაქტის და თითოეული განზავების 50-100 მკლ ითესება პეტრის თასზე;

ა.ბ) თასების ინკუბაცია ხდება  $28^{\circ}\text{C}$ -ზე. თასები მოწმდება ყოველი 48 საათის შემდეგ და ყოველდღიურად 6 დღის განმავლობაში. მავნე ორგანიზმის ტიპური კოლონიები SMSA საკვებ არეზე არის რძისფერი-თეთრი შეფერილობის, ბრტყელი, ასიმეტრიული და თხევადი და ინკუბაციიდან 3 დღის შემდეგ კოლონია ხდება ვარდისფერიდან - სისხლისფერ-წითლამდე შეფერილობის, ცენტრში თხევადი სიმღვრივით მავნე ორგანიზმის ატიპური კოლონიები ფორმირდება საკვებ არეზე, რომლებიც შეიძლება იყოს პატარა, მრგვალი, მთლიანად წითელი ფერის და არათხევადი ან მხოლოდ ნაწილობრივ თხევადი, რის გამოც რთულია განსხვავება საპროფიტული ბაქტერიების კწე-სგან;

ა.გ) მავნე ორგანიზმის სავარაუდო კოლონიები განზავების მეთოდით თესვის შემდეგ უნდა გასუფთავდეს ძირითად საკვებ არეზე, იზოლირებული კოლონიების მიღების მიზნით;

ა.დ) კულტურები ინახება ხანმოკლე დროით სტერილურ წყალში (pH 6-დან 8-მდე ქლორისგან თავისუფალი) ოთახის ტემპერატურაზე სიბნელეში ან ხანგრძლივი დროის განმავლობაში კრიოდამცავ საკვებ არეში  $68^{\circ}\text{C}$ -დან -  $86^{\circ}\text{C}$ -მდე ტემპერატურაზე ან ექვემდებარება ლიოფიზაციას (ქსოვილების და სხვა ბიოლოგიური ობიექტების გამოშრობის მეთოდი გაყინულ მდგომარეობაში, ვაკუუმის პირობებში);

ა.ე) ხდება სავარაუდო კულტურების იდენტიფიცირება ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N12-ის შესაბამისად და ტარდება მავნე ორგანიზმზე გამოკვლევა ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-17 მუხლის შესაბამისად. სელექტიური გადათესვის ტესტი უარყოფითია, თუ ბაქტერიის არცერთი კოლონია არ გაზნვითარდა 6 დღის შემდეგ, ან თუ მავნე ორგანიზმის ტიპური სავარაუდო კოლონია არ გამოვლინდა იმ პირობით, რომ სხვა ბაქტერიების კონკურენციის ან

ანტაგონიზმის გამო არ არის ინჰიბირებაზე ექვი და ტიპური მავნე ორგანიზმის კოლონიები ნაპოვნია დადებით კონტროლში. სელექტიური გადათესვის ტესტი დადებითია თუ გამოვლინდა სავარაუდო მავნე ორგანიზმის კოლონიები;

ბ) გამდიდრების პროცედურისას გამოიყენება ვალიდირებული გამამდიდრებელი საკვები არე, როგორცაა მოდიფიცირებული უილბრინკის ბულიონი. ეს პროცედურა შესაძლებელია გამოყენებულ იქნას ნიმუშის ექსტრაქტში მავნე ორგანიზმის პოპულაციების მატებისთვის, რაც გამოვლენის მგრძობელობას ზრდის. ეს პროცედურა ასევე ეფექტურად ანაზავებს (1:100) პჯრ რეაქციის ინჰიბიტორებს მიუხედავად ამისა, უნდა აღინიშნოს, რომ მავნე ორგანიზმის გამდიდრება შესაძლოა ვერ მოხერხდეს საპროფიტული ორგანიზმების კონკურენციის ან ანტაგონიზმის გამო, რომლებიც ხშირად იმავდროულად არიან გამდიდრებული. აქედან გამომდინარე, მავნე ორგანიზმის გამოყოფა გამდიდრებული ბულიონის კულტურებიდან შესაძლებელია იყოს გართულებული. ამის გარდა, რადგან სეროლოგიურად მსგავსი საპროფიტების პოპულაციები შესაძლებელია გაიზარდოს, პოლიკლონური ანტისხეულების ნაცვლად რეკომენდირებულია მონოკლონური სპეციალური ანტისხეულების გამოყენება, როდესაც ტარდება ELISA ტესტი. ამასთან:

ბ.ა) პჯრ-ს გასამდიდრებად, 100 მკლ ნიმუშის ექსტრაქტი გადაიტანება 10 მლ გამდიდრებულ ბულიონში, რომელიც წინასწარ ალიკვოტირებულია დნმ თავისუფალ სინჯარებში ან კოლბებში. ELISA-გასამდიდრებლად შესაძლებელია გამოყენებულ იქნეს ბულიონის უფრო მაღალი თანაფარდობა (100 მკლ 1.0 მლ გამდიდრებულ ბულიონში);

ბ.ბ) ინკუბაცია ხდება 72 საათი 27 ° C-დან - 30 °C -მდე შენჯღრეულ კულტურაში ან სტატიკურ მდგომარეობაში მოშვებული თავსახურით, რომელიც იძლევა აერაციის საშუალებას;

ბ.გ) პჯრ ან ELISA ტესტებში გამოყენებამდე კარგად უნდა იქნეს არეული;

ბ.დ) გამდიდრებული ბულიონი კარგად უნდა დამუშავდეს ისე, როგორც ზემოაღნიშნული ტესტების ნიმუშებში; თუ მავნე ორგანიზმის გამდიდრების ინჰიბირება არის მოსალოდნელი ზოგიერთი კონკურენტული საპროფიტული ბაქტერიის მაღალი პოპულაციის არსებობის გამო, ნიმუშის ექსტრაქტების გამდიდრებამ ცენტრიფუგირებამდე ან კონცენტრირების სხვა საფეხურებმა შესაძლოა უკეთესი შედეგი აჩვენოს.

5. IF ტესტის გამოყენების პრინციპი მდგომარეობს შემდეგში:

ა) IF ტესტის გამოყენება რეკომენდებულია ძირითადი სკრინინგის ტესტის სახით, როდესაც IF ტესტი გამოიყენება ძირითადი სკრინინგ ტესტის სახით და IF მაჩვენებელი დადებითია, საჭიროა, ჩატარდეს გამოყოფის პჯრ ან FISH ტესტები მეორე სკრინინგ-ტესტის სახით. როდესაც IF ტესტი გამოიყენება მეორე სკრინინგ-ტესტის სახით და IF მაჩვენებელი დადებითია, ანალიზების დასრულების მიზნით საჭიროა შემდგომი ტესტირება ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N2, 3, 4-ის მიხედვით.

გამოიყენება მავნე ორგანიზმის ანტისხეულების დამტკიცებელი წყარო. რეკომენდებულია:

ა.ა) ტიტრის განსაზღვრა ანტისხეულების თითოეული ახალი პარტიისათვის.

ტიტრი განისაზღვრება როგორც განზავება, რომელშიც ოპტიმალური რეაქცია ხორციელდება, მავნე ორგანიზმის ჰომოლოგიური შტამის  $10^5$  -  $10^6$  უჯრედი/მლ შემცველი სუსპენზიის ტესტირებისას და მწარმოებლის რეკომენდაციების შესაბამისად ფლუორესცენტულ იზოთიოციანატის (FITC) კონიუგატის გამოყენებით. ვალიდირებულ პოლოკლონურ ანტიშრატს უნდა ჰქონდეს სულ მცირე 1:2000 IF ტიტრი. ტესტირების დროს ანტისხეულები გამოყენებული უნდა იქნეს სამუშაო ნაზავის სახით, რომელიც მიახლოებულია ან ემთხვევა ტიტრს;

ა.ბ) ტესტი უნდა ჩატარდეს ახლად მომზადებული ნიმუშის ექსტრაქტებზე. საჭიროების შემთხვევაში შესაძლებელია მისი განხორციელება გლიცერინში  $-68^{\circ}\text{C}$ – $86^{\circ}\text{C}$  ტემპერატურაზე შენახულ ექსტრაქტებში. შესაძლებელია გლიცერინის მოშორება ნიმუშიდან 1 მლ დამლექი ბუფერის დამატებით (დანართი N9) განმეორებითი ცენტრიფუგირებით 15 წუთის განმავლობაში 7 000 გ-ზე და რესუსპენდირებით დამლექი ბუფერის იგივე მოცულობით. ხშირად ეს საჭირო არ არის, განსაკუთრებით იმ შემთხვევაში, თუ ნიმუშები პრეპარატზე დაფიქსირებულია ალით;

ა.გ) მზადდება მავნე ორგანიზმის ჰომოგენური შტამის ან ნებისმიერი სხვა რეფერენტული შტამის ცალკე დადებითი კონტროლის პრეპარატები კარტოფილის ექსტრაქტში და ბუფერულ ხსნარში, სურვილისამებრ;

ა.დ) ბუნებრივად დასნებოვნებული ქსოვილი (ლიოფილიზებული ან შენახული  $-16$ -  $-24^{\circ}\text{C}$ -ზე) შესაძლებლობის შემთხვევაში გამოყენებულ უნდა იქნეს იმავე პრეპარატზე როგორც დადებითი კონტროლი;

ა.ე) ნიმუშის ექსტრაქტის ალიქვოტები, რომლებიც მავნე ორგანიზმისთვის მანამდე ტესტირებული იყო, როგორც უარყოფითი, შესაძლოა იქნეს გამოყენებული, როგორც უარყოფითი კონტროლი;

ა.ვ) სტანდარტული დადებითი და უარყოფითი საკონტროლო მასალები გამოყენებული უნდა იქნეს ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N11-ში ჩამოთვლილ ტესტებთან ერთად;

ა.ზ) გამოიყენება მრავალფოსფორიანი მიკროსკოპის სულ მცირე 6 მმ დიამეტრის 10 ფოსო;

ა.თ) საკონტროლო მასალის ტესტირებე ისევე უნდა ჩატარდეს, როგორც ნიმუშ(ებ)ის.

ბ) IF ტესტის პრეპარატები მზადდება ქვემოთ მითითებული ერთ-ერთი პროცედურის გამოყენებით:

ბ.ა) სახამებლის მცირე რაოდენობის შემცველობის შემთხვევაში კარტოფილის ნიმუშის ნალექის 1/100 განზავების სტანდარტული მოცულობა (15 მკლ 6 მმ

დიამეტრის ფოსოში, უფრო დიდი ფოსოს შემთხვევაში იზრდება მოცულობა) პიპეტით დაიტანება პირველ ფოსოში. ამავე რიგში დარწმუნდნენ ფოსოებში დაიტანება გაუზავებელი რესუსპენდირებული ნალექის (1/1) იგივე მოცულობა. მომდევნო რიგის გამოყენება შეიძლება პირველი რიგის დუბლირებისთვის ან მეორე ნიმუშისთვის ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N7 -ის მიხედვით;

ბ.ბ) სხვა ნალექის შემთხვევაში, მზადდება დეციმლარული განზავებები (1/10, 1/100) დამლექ ბუფერში. რესუსპენდირებული ნალექის და თითოეული განზავების სტანდარტული მოცულობა (15 მკლ 6 მმ დიამეტრის ფოსოში, უფრო დიდი ფოსოს შემთხვევაში იზრდება მოცულობა) პიპეტით დაიტანება ფოსოების რიგში. მომდევნო რიგის გამოყენება შეიძლება პირველი რიგის დუბლირებისთვის ან მეორე ნიმუშისთვის ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N8 -ის მიხედვით;

გ) წვეთები შრება გარემო ტემპერატურაზე ან ცხელდება 40°C-45°C-ზე . ბაქტერიული უჯრედები ფიქსირდება პრეპარატზე ან გაცხელებით ( 15 წუთი 60°C-ზე) ცეცხლის ალით, 95%-იანი ეთანოლის სპირტის გამოყენებით ან ანტისხეულების მომწოდებლების სპეციფიკური ინსტრუქციების შესაბამისად;

გ.ა) საჭიროებისამებრ, პრეპარატზე დაფიქსირებული უჯრედები შეიძლება შენახულ იქნეს საშრობ ყუთში, გაყინულ მდგომარეობაში მცირე დროის მანძილზე, როგორც საჭიროა (არაუმეტეს სამ თვემდე ვადით) შემდგომ ტესტირებამდე;

დ) IF პროცედურისას:

დ.ა) საცდელი პრეპარატის მომზადების დროს, ამ მუხლის მე-5 პუნქტის „ბ.ა“ ქვეპუნქტის თანახმად, მზადდება ორჯერადი განზავებები. პირველ ფოსოს უნდა ქონდეს ტიტრის  $\frac{1}{2}$  (T/2), დანარჩენებს ტიტრის  $\frac{1}{4}$  (T/4), ტიტრის  $\frac{1}{2}$  (T/2), ტიტრი (T) და ორმაგი ტიტრი (2T);

დ.ბ) საცდელი პრეპარატის მომზადებისას, ამ მუხლის მე-5 პუნქტის „ბ.ბ“-ს თანახმად, მზადდება ანტისხეულის სამუშაო განზავება (WD) IF ბუფერულ ხსნარში;

დ.გ) პრეპარატები თავსდება ნესტიან ფილტრის ქაღალდზე. თითოეული ფოსო მთლიანად იფარება ანტისხეულის შესაბამისის განზავებით. თითოეულ ფოსოში დატანილი ანტისხეულის მოცულობა სულ მცირე დასატანი ექსტრაქტის მოცულობის შესაბამისი უნდა იყოს. ანტისხეულების მომწოდებლების მითითებების არარსებობის შემთხვევაში უნდა განხორციელდეს შემდეგი პროცედურა:

დ.გ.ა) ინკუბაციის მიზნით პრეპარატები თავსდება ნესტიან ფილტრის ქაღალდზე თავსახურის ქვეშ 30 წუთის განმავლობაში გარემო ტემპერატურაზე (18-25 °C);

დ.გ.ბ) პრეპარატი დაიფერთხება და ფრთხილად ხდება გავლება IF ბუფერულ ხსნარში. ხუთი წუთის განმავლობაში თავსდება IF ბუფერულ -Tween ხსნარში და შემდეგ ირეცხება IF ბუფერული ხსნარით. არ უნდა მოხდეს აეროზოლის წარმოქმნა ან წვეთების გადასვლა, რამაც შესაძლოა ურთიერთდაბინძურება გამოიწვიოს. ფრთხილად დაშრობით შორდება ზედმეტი სისველე;

დ.გ.გ) პრეპარატები თავსდება სველ ქაღალდზე. ტიტრის დასადგენად საცდელი ფოსოები იფარება FITC კონიუგატის განზავებით. თითოეულ ფოსოში დატანილი კონიუგატის მოცულობა ისეთივე უნდა იყოს, როგორც გამოყენებული ანტისხეულის მოცულობა;

დ.გ.დ) პრეპარატის ინკუბაცია ტარდება სველ ქაღალდზე, თავსახურის ქვეშ 30 წუთის განმავლობაში გარემო ტემპერატურაზე (18 - 25 °C);

დ.გ.ე) პრეპარატი იფერთხება წვეთების მოშორების მიზნით. გაივლება და ირეცხება ამ ტექნიკურ რეგლამენტში აღწერილი პროცედურის მსგავსად. ზედმეტი ნესტი ფრთხილად უნდა მოშორდეს;

დ.გ.ვ) თითოეულ ფოსოში დაიტანება 5 - 10 მკლ. 0,1 მოლი მოლარობის ფოსფატ-ბუფერული გლიცერინის ხსნარში ან კომერციულად ხელმისაწვდომი ოპტიკური შემავსებელი და თავზე ეხურება საფარი მინა;

ე) IF ტესტის წასაკითხად:

ე.ა) მოწმდება ტესტის პრეპარატები ეპიფლუორესცენციულ მიკროსკოპზე FITC გააქტიურებისთვის საჭირო ფილტრებით, იმერსიული ზეთის ან წყლის გამოყენებით 500-1000 გადიდებაზე. 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 არეში. პირველ რიგში მოწმდება დადებითი კონტროლის პრეპარატი. უჯრედები მკვეთრად ფლუორესცენტული უნდა იყოს და მთლიანად შეღებილი განსაზღვრული ანტისხეულების ტიტრზე ან IF ტესტი განმეორებით უნდა იქნეს შესრულებული თუ უჯრედების შეღებვა არ შეესაბამება სტანდარტებს;

ე.ბ) უნდა შემოწმდეს, ფიქსირდება თუ არა პრეპარატის ფოსოებში კაშკაშა, ფლუორესცენციული უჯრედები მავნე ორგანიზმის დამახასიათებელი მორფოლოგიით. საცდელ პრეპარატებზე ფლუორესცენციული ინტენსივობა ეკვივალენტური უნდა იყოს დადებითი საკონტროლო შტამისა ანტისხეულის ერთიდაიგივე განზავებისთვის. უჯრედები, რომლებიც არასრულადაა შეღებილი ან სუსტი ფლუორესცენცია აღენიშნება, არ უნდა იქნას გათვალისწინებული. თუ არსებობს ეჭვი ნიმუშის დაბინძურების შესახებ, ტესტი უნდა განმეორდეს. იმ შემთხვევაში, თუ ერთდროულად მომზადებული ყველა პრეპარატის ფოსოებსი ფიქსირდება დადებითი შედეგი, ბუფერის დაბინძურების გამო, ან როდესაც დადებითი უჯრედები ჩანს ფოსოს გარეთ პრეპარატის ზედაპირზე;

ე.გ) არსებობს იმუნოფლუორესცენციული ტესტის სპეციფიკურობასთან დაკავშირებული რამოდენიმე პრობლემა. ატიპიური მორფოლოგიის მქონე ფლუორესცენტული უჯრედების ფონური პოპულაცია, აგრეთვე ზომითა და მორფოლოგიით მავნე ორგანიზმის მსგავსი ჯვარედინი რეაქციის მქონე საპროფიტული ბაქტერიები, შესაძლოა გამოვლინდნენ კარტოფილის სტოლონის ტუბერთან მიმაგრების ადგილზე და ღეროს სეგმენტის ნალექებში;

ე.დ) გასათვალისწინებელია მხოლოდ ტიპიური ზომის და მორფოლოგიის

მქონე ფლუორესცენციული უჯრედები შესაბამის ტიტრზე ან ანტისხეულების სამუშაო განზავებაზე;

ვ) IF მაჩვენებლის ინტერპრეტაციისას:

ვ.ა) იმ შემთხვევაში, თუ აღმოჩენილია კამკაშა ფლუორესცენციული უჯრედები დამახასიათებელი მორფოლოგიით, ფასდება ტიპური უჯრედების საშუალო რაოდენობა მიკროსკოპის მხედველობის არეში და გამოითვლება ტიპური უჯრედების რაოდენობა რესუსპენდირებული ნალექის ყოველ მლ-ზე ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N13-ის მიხედვით. IF მაჩვენებელი დადებითია ნიმუშებისთვის თუ რესუსპენდირებული ნალექის ყოველ მილილიტრში სულ მცირე  $5 \times 10^3$  ტიპური უჯრედი;

ვ.ბ) IF მაჩვენებელი უარყოფითია ნიმუშებისთვის, თუ რესუსპენდირებული ნალექის ყოველ მილილიტრში არის  $5 \times 10^3$  ტიპურ უჯრედზე ნაკლები რაოდენობა. ნიმუში უარყოფითად ითვლება და შემდგომი ტესტირება საჭირო აღარ არის.

