

69. Афанасьев А М, Александров П Я, Якимов С С, Препринт ИАЭ-3337/9 (М.: ИАЭ, 1980)
70. Mitin A V *Phys. Lett. A* **84** 283 (1981)
71. Митин А В *Оптика и спектроск.* **53** 288 (1982)
72. Митин А В, Дисс. ... докт. физ.-мат. наук (Казань: КГТУ, 1984)
73. Александров Е Б *УФН* **107** 595 (1972)
74. Митин А В, в сб. *Тезисы Всесоюз. совещания по ядерно-спектроскопическим исследованиям сверхтонких взаимодействий, Москва, 1985* (М., 1985) с. 110
75. Sadykov E K, Zakirov L L, Yurichuk A A *Laser Phys.* **11** 409 (2001)
76. Садыков Э К и др. *Изв. РАН. Сер. физ.* **67** 995 (2003)
77. Harris S E *Phys. Today* (7) **50** 36 (1997)
78. Митин А В, Роганов Д Ф *Изв. РАН. Сер. физ.* **65** 941 (2001)
79. Митин А В, Анискин И П, Тарасов В А *Изв. РАН. Сер. физ.* **69** 1414 (2005)
80. Дабагов С Б *УФН* **173** 1083 (2003)
81. Mitin A V *Phys. Lett. A* **213** 207 (1996)
82. Mitin A V, in *Proc. First Intern. Induced Gamma Emission Workshop 1997, Predeal, Romania* (Eds I I Popescu, C A Ur) (Bucharest: IGE Foundation, 1999) p. 145
83. Митин А В *Оптика и спектроск.* **92** 432 (2002)
84. Mitin A V, Aniskin I P, in *Proc. of 7th AFOSR Workshop on Isomers and Quantum Nucleonics, Dubna, June 26–July 1, 2005* (Eds S A Kamarin, J J Carroll, E A Cherepanov) (Dubna, 2006) p. 206
85. Poole C P (Jr.), Farach H A *J. Magn. Res.* **1** 551 (1969)
86. Pfeiffer L *J. Appl. Phys.* **42** 1725 (1971)
87. Korciewicz M, Wagner H-G, Gonsler U *Solid State Commun.* **48** 531 (1983)
88. Shvyd'ko Yu V et al. *Phys. Rev. B* **52** R711 (1995)
89. Shvyd'ko Yu V et al. *Phys. Rev. Lett.* **77** 3232 (1996)
90. Cherepanov V M et al., in *Proc. of the First Intern. Induced Gamma Emission Workshop, Predeal, Romania* (Eds I I Popescu, C A Ur) (Bucharest: IGE Foundation, 1999) p. 394
91. Берсукер И Б, Коварский В А *Письма в ЖЭТФ* **2** 286 (1965)
92. Башкиров Ш Ш, Садыков Э К *Письма в ЖЭТФ* **3** 240 (1966)
93. Митин А В *ФТТ* **10** 3632 (1968)
94. Иванов А С, Колпаков А В, Кузьмин Р Н *ФТТ* **16** 1229 (1974)
95. Letokhov V S *Phys. Rev. A* **12** 1954 (1975)
96. Башкиров Ш Ш и др. *Письма в ЖЭТФ* **27** 486 (1978)
97. Бибилова Ю Ф и др. *ФТТ* **22** 2349 (1980)
98. Olariu S et al., in *Intern. Conf. of the Applications of the Mössbauer Effect: ICAME 2005, Montpellier, France, September 5–9, 2005*, Abstracts, p. T6–P17
99. Vagizov F et al., in *Intern. Conf. of the Applications of the Mössbauer Effect: ICAME 2005, Montpellier, France, September 5–9, 2005*, Abstracts, p. T6–P29

PACS numbers: 07.60.–j, 87.64.–t

Методы и приборы иммунного экспресс-анализа. Новый подход к решению проблемы

В.Е. Курочкин

1. Введение

Бурное развитие гетерогенного иммунного анализа (ГетИА) обусловлено высокой специфичностью реакций антиген (Аг)–антитело (Ат), основанной на молекулярном узнавании по принципу "ключ–замок". С теоретической точки зрения это позволяет — при наличии высокочувствительных методов детектирования и быстродействующих механизмов переноса единичных Аг к активным центрам, иммобилизованным на поверхности, — обнаруживать одну молекулу (частицу) искомого вещества в реальном масштабе времени. Наибольшую значимость практическое решение этой задачи имеет для

эпидемиологии при обнаружении возбудителей особо опасных инфекционных заболеваний в многокомпонентных пробах окружающей среды.

Разработанная автором концепция построения высокочувствительных систем экспресс-анализа основана на результатах работ, проводимых в трех основных направлениях.

