

надлежащим выполнением гигиенических требований. Установлено значимую, по сравнению с другими показателями качества, изменчивость показателей КМАФАнМ и количества соматических клеток.

Ключевые слова: молоко-сырье, гигиена получения молока, показатели качества молока, КМАФАнМ, количество соматических клеток.

PRACTICAL SUBSTANTIATION OF QUALITY PARAMETERS OF RAW MILK BY VARIOUS DAIRY FARMING PRACTICES

Kondrasiy L., Yakubchak O., Osipova T.

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv

Summary. In Ukraine take place a tendency to close inefficient farms of producing milk. The reason for this is closing food contract application between Russia and Ukraine. The dairy products can be competitive outside the CIS, if the raw milk (from which it is made) of Ukrainian farms accord with international quality requirements (international standards). According to EU Regulations safety and quality raw milk can be received from farms using good dairy farming practices and good milking hygiene practices. The result of using good dairy farming practices is safety and quality dairy products. There are many different dairy farming practices in Ukraine. The aim of the study was to determine the changes of quality parameters of raw milk under good (where using good milking hygiene practices) and traditional (where were found some mistakes in milking hygiene practices) dairy farming practices using in Ukraine. The quality parameters of raw milk were collected from farms located in Kiev, Cherkassy, Poltava, Chernihiv and Vinnitsa regions of Ukraine. Totally –17 farms in both groups.

Research period – one year (2015/12–01). Studied the following parameters of quality raw milk: density (kg/m³), pH, acidity (°T), the purity by standard (group), temperature (° C), the dry matter (%), the number of mesophilic aerobic and facultative anaerobic microorganisms (according to Ukraine standard 3662-97 – the total bacterial contamination, CFU×100^u /mL), the somatic cells count (1000 /mL) fat content (%) protein (%). Found that parameters of quality raw milk from farms with good milking hygiene practices compared with farms where were found some mistakes in milking hygiene practices had significantly lower relative standard deviation during the research period. Also were below average values of year and maximum and minimum average values of month of total bacterial contamination and somatic cells count of raw milk from farms where using good milking hygiene practices. This results demonstrated the impact of milking hygiene practices to its stability during the year. Established significant volatility total bacterial contamination and somatic cells count compared to other quality parameters of raw milk in farms of both groups. This results demonstrated the importance of determining these indicators in evaluating the implementation of appropriate hygiene requirements to obtain raw milk.

Key words: raw milk, dairy farming practices, total bacteria count, somatic cells count.

УДК 637.075:579.22

РОЗРОБКА ОЛІГОНУКЛЕОТИДНИХ ПРАЙМЕРІВ, СПЕЦИФІЧНИХ ДО ГЕНІВ ШИГАТОКСИНУ *STX 1*, *STX 2* ТА ІНТИМІНУ *EAE* ШИГАТОКСИНПРОДУКУЮЧИХ *E. COLI*

Бергілевич О.М., д.вет. н., професор o.bergylevych@med.sumdu.edu.ua

Касянчук В.В., д.вет. н., професор v.kasyanchuk@med.sumdu.edu.ua

Сумський державний університет, м. Суми

Дерябін О. М., завідувач відділу молекулярної біології і імунохімії don.lmb@gmail.com

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ

Єфімова О.М., к.вет.н., начальник відділу

Департамент ветеринарної медицини Держветфітослужби України, м. Київ,

Кустуров В.Б., здобувач

Сумський національний аграрний університет, м. Суми

Анотація. В роботі представлено результати лабораторних досліджень щодо розробки олігонуклеотидних праймерів, специфічних до генів токсину *stx1*, *stx2* та інтиміну (*eae*) що є маркерами патогенності шигатоксинпродукуючих *E.coli* (STEC). Зроблено аналіз даних літератури,

присвяченої вивченню STEC та розроблено три пари специфічних олігонуклеотидних праймерів для використання в ПЛР та ідентифікації зазначених мікроорганізмів.