6. როდესაც პჯრ ტესტის, როგორც ძირითადი სკრინინგ-ტესტის გამოიყენებისას პასუხი არის დადებითი, მეორე სავალდებულო სკრინინგ-ტესტის სახით უნდა ჩატარდეს გამოყოფის ან IF ტესტი. როდესაც პჯრ გამოყენებულია, როგორც მეორე სკრინინგ ტესტი და შედეგი დადებითია, დიაგნოსტიკის მიზნით საჭიროა შემდგომი ტესტირება. ამ მეთოდის, როგორც ძირითადი სკრინინგ-ტესტის გამოყენება რეკომენდებულია მხოლოდ იმ შემთხვევაში, როდესაც არსებობს ამის შესაბამისი გამოცდილება. აღნიშნული მეთოდით წინასწარმა ტესტირებამ შესაძლებელი უნდა გახადოს წინა კვლევებში უარყოფითი შედეგის მქონე ნიმუშის ექსტრაქტზე დამატებული მავნე ორგანიზმის  $10^3 - 10^4$  უჯრედის რეპროდუცირებადი გამოვლენა. მგრძობელობისა და სპეციფიკურობის მაქსიმალური დონის მისაღწევად, შესაძლოა საჭირო გახდეს ოპტიმიზაციის ექსპერიმენტები ყველა ლაბორატორიაში. აუცილებელია ვალიდირებული პჯრ რეაგენტების და პროტოკოლების გამოყენება ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N14-ის თანახმად. სასურველია, შერჩეულ იქნეს მეთოდი შიდა კონტროლით. საჭიროა დაცული იქნეს ლაბორატორიაში მუშაობის სათანადო ნორმები, რათა თავიდან იქნეს აცილებული ნიმუშის დაბინძურება სამიზნე დნმ-ით. პჯრ უნდა ჩატარდეს გამოცდილი სპეციალისტის მიერ, მოლეკულური ბიოლოგიის შესაბამის ლაბორატორიებში, რათა მინიმუმამდე შემცირდეს სამიზნე დნმ-ით დაბინძურების შესაძლებლობა. უარყოფითი კონტროლები (დნმ-ის გამოყოფისა და პჯრ-ის პროცედურებისათვის) ყოველთვის უნდა იქნეს დამუშავებული ისევე, როგორც საკვლევი ნიმუში, იმისთვის რომ გამოირიცხოს ნიმუშის დაბინძურების ალბათობა. პჯრ ტესტების:

ა) უარყოფითი კონტროლი უნდა მოიცავდეს:

ა.ა) ნიმუშების ექსტრაქტს, რომლებიც მავნე ორგანიზმის მიმართ წინასწარ დადგენილია, როგორც უარყოფითი;

ა.ბ) ბუფერულ კონტროლებს ნიმუშიდან ბაქტერიისა და დნმ-ის გამოსაყოფად;

ა.გ) შერეულ პჯრ-მიქსს (პჯრ სარეაქციო ნარევეს);

ბ) დადებითი კონტროლი უნდა მოიცავდეს:

ბ. ა) რესუსპენდირებული ნალექების ალიკვოტებს, რომლებშიც დამატებულია მავნე ორგანიზმი;

ბ.ბ) მავნე ორგანიზმის ვირულენტური იზოლატის სუსპენზიას  $10^6$  უჯრედი/მლ წყალში (NCPFB 4156=PD 2762=CFBP 3857). თუ შესაძლებელია, პჯრ ტესტში გამოყენებული დადებითი საკონტროლო ნიმუშებიდან გამოყოფილი დნმ-ს დაბინძურების ალბათობის თავიდან აცილების მიზნით, დადებითი კონტროლების მომზადება რეკომენდირებულია საანალიზო ნიმუშებისაგან იზოლირებულ გარემოში. ნიმუშის ექსტრაქტები შეძლებისდაგვარად სუფთა უნდა იყოს ნიადაგის ნარჩენებისგან. გარკვეულ შემთხვევებში, პჯრ მეთოდების გამოყენებისას, რეკომენდებულია ექსტრაქცია მოხდეს გარეცხილი კარტოფილიდან. ამ ტესტის დროს გამოსაყენებელი სტანდარტული დადებითი და უარყოფითი საკონტროლო მასალა ჩამოთვლილია ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N11-ში.

7. დნმ-ის გასუფთავებისას გამოიყენება დადებითი და უარყოფითი საკონტროლო ნიმუშები. საკონტროლო ნიმუშები მზადდება გამოსაკვლევი ნიმუშების იდენტურად. არსებობს სხვადასხვა მეთოდი, რომელიც სამიზნე დნმ-ის გასუფთავების საშუალებას იძლევა ნიმუშის სხვადასხვა სირთულის სუბსტრატებიდან. მათი მეშვეობით შესაძლებელია პჯრ და სხვა ფერმენტული რეაქციების ინჰიბიტორების მოშორება და სამიზნე დნმ-ის კონცენტრირება ნიმუშის ექსტრაქტში. მოცემული მეთოდი ოპტიმიზირებულია ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N14-ში მოცემულ ვალიდირებულ პჯრ მეთოდთან გამოსაყენებლად. დნმ-ის გასუფთავება ეფუძნება შემდეგ მეთოდებს:

ა) პასტრიკის მეთოდის (Pastrik (2000)) მიხედვით:

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  $95^{\circ}\text{C}$  ტემპერატურაზე 10 წუთის განმავლობაში;

ა.გ) სინჯარას ყინულზე ათავსებენ ხუთი წუთის განმავლობაში;

ა.დ) უმატებენ 80 მკლ ლიზოციმის კონცენტრულ ხსნარს (ლიზოციმი 50 მგ/მლ 10 mM Tris HCl [pH 8,0]) და უკეთებენ ინკუბაციას  $37^{\circ}\text{C}$  ტემპერატურაზე 30 წუთის განმავლობაში;

ა.ე) უმატებენ 220 მკლ Easy-DNA® -ის ხსნარს A (Invitrogen), შეანჯღრევენ კარგად ვორტექსზე და უკეთებენ ინკუბაციას  $65^{\circ}\text{C}$  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 1მლ აბსოლუტურ (100%) ეთანოლს (-20° C), მცირე ხნით შეანჯღრევენ ვორტექსზე და აჩერებენ ყინულზე 10 წთ-ის 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 წარმოქმნილ ნალექს აშრობენ 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 დასაღებად დააცენტრიფუგირებენ დაბალ სიჩქარეზე და პჯრ ანალიზისთვის გამოიყენებენ 5 მკლ სუპერნატანტს, რომელიც შეიცავს დნმ-ს;

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

#### 8. პჯრ ანალიზისას:

ა) გამოსაცდელი და საკონტროლო ნიმუშები მზადდება პჯრ-თვის ვალიდირებული პროტოკოლის და ამ მუხლის მე-6 - მე-10 პუნქტების შესაბამისად. აგრეთვე მზადდება ნიმუშის დნმ-ს ექსტრაქტის დეციმომლური განზავება ( 1:10-თან განზავება ულტრა სუფთა წყალში (UPW));

ბ) მზადდება პჯრ-ს შესაბამისი სარეაქციო ნარევი დაბინძურებისგან თავისუფალ გარემოში ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N14-ის შესაბამისად. შესაძლებლობის შემთხვევაში რეკომენდებულია მრავალფუნქციური პჯრ პროტოკოლის გამოყენება, რომელიც აგრეთვე მოიცავს შიდა პჯრ კონტროლს;

გ) პჯრ რეაქციის ყოველ 25 მკლ-ს ემატება 2-5 მკლ დნმ ექსტრაქტი პჯრ-ს სტერილურ სინჯარებში ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N14-ის შესაბამისად;

დ) გათვალისწინებული უნდა იქნეს პჯრ სარეაქციო ნარევის შემცველი უარყოფითი კონტროლის ნიმუში და ემატება ნიმუშის ადგილზე პჯრ ნარევი გამოყენებული ულტრა სუფთა წყალი (UPW);

ე) სინჯარები უნდა განთავსდეს იმავე თერმოციკლერში, რომელიც მანამდე იყო გამოყენებული წინასწარი ტესტირებისას და გაშვებულ უნდა იქნეს შესაბამისად ოპტიმიზირებული პჯრ პროგრამა ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N14-ის მიხედვით.

#### 9. 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 N14-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, 100 bp-ს ლადერი;

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

გ) განსაზღვრული ზომის პჯრ ამპლიფიცირებული ფრაგმენტების ვიზუალიზაციისათვის შეღებილ გელს ათავსებენ ულტრაიისფერი გამოსხივების (UV) ტრანსილუმინატორზე ( $\lambda=302$  ნმ) ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N14-ის შესაბამისად და იღებენ ფოტოს;

დ) ყველა ახალ შედეგთან/შემთხვევასთან დაკავშირებით, პჯრ ამპლიფიცირებული პროდუქტების ავთენტურობას ამოწმებენ დარჩენილი ამპლიფიცირებული დნმ-ის ნიმუშებზე რესტრიქტაზული ფერმენტების მოქმედებით. შესაბამისი ფერმენტისა და ბუფერის გამოყენებით, ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N14-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.

#### 10. პჯრ ტესტის შედეგების ინტერპრეტაციისას:

ა) პჯრ ტესტის შედეგი უარყოფითია, თუ გამოსაცდელ ნიმუშში არ გამოვლინდება მოსალოდნელი ზომის, მავნე ორგანიზმისათვის სპეციფიური პჯრ ამპლიფიცირებული პროდუქტები მაშინ, როცა დადებითი კონტროლის ყველა ნიმუშში ეს ფრაგმენტი ფიქსირდება (მულტიფლექს 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 ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N14-ის 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.

#### 11. FISH ტესტის შემთხვევაში:

ა) როდესაც FISH ტესტი გამოიყენება, როგორც პირველი სკრინინგ-ტესტი და ის აღმოჩნდება დადებითი, ამ შემთხვევაში IF ტესტი ან გამოყოფა უნდა ჩატარდეს, როგორც მეორე სავალდებულო სკრინინგ-ტესტი. როდესაც FISH ტესტი გამოიყენება, როგორც მეორე სკრინინგ-ტესტი და აღმოჩნდება დადებითი, დიაგნოსტიკის დასრულების მიზნით აუცილებელია კვლევა გაგრძელდეს ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N2-6-ის მიხედვით;

ბ) გამოიყენება ვალიდირებული მავნე ორგანიზმისთვის სპეციფიური ოლიგო-ზონდები. აღნიშნული მეთოდის გამოყენებით წინასწარმა ტესტირებამ უნდა უზრუნველყოს უარყოფითად მიჩნეული ნიმუშის ექსტრაქტებზე დამატებული სულ მცირე  $10^3 - 10^4$  უჯრედი/მლ-ზე მავნე ორგანიზმის უჯრედების აღმოჩენა;

გ) პროცედურა რეკომენდებულია ჩატარდეს ახლად მომზადებული ნიმუშის ექსტრაქტზე, თუმცა შესაძლებელია ასევე წარმატებით ჩატარდეს იმ ნიმუშის ექსტრაქტზეც, რომელიც ინახება გლიცერინში  $-16^{\circ}C$  -დან  $-24^{\circ}C$ , ან  $-68^{\circ}C$  -დან  $-86^{\circ}C$  -მდე ტემპერატურაზე;

დ) უარყოფითი კონტროლისათვის გამოიყენება იმ ნიმუშის ექსტრაქტის

ალიკვოტები, რომლებმაც წინასწარი შემოწმებით უარყოფითი შედეგი აჩვენა მავნე ორგანიზმის არსებობაზე;

ე) დადებითი კონტროლისთვის 0,01M ფოსფატურ ბუფერში (PB) 3 - 5 დღის კულტურიდან მზადდება მავნე ორგანიზმის  $10^5$  -  $10^6$  უჯრედი/მლ -ზე სუსპენზიები (შტამი NCPPB 4156=PD 2762= CFBP 3857 დანართი N11-ის შესაბამისად). ცალკე მზადდება კარტოფილის ექსტრაქტში განზავებული მავნე ორგანიზმის ჰომოგენური შტამების ან ნებისმიერი სხვა რეფერენტული შტამის დადებითი საკონტროლო ნიმუშები, როგორც ეს აღწერილია ამ ამ ტექნიკური რეგლამენტის **დანართი N11-ის მე-2 პუნქტის „ბ“ ქვეპუნქტის შესაბამისად**. FITC-ით მონიშნული ეუბაქტერიული ოლიგო-ზონდების გამოყენება იძლევა ჰიბრიდიზაციის პროცესის კონტროლის საშუალებას, რამდენადაც ის ღებავს ნიმუშში არსებულ ყველა ეუბაქტერიას. ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი **N11-ის მე-2 პუნქტის „ა“ ქვეპუნქტში** ჩამოთვლილი მასალები შესაძლებელია გამოყენებულ იქნეს, როგორც სტანდარტული დადებითი და უარყოფითი კონტროლები. საკონტროლო მასალების ტესტირება ხდება საგამოცდო ნიმუშის იდენტიფიკაციის მიზნით;

ვ) კარტოფილის ექსტრაქტის ფიქსაციისას:

ვ.ა) კარტოფილის ექსტრაქტის ფიქსაციის პროტოკოლი ეფუძნება Wullings et al., (1998)-ის მეთოდს;

ვ.ბ) საფიქსაციო ხსნარი მზადდება ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N15-ის შესაბამისად;

ვ.გ) თითოეული ნიმუშის 100 მკლ ექსტრაქტი პიპეტირებით გადაიტანება ეპენდორფის სინჯარაში და დაცენტრიფუგირდება შვიდი წუთი 7 000 გ -ზე;

ვ.დ) სუპერნატანტი სცილდება და ნალექი იხსნება 200 მკლ. საფიქსაციო ხსნარში (რომელიც მომზადებულია გამოყენებამდე არაუმეტეს 24 სთ-ით ადრე). ვორტექსზე შეინჯღრევა და ერთი საათის განმავლობაში ინკუბაცია ხდება მაცივარში;

ვ.ე) დაცენტრიფუგირდება 7 წუთი 7 000 გ-ზე, მოსცილდება სუპერნატანტი და ხელახლა გაიხსნება ნალექი 75 მკლ 0.01M ფოსფატის ბუფერში ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N15-ის შესაბამისად;

ვ.ვ) საფიქსაციო ხსნარის 16 მკლ ეწვეთება სუფთა მრავალფოსფორიან სასაგნე მინაზე, როგორც ეს ნაჩვენებია ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N17-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  $-20^{\circ}\text{C}$  ტემპერატურაზე 1 მოცულობა 96%-იანი ეთნოლის დამატების შემდეგ. იმ შემთხვევაში, თუ საჭირო გახდება FISH ტესტის განმეორება, ეთნოლი მოსცილდება ცენტრიფუგირებით და დაემატება 0,01 PB-ს თანაბარი მოცულობა (შეინჯღრევა ვორტექსზე);

ვ.ზ) პრეპარატები შრება ჰაერზე (ან პრეპარატის საშრობით 37°C ტემპერატურაზე) და ფიქსირდება ალზე გატარებით;

ვ. თ) ამ ეტაპზე შესაძლებელია პროცედურის შეწყვეტა და ჰიბრიდიზაციის მომდევნო დღეს გაგრძელება. პრეპარატები შენახული უნდა იყოს მშრალ და მტვრისგან დაცულ ადგილას ოთახის ტემპერატურაზე;

ზ) ჰიბრიდიზაციისას:

ზ.ა) პრეპარატის ფოსოების დეჰიდრატაცია ხდება 50%, 80% და 96%-იანი ეთანოლით მოცემული თანმიმდევრობით, ერთი წუთის ინტერვალით. შტატივში მოთავსებული პრეპარატები შრება ჰაერზე.