1. Целенаправленное использование физических процессов, происходящих в поле ультразвуковой стоячей волны (УЗСВ), для доставки Аг к поверхности иммуносорбента (ИС) при диффузионных и концентрационных ограничениях массопереноса, а также для минимизации влияния неспецифически сорбирующихся примесей.

2. Развитие теоретических положений отражательной фотометрии применительно к тонкослойным оптически прозрачным элементам (хемо- и биосенсорам) для создания высокочувствительных детекторов, работающих в реальном режиме времени и оптимально сопряженных с блоком постановки реакций.

3. Исследование свойств рекуррентного стохастического алгоритма оценивания сигналов типа "линейный тренд" для получения быстродействующего помехоустойчивого оценивания информативных параметров сигналов.

2. Интенсификация реакций антиген–антитело с помощью стоячей волны ультразвукового поля

Анализ различных способов ускорения массопереноса в ГетИА показал, что применение традиционных методов — проточный режим, интенсификация перемешивания и др. — является недостаточно результативным [1–3]. Наиболее перспективным представляется применение УЗ-полей, причем, по мнению автора, наибольшие преимущества дает постановка реакций Аг–Ат в некавитирующем поле УЗСВ мегагерцового диапазона, так как это позволяет:

— формировать слои ИС с периодичностью в половину длины УЗ-волны (используя действие радиационной силы на частицы ИС [4–6]);

— удерживать частицы ИС во взвешенном состоянии в УЗ-ячейке в проточном режиме, противодействуя силе Стокса, что обеспечивает возможность смены растворов ингредиентов [7];

— организовывать в микрообъемах проб бесконтактное перемешивание с заданным пространственным масштабом L (с помощью конвективных течений — $L \gg \lambda$, течений Рэлея — $L \sim \lambda/2$, пограничных течений Шлихтинга — $L = (\lambda/4) 2\delta$, где $\delta = (v/\pi f)^{1/2}$ — толщина акустического пограничного слоя, v — кинематическая вязкость жидкости, f — частота колебаний [8]). При обычных условиях (вода, температура 20 °С) и $f = 3$ МГц — толщина пограничного слоя $\delta \sim 0,3$ мкм.

Автором была выдвинута гипотеза, согласно которой целенаправленное создание течения Рэлея или сочетания течений Рэлея и Шлихтинга является основой нового универсального быстродействующего механизма переноса определяемых Аг к поверхности ИС. Скорость течений, пропорциональная средней плотности акустической энергии E [8] и, следовательно, регулируемая в широком диапазоне, должна выбираться так, чтобы: а) значительно увеличивать скорость массопереноса, т.е. вероятность встречи Аг с Ат; б) не препятство-

вать специфическим взаимодействиям, т.е. кинетическая энергия Аг должна быть меньше энергии связи Аг–Ат; в) уменьшать вероятность неспецифических взаимодействий компонентов пробы с поверхностью ИС; г) обеспечивать быстрое и эффективное удаление неспецифически сорбированных компонентов пробы на стадии отмывки.

В случае Аг бактериальной природы в УЗСВ возможна реализация дополнительного механизма переноса — перемещение Аг к поверхности ИС под действием радиационной силы, приводящее к концентрированию частиц в узлах давления или пучности (в зависимости от свойств среды и частиц). Эффективность этого механизма возрастает с увеличением размера частиц. (При определенных соотношениях плотностей и сжимаемостей частиц и среды этот механизм может тормозить или даже блокировать перенос частиц акустическими течениями.)

Для оценки справедливости гипотезы и возможности практической реализации предложенного механизма создана экспериментальная установка (рис. 1), состоящая из блока постановки специфических реакций на микросферах ИС и блока регистрации флуоресценции. Блок постановки реакций включает УЗ-излучатель, сменные реакционные микрокамеры (объемом 15, 20 и 25 мкл), насосы для ввода ингредиентов реакций и термостатирующей жидкости. Микрокамера установлена в фокусе объектива 11 (см. рис. 1), через который подается возбуждающее излучение на продукты реакции и собирается информативный сигнал.