Ключові слова: шигатоксинпродукуючі *E.coli*, STEC, олігонуклеотидні праймери, ПЛР

Актуальність проблеми. Гострі кишкові захворювання в людей, що викликані харчовими продуктами контамінованими шигатоксинпродукуючими *E.coli* представляють актуальність в розвинених країнах особливо в останні десять років. Усі шигатоксинпродукуючі *E.coli* об'єднані в групу, яка на міжнародному рівні має аббревіатурну назву STEC (*Shigatoxigenic Escherichia coli*) або VTEC (*verotoxigenic Escherichia coli*). Ця група STEC, ще називається «важлива шістка STEC», яка представляє великий інтерес для Європейського Союзу та інших розвинених країн [1, 2, 5]. Всі ці серотипи виробляють шигатоксин, а також інші фактори вірулентності, і методи їх виявлення вважаються актуальними для дослідників. Захворювання, що викликають STEC відносяться до гострих кишкових інфекцій та часто супроводжуються гемолітико-уремічним синдромом (ГУС). Слід зазначити, що кількість цих захворювань, щорічно зростає у таких країнах як США, Канада, Фінляндія, Японія, та в ЄС [1, 2, 4, 5]. STEC відносяться до ентєрогеморагічних, що продукують веротоксини (шигаподібні токсини). Вони представлені різними серологічними варіантами, серед яких *E. coli* O157 : H7. *E. coli* O157 : H7 має найбільше епідеміологічне значення тому, що є основною причиною гострих кишкових інфекцій з кров'янистою діареєю та з наступним розвитком ГУС [3, 4]. Найбільший ризик ці мікроорганізми представляють для дітей до 5 років і людей похилого віку.

У світі існує два підходи до контролю STEC. Перший – це контроль за *E. coli* O157:H7, а другий – контроль за групою мікроорганізмів, що об'єднує шість найбільш важливих для контролю шигатоксинпродукуючих видів *E. coli*, які на міжнародному рівні називаються Non – *E. coli* O157:H7 [2,5,6].

У своїй роботі ми обрали саме другий підхід щодо контролю за такими небезпечними видами *E. coli* – контроль за Non – *E. coli* O157: H7, тобто за групою STEC. *E.coli* O157:H7 вважається причиною третини випадків захворювань, решту випадків захворювання спричиняють шигатоксинпродукуючі *E.coli*, які не належать до *E.coli* O157.

Було доведено, що STEC локалізуються в шлунково-кишковому тракті великої рогатої худоби, свиней і за певних умов спричиняють забруднення сирого м'яса від цих тварин [1,2,4]. Для ефективного контролю STEC вчені розробляють високочутливі та ефективні методи на основі ПЛР. Важливим етапом для розробки методу на основі ПЛР – аналізу є характеристика ізолятів *E. coli*, що спричиняють діарею і гемолітико-уремічний синдром у людини за фенотиповими та генетичними ознаками. Такі дослідження були проведені рядом науковців, які підтверджують що патогенні властивості STEC проявляються завдяки наявності у них таких генів як *stx1*, *stx2* та *eae* [3, 4, 5, 6]. Для розробки ПЛР методу діагностики першочергово необхідно розробити праймери, які повинні бути високоспецифічними. В Україні на даний час існує незначна кількість досліджень у даному напрямку. Враховуючи важливість контролю за STEC та необхідність розробки новітніх методів їх ідентифікації, вважаємо проведення досліджень у даному напрямку актуальними.

Метою дослідження було розробити олігонуклеотидні праймери, специфічні до генів токсину *stx1*, *stx2* та інтиміну (*eae*) шигатоксинпродукуючих *E.coli*.

Завдання дослідження. (I)Провести аналіз та теоретичне обґрунтування існуючих в науковій літературі послідовностей груп генів специфічних для шигатоксинпродукуючих *E.coli*. (II) На основі вищезазначеного провести розрахунок та розробити високоспецифічні олігонуклеотидні праймери для мультиплексного варіанту полімеразної ланцюгової реакції. (III) Синтезувати та випробувати розроблені праймери і провести оптимізацію умов проведення мультиплексного варіанту ПЛР.