ზ.ბ) მზადდება ნოტიო საინკუბაციო კამერა: ჰერმეტიულად დახურული ყუთის ძირზე იფინება 1 x საჰიბრიდიზაციო ნარევი დასველებული ქსოვილი ან ფილტრის ქაღალდი. ყუთი წინასწარი ინკუბაციისათვის თავსდება ჰიბრიდიზაციის ლუმელში 45°C ტემპერატურაზე სულ მცირე 10 წუთი;

ზ.გ) 10-10 მკლ ჰიბრიდიზაციის ხსნარი დაიტანება პლანშეტ(ებ)ის რვა (1,2,4,5,6,7,9 და 10) ფოსოში, ისე რომ ორი ცენტრალური ფოსო (3 და 8) დარჩეს ცარიელი;

ზ.დ) თითოეული პრეპარატისთვის გამოიყენება ორი საფარი მინა (24 x 24 მმ) (არ უნდა შეჰყვეს ჰაერი). პრეპარატები თავსდება წინასწარ გამთბარ ნოტიო კამერაში და მთელი ღამით ჩერდება ლუმელში 45°C ტემპერატურაზე, სიბნელეში ჰიბრიდიზაციისთვის;

ზ.ე) მზადდება სამი საზომი ჭიქა: ერთი 1 ლ ულტრა სუფთა წყალით (UPW), მეორე 1 ლ 1 x საჰიბრიდიზაციო ნარევი (334 მლ 3 x საჰიბრიდიზაციო ნარევი და 666 მლ ულტრა სუფთა წყალი (UPW)), ხოლო მესამე 1 ლ 1/8 x საჰიბრიდიზაციო ნარევი (42 მლ 3 x საჰიბრიდიზაციო ნარევი და 958 მლ ულტრა სუფთა წყალი (UPW)). თითოეულ მათგანს უტარდება წინასწარი ინკუბაცია 45°C ტემპერატურაზე წყლის აბაზანაში;

ზ.ვ) პრეპარატებს სცილდება საფარი მინები და თავსდება შტატივში;

ზ.ზ) ზონდების ზედმეტი ნარჩენების მოსაცილებლად თავსდება საზომ ჭიქაში, რომელშიც ასხია 1x საჰიბრიდიზაციო ნარევი და უკეთდება ინკუბაცია 45°C ტემპერატურაზე, 15 წუთის განმავლობაში;

ზ.თ) შტატივი გადაიტანება 1/8x საჰიბრიდიზაციო ნარევის გასარეცხ ხსნარში და დაყოვნდება 15 წუთის განმავლობაში;

ზ.ი) პრეპარატები ძალიან ცოტახნით თავსდება ულტრა სუფთა წყალში (UPW) და გადაიტანება ფილტრის ქაღალდზე. ზედმეტი სითხის მოსაცილებლად ფრთხილად ეფარება ფილტრის ქაღალდი. პიპეტით ეწვეთება 5-10 მკლ ოპტიკური შემავსებელი ხსნარი (Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA ან სხვა მსგავსი) თითოეულ ფოსოზე და პრეპარატს მთლიანად ეფარება დიდი საფარი მინა (24X60 მმ).

## 12. FISH ტესტის მონაცემების წაკითხვის მიზნით:

ა) პლანშეტები დაუყოვნებლივ მოწმდება იმერსიული ზეთის ქვეშ ეპიფლუორესცენტული დაკვირვებისთვის აღჭურვილი მიკროსკოპით 630 ან 1000 x გადიდებაზე. ფილტრით, რომელიც შეესაბამება ფლუორესცენტულ იზოთიოციანატს (FITC) ნიმუშში არსებული ეუბაქტერიული უჯრედები (მათ შორის მეტი წილი გრამუარყოფითი უჯრედებისა) ჩანს ფლუორესცენტულ მწვანედ. ტეტრამეთილროდამინ-5-იზოთიოციანატის ფილტრის გამოყენებით Cy3-ით შეღებილი მავნე ორგანიზმის უჯრედები იღებენ ფლუორესცენტულ წითელ შეფერილობას. ხდება უჯრედის მორფოლოგიის შედარება დადებითი კონტროლის უჯრედებთან. უჯრედები უნდა იყოს ძლიერ ფლუორესცენტული და მთლიანად შეღებილი. არასაკმარისად შეღებვის შემთხვევაში FISH ტესტი უნდა იქნეს განმეორებული. 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 არეში;

ბ) პრეპარატების საკვლევ ფოსოში დაკვირვება ხდება მავნე ორგანიზმის დამახასიათებელი მორფოლოგიური ნიშნების მქონე, ძლიერ ფლუორესცენტულ უჯრედებზე. ფლუორესცენციის ინტენსივობა უნდა იყოს დადებითი კონტროლის შტამის ეკვივალენტური, ან უფრო ძლიერი. არასრულად შეღებილი ან სუსტი ფლუორესცენციის მქონე უჯრედები უნდა იქნას იგნორირებული;

გ) თუ არსებობს დაბინძურებასთან დაკავშირებული ეჭვი, აუცილებელია ტესტის განმეორება. კერძოდ, ეს შესაძლოა იყოს ისეთი შემთხვევები, როდესაც მომზადებული ყველა პრეპარატი ბუფერის დაბინძურების გამო, აჩვენებს დადებით შედეგს ან დადებითი უჯრედები ჩანს საკვლევ ფოსოს გარეთ სასაგნე მინაზე;

დ) არსებობს FISH ტესტის სპეციფიკისთვის დამახასიათებელი რამდენიმე პრობლემა. კერძოდ, ატიპიური 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 სტოლონის ტუბერთან მიმაგრების ადგილიდან აღებული ქსოვილის და ღეროს სეგმენტის ნალექებში;

ე) გათვალისწინებულ უნდა იქნეს მხოლოდ ტიპური ზომისა და მორფოლოგიის მქონე ფლუორესცენტული უჯრედები.

## 13. FISH ტესტის შედეგების ინტერპრეტაციისას:

ა) FISH ტესტის შედეგები ვალიდურია, თუ ყველა დადებით კონტროლში FITC ფილტრის საშუალებით გამოვლინდება მავნე ორგანიზმისათვის 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, გამოითვლება ტიპური უჯრედების საშუალო რაოდენობა მიკროსკოპის მხედველობის თითოეულ ველზე და ტიპური უჯრედების რაოდენობა გახსნილი ნალექის ყოველ ერთ მლ-ში. ნიმუშები, რომლებიც გახსნილი ნალექის ერთ მლ-ში შეიცავენ სულ მცირე  $5 \times 10^3$  ტიპურ უჯრედს ითვლებიან პოტენციურად დაბინძურებულად. შესაბამისად, აუცილებელია შემდგომი შემოწმების ჩატარება. ტესტის შედეგები უარყოფითია იმ ნიმუშებისთვის, რომლებშიც გახსნილი ნალექის ერთ მლ-ში ტიპური უჯრედების რაოდენობა  $5 \times 10^3$ -ზე ნაკლებია;

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

14. ELISA ტესტის შემთხვევაში დაბალი მგრძნობელობის გამო, მისი, როგორც დამატებითი ტესტის ჩატარება ნებაყოფლობითია IF, FISH და პჯრ ტესტების შემდგომ. DAS ELISA გამოყენების შემთხვევაში, ტესტის მგრძნობელობის გაზრდის მიზნით, სავალდებულოა მონოკლონური ანტისხეულების გამოყენება და ტესტის დაწყებამდე ნიმუშების გამდიდრება. თუმცა შესაძლებელია ტესტი წარუმატებელი იყოს ნიმუშში სხვა კონკურენტული ორგანიზმების არსებობის გამო. გამოყენებულ უნდა იქნეს მავნე ორგანიზმის ანტისხეულების ვალიდირებული წყარო. რეკომენდებულია, რომ ტიტრი განისაზღვროს ანტისხეულის ყოველი ახალი პარტიისთვის. ტიტრი არის უმაღლესი განზავება, რომელიც ოპტიმალურ რეაქციას იძლევა სუსპენზიაში მავნე ორგანიზმის ჰომოლოგიური შტამის  $10^5$  - $10^6$  უჯრედი/მლ შემცველობისას და შესაბამისი მეორადი ანტისხეულების კონიუგატების გამოყენებისას, მწარმოებლის რეკომენდაციების თანახმად. ტესტირების დროს ანტისხეულების სამუშაო ხსნარის განზავება უნდა ემთხვეოდეს, ან მიახლოებული იყოს კომერციული წარმოების ანტისხეულების ხსნარის ტიტრთან. ანტისხეულების ტიტრი დგინდება სუსპენზიით, რომლის ყოველ მლ-ში არის მავნე ორგანიზმის ჰომოლოგიური შტამის  $10^5$  - $10^6$  უჯრედი. ტესტირებისას უარყოფით კონტროლად გამოყენებულ უნდა იყოს ნიმუშის ექსტრაქტი, რომელმაც წინა გამოკვლევისას აჩვენა მავნე ორგანიზმის არსებობაზე უარყოფითი შედეგი და აგრეთვე, ფოსფატის მარილის ბუფერში (PBS) არაჯვარედინი რეაქციის ბაქტერიის სუსპენზია. ნიმუშის ექსტრაქტის ალიქვოტები, რომელმაც მანამდე აჩვენა უარყოფითი შედეგი, გამოიყენება დადებითი კონტროლისათვის. ამისთვის მას უნდა დაემატოს მავნე ორგანიზმის, ბიოვარი 2-ის  $10^3$ - $10^4$  უჯრედი ყოველ მლ-ზე (მაგ. შტამი NCPPB 4156= PD 2762=CFBP 3857), ამ ტექნიკური რეგლამენტის **დანართი N11-ის მე-2 პუნქტის „გ“ ქვეპუნქტის თანახმად**. ტესტის შედეგების შესადარებლად თითოეულ თასზე გამოყენებულ უნდა იქნეს სტანდარტული სუსპენზია, რომელშიც არის  $10^5$  - $10^6$  უჯრედი/მლ PBS ბუფერში. უზრუნველყოფილ იქნეს, თასზე, დადებითი კონტროლის ნიმუშების სატესტო

ნიმუშებისაგან კარგად გამოცალკევება. დადებითი და უარყოფითი საკონტროლო მასალების ჩამონათვალი მოცემულია ამ ტექნიკური რეგლამენტის **დანართი N11-ის მე-2 პუნქტის „ა“ ქვეპუნქტში**. საკონტროლო მასალის ტესტირება ისევე უნდა ჩატარდეს, როგორც ნიმუშ(ებ)ისა.

15. ELISA-თვის ვალიდირებული იქნა ორი პროტოკოლი:

ა) არაპირდაპირი ELISA-ს (Robinson Smith *et al.*, 1995) დროს:

ა.ა) გამოიყენება 100 – 200 მკ.ლ ნიმუშის ექსტრაქტის ალიქვოტები (გაცხელებამ 100°C-ზე წყლის აბაზანაში ან გათბობის ბლოკში შეიძლება შეამციროს არასპეციფიკური შედეგების ალბათობა ზოგიერთ შემთხვევაში);

ა.ბ) ემატება თანაბარი მოცულობის ორმაგი სიძლიერის დამფენი ბუფერი და ხდება შენჯღრევა ვორტექსზე;

ა.გ) თევზის სულ მცირე ორ ფოსოში დაიტანება 100-100 მკლ ალიქვოტი ( მგალითად Nunc-polysorp ან ეკვივალენტური) და თავსდება ერთი საათით 37 °C-ზე ან მთელი ღამით 4 ° C-ზე;

ა.დ) თევზის ფოსოები თავისუფლდება ექსტრაქტისაგან და სამჯერ ირეცხება ფოსფატის მარილის ბუფერული ხსნარით (დანართი N9), ბოლო გარეცხვას ხსნარი რჩება ფოსოებში სულ მცირე 5 წუთით;

ა.ე) მზადდება მავნე ორგანიზმის შესაბამისი ანტისხეულების ხსნარი დამჭერ ბუფერში. ვალიდირებული კომერციული ანტისხეულებისათვის გამოიყენება რეკომენდებული განზავებები (ჩვეულებრივ ტიტრთან შედარებით ორჯერ კონცენტრირებული);

ა.ვ) თითოეულ ფოსოში ემატება 100 მკლ და ინკუბირდება ერთი საათის განმავლობაში 37 °C-ზე;

ა.ზ) ფოსოები თავისუფლდება ექსტრაქტებისგან და ირეცხება ამ პუნქტის „ა.დ“ ქვეპუნქტის შესაბამისად;

ა.თ) დამჭერ ბუფერში მზადდება მეორადი ანტისხეულების ტუტე ფოსფატაზას კონიუგატი. თითოეულ ფოსოს ემატება 100 მკლ და ყოვნიდება 1 საათის განმავლობაში 37°C-ზე;

ა.ი) ფოსოები თავისუფლდება კონიუგატისგან და ირეცხება ამ პუნქტის „ა.დ“ ქვეპუნქტის შესაბამისად;

ა.კ) თითოეულ ფოსოში ემატება 100 მკლ ტუტე ფოსფატაზას სუბსტრატის ხსნარი ინკუბაცია ხდება სიბნელეში გარემოს ტემპერატურაზე და აბსორბცია იკითხება 90 წუთის ინტერვალით 405 ნმ-ზე;

ბ) DASi ELISA-ს დროს:

ბ.ა) მზადდება მავნე ორგანიზმის ანტი-პოლიკლონური იმუნოგლობულინის შესაბამისი განზავებები დამფენ ბუფერში (PH 9.6). თითოეულ ფოსოში ემატება 200



მკლ. დაყოვნება ხდება 37 °C-ზე, 4-5 სთ, ან 4 °C -ზე 16 სთ;

ბ.ბ) ფოსოები სამჯერ ირეცხება PBS-Tween ბუფერით. ემატება 190 მკლ ნიმუშის ექსტრაქტი სულ მცირე ორ ფოსოში. ყოველ თეფშზე ორ-ორ ფოსოში ემატება დადებითი და უარყოფითი კონტროლები. ინკუბაცია ხდება 16 საათის განმავლობაში 4 °C-ზე;

ბ.გ) ფოსოები ირეცხება სამჯერ PBS-Tween ბუფერით;

ბ.დ) მზადდება მავნე ორგანიზმის სპეციფიკური მონოკლონური ანტისხეულების შესაბამისი განზავებები ფოსფატის მარილის ბუფერში, რომელიც აგრეთვე უნდა შეიცავდეს 0.5% ხარის ალბუმინის შრატს, 190 მკლ ემატება თითოეულ ფოსოს და ყოვნდება 37°C-ზე ორი საათით;

ბ.ე) ფოსოები სამჯერ ირეცხება PBS-Tween ბუფერით;

ბ.ვ) მზადდება ანტი-თაგვის იმუნოგლობულინის კონიუგატის შესაბამისი განზავებები PBS ბუფერში გახსნილი ტუტე ფოსფატით. 190 მკლ ემატება თითოეულ ფოსოს და ინკუბირდება 37°C -ზე ორი საათით;

ბ.ზ) ფოსოები სამჯერ ირეცხება PBS-Tween ბუფერით;

ბ.თ) მზადდება ტუტე ფოსფატას სუბსტრატის ხსნარი რომელიც შეიცავს 1მგ p-ნიტროფენილფოსფატს სუბსტრატის ბუფერის 1 მლ-ზე, თითოეულ ფოსოს ემატება 200 მკლ-ის ოდენობით, ოთახის ტემპურაზე და აბსორბციის იკითხება 90 წუთის ინტერვალით 40 ნმ-ზე;

გ) ELISA ტესტის შედეგების წაკითხვისას: ELISA ტესტი უარყოფითა თუ წაკითხვის საშუალო ოპტიკური სიმკვრივე ნიმუშის დუბლირებულ ფოსოში არის ორჯერ ნაკლები, ვიდრე უარყოფითი ნიმუშის ექსტრაქტის საკონტროლო ფოსოში, იმ პირობით, რომ დადებითი კონტროლის ოპტიკური სიმჭიდროვე არის 1.0 -ზე მაღალი (სუბსტრატთან ინკუბირების 90 წთ-ის შემდეგ) და უარყოფითი ნიმუშის ოპტიკური სიმკვრივეზე ორჯერ მეტია. ELISA ტესტი დადებითია თუ წაკითხვის საშუალო ოპტიკური სიმკვრივე ნიმუშის დუბლირებულ ფოსოში არის 2-ჯერ მეტი, ვიდრე უარყოფითი საკონტროლო ნიმუშის ოპტიკური სიმკვრივე, ხოლო თავად უარყოფითი საკონტროლო ნიმუშის ოპტიკური სიმკვრივე დადებითი კონტროლის ნიმუშზე 2-ჯერ ნაკლები უნდა იყოს. დადებითი კონტროლის ფოსოებში ELISA ტესტის უარყოფითი შედეგები მიუთითებს იმაზე რომ ტესტი არ იქნა ჩატარებული სწორად, ან იქნა ინჰიბირებული. უარყოფითი კონტროლის ფოსოებში ELISA ტესტის დადებითი შედეგები მიუთითებს იმაზე, რომ ადგილი აქვს ჯვარედინ დაბინძურებას ან არასპეციფიკური ანტისხეულის არსებობას.