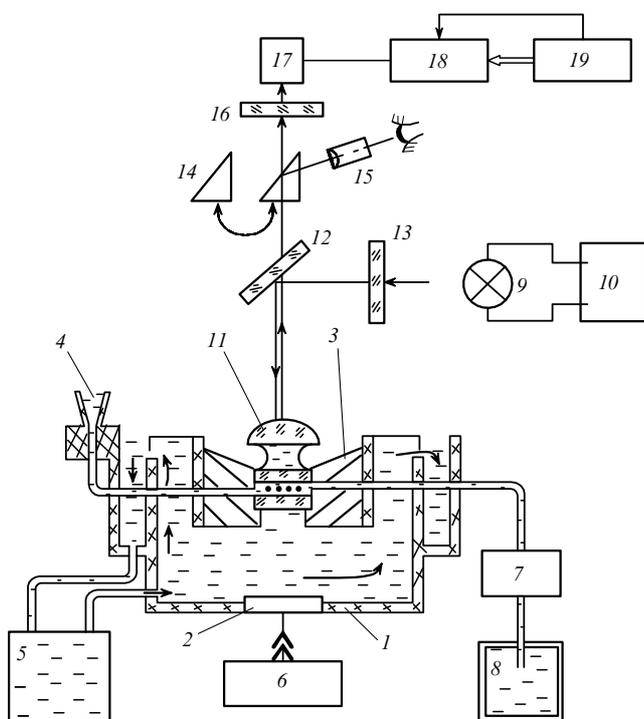


Рис. 1. Функциональная схема экспериментальной установки: 1 — держатель УЗ-излучателя; 2 — УЗ-излучатель; 3 — микрокамера; 4 — микроворонка; 5 — насос с термостатом; 6 — генератор высокой частоты (ГВЧ); 7 — перистальтический насос; 8 — емкость; 9, 10 — источник излучения; 11 — объектив; 12, 13, 16 — светофильтры; 14 — поворотная призма; 15 — окуляр; 17 — фотоэлектронный умножитель (ФЭУ); 18 — аналого-цифровой преобразователь (АЦП); 19 — компьютер.

Рабочие параметры установки: $f = 1-4$ МГц, $E = 1-10$ Дж м⁻³, скорость прокачки раствора $u = 0,02-0,50$ см с⁻¹.

Иммуносорбент приготовлен на основе оптически прозрачных агарозных или сефарозных сферических частиц радиусом $R = 15$ мкм.

На стадии предварительных исследований изучена зависимость степени удерживания частиц от E, f, u и R , выбраны оптимальные условия для полного удерживания частиц ИС в потоке при объемной скорости до 1 мл мин⁻¹. Разработаны способы формирования заданного числа плотноупакованных монослоев ИС (≥ 1), параллельных плоскости излучателя, в одно- и двухволновых УЗ-камерах.

Эффективность предложенного механизма интенсификации реакций Аг–Ат оценивали сравнением аналитических характеристик, полученных при проведении анализа в УЗСВ и традиционным методом [9] — в микропланшете при перемешивании многократным пипетированием. Основные аналитические характеристики: время, необходимое для завершения реакции (t_p), время отмывки от примесей (t_o), чувствительность (предел детектирования (ПрД)). Исследуемые агенты — антигены различных размеров (иммуноглобулины, токсины, вирусы, бактерии).

Из экспериментальных данных следует, что t_p зависит от размера антигенов (рис. 2а), но даже в "наихудшем случае" (крупные бактерии бруцеллеза) при использовании УЗ-поля t_p сокращается в 25 раз по сравнению со временем реакции в традиционном методе (кривая 3 на рис. 2а и кривая на рис. 2б соответственно) и не превышает 90 с.

Применение УЗ-поля позволяет не только значительно уменьшить t_p , но и в три раза сократить стадию

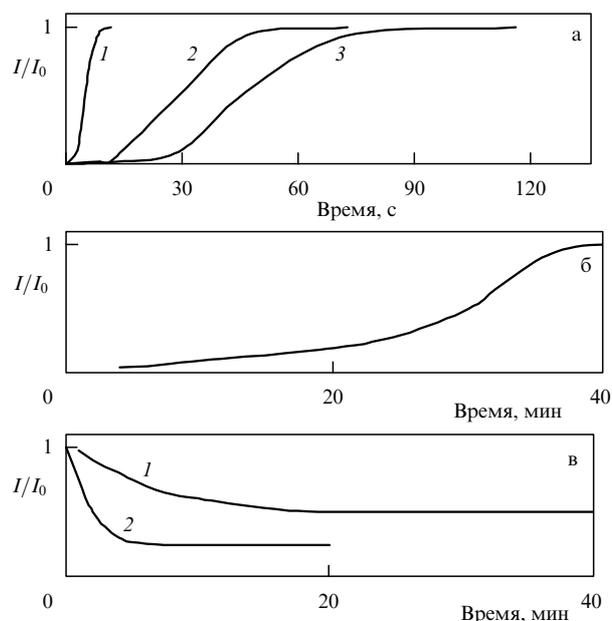


Рис. 2. Зависимости интенсивности люминесценции от времени инкубирования (а), (б) и времени отмывки (в). На рисунке а реакции в УЗСВ, антигены: кривая 1 — иммуноглобулины ($D \sim 0,04$ мкм); кривая 2 — хламидии ($D \sim 0,3$ мкм); кривая 3 — бруцеллы ($0,4 \times 1,2$ мкм); на рис. б — традиционная постановка, антиген бруцеллы; на рис. в, кривая 1 — традиционный способ отмывки, кривая 2 — отмывка в УЗСВ.