Методи дослідження. Дослідження проводили в Національному центрі штамів мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ) та в Державному НДІ з лабораторної діагностики. Мікробіологічні дослідження щодо виділення STEC здійснювали загальноприйнятими методиками згідно чинними в Україні нормативно-правовими актами на диференційно-діагностичних поживних середовищах. Виділення STEC проводили із проб змивів з туш яловичини, свинини в процесі їх виробництва на м'ясопереробних підприємствах.

Розробка олігонуклеотидних праймерів, специфічних до генів токсину *stx1*, *stx2* та інтиміну (*eae*) STEC для використання у мультиплексному варіанті ПЛР була проведена нами спільно із співробітниками відділу молекулярної біології і імунохімії та співробітниками Національного центру штамів мікроорганізмів, відділу біотехнології та контролю якості бактеріальних препаратів ДНКІБШМ (м. Київ). Для отримання продуктів ПЛР - олігонуклеотидних праймерів, специфічних до генів токсину *stx1*, *stx2* та інтиміну (*eae*), були відібрані і проаналізовані послідовності генів з

Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини

використанням баз даних GenBank, EMBL (Європейська молекулярно-біологічна бібліотека), DDBJ (Японська база даних нуклеотидних послідовностей), PDB sequences. За основу були відібрані наступні послідовності: AB647443, AF022236, BA000007, ECOSTLII, AB647559, AB647430, AB647374, AB334567, AJ308552.1, AB647553.1, DQ523611.1, AB647374.1, H19BSLTA, KF771380.1, AB647493.1, AB647432.1, AB647437.1, AB647449.1, DQ523603.1, AB647365.1, EU700490.1, EF441598.1, EF441588.1.

Праймери для мультиплексного варіанта ПЛР були розраховані за допомогою програмного забезпечення "Vector NTI" v.10.0.1 (Invitrogen) і синтезовані в НВФ „ЛИТЕХ”. Вирівнювання нуклеотидних послідовностей та аналіз їх гомології виконали за допомогою модуля CLUSTALX програмного забезпечення "Vector NTI" v.10.0.1 (Invitrogen) і BLAST-аналізу ресурсу <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Національного центру біотехнологічної інформації, США). Ліофілізовані праймери розводили до концентрації 100 пкм/мкл "Ultra Pure Distilled Water" (Invitrogen, Cat.#10977-023, США) і зберігалися при температурі мінус 20 °С до використання.

Результати дослідження. Результати встановлених послідовностей, розроблених олігонуклеотидних праймерів, специфічних до генів токсину (*stx2*, *stx1*) та інтиміну (*eae*) шигатоксинпродукуючих варіантів *E. coli* наведено в таблиці 1.

У результаті для виявлення та ідентифікації шигатоксинпродукуючих варіантів бактерій *E. coli* були розроблені олігонуклеотидні праймери, специфічні до генів токсину *stx1* і *stx2* та усіх поліморфних варіантів гену *eae* (інтиміну), а їх гомологія і позиції на відповідних генах оригінальних праймерів наведена на рис. 1 (А, В, С та D).

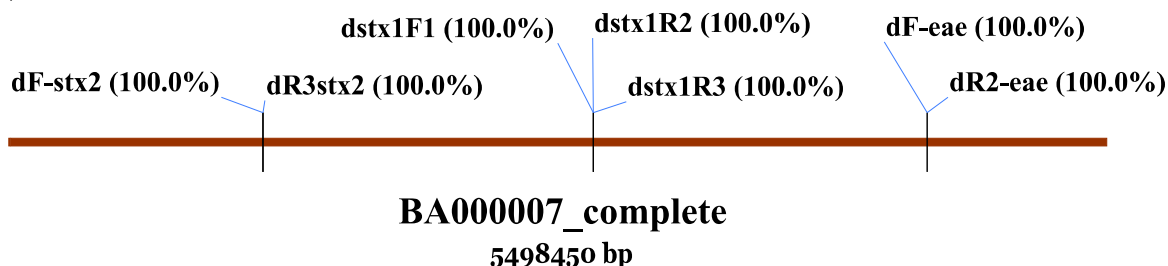
Таблиця 1

Послідовність розроблених олігонуклеотидних праймерів, специфічних до генів токсину (*stx2*, *stx1*) та інтиміну (*eae*) STEC

