**Быстрая и точная диагностика *C. difficile*: новый ИХА тест для выявления токсинов А и В**

***Муратова К.В.1,2*, *Моисеева А.А.1, Семейкина А.А.1***

*Студент, 4 курс бакалавриата*

*1Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия*

*2Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "МИРЭА - Российский технологический университет", Москва, Россия*

*E-mail:* [*melonmur@gmail.com*](mailto:melonmur@gmail.com)

*Clostridioides difficile* – анаэробная, грамположительная, спорообразующая бактерия,некоторые штаммы которой продуцируют токсины. Инфекция может быть бессимптомной или вызвать псевдомембранозный колит из-за колонизации токсикогенных штаммов. Бактерия распространяется через споры, особенно в больницах, а основной группой риска являются люди пожилого возраста. Инфекция *C. difficile* может вызывать угрожающие жизни симптомы, такие как интенсивная диарея и обезвоживание, что делает разработку теста для ранней диагностики важной задачей.

Эталонным методом диагностики этой бактерии считается посев из кала на токсикогенность из-за высокой чувствительности и специфичности, но он занимает 2-5 дней. Иммуноферментный анализ также широко применяется, обладая хорошей чувствительностью и специфичностью, с получением результата за 2-6 часов. На фоне этих методов иммунохроматографический анализ быстрее (10 – 15 минут) и проще в исполнении.

Цель исследования – разработка иммунохроматографической тест – системы для диагностики *Clostridioides difficile* в кале. Определяемыми антигенами выбраны токсины А и Б.

Метками для антител выбраны карбоксилированные латексные частицы. Активация активной группы на поверхности латексных частиц позволяет образовывать им ковалентной связь с антителами. Такой метод связывания гарантирует лучшую фиксацию антител, в отличии от физической адсорбции. В данной тест – системе были подобраны латексы разных цветов для упрощения визуализации результата. На рабочей мембране было подобрано оптимальное расположение тестовых зон для каждого из токсинов.

Проведен скрининг моноклональных антител и последующая их характеристика методами иммуноферментного анализа и электрофореза. По результатам эксперимента были выбраны антитела, которые обладали лучшей активностью и чистотой.

В ходе исследования оптимизирован мультимембранный композит, а именно мембраны и реагенты, наносимые на них. В качестве исследуемого образца используется кал, под который была подобрана стекловолоконная мембрана SB06 («Kinbio», Китай). Для рабочей зоны выбрали нитроцеллюлозную мембрану CN95 («Sartorius», Германия), которая обеспечивает оптимальную скорость потока и удерживает антитела.

Для образца был подобран рабочий буфер. Основа подбиралась из фосфатного, боратного и Tris/HCl буферов. По итогам шахматного теста был выбран 100 мМ фосфатный буфер. Далее проводился подбор добавок, в результате которого положительно повлияли на сигнал и чувствительность 0,25 % TritonX 100 и 1 % BSA.

Предел обнаружения для токсина A и B составил 12 и 0,3 нг/мл соответственно. Тест показывает результат в течение 10 минут, что позволяет оперативно получать результаты и облегчает дальнейшую диагностику и лечение заболеваний, ассоциированных с *C. difficile*. Благодаря подбору разноцветных латексов визуализация результатов стала более наглядной, что очень важно для мультисистем.