отмывки ИС от неспецифически сорбировавшихся примесей благодаря сочетанию проточного режима промывания с действием акустических пограничных течений (рис. 2в).

Применимость метода для практических целей проверяли с помощью шифрованных проб, содержащих в качестве примесей гетерологичные микроорганизмы и токсины (пороговые и более высокие концентрации), а также пыль и некоторые биоактивные вещества (суммарная концентрация $0,125-0,25 \text{ мг мл}^{-1}$). Количество и вид примесей, добавляемых в анализируемые пробы, изменяли по закону случайных чисел. Время инкубирования составляло 120 с. При оценке специфичности по результатам исследования 65 проб получены следующие результаты: чувствительность обнаружения — 1; специфичность обнаружения — 0,95; относительный риск — 0; доля ложноположительных результатов — $1/45$; доля ложноотрицательных результатов — 0.

Указанные результаты, а также оценки ПрД (табл.) показывают, что предложенный и реализованный автором механизм интенсификации ГетИА позволяет быстро, достоверно и воспроизводимо обнаруживать присутствие единичных возбудителей инфекционных заболеваний в микрообъемах проб при наличии помех. (Содержание бактерий бруцеллеза и туляремии в УЗ-ячейке составляло 10 микробных тел и 2 микробных тела соответственно.)

Таблица. Оценка чувствительности экспресс-анализа

Иммуноактивный объект	Чувствительность, микробные тела на 1 см^3 (разведение)	
	Прибор	Референтный метод
Бактерии туляремии	1×10^2	1×10^4
Анатоксин столбнячный	(1:1000)	(1:200)
Бактерии бруцеллеза	5×10^2	1×10^4
Вирус осповакцины	(1:200)	(1:1)
Риккетсии <i>D. sibiricus</i>	(1:2000)	(1:250)

Новизна способа защищена авторскими свидетельствами [10, 11]; экспериментальные результаты частично отражены в работе [12].

Обоснованность разработанной автором концепции применения УЗСВ и технических решений была подтверждена позднее другими исследователями, которые предложили аналогичный вариант построения одно- и полуволновых камер для исследования агрегации частиц и акустических течений в УЗСВ [13], использование рэлеевского акустического течения или проточных УЗ-камер для ускорения массопереноса к живым индикаторным клеткам при оценке токсичности воды [14], применение УЗСВ для увеличения чувствительности определения бактериальных спор методом ГетИА в проточных камерах [15]. (Оценку применимости устройств и методов для анализа реальных проб в двух последних работах не проводили.)

3. Принципы создания высокочувствительных оптических детекторов

Классическое фотометрирование тонкослойных объектов (монослоев ИС в одноволновых и двухволновых

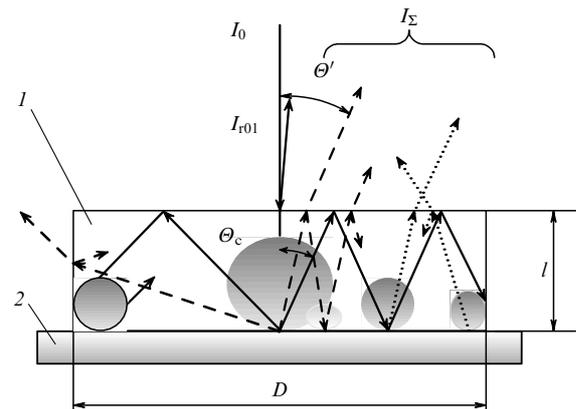


Рис. 3. Схема распространения световых потоков в тонкослойном оптически прозрачном элементе 1 ограниченного размера на отражающей подложке 2 (см. пояснения в тексте).

УЗ-кюветах и оптических сенсоров на основе селективных пластифицированных мембран) в проходящем свете приводит к низкой чувствительности анализа [16]. В то же время известно [17], что диффузное излучение поглощается эффективнее, чем направленное, а многократное отражение светового потока автоматически увеличивает длину оптического пути. Можно поэтому ожидать, что при помещении тонких оптически прозрачных чувствительных элементов (ЧЭ) на диффузно отражающую подложку и проведении измерений в отраженном свете чувствительность анализа увеличится. В связи с отсутствием адекватных теоретических моделей [18–20] нами дано описание процессов распространения светового потока в ЧЭ с ограниченным размером, оптически сопряженных с отражающей подложкой.