Ген	праймер	послідовність (5'→3')	Tm (°C)	розмір фрагмента (п.н.)
<i>Eae</i>	dF-eae	CGCTCTTGGTATCGCTGGTAAC	53,1	327
	dR2-eae	TAGTCTCGCCAGTATTCGCCAC	53,9	
<i>stx2</i>	dF1-stx2	CCATGACAACGGACAGCAGT	53,1	466
	dR3-stx2	ATCTGACATTCTGGTTGACTCTCTTC	53,9	
<i>stx1*</i>	7d-stx1_F	CGTGTTGCAGGGATCAGTCCG	54,3	728
	dstx1-r3	CGCACTGAGAAGAAGAGACTGAAG	56,3	
	d-stx1-f1	GCAAAGACGTATGTAGATTCGCTG	53,2	796
	d-stx1-R2	CAGTTACACAATCAGGCGTCCG	55,0	

Примітка: *пари праймерів 7d-stx1_F/dstx1-r3 та d-stx1-f1/d-stx1-R2 є альтернативними.

А).



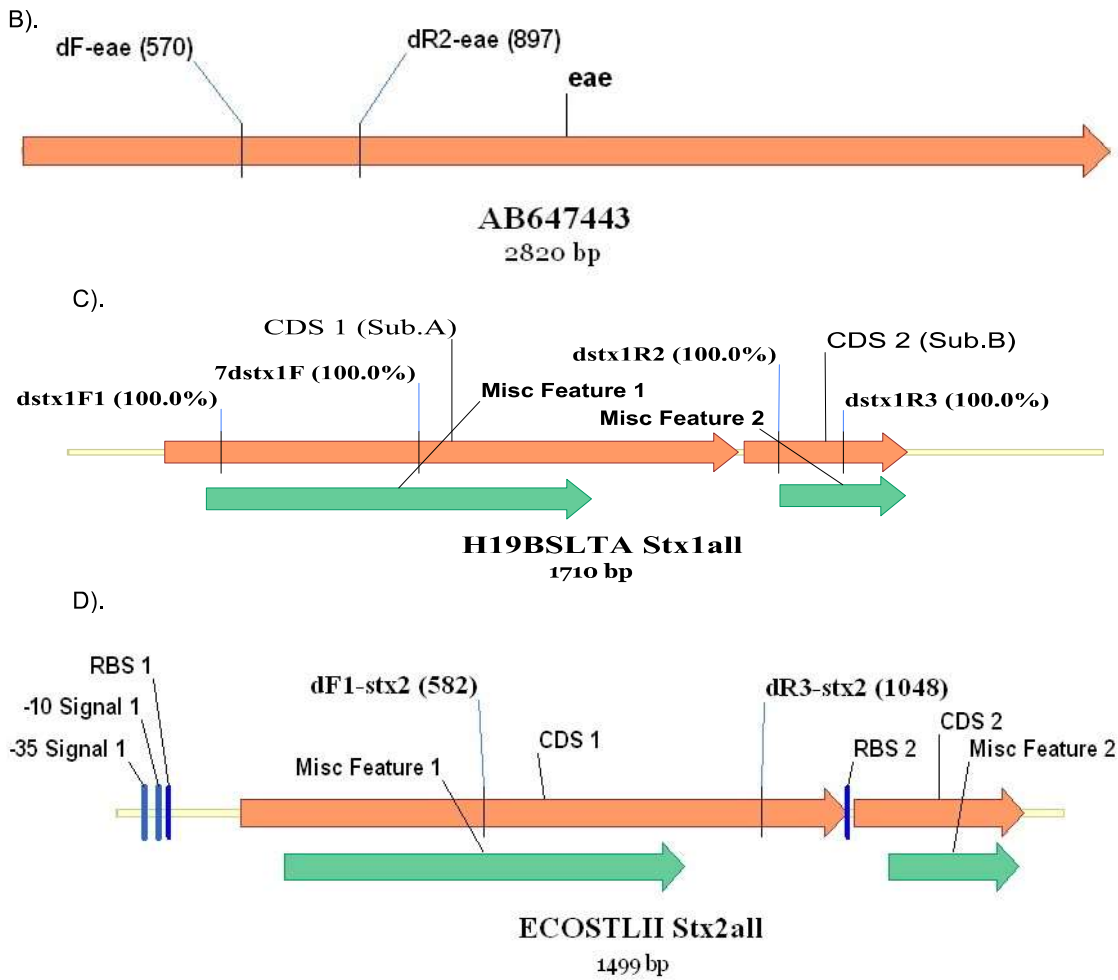


Рис. 1. Гомологія (А) і позиції олігонуклеотидних праймерів на послідовностях генів *eae* (В), *stx1* (С) та *stx2* (D) бактерій *E.coli* серотипу (групи) O157:H7.

Для перевірки специфічності та чутливості синтезованих праймерів як можливе джерело цільових генів були використані штами *E.coli* різних серотипів з колекцій відділу біотехнології та контролю якості бактеріальних препаратів ДНКІБШМ та Національного центру штамів мікроорганізмів. Перевірці підлягали штами *E. coli* серотипів