16. ბიოტესტით მავნე ორგანიზმის გამოკვლევისას:

ა) წინასწარი ტესტირების მეთოდმა უნდა აჩვენოს ტესტირებული უარყოფით ნიმუშის ექსტრაქტში მილილიტრში მავნე ორგანიზმის  $10^3$  - $10^4$  კოლონიის წარმომქმნელი ერთეულის გამოვლენის განმეორებითობა. მაქსიმალური

მგრძნობელობის გამოსავლენად სასურველია გამოყენებულ იქნეს ახლად მომზადებული ნიმუშის ექსტრაქტი და ზრდისთვის ოპტიმალური პირობები. თუმცა, მეთოდის წარმატებით განხორციელება შესაძლებელია იმ ექსტრაქტებით, რომლებიც ინახებიან გლიცერინში  $-68^{\circ}\text{C}$ -დან  $-86^{\circ}\text{C}$ -მდე ტემპერატურაზე;

ბ) პროტოკოლი ეფუძნება Janse (1988), რომლის თანახმად:

ბ.ა) გამოიყენება მავნე ორგანიზმისადმი მიმღებიანი პომიდორის 10 საცდელი მცენარე (Moneymaker ან სხვა ასეთივე მიმღებიანი ჯიშები.) სამი ნამდვილი ფოთლის ფაზაში. ალტერნატიულად შესაძლებელია გამოყენებულ იქნას ბადრიჯნის მცენარე (Black Beauty ჯიში ან სხვა ჯიშები ეკვივალენტური მიმღებიანობით) მეორე და მესამე ფოთლის ფაზაში, სანამ მოხდება მესამე ფოთლის სრულად განვითარება. ბადრიჯანში, დაავადების სიმპტომები იქნება ნაკლებ მწვავე და განვითარება იქნება შედარებით ნელი. თუ შესაძლებელია, უმჯობესია პომიდორის ჩითილების გამოყენება;

ბ.ბ) 100 მკლ ნიმუშის ექსტრაქტი ნაწილდება საცდელ მცენარეზე, როდესაც:

ბ.ბ.ა) ღეროზე, ჩანასახოვანი ფოთოლის ზემოთ, ინოკულაცია ხდება ისეთი შპრიცის გამოყენებით, რომელსაც ერგება ჰიპოდერმული ნემსი (არანაკლები 23 G - ზომის). ნიმუში ნაწილდება საცდელ მცენარეებზე;

ბ.ბ.ბ) დასერვის მეთოდით ინოკულაციისას მცენარე მოექცევა ორ თითს შორის. ღეროზე ჩანასახოვან ფოთოლსა და პირველ ნამდვილ ფოთოლს შორის ეწვეთება სუსპენზია (დაახლოებით 5-10 მკლ). გამოიყენება სტერილური ლანცეტი, კეთდება დაახლოებით 1.0 სანტიმეტრი სიგრძის დიაგონალური ჭრილი, ღეროს 2/3 სიღრმეზე. გაჭრა იწყება იმ ადგილიდან სადაც წვეთია დაწვეთებული. დასერილი ადგილი შპრიცის საშუალებით იფარება სტერილური ვაზელინით;

გ) 5 მცენარეში ინოკულაცია ხდება იგივე მეთოდების გამოყენებით, წყლიანი სუსპენზიით, რომელიც შეიცავს მავნე ორგანიზმის კულტურას  $10^5$ - $10^6$  უჯრედი/მლ. გამოიყენება მავნე ორგანიზმის 48 საათიანი მომზადებული ვირულენტური შტამი ბიოვარ 2, როგორც დადებითი კონტროლი და ნალექის ბუფერი (დანართი N9), როგორც უარყოფითი კონტროლი. ჯვარედინი დაბინძურების თავიდან ასაცილებლად ერთმანეთისაგან უნდა განცალკევდეს დადებითი და უარყოფითი საკონტროლო მცენარეები;

დ) სადელი მცენარეების გაზრდა ხდება კარანტინის პირობებში არა უმეტეს ოთხი კვირისა,  $25$ - $30^{\circ}\text{C}$ -ზე, მაღალი ტენიანობის და შესაბამისი მორწყვის უზრუნველყოფით, რათა თავიდან იქნას აცლებული წყლის უკმარისობით გამოწვეული გაუწყლობა და ჭკნობა. იმისთვის, რომ თავიდან ავიცილოთ დადებით და უარყოფით კონტროლებს შორის ურთიერთდაბინძირება, მცენარეები უნდა იქნენ განთავსებულნი განცალკავებულ სადგამებზე სათბურში ან ზრდის კამერაში. იმ შემთხვევაში, თუ სივრცე შეზუდულია, უზრუნველყოფილ უნდა იქნეს დამუშავებებს შორის მკაცრი განცალკავება. თუ აუცილებელია, რომ სხვადასხვა მცენარის ნიმუშები მოთავსებული იყვნენ ერთმანეთთან ახლოს, მათი ერთმანეთისგან გამოყოფა უნდა

მოხდეს შესაბამისი ზადით. მორწყვის, საკვები ნივთიერებების შეტანის, დაკვირვების და ნებისმიერი სხვა მოქმედებების დროს გამოჩენილ უნდა იქნას უდიდესი სიფრთხილე, რათა თავიდან იქნეს აცილებული ჯვარედინი დაბინძურება. აუცილებელია სათბურები და ზრდის კამერები დაცულ იქნეს მწერებისგან, რათა ნიმუშიდან ნიმუშზე არ მოხდეს ბაქტერიების გადატანა. დაკვირვება უნდა მოხდეს ჭკნობის, ქლოროზის, ეპინასტიის და /ან ზდის შეჩერების სიმპტომებზე;

ე) ამ ტექნიკური რეგლამენტის მე-16 მუხლის თანახმად, დასნებოვნებული მცენარიდან ხდება მავნე ორგანიზმის სავარაუდო სუფთა კულტურის გამოყოფა და იდენტიფიკაცია;

ვ) თუ სამი კვირის შემდეგ სიმპტომები არ გამოვლინდა, თითოეული საცდელი მცენარის ინოკულაციის ადგილიდან 1 სმ-ის ზემოთ ღეროს ნაწილების შერეულ ნიმუშზე ტარდება IF/პჯრ/გამოყოფის ტესტები. თუ შედეგი დადებითია ხდება გადათესვა განზავებით;

ზ) უნდა მოხდეს სავარაუდო მავნე ორგანიზმის სუფთა კულტურების იდენტიფიკაცია ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართი N12-ის შესაბამისად. ბიოტესტის შედეგები ვალიდურია, როდესაც დადებითი საკონტროლო მცენარეები ამჟღავნებენ ტიპიურ სიმპტომებს, ხოლო უარყოფითი საკონტროლო მცენარეები არ ამჟღავნებენ ტიპიურ სიმპტომებს. სიმპტომური დადებითი საკონტროლო მცენარიდან ბაქტერია შესაძლებელია თავიდან იქნეს გამოყოფილი. ბიოლოგიური ტესტი უარყოფითია თუ საცდელი მცენარეები არ არის დასნებოვნებული მავნე ორგანიზმით და უზრუნველყოფს, რომ მავნე ორგანიზმი გამოვლენილ იქნეს დადებით კონტროლებში. ბიოტესტის შედეგები დადებითია თუ საცდელი მცენარეები დასნებოვნებულია მავნე ორგანიზმით.

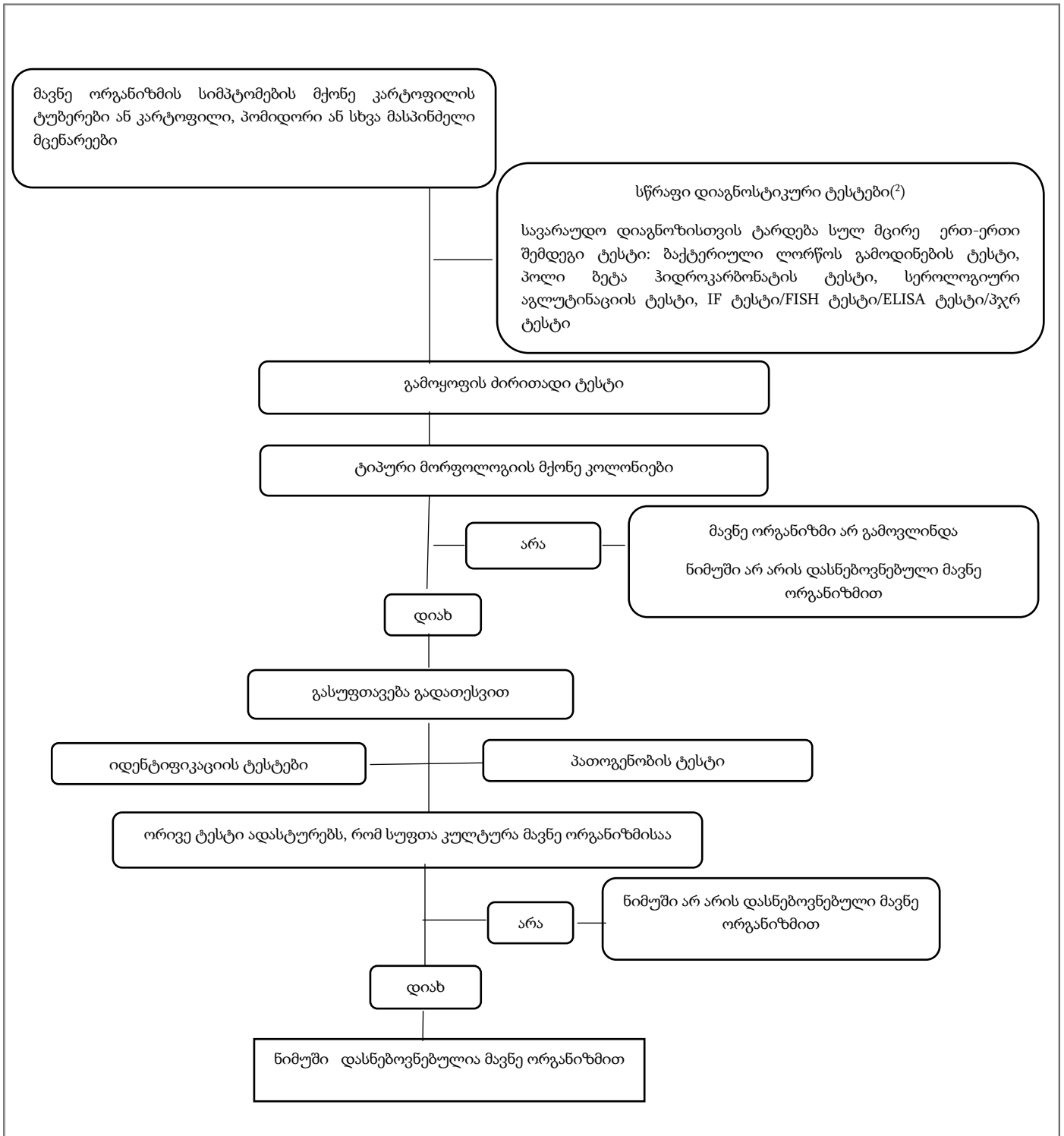
## დანართი N1

### მავნე ორგანიზმის მასპინძელი მცენარეები

1. კარტოფილის *Solanum tuberosum* L. მცენარეები ( ტუბერების ჩათვლით), გარდა ნამდვილი თესლისა.
2. პომიდორის *Lycopersicon lycopersicum* (L.) Karsten ex Farw. მცენარეები, გარდა ნაყოფისა და თესლისა.

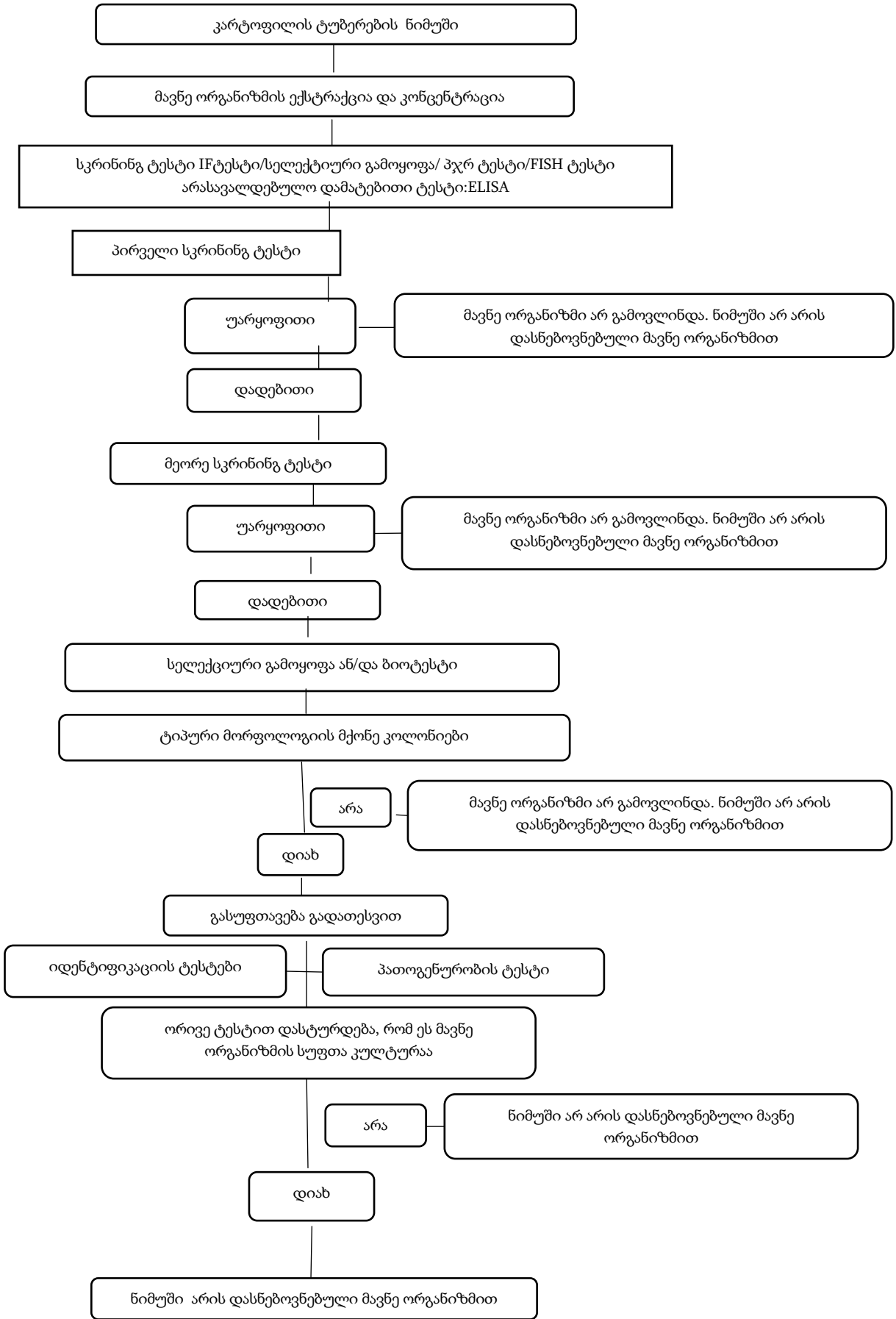
დანართი N2

მაგნე ორგანიზმების გამოვლენა კარტოფილის ტუბერებში და მაგნე ორგანიზმების  
სიმპტომების მქონე კარტოფილის, პომიდორის, ან სხვა მასპინძელი მცენარეების  
ნიმუშებში



**დანართი N3**

უსიმპტომო კარტოვილის ტუბერეზის ნიმუშებში მაგნი ორგანიზმის გამოვლენა და იდენტიფიკაცია



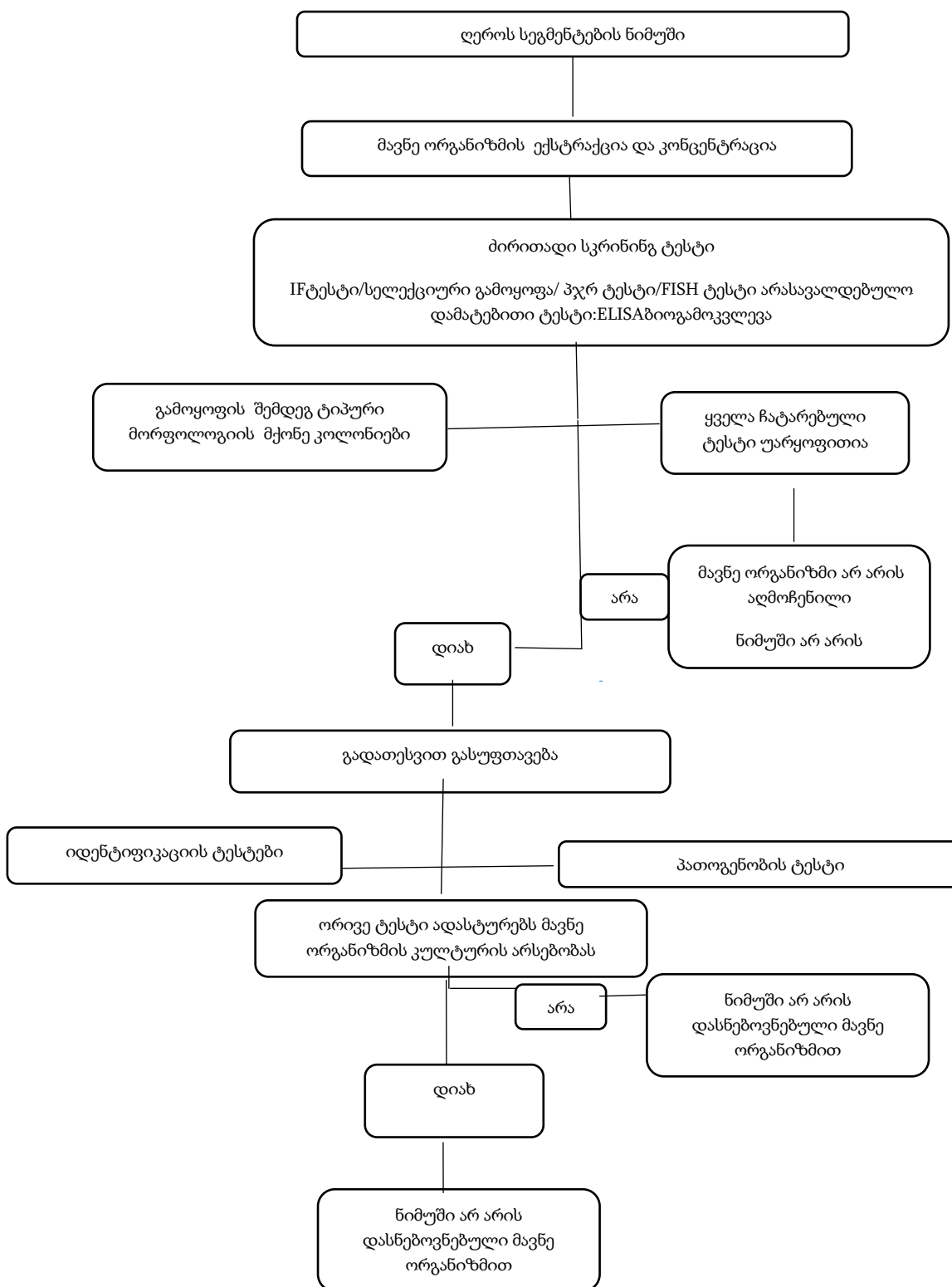
1. სტანდარტული ნიმუშის რაოდენობაა 200 ტუბერი. თუ 200 ტუბერი ხელმისაწვდომი არ არის, პროცედურის განხორციელება შესაძლებელია შედარებით მცირე რაოდენობის ნიმუშზეც.