Чувствительный элемент представляет собой цилиндр (диаметром D и высотой l) из оптически прозрачного материала (рис. 3), характеризуемый геометрическим безразмерным параметром $g = D/l$, показателем преломления n и коэффициентом экстинкции ε . Подложка имеет коэффициент отражения $\rho_b(\theta')$ и показатель преломления n_b .

Принятые допущения: а) поглощающие свет компоненты распределены по объему ЧЭ равномерно, а пропускание изменяется по закону Бера (в соответствии с изменениями концентрации компонентов); б) коэффициент отражения светового потока вблизи критического угла θ_c полного внутреннего отражения (ПВО) изменяется скачкообразно; в) средняя высота шероховатостей ЧЭ и отражающей подложки много меньше длины волны зондирующего излучения.

Пусть на ЧЭ перпендикулярно поверхности падает параллельный световой поток с интенсивностью I_0 и поперечным сечением $d < D$. (Отраженные от подложки лучи падают на границу раздела ЧЭ–воздух под углом θ .) Тогда общая интенсивность светового потока I_{Σ} , выходящего из ЧЭ под углом θ' , может быть представлена в виде

$$I_{\Sigma} = I_0 B(\theta') [\Phi_1 + \Phi_2 + \Phi_3 + \Phi_4] \exp \left[-\varepsilon l \left(1 + \frac{1}{\cos \theta'} \right) \right], \quad (1)$$

где

$$\begin{aligned}
 B(\Theta') &= [1 - \rho_{10}(\Theta')][1 - \rho_{01}] \rho_b(\Theta'); \\
 \Phi_1 &= \frac{E(0) \exp(-2\epsilon l)}{1 - E(0) \exp(-2\epsilon l)}; \\
 \Phi_2 &= \int_{\delta}^{\Theta_1} \frac{d\Theta}{1 - E(\Theta) \exp(-2\epsilon l / \cos \Theta)}; \\
 \Phi_3 &= \rho_c \int_{\Theta_1}^{\Theta_2} \frac{\exp(-2\epsilon l / \cos \Theta) d\Theta}{1 - E(\Theta) \exp(-2\epsilon l / \cos \Theta)}; \\
 \Phi_4 &= \rho_c \int_{\Theta_2}^{\Theta_3} \frac{\rho_b(\Theta) \rho_{10}(\pi/2 - \Theta) \exp(-2\epsilon l / \cos \Theta) d\Theta}{1 - E\Theta \exp(-2\epsilon l / \cos \Theta)}; \\
 E(\Theta) &= \rho_{10} \rho_b(\Theta); \quad \delta \rightarrow 0; \quad \Theta_1 \leq \Theta_c = \arcsin\left(\frac{1}{n}\right); \\
 \Theta_c &> \arctan\left(\frac{g}{2}\right); \quad \Theta_2 = \arctan \frac{g - 2 \tan \Theta'}{4};
 \end{aligned}$$

$\Theta_3 = \arctan(3g/2)$; ρ_{10} и ρ_{01} — коэффициенты отражения от границы раздела ЧЭ–воздух и воздух–ЧЭ соответственно, ρ_c — коэффициент критического отражения, $\rho_b(\Theta)$ — функция отражательной способности подложки под углом распространения светового потока Θ в ЧЭ.

Каждый из членов суммы Φ_i в (1) описывает вклад различных составляющих потока: Φ_1 — многократного отражения луча, падающего по нормали к поверхности элемента; Φ_2 — первого отражения от подложки в интервале углов $[\delta, \Theta_1]$ и многократных отражений светового потока от торцевых поверхностей ЧЭ; Φ_3 — первых отражений от подложки в интервале углов $[\Theta_1, \Theta_2]$, которые испытывают ПВО от верхней поверхности ЧЭ и образуют световые потоки с высокой яркостью, сравнимой с первым отражением; Φ_4 — отражений от боковых поверхностей ЧЭ.

Оценка относительных вкладов составляющих потока показывает, что Φ_1 меньше Φ_2 и Φ_3 . Величина Φ_2 зависит от отражательных свойств подложки (вклад многократного отражения от боковых поверхностей мал). Вклад Φ_3 соизмерим с Φ_2 , а верхняя граница углов определяется величиной g . Величина Φ_4 меньше Φ_1 , Φ_2 и Φ_3 , так как коэффициенты $\rho_b(\Theta)$ и $\rho_{10}(\pi/2 - \Theta)$ много меньше 1, а рассматриваемая область углов $[\Theta_2, \Theta_3]$ мала и находится вблизи $\pi/2$.

Наибольший вклад в величину I_{Σ} вносят первое отражение от подложки и многократные отражения (с большой яркостью), определяемые условиями ПВО. При $g > 10$ величина I_{Σ} в основном определяется суммой Φ_2 и Φ_3 , вносящих наибольший вклад в результирующее световое поле.