O19, O20, O25, O26, O45, O55, O103, O111, O145 та 2 штами серотипу O157. В результаті проведених досліджень ген *stx2* був виявлений в одного штама *E.coli* серотипу O157, а ген *eae* – у штама *E.coli* серотипу O145 та в одного з двох штамів серотипу O157. Слід відзначити, що ген *stx1* не був виявлений в жодному з досліджених штамів колекцій. Як негативні контролю було використано штама *E.coli* серотипу O19.

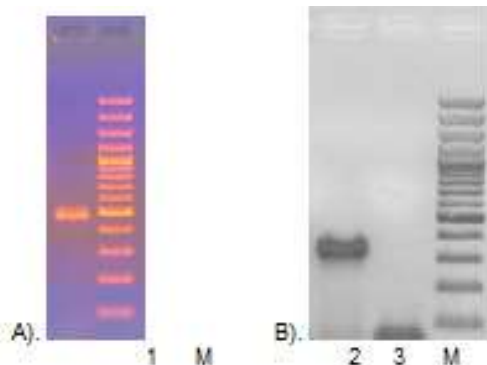


Рис. 2. Результат електрофоретичного аналізу в 1,5 % гелі агарози продуктів ампліфікації: 1 – ген *stx2* (A) бактерій *E.coli* серотипу O157; 2 – ген *eae* (B) бактерій *E.coli* серотипу O145; 3 – бактерії *E.coli* серотипу O19; M – маркер “100 bp Plus DNA Ladder” (Fermentas).

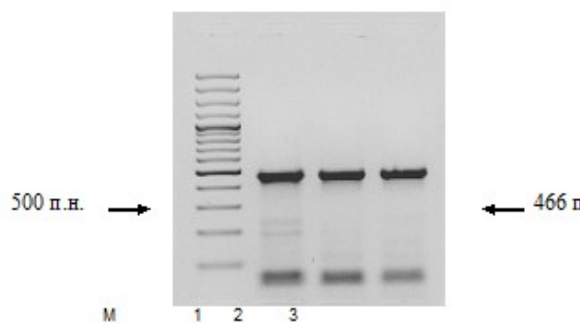


Рис. 3. Результат електрофоретичного аналізу в 1,5 % гелі – агарози продуктів ампліфікації гена *stx2* бактерій *E.coli* серотипу O157 – при температурі відпалу праймерів dF1-*stx2*/dR3-*stx2*: 1 – 58 °C; 2 – 60 °C; 3 – 62 °C; M – маркер “100 bp Plus DNA Ladder” (Fermentas).