2. იმ შემთხვევაში, თუ სხვადასხვა ბიოლოგიურ პრინციპებზე დაყრდნობით სულ მცირე ორი ტესტი დადებითია, საჭიროა განხორციელდეს გამოყოფა და დადასტურება. ტარდება სულ მცირე ერთი სკრინინგ-ტესტი. თუ ტესტის შედეგი უარყოფითია, ნიმუშიც მიიჩნევა უარყოფითად, ხოლო თუ ტესტი დადებითია, საჭიროა დამატებით სკრინინგ-ტესტების ჩატარება სხვადასხვა ბიოლოგიურ პრინციპებზე დაყრდნობით, რათა დადასტურდეს პირველი დადებითი შედეგი. თუ მეორე ან სხვა ტესტები უარყოფითია, ნიმუში უარყოფითად ითვლება. შემდგომი ტესტები საჭირო აღარ არის.

3. კულტივირება, ან ბიოტესტები შესაძლოა წარუმატებელი აღმოჩნდეს საპროფიტული ბაქტერიებით გამოწვეული კონკურენციის ან ინჰიბირების შედეგად. თუ სკრინინგ-ტესტებში მიღებულია აშკარა დადებითი შედეგები, მაგრამ გამოყოფის ტესტები უარყოფითია, გამოყოფის ტესტები უნდა განმეორდეს იმავე სინჯარიდან, ან უნდა აღებულ იქნეს დამატებითი ჭურჭელბოჭკოვანი ქსოვილი იმავე ნიმუშის გაჭრილი ტუბერებიდან და საჭიროების შემთხვევაში ჩატარდეს დამატებითი ნიმუშების ტესტირება.

დანართი N4

უსიმპტომო კარტოფილის, პომიდორის ან სხვა მასპინძელი მცენარეების ნიმუშებში მავნე ორგანიზმის გამოვლენა და იდენტიფიკაცია



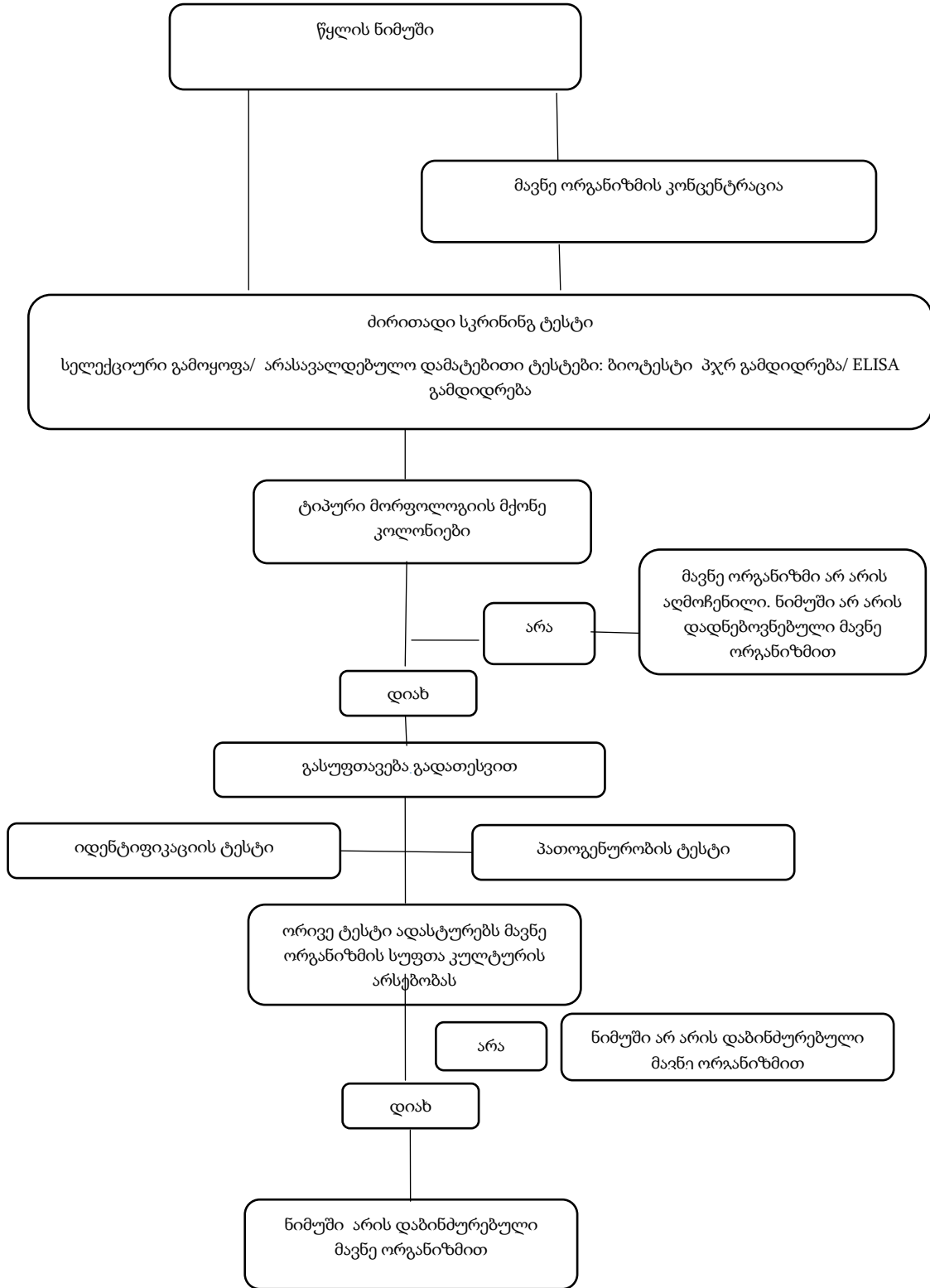
1. იმ შემთხვევაში, თუ სულ მცირე ორი, სხვადასხვა ბიოლოგიურ პრინციპებზე დაფუძნებული ტესტი დადებითია, საჭიროა განხორციელდეს გამოყოფა და დადასტურება. ტარდება სულ მცირე ერთი სკრინინგ-ტესტი. თუ ტესტის შედეგი უარყოფითია, ნიმუშიც უარყოფითია, ხოლო თუ ტესტი დადებითია, საჭიროა მეორე



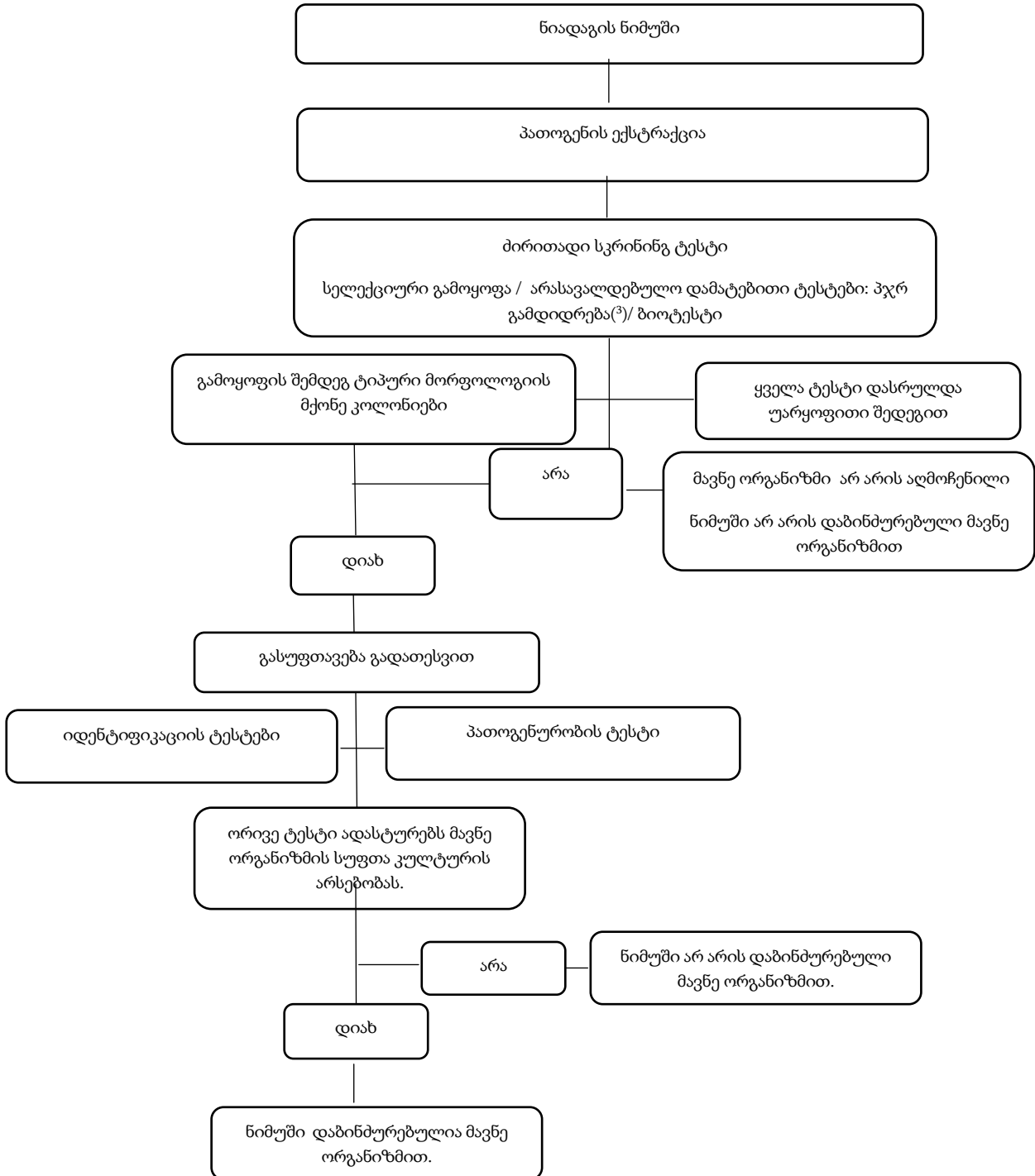
ან მეტი სკრინინგ-ტესტის ჩატარება სხვადასხვა ბიოლოგიურ პრინციპებზე დაყრდნობით, რათა დადასტურდეს პირველი დადებითი შედეგი. თუ მეორე ან სხვა ტესტები უარყოფითია, ნიმუში უარყოფითად ითვლება. შემდგომი ტესტები საჭირო აღარ არის.

2. კულტივირება ან ბიოტესტი შესაძლოა წარუმატებელი აღმოჩნდეს საპროფიტული ბაქტერიის მიერ გამოწვეული კონკურენციის ან ინჰიბირების შედეგად. თუ სკრინინგის ტესტებში მიღებულია აშკარა დადებითი შედეგები, მაგრამ გამოყოფის ტესტები უარყოფითია, გამოყოფის ტესტები უნდა განმეორდეს.

## წყალში მავნე ორგანიზმის გამოვლენა და იდენტიფიკაცია



## ნიადაგში მავნე ორგანიზმის გამოვლენა და იდენტიფიკაცია













მაგნე ორგანიზმის კულტივირება შესაძლოა წარუმატებელი აღმოჩნდეს საპროფიტული ბაქტერიის მიერ გამოწვეული კონკურენციის ან ინჰიბირების შედეგად. იმ შემთხვევაში, თუ ძალიან მაღალია საპროფიტების პოპულაცია, მაშინ გამოყოფის ტესტის სანდოობის მიზნით, უნდა მოხდეს ნიმუშის განზავება და თავიდან გამოყოფა.

დანართი N7











სატესტო პრეპარატის მომზადება  
რესუსპენდირებული ნალექის განზავება

რესუსპენზირებადი ნალექის განზავება	1/100	1/1	1/1	1/1	1/1
ანტიშრატის/ ანტისხეულის ორჯერადი განზავება (T=ტიტრი)	T/2	T/4	T/2	T	2T -

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

სატესტო პრეპარატის მომზადება  
ანტიბრატი/ანტისხეულის სამუშაო განზავება

რესუსპენდირებული ნალექის ათჯერადი განზავება	1/1	1/10	1/100	ცარიელი	ცარიელი
---	-----	------	-------	---------	---------

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

ტესტირების პროცედურებისათვის საჭირო ბუფერები

ზოგადი ინფორმაცია: გაუხსნელი სტერილური ბუფერები შეიძლება შენახულ იქნეს ერთი წლის განმავლობაში

1. საექსტრაქციო ბუფერები მოიცავს:

ა) საექსტრაქციო ბუფერს (50 მმოლი ფოსფატის ბუფერული ხსნარი, pH 7,0), რომელიც გამოიყენება მცენარის ქსოვილიდან ბაქტერიის ექსტრაქციისთვის ჰომოგენიზაციის ან შენჯღრევის გზით.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ( უწყლო)	4,26 გ
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,72 გ
გამოხდილი წყალი	1.00 ლ

ინგრედიენტები იხსნება, მოწმდება pH და ავტოკლავით ხდება სტერილიზაცია 121 °C-ზე 15 წუთის განმავლობაში. შესაძლოა საჭირო გახდეს შემდეგი დამატებითი რეაგენტები:

მიზანი	რაოდენობა (1 ლიტრზე)	
Lubrol ფანტელები	დეფლოკულანტი (*)	0,5 გ
DC აქაფების საწინააღმდეგო სილიკონი	აქაფების საწინააღმდეგო საშუალება (*)	1,0 მლ.
ნატრიუმის პიროფოსფატი	ანტიოქსიდანტი	1,0 გ
პოლივინილპიროლიდონი-40000 (PVP-40)	ჰჯრ ინჰიბიტორების შემზოჭავი	50 გ

(\*)ჰომოგენიზაციით ექსტრაქციის მეთოდთან ერთად გამოყენებისათვის.

ბ) დამლევი ბუფერი (10 მმოლი ფოსფატის ბუფერული ხსნარი, pH 7,2) გამოიყენება კარტოფილის ტუბერის სტოლონთან მიმაგრების ადგილის ექსტრაქტების რესუსპენდირებისა და განზავებისათვის ცენტრიფუგირების გზით ნალექთან კონცენტრირების შემდეგ.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	2,7 გ
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,4 გ
გამოხდილი წყალი	1,0 ლ.

ინგრედიენტები იხსნება, მოწმდება pH და ავტოკლავით ხდება სტერილიზაცია 121 °C-ზე 15 წუთის განმავლობაში.

## 2. ბუფერები IF ტესტისათვის :

ა) IF ბუფერი (10 მმოლი მარილშემცველი ფოსფატური ბუფერი (PBS), pH 7.2) ეს ბუფერი გამოიყენება ანტისხეულების განზავებისთვის

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 12H <sub>2</sub> O	2,7 გ
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,4 გ
NaCl	8,0 გ
გამოხდილი წყალი	1.0 ლ

ინგრედიენტები იხსნება, მოწმდება pH და ავტოკლავით ხდება სტერილიზაცია 121 °C-ზე 15 წუთის განმავლობაში;

ბ) IF -ბუფერი - „Tween“, ეს ბუფერი გამოიყენება პრეპარატების გასარეცხად. IF ბუფერს ემატება 0,1% Tween 20;

გ) გლიცერინიანი ფოსფატური ბუფერი pH 7,6 გამოიყენება IF პრეპარატის ფოსფატის ოპტიკურ შემავსებლად ფლუორესცენციის გაძლიერებისათვის.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	3,2 გ
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,15 გ
გლიცერინი	50 მლ
გამოხდილი წყალი	100 მლ.