Зависимость коэффициента отражения $r(\Theta')$ от ϵl может быть оценена следующим образом:

$$r(\Theta') = \frac{I_{\Sigma}}{I_{\Sigma 0}} = \frac{L}{L_0} \exp \left[-\epsilon l \left(1 + \frac{1}{\cos \Theta'} \right) \right], \quad (2)$$

где $I_{\Sigma 0}$ — фоновый сигнал (в отсутствие поглощающих свет компонентов); Θ' — угол распространения светового потока вне ЧЭ,

$$\begin{aligned}
 L &= \sum_1^4 \Phi_i; \quad L_0 = \frac{E(0)}{1 - E(0)} + \int_{\delta}^{\Theta_1} \frac{d\Theta}{1 - E(\Theta)} + \\
 &+ \rho_c \left[\int_{\Theta_1}^{\Theta_2} \frac{d\Theta}{1 - E(\Theta)} + \int_{\Theta_2}^{\Theta_3} \frac{\rho_b(\Theta) \rho_{10}(\Theta') d\Theta}{1 - E(\Theta)} \right].
 \end{aligned}$$

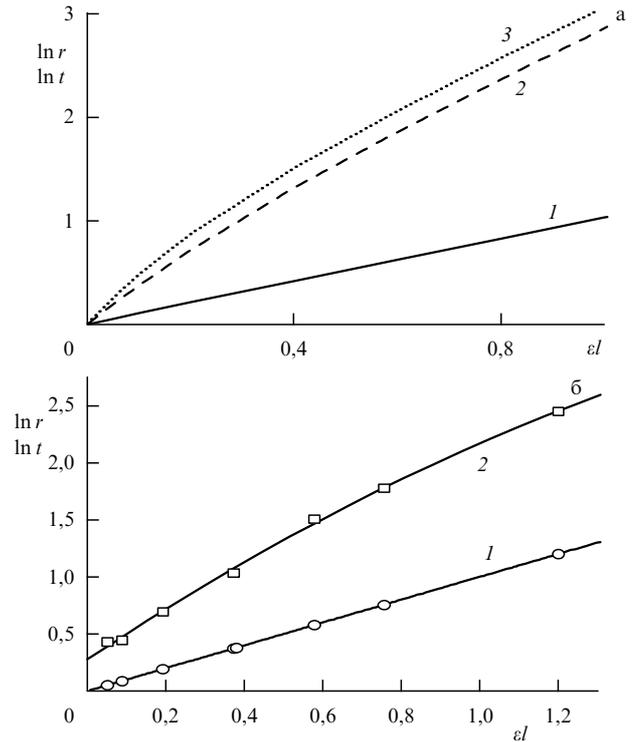


Рис. 4. (а) Теоретические зависимости оценок логарифма коэффициента пропускания ($\ln t$) (кривая 1) и логарифма коэффициента отражения ($\ln r$) от значения ϵl для ЧЭ ($n = 1,45$). Оценки отражательной способности получены для ЧЭ на диффузно отражающей подложке с $\rho_{b0} = 0,1$ при $g = 5$ (кривая 2) и $g = 20$ (кривая 3). (б) Экспериментальные результаты для тех же зависимостей для имитатора сенсора в проходящем (1) и отраженном (2) свете, полученные на $\lambda = 550$ нм при угле регистрации отраженного света 45° .

Расчеты показывают (рис. 4а), что даже при использовании слабо отражающей подложки ($\rho_{b0} = 0,1$) в диапазоне $\epsilon l \in (0; 0,1)$ поглощение в отраженном свете ($\ln r$) значительно выше, чем в проходящем ($\ln t$) и зависит от g . Так, при $\epsilon l = 0,05$ относительное увеличение информативного сигнала $K = \ln r / \ln t$ должно составлять $K = 2,5$ ($g = 2$), $K = 3,6$ ($g = 5$) и $K = 5,1$ ($g = 20$). При $\epsilon l = 1,0$ $K = 2,4$ ($g = 2$) и $K = 3,1$ ($g = 20$).

Величина информативного сигнала, регистрируемого фотоприемником, зависит от угла регистрации отраженного светового потока Θ' и угла поля зрения детектора, которые, как и g , должны выбираться в соответствии с требуемыми диапазоном и чувствительностью измерений.

Экспериментальную проверку оценок (2) (рис. 4б) проводили с помощью имитаторов сенсоров — нейтральных стекол (НС) марки НС6, НС7, НС8, НС9 и НС10 ($D = 6$ мм, $l = 0,3$ мм, $g = 20$), расположенных на фторопластовой подложке. В области $\epsilon l \in (0; 0,1)$ $K = 5$, что соответствует расчетным значениям. В диапазоне $\epsilon l = 0,12 - 1,25$ отклонение экспериментальных оценок от рассчитанных значений не превышало $\pm 5\%$. Подробное обсуждение полученных теоретических и экспериментальных результатов приведено в [23, 24].