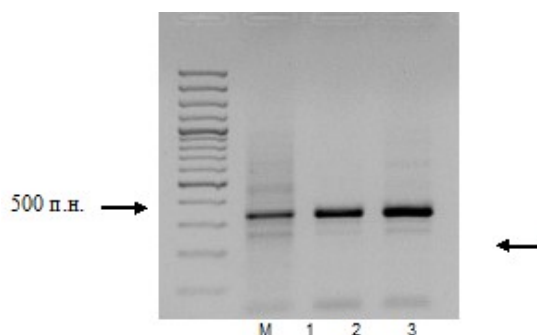


Рис. 4. Результат електрофоретичного аналізу в 1,5 % гелі – агарози продуктів ампліфікації гена *eae* бактерій *E.coli* серотипу O145 – при температурі відпалу праймерів dF-*eae*/dR2-*eae*: 1 – 58 °C; 2 – 60 °C; 3 – 62 °C; M – маркер “100 bp Plus DNA Ladder” (Fermentas).

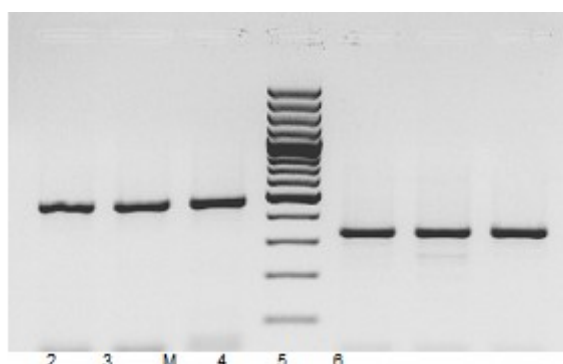


Рис. 5. Результати електрофоретичного аналізу продуктів ампліфікації генів *stx2* та *eae* після оптимізації температури відпалу праймерів: M - маркер “100 bp Plus DNA Ladder” (Fermentas); ген *stx2* – 1 – 63 °C, 2 – 64 °C, 3 – 65 °C; ген *eae* – 4 – 63 °C, 5 – 64 °C, 6 – 65 °C.

Оскільки при розрахунку олігонуклеотидних праймерів урахувалася можливість їх використання в мультиплексному варіанті полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для розробки на їх основі діагностичної тест-системи, то оптимізацію температури відпалу праймерів проводили однаково (рис. 3, рис. 4 та рис. 5).

За результатами проведеного аналізу оптимальною температурою відпалу для праймерів, специфічних до генів *stx2* та *eae*, визначено температуру в 65 °C (табл.2).

Таблиця 2

Програма температурного режиму проведення ПЛР для розробки тест системи

Етап	Режим	Кількість циклів
1	95 °C – 3 хв	1
2	94 °C – 30 с	35
	65 °C – 20 с	
	72 °C – 30 с	
4	72 °C – 4 хв	1
5	10 °C	зберігання

Для визначення чутливості розроблених праймерів були приготовлені 10-кратні послідовні розведення очищеної бактеріальної ДНК. Виділення ДНК виконували трьома різними методами: 1-й – одну колонію культури *E. coli* відбирали в 0,5 см³ стерильної деіонізованої води і прогрівали 3 хв. при температурі 100 °С, після чого негайно переносили на лід; 2-й – виділення за допомогою комерційного набору «ДНК-сорб-В» (Амплісенс, Росія); 3-й – з використанням силіка-модифікованих (~15 нм) магнітних часточок (синтезовані і надані Н.М.Волковою, Інститут проблем фізики і біофізики НАНУ), з концентрацією 10 мг/мл і насиченістю 37 емс(А·м²/кг). Очищення бактеріальної ДНК для спектрофотометричного аналізу виконували за допомогою набору «Ultra Clean DNA Purification Kit» (Cat.# 12500-100; МОБІО, США). Перевірку специфічності праймерів провели на тестових штаммах гетеро логічних мікроорганізмів відділу біотехнології та контролю якості бактеріальних препаратів ДНКІБШМ, а саме: *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus anthracis*, *Campylobacter jejuni*, *Pasterella multocida* та *Yersinia enterocolitica*

Розроблені праймери для виявлення та ідентифікації шига-токсинпродукуючих варіантів *E.coli* були перевірені реакцією методом «гарячого» старту в об'ємі 0,025 см³. Електрофоретичний аналіз отриманих олігонуклеїдних праймерів проводили шляхом розділення фрагментів ДНК в 1,5 % гелі агарози (Sigma, США). Після охолодження розплавленої агарози до 60 - 65 °С додавали 0,003 см³ розчину бромиду етидію і перемішували. Агарозний гель заливали у форму (завтовшки 5-6 мм) і формували за допомогою гребінок лунки для внесення зразків шигатоксинпродукуючих *Escherichia coli* – 327 п.н., 466 п.н та 728 п.н..