არსებობს კომერციული, ოპტიკური შემავსებელი ფლუორესცენციის გასაძლიერებელი ხსნარები. მაგ., Vectashield® ( Vector Laboratories) ან Citifluor ® ( Leica).

### 3. არაპირდაპირი ELISA ბუფერები

ა) ორმაგი სიძლიერის დამფენი ბუფერი, pH 9,6.

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	6,36 გ
NaHCO <sub>3</sub>	11,72 გ
გამოხდილი წყალი	1,00 ლ

ინგრედიენტები იხსნება, მოწმდება pH და ავტოკლავით ხდება სტერილიზაცია 121 °C-ზე 15 წუთის განმავლობაში. ნატრიუმის სულფიტი (0.2%) შესაძლოა დამატებულ იქნეს, როგორც ანტიოქსიდანტი არომატული ნაერთების ჟანგის თავიდან ასაცილებლად;

ბ) 10 X მარილშემცველი ფოსფატური ბუფერი (PBS), pH 7.4;

NaCl	80,0 გ
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 გ
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	29,0 გ
KCl	2,0 გ

გამოხდილი წყალი	1,0 ლ
-----------------	-------

გ) PBS-Tween;

10X PBS	100 მლ
10 % Tween 20	5 მლ
გამოხდილი წყალი	895 მლ

დ) დამჭერი (ანტისხეული) ბუფერი (უნდა იყოს ახლად მომზადებული);

10X PBS	10,0 მლ
პოლივინილპიროლიდონი-44000 (PVP-44)	2,0 გ
10 % Tween 20	0,5 მლ
რძის ფხვნილი	0,5 გ
გამოხდილი წყალი	ივსება 100 მლ-მდე

ე) ტუტე ფოსფატაზის სუბსტრატის ხსნარი pH 9,8

დიეთანოლამინი	97 მლ
გამოხდილი წყალი	800 მლ

უნდა შეერიოს და დარეგულირდეს pH 9,8 კონცენტრირებული HCl- ით.

გამოხდილი წყლით უნდა შეივსოს 1 ლ-მდე. ემატება 0,2 გ MgCl<sub>2</sub>. 2 ფოსფატაზას სუბსტრატის 5 მგ აბი ( სიგმა) იხსნება ხსნარის 15 მლ-ში.

4. ბუფერები DASi ELISA ტესტისთვის :

ა) საფარი ბუფერი, pH 9,6

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,59 გ
NaHCO <sub>3</sub>	2,93 გ
გამოხდილი წყალი	1000 მლ

ინგრედიენტები იხსნება და მოწმდება pH 9,6;

ბ) 10 X მარილშემცველი ფოსფატური ბუფერი (PBS) pH 7,2 - 7,4;

NaCl	80,0 გ
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2 H <sub>2</sub> O	4,0 გ



Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	27,0 გ
გამოხდილი წყალი	1000 მლ

გ) PBS-Tween;

10X PBS	50 მლ
10 % Tween 20	5 მლ
გამოხდილი წყალი	950 მლ

დ) სუბსტრატის ბუფერი, pH 9,8

დიეთანოლამინი	100 მლ
გამოხდილი წყალი	900 მლ

შეერვა და კონცენტრირებული HCl-ით მიიღწევა pH 9,8 .

დანართი N10

საკვები არე მავნე ორგანიზმის გამოვლენისა და კულტივირებისათვის

1. ძირითადი საკვები არე ბაქტერიის განვითარებისთვის

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

ინგრედიენტები იხსნება და სტერილდება ავტოკლავირებით 121 °C -ზე 15 წთ-ის განმავლობაში:

ა.) YPGA აგარი (საფუარის ექსტრაქტი, პეპტონით და გლუკოზით)

საფუარის ექსტრაქტი (Difco)	5,0 გ.
ბაქტო-პეპტონი (Difco)	5,0 გ.
D(+) გლუკოზა (მონოჰიდრატი)	10,0 გ
ბაქტო-აგარი (Difco)	15,0 გ.

გამოხდილი წყალი	1,0 ლ
-----------------	-------

ინგრედიენტები იხსნება და სტერილდება ავტოკლავირებით 121 °C -ზე 15 წთ-ის განმავლობაში;

ბ) საქაროზა პეპტონის აგარი (SPA)

სუკროზა	20,0 გ
ბაქტო-პეპტონი (Difco)	5,0 გ
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 გ
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,25 გ
ბაქტო-აგარი (Difco)	15,0 გ.
გამოხდილი წყალი	1,0 ლ
pH	7,2 – 7,4

ინგრედიენტები იხსნება და სტერილდება ავტოკლავირებით 121 °C -ზე 15 წთ-ის განმავლობაში;

გ) კელმანის ტეტრაზოლიუმის საკვები არე

კაზამინის მჟავები (Difco)	1,0 გ
ბაქტო-პეპტონი (Difco)	10,0 გ
დექსტროზა	5,0 გ
ბაქტო-აგარი (Difco)	15,0 გ
გამოხდილი წყალი	1,0 ლ

ინგრედიენტები იხსნება და სტერილდება ავტოკლავირებით 121 °C -ზე 15 წთ-ის განმავლობაში. გრილდება 50 °C-მდე და ემატება გაფილტრული 2,3,5-ტრიფენილ ტეტრაზოლიუმის ქლორიდი (Sigma) წყალხსნარი ისე, რომ მიღებულ იქნეს საბოლოო კონცენტრაცია 50 მგ/ლიტრზე;

2. ვალიდირებული სელექტიური საკვები არე ბაქტერიის განვითარებისთვის SMSA საკვები არე (Englebrecht, 1994 ცვლილება Elphinstone et al., 1996) ძირითადი საკვები არე

კაზამინის მჟავები (Difco)	1,0 გ
ბაქტო-პეპტონი (Difco)	10,0 გ
გლიცერინი	5,0 გ
ბაქტო-აგარი (Difco);	15,0 გ.
გამოხდილი წყალი	1,0 ლ

ინგრედიენტები იხსნება და სტერილდება ავტოკლავირებით 121°C -ზე 15 წთ-ის განმავლობაში. გრილდება 50°C-მდე და ემატება გაფილტრული შემდეგი ინგრედიენტების წყალხსნარები შემდეგი საბოლოო კონცენტრაციის მისაღებად:

კრისტალური იისფერი (სიგმა)	5 მგ/ლ-ზე
პოლიმიქსინ-B-სულფატი (სიგმა P- 1004)	600 000 U (დაახლოებით 100 მგ/ლ)
ბაციტრაცინი (სიგმა B-0125)	1 250 U (დაახლოებით 25 მგ) ლ
ქლორამფენიკოლი (სიგმა C-3175)	5 მგ/ლ-ზე
პენიცილინი-G (სიგმა P-3032)	825 U ( დაახლოებით 25 მგ) ლ
2,3,5-ტიფენილი ტეტრაზოლიუმის ქლორიდი (სიგმა)	50 მგ/ლ

შენიშვნა:

ზემოთ მოყვანილი რეაგენტების გამოყენებამ შესაძლოა გავლენა მოახდინოს მავნე ორგანიზმის ზრდაზე. Oxoid აგარ № 1 შეიძლება გამოყენებულ იქნეს ბაქტო-აგარის (Difco) სანაცვლოდ. ამ შემთხვევაში შემცირდება მავნე ორგანიზმის და აგრეთვე კონკურენტი საპროფიტების ზრდაც . მავნე ორგანიზმის ტიპური კოლონიების წარმოქმნა შეიძლება გაგრძელდეს 1-2 დღეზე მეტ ხნს, წითელი შეფერილობა შესაძლებელია იყოს ნათელი, მაგრამ უფრო დიფუზური ვიდრე ბაქტო-აგარზე. ბაციტრაცინის კონცენტრაციის გაზრდას 2 500 ერთეული/ლ-მდე შეუძლია შეამციროს კონკურენტი ბაქტერიის პოპულაცია ისე, რომ ზეგავლენა არ იქონიოს მავნე ორგანიზმის ზრდაზე.საკვები არე და ანტიბიოტიკების ხსნარები ინახება 4 ° C-ზე სიბნელეში და გამოიყენება ერთი თვის მანძილზე. გამოყენებამდე თასები თავისუფალი უნდა იყოს ზედაპირული კონდენსატისგან. თასების ზედმეტად გამოშრობა თავიდან უნდა იქნეს აცილებული. ხარისხის კონტროლი უნდა ჩატარდეს საკვები არის ყოველი ახალი პარტიის მომზადების შემდეგ, მავნე ორგანიზმის რეფერენტული კულტურის გადათესვით და 28 °C ტემპერატურაზე ინკუბაციიდან მე-2 - მე-5 დღეს ტიპური კოლონიების ფორმირებაზე დაკვირვებით.

3. ვალიდირებული გამდიდრებული საკვები არე:

ა) SMSA ბულიონი (Elphinstone et al., 1996) მზადდება ისევე როგორც SMSA აგარის სელექტიური საკვები არე, მაგრამ არ ემატება ბაქტო-აგარი და 2,3,5-ტეტრაზოლიუმ ქლორიდი;

ბ) უილბრინკის მოდიფიცირებული ბულიონი (Caruso et al., 2002)

საქაროზა	10 გ
პროტეოზა პეპტონი	5 გ
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 გ

MgSO4	0,25 გ
NaNO3	0,25 გ
გამოხდილი წყალი	1 ლ

სტერილდება ავტოკლავირებით 121°C ტემპერატურაზე 15 წთ-ის განმავლობაში და გრილდება 50 °C ტემპერატურამდე. ემატება ანტიბიოტიკის სამუშაო ხსნარები ისე, როგორც SMSA ბულიონისათვის

დანართი N11

**კომერციულად ხელმისაწვდომი სტანდარტული საკონტროლო მასალა**

1. რეკომენდებულია ბაქტერიული იზოლატების გამოყენება სტანდარტული რეფერენტული მასალის სახით, როგორც დადებითი კონტროლი (ცხრილი N1) ან ტესტების ოპრიმიზაცია, რათა თავიდან იქნას აცილებული ჯვარედინი რეაქციები (ცხრილი 2). ყველა შტამი კომერციულად ხელმისაწვდომია:

ა) მცენარეთა პათოგენური ბაქტერიების ეროვნული კოლექცია (NCPPB), ცენტრალური სამეცნიერო ლაბორატორია, იორკი, გაერთიანებული სამეფო;

ბ) მცენარეთა დაცვის სამსახურის კულტურის კოლექცია (PD), ვაგენინგენი, ნიდერლანდები;

გ) საფრანგეთის ფიტოპათოგენური ბაქტერიების კოლექცია ფიტოპათოლოგიის სადგური, ანჟერი

**ცხრილი 1. მავნე ორგანიზმის იზოლატების SMT სახელმძღვანელო პანელი**

NCPPB კოდი	SMT №	სხვა კოდები	წარმომავლობის ქვეყანა	ბიოვარი
NCPPB 4153	6	CFBP 4582, Pr 3020, EURS11	ევვიპტე	2
NCPPB 4154	10	CFBP 4585, 550, EURS21	თურქეთი	2
NCPPB 3857	12	CFBP 4587, Pr 1140, EURS26	ინგლისი	2
NCPPB 1584	23	CFBP 4598, EURS49	კვიპროსი	2
NCPPB 2505	24	CFBP 4599, EURS50	შვედეთი	2
NCPPB 4155	26	CFBP 4601, 502, EURS55	ბელგია	2
NCPPB 4156 (*)	71(*)	PD 2762, CFBP 3857	ნიდერლანდები	2
NCPPB 4157	66	LNPV 15.59	საფრანგეთი	2
NCPPB 4158	39	CFBP 4608, Port 448, EURS80	პორტუგალია	2
NCPPB 4160	69	IVIA-1632-2	ესპანეთი	2
NCPPB 4161	76	B3B	გერმანია	2
NCPPB 325	41	CFBP 2047, KEL60-1, R842	აშშ	1
NCPPB 3967	42	CFBP 4610, R285, GONg7	კოსტარიკა	1

NCPPB 4028	43	CFBP 4611, R303/571, CIP310, SEQ225	კოლუმბია	2
NCPPB 3985	44	CFBP 4612, R578, CIP312	პერუ	2 T
NCPPB 3989	45	CFBP 4613, R568, CIP226	ბრაზილია	2 T
NCPPB 3996	46	CFBP 3928, R276/355, CIP72, SEQ225	პერუ	3
NCPPB 3997	47	CFBP 4614, R280/363, CIP49, HAY0131a	ავსტრალია	3
NCPPB 4029	48	CFBP 4615, R297/349, CIP121, CMIb2861	შრი-ლანკა	4
NCPPB 4005	49	CFBP 4616, R470	ფილიპინები	4
NCPPB 4011	50	CFBP 4617, R288, HEmps2	ჩინეთი	5

(\*)გამოიყენება, როგორც მავნე ორგანიზმის ბიოვარ 2-ის სტანდარტული რეფერენტული შტამი ( რასა 3).

შენიშვნა: ზემოაღნიშნული შტამების ავთენტურობის შესახებ გარანტია არსებობს მხოლოდ იმ შემთხვევაში, თუ მოპოვებულია ავთენტური კულტურის კოლექციიდან.

**ცხრილი 2: სეროლოგიურად ან გენეტიკურად დაკავშირებული მსგავსი ბაქტერიების SMT რეფერენტული მასალა გამოვლენის ტესტების ოპტიმიზაციისათვის**

NCPPB კოდი	SMT №	სხვა კოდი	იდენტიფიკაცია
NCPPB 4162	51	CFBP 1954	<i>Bacillus polymyxa</i> <sup>(1)</sup>
NCPPB 4163	52	CFBP 1538	<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i> <sup>(1)</sup>
NCPPB 4164	-	CFBP 2227	<i>Burkholderia cepacia</i> <sup>(2)</sup>
NCPPB 4165	-	CFBP 2459	<i>Ralstonia pickettii</i> <sup>(2)</sup>
NCPPB 4166	58	CFBP 3567	<i>Ralstonia pickettii</i> <sup>(1)</sup>
NCPPB 4167	60	CSL Pr1150 CFBP 4618 PD 2778	<i>Ralstonia</i> სგვ. <sup>(1)</sup>
NCPPB 1127	53	CFBP 3575	<i>Burkholderia andropogonis</i> <sup>(1)</sup>
NCPPB 353	54	CFBP 3572	<i>Burkholderia caryophylli</i> <sup>(1)</sup>
NCPPB 945	55	CFBP 3569	<i>Burkholderia cepacia</i> <sup>(1)</sup>
NCPPB 3708	56	CFBP 3574	<i>Burkholderia glumae</i> <sup>(1)</sup>
NCPPB 3590	57	CFBP 3573	<i>Burkholderia plantarii</i> <sup>(1)</sup>
NCPPB 3726	59	CFBP 3568	Banana Blood Disease <i>Bacterium</i> <sup>(1) (2) (3)</sup>
NCPPB 4168	61	CFBP 4619 IPO S339	<i>Enterobacter</i> sp. <sup>(1)</sup>

NCPPB 4169	62	IPO 1695	<i>Enterobacter sp.</i> <sup>(1)</sup>
NCPPB 4170	63	CFBP 4621	<i>Ochrobactrum anthropi</i> <sup>(1)(2)</sup>
		IPO S306	
NCPPB 4171	64	CFBP 4622	<i>Curtobacterium sp.</i> <sup>(1)(2)</sup>
		IPO 1693	
NCPPB 4172	65	IPO 1696a	<i>Pseudomonas sp.</i> <sup>(1)</sup>
NCPPB 4173	-	PD 2318	<i>Aureobacterium sp.</i> <sup>(2)</sup>
NCPPB 4174	81	IVIA 1844.06	<i>Flavobacterium sp.</i> <sup>(1)(2)</sup>

<sup>(1)</sup> პოტენციურად ჯვარედინი რეაქციის მქონე შტამი პოლიკლონური ანტიშრატიტ სეროლოგიურ ტესტებისთვის (IF ან/და ELISA)

<sup>(2)</sup> შტამი, რომლისგანაც პჯრ პროდუქტი შესაძლებელია იქნეს გაძლიერებული ანალოგიური ზომის ლაბორატორიაში მოსალოდნელთან შედარებით სპეციფიური პრაიმერების OLI-1 და Y-2 გამოყენებით.

<sup>(3)</sup> ტესტების უმრავლესობაში ამჟღავნებს ჯვარედინი რეაქციას, მაგრამ, ცნობილია, რომ გვხვდება მხოლოდ ბანანზე, ინდონეზიაში.