Таким образом, показано, что измерения в отраженном свете приводят к "автоподстройке" длины оптического пути: чем меньше концентрация поглощающего вещества, тем больше оптический путь зондирующего

излучения, и наоборот, увеличение концентрации сокращает длину оптического пути. Это позволяет увеличивать чувствительность измерений в области малых концентраций и расширять динамический диапазон, т.е. создавать условия для использования различных способов регистрации информативного сигнала — не только методом конечной точки, но и кинетическим методом [25, 26]. Кинетические измерения в отраженном свете были применены при создании быстродействующих хемосенсоров на основе селективных оптически прозрачных пластифицированных мембран [25].

4. Исследование свойств и программно-аппаратная реализация рекуррентного алгоритма оценивания сигналов типа "линейный тренд"

Разработанные устройства и методы позволяют проводить анализ при двух способах регистрации сигнала — по методу конечной точки и в кинетическом режиме. В обоих случаях выходной сигнал детектора имеет детерминированную форму с неизвестными информативными параметрами, подлежащими оцениванию. С помощью преобразования координат "сигнал q –время t ", а именно ввода специальной временной шкалы $\varphi(t)$ и трансформации $x(q)$, можно получить зависимость в форме

$$x = a_0 + b_0\varphi(t) + \xi(t), \quad (3)$$

где a_0 , b_0 — информативные оцениваемые параметры, $\xi(t)$ — аддитивная случайная помеха с априорно неизвестным законом распределения.

Основными задачами являлись: а) анализ составляющих сигналов типа линейного тренда (3); б) выбор и исследование алгоритмов оценивания параметров a_0 , b_0 ; в) оптимизация алгоритмов по критериям минимизации ошибки оценивания и/или затрат вычислительных ресурсов; г) программно-аппаратная реализация. Решению этих задач посвящен цикл наших работ [27–29].

В большинстве случаев информативным является параметр b_0 . Переход к первой разности от совокупности трендов (3) позволяет получить совокупности постоянных сигналов с аддитивной симметричной (и, следовательно, центрированной) помехой. Последняя задача эффективно решается с помощью применения алгоритма Фабиана–Цыпкина [30]:

$$c_{n+1} = c_n - \frac{\beta}{n} \Psi(c_n - x_{n+1}), \quad (4)$$

где

$$\Psi(z) = \begin{cases} -1, & z \leq -\Delta \\ 0, & |z| < \Delta \\ 1, & z \geq \Delta \end{cases},$$

$x_{n+1} = c^* + \xi_{n+1}$ — измерение, ξ_{n+1} — помеха, c_n , c_{n+1} — оценки величины c^* на n -м и $(n+1)$ -м шагах оценивания, β — параметр алгоритма, 2Δ — величина зоны нечувствительности, в случае $\Delta = 0$, $\Psi(z) = \text{sign}(z)$. Известно [30, 31], что в отличие от оценки, получаемой с помощью метода наименьших квадратов, оценка, получаемая на основе рекуррентного алгоритма (4), робастна (устойчива к выбросам). Эффективность оценивания в общем

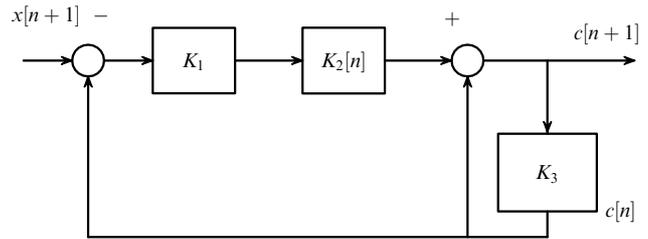


Рис. 5. Структурная схема САУ, реализующей алгоритм (4) (см. пояснения в тексте).

случае существенно зависит от параметров (β, Δ) [31], выбор которых оптимизируется по критерию минимума дисперсии ошибки оценивания.

Неисследованный ранее случай треугольной (симпсонской) помехи как первой разности равномерно распределенных помех описан в [27]. Впервые доказано, что только в этом случае при оптимальном соотношении β/Δ дисперсия ошибки оценивания не зависит от зоны нечувствительности.

Важным основополагающим результатом явилась оригинальная авторская интерпретация алгоритма (4) как системы автоматического управления (САУ) [29] (рис. 5), что позволило использовать методы, применяемые в САУ, для оценки его устойчивости и, как следствие, сходимости оценки c_n к истинному значению c^* .