Облік та інтерпретація результатів проводять шляхом наявності смуг на всіх доріжках ампліфікованих ДНК зразків. У негативному контрольному зразку (К-) смужки повинні бути відсутні. Поява смужки на рівні позитивного контролю свідчить про контамінацію (забруднення) компонентів набору. У позитивних контрольних зразках (К+) повинна виявлятися три смужки жовтогарячого кольору розміром 327 п.н., 466 п.н та 728 п.н. Відсутність смужок жовтогарячо-червоного кольору на рівні позитивного контролю (К+) 327 п.н., 466 п.н та 728 п.н.) свідчить про відсутність шигатоксинутворюючих *E. coli* у аналізованій пробі. Наявність смужок, що відповідають за електрофоретичною рухливістю позитивному контролю (327 п.н., 466 п.н та 728 п.н.) свідчить про присутність шигатоксинутворюючих *E. coli* у аналізованій пробі. Результат аналізу не можна вважати достовірним, якщо на доріжці будь-якого негативного контролю виявляється специфічні смужки (327 п.н., 466 п.н та 728 п.н.). Необхідно поставити не менше трьох негативних контролів на етапі виділення ДНК і стільки ж на етапі постановки ПЛР для виявлення джерела контамінації.

Висновки

1. Встановлено, що оптимальним температурним режимом відпалу для праймерів, специфічних до генів *stx2* та *eae*, які є характерними маркерами патогенності STEC встановлено температуру в 65 °.
2. Розроблено три пари олігонуклеотидних праймерів, специфічних до генів токсину *stx1* і *stx2* та усіх поліморфних варіантів гену *eae* (інтиміну) для використання в ПЛР для ідентифікації STEC.

Література

1. Бергілевич О. М. Маркери патогенності *E. coli* O157: H7 та основні гени-мішені для діагностики цього мікроорганізму в яловичині ПЛР тест-системою / О. М. Бергілевич., В. В. Касянчук, О. М. Єфімова // Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини / Зб. наук. праць Харківськ. держ. зоовет. акад.– Вип. 28, Ч.2. – Харків, 2014. – С.188-192.
2. Виявлення та ідентифікація шига-токсин-продукуючих штамів бактерій *E. coli* методом полімеразної ланцюгової реакції / В. В.Касянчук, В. О.Ушкалов, О. М.Бергілевич, О. М.Дерябін, О. М.Єфімова, Р. В.Козій // Вісник Сумськ. нац. аграр. ун-т. – Вип.7. (37) Серія «Ветеринарна медицина». - Суми, 2015. – С. 121-124.
3. Friedrich A. W. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms /A.W. Friedrich, M. Bielaszewska, W. L. Zhang, et al. // J. Infect. Dis. №185. – 2002. – P. 74- 84
4. Ghafir Y. Comparison of swabbing and destructive methods for microbiological pig carcass sampling / Y.Ghafir, G. Daube // Let. of Applied Microbiology, № 47. – 2008.– P. 322-326.
5. Monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards (Question No EFSA– Q– 2007– 036) // The EFSA Journal. – № 579. – 2007. – P. 1– 61.
6. Perelle S. Detection of *Escherichia coli* serogroup O103 by real-time polymerase chain reaction. / S. Perelle, F. Dilasser, J. Grout, P. Fach // J Appl Microbiol. № 98(5). – 2005.– P. 1162-1168.

РАЗРАБОТКА ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРАЙМЕРОВ, СПЕЦИФИЧЕСКИХ К ГЕНАМ ШИГАТОКСИНА *STX1*, *STX2* И ИНТИМИНА (*EAE*) ШИГАТОКСИНПРОДУЦИРУЮЩИХ *E. COLI* Бергилевич А.Н., Касянчук В.В., Дерябин О.Н., Ефимова О.Н., Кустуров В.Б.