2. კომერციულად ხელმისაწვდომი სტანდარული საკონტროლო მასალა:

ა) ხელმისაწვდომია NCPPB კულტურის კოლექციიდან;

ბ) კარტოფილის 200 ჯანსაღი ტუბერის ექსტრაქტის ლიოფილიზირებული ნალექიდან, როგორც ყველა ტესტის უარყოფითი კონტროლი;

გ) კარტოფილის 200 ჯანსაღი ტუბერის ექსტრაქტის ლიოფილიზირებული ნალექი, რომელიც სეროლოგიური და პჯრ ტესტებისთვის დადებით კონტროლის სახით შეიცავს მავნე ორგანიზმის ბიოვარ 2-ის  $10^3$ -დან  $10^4$  და  $10^4$ -დან  $10^6$  -მდე უჯრედებს (შტამი NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857), ვინაიდან უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობაზე გავლენას ახდენს გაყინვა-გაშრობა, ის არ გამოდგება როგორც სტანდარტული კონტროლი გამოყოფის და ბიოტესტისთვის. მავნე ორგანიზმის ბიოვარ 2-ის ( შტამი NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) ფორმალინში დაფიქსირებული  $10^6$  უჯრედი /მლ სუსპენზია, როგორც დადებითი კონტროლი სეროლოგიური ტესტებისათვის;

3. პჯრ/ IF და FISH სკრინინგ ტესტებისათვის დადებით და უარყოფით კონტროლად გამოიყენება ძირითად SMSA საკვებ არეზე განვითარებული მავნე ორგანიზმის რასა 3/ბიოვარი 2 ვირულენტური შტამის 48 საათიანი კულტურა (მაგ. შტამი NCPPB 4156=PD 2762=CFBP 3857) და დაახლოებით  $2 \times 10^8$  კწე სიმკვრივის უჯრედების მისაღებად განზავდება 10 მმოლი ფოსფატის ბუფერში. ეს როგორც წესი შეესაბამება ოდნავ მღვრიე სუსპენზიას, რომელიც 600 ნმ-ზე 0.15 ოპტიკური სიმკვრივის ეკვივალენტურია. თეთრკანიანი ჯიშის კარტოფილიდან შერჩეული იქნება

კარტოფილის 200 ტუბერი, რომლის სტოლონთან მიმაგრების ადგილი თავისუფალია მავნე ორგანიზმისგან. სტოლონის ტუბერთან მიმაგრების ადგილი დამუშავდება ჩვეულებისამებრ და ნალექი ხელახლა რესუსპენდირდება 10 მლ-ში. მზადდება 10 ცალი სტერილური 1.5 მლ-იანი მიკროსინჯარა 900 მკლ რესუსპენდირებული ნალექით. მავნე ორგანიზმის 100 მკლ სუსპენზია გადაიტანება პირველ მიკროსინჯარაში. ვორტექსზე შეინჯღრევა. დადგინდება დაბინძურების ათჯერადი დონე დანარჩენ ხუთ მიკროსინჯარაში შემდგომი განზავებით. ექვსი დაბინძურებული მიკროსინჯარა გამოყენებული იქნება, როგორც დადებითი კონტროლი. ოთხი სუფთა მიკროსინჯარა კი, როგორც უარყოფითი კონტროლი. მიკროსინჯარები სათანადოდ უნდა იქნეს ეტიკეტირებული. მზადდება 100 მკლ ალიკვოტები სტერილურ 1.5 მლ მიკროსინჯარებში, რის შედეგადაც მიიღება თითოეული საკონტროლო ნიმუშის ცხრა განმეორება. გამოყენებამდე ინახება -16°C - 24°C ტემპერატურაზე. საკონტროლო ნიმუშებში მავნე ორგანიზმის არსებობა და მისი რაოდენობის განსაზღვრა პირველ რიგში უნდა იქნეს დადასტურებული IF-ით. პჯრ ტესტისთვის ტარდება დნმ-ის ექსტრაქცია ყოველი სატესტო ნიმუშის თითოეული სერიის დადებითი და უარყოფითი საკონტროლო ნიმუშებიდან. IF და FISH ტესტებისთვის გამოკვლევები ტარდება სატესტო ნიმუშების თითოეული სერიის დადებით და უარყოფით საკონტროლო ნიმუშებზე. პჯრ, IF და FISH გამოკვლევებისთვის მავნე ორგანიზმი უნდა გამოვლინდეს სულ მცირე დადებითი კონტროლის 10<sup>4</sup> და 10<sup>6</sup> უჯრედი/ მლ და უარყოფით კონტროლში.

## დანართი N12

### საიდენტიფიკაციო ტესტები

ფიზიოლოგიურ-ბიოქიმიური საიდენტიფიკაციო ტესტები Lelliott and Stead (1987), Klement et al. (1990), Schaad (2001)-ის შესაბამისი მეთოდებით განისაზღვრება ის ფენოტიპური თვისებები, რომლებიც გააჩნია ან არ გააჩნია მავნე ორგანიზმს.

ტესტი	მოსალოდნელი შედეგი
ფლუორესცენტული პიგმენტის წარმოქმნა	-
პოლი-მ-ჰიდროქსიბუტირატის ჩანართები	+
დაჟანგვა/ფერმენტაციის (O/F) ტესტი	O+/F-

კატალაზური აქტივობა	+
კოვაჩის ოქსიდაზა ტესტი	+
ნიტრატ-რედუქცია	+
ციტრატის უტილიზაცია (შეთვისების უნარი)	+
ზრდა 40 °C-ზე	-
ზრდა 1 % NaCl-ში	+
ზრდა 2 % NaCl-ში	-
არგინინ-დიჰიდროლაზური აქტივობა	-
ჟელატინის გათხევადება	-
სახამებლის ჰიდროლიზი	-
ესკულინის ჰიდროლიზი	-
ლევანის წარმოქმნა	-

1. IF ტესტისას:

- ა) IF ბუფერში მზადდება დაახლოებით  $10^6$  უჯრედი / მლ სუსპენზია;
- ბ) მზადდება შესაბამისი ანტიშტარის ორჯერადი თანმიმდევრული განზავებები;
- გ) გამოიყენება IF პროცედურა;
- დ) IF ტესტი დადებითია,თუ კულტურის IF ტიტრი ეკვივალენტურია დადებითი კონტროლის ტიტრისა.

2. ELISA ტესტისას თუ მხოლოდ ორი საიდენტიფიკაციო ტესტი უნდა ჩატარდეს, მაშინ სეროლოგიური ტესტის გამოყენება არ არის სასურველი. შესაბამისად:

- ა) მზადდება  $10^8$  უჯრედი / მლ-ზე სუსპენზია 1XBPS -ში;
- ბ) ტარდება შესაბამისი ELISA-ს პროცედურა მავნე ორგანიზმის სპეციფიური მონოკლონური ანტისხეულით;
- გ) დადებითია ELISA ტესტი, თუ წაკითხვის მაჩვენებელი მავნე ორგანიზმის კულტურისათვის დადებითი კონტროლის წაკითხვის მაჩვენებლის სულ მცირე ნახევრის ტოლია.

3. პჯრ ტესტისას:

- ა) მზადდება  $10^6$  უჯრედი/მლ სუსპენზია მოლეკულური ხარისხის სტერილურ წყალში;



ბ) სუსპენზიის 100 მკლ. დახურულ სინჯარებში ცხელდება გამაცხელებელ ბლოკში ან წყლის აბაზანაზე 100 °C-ზე ოთხი წუთის განმავლობაში. შემდეგ ნიმუში შესაძლოა შენახულ იქნეს -16-(-24) °C-ზე საჭირო დროით;

გ) შესაბამისი პჯრ პროცედურები გამოიყენება მავნე ორგანიზმის სპეციფიური ამპლიკონების (e.g. Seal et al. (1993); Pastrok and Maiss (2000); Pastrok et al. (2002); Boudazin et al. (1999); Opina et al. (1997), Weller et al. (1999) მისაღებად;

დ) მავნე ორგანიზმის იდენტიფიკაციის პჯრ რეაქცია დაებითაა, თუ მიღებული ამპლიფიცირებული ფრაგმენტების ზომები და რესტრიქციული ფრაგმენტების სიგრძის პოლიმორფიზმი შეესაბამება დადებით საკონტროლო შტამის ამავე მახასიათებლებს.

#### 4. FISH ტესტისას:

ა) მზადდება დაახლოებით 10<sup>6</sup> უჯრედი/მლ სუსპენზია UPW-ში;

ბ) გამოიყენება FISH პროცედურა მავნე ორგანიზმის სპეციფიკური სულ მცირე 2 ოლიგო-სინჯი;

გ) დადებითაა FISH ტესტი,თუ კულტურიდან და დადებითი კონტროლიდან ერთი და იგივე რეაქციებია მიღებული.

#### 5. ცხიმოვანი მჟავების პროფილირებისას (FAP):

ა) კულტურის გამოზრდა ხდება ტრიფსინ-სოიას საკვებ აგარზე 48 სთ-ის განმავლობაში 28°C -ზე;

ბ) გამოიყენება შესაბამისი FAP პროცედურა (Janse, 1991; Stead, 1992);

გ) FAP ტესტი დადებითი თუ სავარაუდო კულტურების პროფილი იდენტურია დადებითი კონტროლის პროფილისა. დამახასიათებელი ცხიმოვანი მჟავების 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH და 18:1 2OH არსებობა და 16:0 3OH-ის არ არსებობა არის მავნე ორგანიზმის მაღალი მაჩვენებელი.

6. შტამის დახასიათების მეთოდებიდან მავნე ორგანიზმის თითოეული ახალი შემთხვევის დროს რეკომენდებულია გამოიყენებულ იქნეს ქვემოთ მოცემულთაგან ერთ-ერთი მეთოდი (საჭიროების შემთხვევაში ყოველი ჩატარებული ტესტისათვის მითითებული უნდა იქნეს რეფერენტული შტამები:

ა) ბიოვარის დადგენისას მავნე ორგანიზმის ბიოვარების დადგენა ხდება სამი დისაქარიდის და სამი ჰექსოზის სპირტის უტილიზაციის და/ან ჟანგვის უნარის საფუძველზე (Hayward, 1964 and Hayward et al., 1990). ბიოვარების ზრდისთვის საკვები არეები აღწერილია ამ ტექნიკური რეგლამენტის დანართ N10-ში. გამოცდა შესაძლოა წარმატებით განხორციელდეს მავნე ორგანიზმის სუფთა კულტურის იზოლატების საკვებ არეზე 28°C-ზე ინკუბირებით. თუ საკვები არე განაწილებულია 96 ფოსოიან (თითოეულ ფოსოში 200 მკლ) უჯრედის კულტურის სტერილურ პლანშენტზე, 72 სთ-ში შეიმჩნევა ფერის შეცვლა ზეთისხილის ფერიდან ყვითლამდე, რაც მიუთითებს ტესტის დადებით შედეგზე;

ბიოვარის დადგენა

	1	2	3	4	5
შეთვისების უნარი:					
მალტოზა	-	+	+	-	+
ლაქტოზა	-	+	+	-	+
D(+) <i>ცელოზი</i>	-	+	+	-	+
მანიტოლი	-	-	+	+	+
სორბიტოლი	-	-	+	+	-
დულციტოლი	-	-	+	+	-

დამატებითი ტესტები ახდენს ბიოვარ2-ის ქვე-ფენოტიპების დიფერენცირებას;

ბ) მოლეკულური დიფერენცირება მავნე ორგანიზმის შტამების შესაძლოა მიღწეულ იქნეს სხვადასხვა მეთოდით, მათ შორის:

ბ.ა) რესტრიქციული ფრაგმენტების სიგრძის პოლიმორფიზმის (RFLP) ანალიზით (Cook et al., 1989);

ბ.ბ) REP, BOX ERIC პრაიმერების (ზონდების) გამოყენებით განმეორებითი თანმიმდევრობის პჯრ ანალიზით (Louws et al., 1995; Smith et al., 1995);

ბ.გ) ამპლიფიცირებული ფრაგმენტის სიგრძის პოლიმორფიზმის (AFLP) ანალიზით (Van der Wolf et al., 1998);

გენომური ანაბეჭდი

	ბიოვარ 2A	ბიოვარ2A	ბიოვარ 2T
ტრეჰალოლის გამოყენება	-	+	+
meso-ინოზიტოლის გამოყენება	+	-	+
D რიბოზის გამოყენება	-	-	+
პექტოლიტური აქტივობა	დაბალი	დაბალი	მაღალი

7. სპეციფიური პჯრ პრაიმერები შეიძლება გამოყენებულ იქნეს მავნე ორგანიზმის შტამების ჯგუფი 1 (ბიოვარები 3, 4, 5) და ჯგუფი 2 (ბიოვარები 1, 2A, 2T) დიფერენცირებისათვის, როგორც ეს წინასწარ განსაზღვრულ იქნა RFLP ანალიზით (Cook et al., 1989) და 16S რდნმ თანმიმდევრობის სექვენირებით (Taghavi et al., 1996).

დაბინძურების დონის დადგენა 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 ფოსოში ( C );

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

სადაც S = ზედაპირის მრავალფოსოიანი სასაგნე მინის ფოსოს ზედაპირის 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 = ტუბუსის კოეფიციენტი (1 ან 1,25)

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

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

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

სადაც y = თითოეულ ფოსოში რესუსპენდირებული ნალექის მოცულობა

F = რესუსპენდირებული ნალექის განზავების კოეფიციენტი

ვალიდირებული პჯრ პროტოკოლები და რეაგენტები

შენიშვნა: წინასწარი ტესტირებით შესაძლებელი უნდა იყოს ნიმუშის ექსტრაქტში მავნე ორგანიზმის სულ მცირე  $10^3-10^4$  უჯრედი/მლ გამოვლენა; წინასწარმა ტესტმა ასევე არ უნდა აჩვენოს საექვო დადებითი შედეგები შერჩეული ბაქტერიული შტამების პანელზე.

1. Seal et al.(1993) პჯრ პროტოკოლი

ა) ოლიგონუკლეოტიდური პრაიმერები

პირდაპირი პრაიმერი OLI-1	5'-GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC-3'
შებრუნებული პრაიმერი Y-2	5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT- 3'

მავნე ორგანიზმის დნმ-დან ამპლიფიცირებული ფრაგმენტების მოსალოდნელი ზომა = 288 bp

ბ) პჯრ სარეაქციო ნარევი შედგება

რეაგენტი	რაოდენობა თითოეულ რეაქციაზე	საბოლოო კონცენტრაცია
სტერილური UPW	17,65 მკლ	
10 x პჯრ ბუფერი <sup>(1)</sup> (15 მმოლი MgCl <sub>2</sub> )	2,5 მკლ	1x (1,5მმოლიMgCl <sub>2</sub> )
dNTP ნარევი (20 მმოლი)	0,25 მკლ	0,2 მმოლი
პრაიმერი OLI-1 (20 μM)	1,25მკლ	1 მკმოლი
პრაიმერი Y-2 (20 μM)	1,25 მკლ	1 მკმოლი
Taq-პოლიმერაზა 5U/μl) (1)	0,1 მკლ	0,5 ერთეული
ნიმუშის მოცულობა	2,0 მკლ	
ჯამური მოცულობა	25 მკლ	

<sup>(1)</sup> მეთოდი ვალიდირებულია Perkin Elmer (AmpliTaq ან Gold) and Gibco BRL. ფირმის Taq-პოლიმერაზას გამოყენებით.

გ) პჯრ პროგრამა

1 ციკლი	2 წთ. 96 °C ტემპერატურაზე (მატრიცული დნმ-ის დენატურაცია)
35 ციკლი	20 წმ 94 °C ტემპერატურაზე (მატრიცული დნმ-ის დენატურაცია) 20 წმ. 68 °C ტემპერატურაზე (პრაიმერების შელღობა) 30 წმ 72 °C ტემპერატურაზე (ასლის ელონგაცია)
1 ციკლი	10 წთ 72 °C ტემპერატურა (საბოლოო ელონგაცია)
1 ციკლი	ლოდინი 4 °C ტემპერატურა.

შენიშვნა: მოცემული პროგრამა ოპტიმიზირებულია Perkin Elmer 9600 თერმოციკლერისთვის. სხვა მოდელების გამოყენების შემთხვევაში, შესაძლებელია საჭირო გახდეს „გ“ პუნქტის „გ.ბ“, „გ.გ“, „გ.დ“ ქვეპუნქტებით განსაზღვრული ციკლების საფეხურების ხანგრძლიობის მოდიფიცირება; ამპლიფიცირებული ფრაგმენტების რესტრიქციული ანალიზისას მავნე ორგანიზმის დნმ-დან ამპლიფიცირებული პჯრ პროდუქტები, 37°C ტემპერატურაზე Ava II ფერმენტის მოქმედებით, აჩვენებს რესტრიქციული ფრაგმენტების განსხვავებული სიგრძის პოლიმორფიზმს.

2. Pastrok and Maiss (2000)-ის პჯრ პროტოკოლი მოიცავს:

ა) ოლიგონუკლეოტიდურ პრაიმერებს

პირდაპირი პრაიმერი Ps-1	5'- agt cga acg gca gcg ggg g -3'
შებრუნებული პრაიმერი Ps -2	5'- ggg gat ttc aca tcg gtc ttg ca -3''

მავნე ორგანიზმის დნმ-დან ამპლიფიცირებული ფრაგმენტების მოსალოდნელი ზომა = 553 bp

ბ) პჯრ ნარევი

რეაგენტი	რაოდენობა	საბოლოო კონცენტრაცია
----------	-----------	----------------------

	თითოეულ რეაქციაზე	
სტერილური UPW	16,025 მკლ	
10 x პჯრ ბუფერი <sup>(1)</sup>	2,5 მკლ	1X (1,5 მმოლი MgCl <sub>2</sub> )
BSA (ფრაქცია V) (10 %)	2,5 მკლ	0,1 %
dNTP ნარევი (20 mM)	0,125 მკლ	0,1 მმოლი
პრაიმერი Ps-1 (10 μM)	0,5 მკლ	0,2 მკმოლი
პრაიმერი Ps-2 (10 μM)	0,5 მკლ	0,2 მკმოლი
Taq-პოლიმერაზა (5 ერთეული/მკლ) <sup>(1)</sup>	0,1 მკლ	0,5 ერთეული
ნიმუშის მოცულობა	5,0 მკლ	
ჯამური მოცულობა	25,0 მკლ	

<sup>(1)</sup> მეთოდები ვალიდირებულია Perkin Elmer (AmpliTaq ან Gold) and Gibco BRL. ფირმის Taq-პოლიმერაზას გამოყენებით. შენიშვნა: ოპტიმიზირებულია MJ Research PTC 200 თერმოციკლერისთვის Gibco Taq პოლიმერაზის გამოყენებით.