Аннотация. В работе представлены результаты лабораторных исследований по разработке олигонуклеотидных праймеров, специфических к генам токсина *stx1*, *stx2* и интимина (*eae*) которые являются маркерами патогенности шигатоксинпродуцирующих *E.coli*. Сделан анализ данных литературы, посвященной изучению STEC и разработано три пары специфических олигонуклеотидных праймеров для использования в ПЦР для идентификации упомянутых микроорганизмов.

Ключевые слова: шигатоксинпродуцирующие *E.coli*, STEC, олигонуклеотидные праймеры, ПЦР.

THE DEVELOPMENT OF OLIGONUCLEOTIDE PRIMERS SPECIFIC TO THE GENES OF SHIGA TOXIN *STX1*, *STX2* AND INTIMIN (*EAE*) OF SHIGA TOXIN-PRODUCING STRAIN OF *E.COLI*.

O. Berhilevych, V. Kacianchuk, O. Deryabin, O. Efrimova, V. Kusturov

Summary. Shiga toxin-producing strains of *Escherichia coli* (STEC) is a very dangerous food-borne pathogen that can cause hemorrhagic colitis (HC), hemolytic uremic syndrome (HUS) and thrombotic thrombocytopenic purpura. There are two types of Shiga toxin (*Stx1* and *Stx2*) produce by STEC. The production of these toxins is coded by appropriate genes - *stx1* and *stx2*. In addition to Shiga toxin production, another virulence factor expressed by STEC is an intimin. The intimin is a membrane protein produced by all attaching enteric pathogens including STEC as adherence factor for attachment to the intestinal epithelial cells. The *eae* gene codes producing of this protein.

The aim of this study was to identify of oligonucleotide primers specific to the toxin gene *stx1*, *stx2* and intymin (*eae*) which are markers of pathogenicity Shiga toxin-producing strain of *E.coli* (STEC).

The work was performed in the Microbiology Laboratory of Center "ECOMEDHIM" in Sumy State University (Sumy, Ukraine), in the State Research Institute of Laboratory Diagnostics and Veterinary Expertise (Kyiv, Ukraine) and in State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms, (Kyiv, Ukraine). Primers for PCR multiplex variant were calculated by the software "Vector NTI" v.10.0.1 (Invitrogen) with using BLAST-analysis and resource <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (National Center for Biotechnology Information, USA). and synthesized in the Firm "LYTEH" (Russia). Polymerase chain reaction was performed in termocycles "Tertsyk" (DNA technology, Russia) and "T1" (Biometra, Germany). The reaction was carried out by "hot" start in a volume of 0,025 cm³. In order to minimize the formation of nonspecific dimers primer matrix and its amplification the method of preparation of the reaction mixture with the physical separation of PCR components was used. To prepare the "lower" reaction mixture nucleotydryphosphate (2 mM) was mixed with appropriate primers in one tube at the rate of 0,025 cm³ each (final concentration from each primer 10-15 pmol / sample). After mixing in a vortex, the mixture was dropped in prepared for PCR microtubes in volume 0,005 cm³ in earch and on the top of it molten wax in volume 0,015 cm³ was added. After solidification of wax in tube "upper" reaction mixture in volume 0,017 cm³ and 2 drops of mineral oil were added. The "upper" reaction mixture (1 sample calculation) consist of 0,005 cm³ PCR buffer; 0.0025 cm³ 50 mM MgSO₄; 0,009 cm³ H₂O MilliQ and 0.0005 cm³ Taq-polymerase (5 units / ml). Samples of bacterial DNA placed under oil in the volume 0,003 cm³.

As a result three pairs of specific oligonucleotide primers were developed for using in PCR and identification of these type microorganisms. After culture-dependent method of isolation of *E. coli*, each positive sample was analyzed by multiples PCR to detect the *stx1*, *stx2*, and *eae* genes. It was established that the optimal annealing temperatures for primers specific to the gene *eae* *stx2* and that characteristic markers of pathogenic STEC defined temperature 65°C.