Perkin Elmer AmpliTaq და ბუფერი შესაძლებელია ასევე იქნეს გამოყენებული იმავე კონცენტრაციით

გ) პჯრ პროგრამა:

1 ციკლი	5 წთ. 96 °C ტემპერატურაზე (მატრიცული დნმ-ის დენატურაცია)
35 ციკლი	30 წმ 95 °C ტემპერატურაზე (მატრიცული დნმ-ის დენატურაცია) 30 წმ. 68 °C ტემპერატურაზე (პრაიმერების შელღობა) 45 წმ 72 °C ტემპერატურაზე (ასლის ელონგაცია)
1 ციკლი	5 წთ 72 °C ტემპერატურა (საბოლოო ელონგაცია)
1 ციკლი	ლოდინი 4 °C ტემპერატურა.

შენიშვნა: მოცემული პროგრამა ოპტიმიზირებულია MJ Research PTC 200 თერმოციკლერისთვის. სხვა მოდელების გამოყენების შემთხვევაში, შესაძლებელია

საჭირო გახდეს „გ“ პუნქტის „გ.ბ“, „გ.გ“, „გ.დ“ ქვეპუნქტებით განსაზღვრული ციკლების საფეხურების ხანგრძლიობის მოდიფიცირება, ამპლიფიცირებული ფრაგმენტების რესტრიქციული ანალიზისას მავნე ორგანიზმის დნმ-ის ამპლიფიცირებული ფრაგმენტები, 65°C ტემპერატურაზე 30 წთ-ის განმავლობაში ფერმენტი Taq I-ის მოქმედებით, აჩვენებს რესტრიქციული ფრაგმენტების განსხვავებული სიგრძის პოლიმორფიზმს. მავნე ორგანიზმის სპეციფიური რესტრიქციული ფრაგმენტების ზომა უნდა იყოს 457 bp და 296 bp.

3. მულტიფლექს-პჯრ პროტოკოლი შიდა კონტროლით (Patrik at al.,2002) მოიცავს:

ა) ოლიგონუკლეოტიდურ პრაიმერებს

პირდაპირი პრაიმერი RS-1-F	5'- ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA -3'
შებრუნებული პრაიმერი RS-1-R	5'- CCC AGT CAC GGC AGA GAC T -3'
პირდაპირი პრაიმერი NS-5-F	5'- AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G - 3'
შებრუნებული პრაიმერი NS-6-R	5'- GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC -3'
მავნე ორგანიზმის მატრიცული დნმ-დან ამპლიფიცირებული ფრაგმენტების მოსალოდნელი ზომა	= 718 bp ( RS-პრაიმერების წყვილი);
18S რრნმ შიდა პჯრ კონტროლის ამპლიფიცირებული ფრაგმენტების მოსალოდნელი ზომა	= 310 bp ( NS-პრაიმერების წყვილი).

ბ) პჯრ სარეაქციო ნარევის

რეაგენტი	რაოდენობა თითოეულ რეაქციაზე	საბოლოო კონცენტრაცია
სტერილური UPW	12,625 მკლ	
10 x პჯრ ბუფერი <sup>(1)</sup> (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	2,5 მკლ	1X (1,5 მმოლი MgCl <sub>2</sub> )
BSA (ფრაქცია V) (10 %)	2,5 მკლ	0,1 %
dNTP ნარევი (20 მმოლი)	0,125 მკლ	0,1 მმოლი

პრაიმერი RS-1-F (10 )	2,0 მკლ	0,8 მკმოლი
პრაიმერი RS-1-R (10 μM)	2,0 მკლ	0,8 მკმოლი
პრაიმერი NS-5-F (10 μM) (2)	0,15 მკლ	0,06 მკმოლი
პრაიმერი NS-6-R (10 μM) (2)	0,15 მკლ	0,06 მკმოლი
Taq პოლიმერაზა (5 U/მკლ) (1)	0,2 მკლ	1,0 ერთეული
ნიმუშის მოცულობა	5,0 მკლ	
ჯამური მოცულობა	25,0 მკლ	

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

(2) NS-5- F და NS-6 R პრაიმერების კონცენტრაცია ოპტიმიზირებულია კარტოფილის ტუბერის ექსტრაქტისთვის, რომელიც მიღებულია ჰომოგენიზაციის და დნმ-ის გასუფთავების (Patrik (2000)) მეთოდის გამოყენებით. რეაგენტების კონცენტრაციების რეოპტიმიზაცია იქნება საჭირო თუ ექსტრაქციისთვის გამოყენებული იქნება შენჯღრევა ან დნმ-ის გამოყოფის სხვა მეთოდები.

გ) პჯრ რეაქციის პირობაა გაიშვას შემდეგი პროგრამა

1 ციკლი	5 წთ. 95 °C ტემპერატურაზე (მატრიცული დნმ-ის დენატურაცია)
35 ციკლი	30 წმ 95 °C ტემპერატურაზე (მატრიცული დნმ-ის დენატურაცია) 30 წმ. 58 °C ტემპერატურაზე (პრაიმერების შელღობა) 45 წმ 72 °C ტემპერატურაზე ( ასლის ელონგაცია )
1 ციკლი	5 წთ 72 °C ტემპერატურა (საბოლოო ელონგაცია)
1 ციკლი	ლოდინი 4 °C ტემპერატურა.

შენიშვნა: მოცემული პროგრამა ოპტიმიზირებულია MJ Research PTC 200 თერმოციკლერისთვის. სხვა მოდელების გამოყენების შემთხვევაში, შესაძლებელია საჭირო გახდეს „გ“ პუნქტის „გ.ბ“, „გ.გ“, „გ.დ“ ქვეპუნქტებით განსაზღვრული ციკლების საფეხურების ხანგრძლიობის მოდიფიცირება; ამპლიფიცირებული



ფრაგმენტების რესტრიქციული ანალიზისას მავნე ორგანიზმის დნმ-ის პჯრ ამპლიფიცირებული პროდუქტები, 65°C ტემპერატურაზე 30 წთ-იანი ინკუბაციის შემდეგ, ფერმენტი Bsm I-ის ან იზომიზომერის (e.g. Mva 1269 I) მოქმედებით, აჩვენებს რესტრიქციული ფრაგმენტების განსხვავებული სიგრძის პოლიმორფიზმს.

4. მავნე ორგანიზმის ბიოვარ-სპეციფიური პჯრ პროტოკოლი (Patrik et al., 2001) მოიცავს:

ა) ოლიგონუკლეოტიდურ პრაიმერებს

პირდაპირი პრაიმერი Rs-1-F	5'- ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA - 3'
შებრუნებული პრაიმერი Rs-1-R	5'- CCC AGT CAC GGC AGA GAC T -3'
შებრუნებული პრაიმერი Rs-3-R	5'- TTC ACG GCA AGA TCG CTC -3'
მავნე ორგანიზმის მატრიცული დნმ-დან ამპლიფიცირებული ფრაგმენტების მოსალოდნელი ზომა	Rs-1-F/Rs-1-R-ით = 718 bp Rs-1-F/Rs-3-R -ით = 716 bp.

ბ) პჯრ სარეაქციო ნარევის:

ბ. ა) ბიოვარ 1/2 -სპეციფიური პჯრ-ს

რეაგენტი	რაოდენობა თითოეულ რეაქციაზე	საბოლოო კონცენტრაცია
სტერილური UPW	12,925 მკლ	
10X პჯრ ბუფერი <sup>(1)</sup>	2,5 მკლ	1X (1,5 მმოლი MgCl <sub>2</sub> )
BSA (ფრაქცია V) (10 %)	0,25 მკლ	0,1 %
d-NTP ნარევი (20 mM)	0,125 მკლ	0,1 მმოლი
პრაიმერი Rs-1-F (10 μM)	2 მკლ	0,8 მკმოლი
პრაიმერი Rs-1-R (10 μM)	2 მკლ	0,8 მკმოლი
Taq პოლიმერაზა (5U/მკლ) (1)	0,2 მკლ	1 ერთეული
ნიმუშის მოცულობა	5,0 მკლ	
ჯამური მოცულობა	25,0 მკლ	

<sup>(1)</sup> მეთოდები ვალიდირებულია Perkin Elmer (AmpliTaq ან Gold) და Gibco BRL. ფირმის Taq-პოლიმერაზას გამოყენებით.

ბ.ბ) ბიოვარ 3/4/5 -სპეციფიური პჯრ-ს

რეაგენტი	რაოდენობა თითოეულ რეაქციაზე	საბოლოო კონცენტრაცია
----------	-----------------------------	----------------------

სტერილური UPW	14,925 მკლ	
10X პჯრ ბუფერი <sup>(1)</sup>	2,5 მკლ	1X (1,5 მმოლი MgCl <sub>2</sub> )
BSA (ფრაქცია V) (10 %)	0,25 მკლ	0,1 %
d-NTP ნარევი (20 mM)	0,125 მკლ	0,1 მმოლი
პრაიმერი Rs-1-F (10 μM)	1 მკლ	0,4 მკმოლი
პრაიმერი Rs-1-R (10 μM)	1 მკლ	0,4 მკმოლი
Taq პოლიმერაზა (5U/მკლ) (1)	0,2მკლ	1 ერთეული
ნიმუშის მოცულობა	5,0 მკლ	
სულ მოცულობა	25,0 მკლ	

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

გ) პჯრ პროგრამა:

1 ციკლი	5 წთ. 95 °C ტემპერატურაზე (მატრიცული დნმ-ის დენატურაცია)
35 ციკლი	30 წმ 95 °C ტემპერატურაზე (მატრიცული დნმ-ის დენატურაცია) 30 წმ. 58 °C ტემპერატურაზე (პრაიმერების შელღობა) 45 წმ 72 °C ტემპერატურაზე (ასლის ელონგაცია)
1 ციკლი	5 წთ 72 °C ტემპერატურა (საბოლოო ელონგაცია)
1 ციკლი	ლოდინი 4 °C ტემპერატურა.

შენიშვნა: მოცემული პროგრამა ოპტიმიზირებულია MJ Research PTC 200 თერმოციკლერისთვის. სხვა მოდელების გამოყენების შემთხვევაში, შესაძლებელია საჭირო გახდეს „გ“ პუნქტის „გ.ბ“, „გ.გ“, „გ.დ“ ქვეპუნქტებით განსაზღვრული ციკლების საფეხურების ხანგრძლიობის მოდიფიცირება; მავენ ორგანიზმის დნმ-დან პჯრ ამპლიფიცირებული პროდუქტები Rs-1-F და 1-R პრაიმერების გამოყენებისას, 65°C ტემპერატურაზე 30 წთ-იანი ინკუბირების შემდეგ, ფერმენტი Bsm I-ის ან იზოშიზომერის (e.g. Mva 1269 I) მოქმედებით, აჩვენებს რესტრიციული ფრაგმენტების განსხვავებული სიგრძის პოლიმორფიზმს. მავენ ორგანიზმის დნმ-დან პჯრ

ამპლიფიცირებულ პროდუქტებს Rs-1-F და Rs-3-R პრაიმერების გამოყენებისას არ გააჩნია რესტრიქციული ადგილები.

5. დამტანი (ლოადინგ) ბუფერის მომზადება

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

6. 10 X ტრის აცეტატ EDTA ბუფერი (TAE), pH 8,0

ტრის ბუფერი	48,4 გ
ცინულოვანი ძმარმჟავა	11,42 მლ
EDTA(ორჩანაცვლებული ნატრიუმის მარილი)	3,72 გ
გამოხდილი წყალი	1,00 ლ

გამოყენებამდე უნდა განზავდეს 1x -მდე არსებობს ასევე კომერციული სახით (Invitrogen, ან სხვა მსგავსი).

დანართი N15

FISH ტესტისთვის ვალიდირებული რეაგენტები

1. ოლიგონუკლეოტიდები

მავნე ორგანიზმისთვის სპეციფიური ზონდი OLI-1-CY3:	5'-ggc agg tag caa gct acc ccc-3'
არასპეციფიური ეუბაქტერიული ზონდი EUB-338-FITC:	5'- gct gcc tcc cgt agg agt -3'

## 2. საფიქსაციო ხსნარი

ა) გაფრთხილება! საფიქსაციო ხსნარი შეიცავს პარაფორმალდეჰიდს, რომელიც მომწამვლელია. გამოყენებულ უნდა 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 სანჯღრეველაზე მორევით;

გ) 1 მლ 0.1 მოლი ფოსფატის ბუფერის pH 5 წვეთი 1 N HCl-ის დამატებით დაიყვანება 7.0 (PB; pH7,0) - 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 μm ზომის მემბრანული ფილტრით და გამოყენებამდე ინახება სუფთა ადგილას 4°C ტემპერატურაზე.

## 3. 3x საჰიბრიდიზაციო ნარევი

NaCl	2,7 მოლი
ტრის-HCl	60 მმოლი (pH 7,4)
EDTA (გაფილტვრით გასტერილებულ და ავტოკლავირებულ)	15 მმოლი

საჭიროებისამებრ განზავება ხდება 1 x -მდე

## 4. საჰიბრიდიზაციო ხსნარი

1 x საჰიბრიდიზაციო ნარევი	
ნატრიუმის დოდეცილ სულფატი ( SDS )	0,01 %
ფორმამოდი	30%
ზონდი EUB 338	5 ნგ/მკლ
ზონდი OLI-1 ან OLI-2	5 ნგ/მკლ

საჰიბრიდიზაციო ხსნარი მზადდება ცხრილი N1-ში მითითებული გამოთვლების შესაბამისად. თითოეული პრეპარატისთვის (ორი ნიმუში, თვითოეული თავისი განმეორებით) საჭიროა 90 მკლ საჰიბრიდიზაციო ხსნარი. გაფრთხილება: ფორმალდეჰიდი ძალიან ტოქსიკურია. უნდა გამოყენებულ იქნეს ხელთათმანები და დაცული იქნეს უსაფრთხოების ზომები.

**ცხრილი N1**

საჰიბრიდიზაციო ნარევის დასამზადებლად საჭირო რეაგენტების რაოდენობა

პრეპარატების რაოდენობა	1	4	6	8	10
სტერილური UPW	23,1	92,4	138,6	184,8	231,0
3x საჰიბრიდიზაციო ნარევი	30,0	120,0	180,0	240,0	300,0
1 % SDS	0,9	3,6	5,4	7,2	9,0
ფორმამიდი	27,0	108,0	162,0	216,0	270,0
ზონდი EUB 338 (100 ნგ/მკლ)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
ზონდი OLI-1 or OLI-2 (100 ნგ/მკლ)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
ჯამური მოცულობა (მკლ)	90,0	360,0	540,0	720,0	900,0

სინათლისადმი მგრძობიარე ოლიგო-ზონდების შემცველი ყველა ხსნარი ინახება ბნელ ადგილას -20 ° C ტემპერატურაზე. ხმარებისას დაცული უნდა იყოს პირდაპირი მზის სხივების და ელექტროგანათებისგან.

0,1 M ფოსფატის ბუფერი, pH 7,0

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,52 გ
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,44 გ
გამოხდილი წყალი	1,00 ლ

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

დანართი N16

### ბადრიჯნის და პომიდორის კულტურა

ბადრიჯნის (*Solanum melongena*) ან პომიდორის (*Lycopersicon esculentum*) თესლი ითესება პასტერიზებულ სათესლე კომპოსტში. ჩითილი კარგად განვითარებული ჩანასახოვანი ფოთლებით (10 – 14 დღე) უნდა გადაირგას პასტერიზებულ ნიადაგში;

ბადრიჯანი ან პომიდორი მოყვანილი უნდა იქნეს სათბურში შემდეგ პირობებში:

დღის ხანგრძლივობა:	14 საათი, ან ბუნებრივი დღის ხანგრძლივობა, თუ ის
--------------------	--

	მეტია
ტემპერატურა:	დღე: 21 - 24 <sup>0</sup> C ღამე: 14-18 °C.
პომიდვრის მიმღებიანი ჯიში	„Moneymaker“
ბადრიჯნის მიმღებიანი ჯიში	„Black Beauty“

დანართი N17

ფოსოების განლაგება FISH-ის პრეპარატისათვის

ნიმუში 1



ფოსო 1

ცარიელი



ფოსო 2

ცარიელი



ფოსო 3

ცარიელი



ფოსო 4

ნიმუში 2



ფოსო 5

ნიმუში 1



ფოსო 6

ცარიელი



ფოსო 7

ცარიელი



ფოსო 8

ცარიელი



ფოსო 9

ნიმუში 2



ფოსო 10

საფარი მინა 1

საფარი მინა 2