Основные свойства САУ: а) дискретна, б) имеет два контура обратной связи, один из которых предназначен для отрицательной обратной связи, в) содержит нелинейный элемент K_1 , реализующий функцию Ψ (неидеальное реле с зоной нечувствительности 2Δ), г) содержит звено с переменными параметрами $K_2[n]$, реализующее умножение на β/n , д) имеет линию задержки на один такт с передаточной характеристикой K_3 .

Вывод исследования [29] — при наличии любой ненулевой зоны нечувствительности данная САУ асимптотически устойчива — полностью подтвержден работами других авторов.

Для практической реализации алгоритма (4) в виде вычислительного устройства были решены задачи: а) выбор параметров β и Δ на основе экстремальных порядковых статистик, требующих только рекуррентного пересчета минимального и максимального элементов, б) выбор начального приближения оценки как центра размаха (на той же основе), в) обоснование критерия остановки оценивания (например из-за разладки, т.е. изменения формы тренда сигналов). При этом фиксировались знаки нелинейного слагаемого в (4), строилась их гистограмма и оценивалась ее асимметрия [28, 29], т.е. применялись экономичные процедуры, не требующие упорядочивания (поиск медианы, центра сгиба и т.д.).

Описанное устройство реализует экономичные вычислительные процедуры, эффективно осуществляя оценивание в условиях минимальной априорной информации о параметрах случайной помехи. Тем самым реализована возможность разработки и создания унифицированного вычислительного алгоритма и приборного блока, пригодного для широкого класса приборов экспресс-анализа, в том числе портативных и микроформатных.

5. Заключение

Предсказание и реализация новых механизмов ускорения иммунных реакций при ГетИА открыли ранее неизвестные возможности практического применения поля УЗСВ:

— для развития высокоинформативных методов исследования иммуноактивных объектов молекулярной, надмолекулярной и клеточной организации;

— для создания высокоселективных устройств пробоподготовки.

Сейчас нами разрабатываются устройства и методы пробоподготовки для определения и исследования биообъектов на основе анализа молекул нуклеиновых кислот (методы полимеразной цепной реакции, в том числе в реальном масштабе времени). В указанных устройствах иммуносорбентное выделение биообъектов в поле УЗСВ предотвращает ингибирование полимеразной реакции примесями. При этом экспресс-определение иммуноактивных объектов, не содержащих нуклеиновых кислот, например токсинов, осуществляется иммунной реакцией в поле УЗСВ. В основе разработки лежат фундаментальные исследования свойств УЗ-полей и поведения в поле УЗСВ биообъектов, представленных в разделе 2.

Результатом теоретического анализа распространения светового потока в ранее неисследованном объекте фотометрии — оптически прозрачном светопоглощающем тонком элементе ограниченного размера, расположенном на диффузно отражающей подложке, — явилось создание простой универсальной схемы детектора (рис. 6), которая легко преобразуется в многоканальную, например с помощью оптоволоконных технологий [32]. Предложенная схема использована в целом ряде

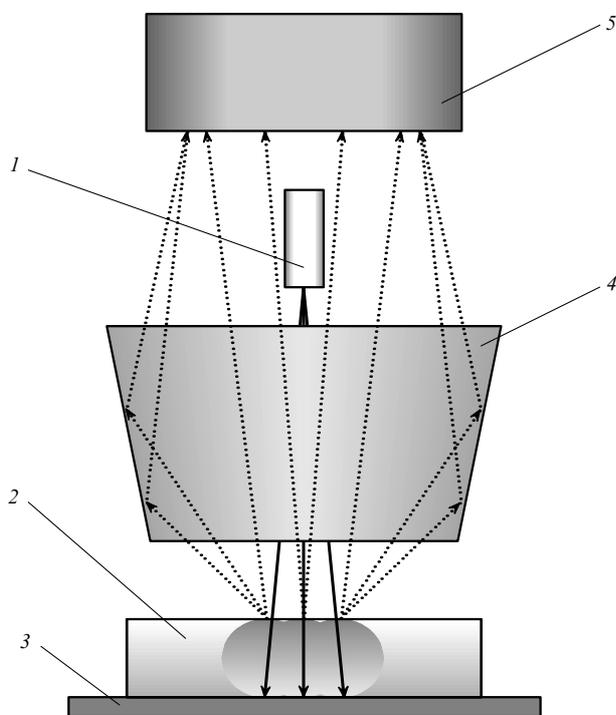


Рис. 6. Оптическая схема фотометра отраженного света: 1 — источник излучения, 2 — чувствительный элемент (хемосенсор), 3 — отражающая подложка, 4 — устройство сбора излучения (эллиптическое зеркало), 5 — фотоприемное устройство.

приборов, разработанных в Институте аналитического приборостроения РАН и выпускаемых серийно: анализаторе иммуноактивных объектов "Иматест-01" [33], приборах высокоэффективного капиллярного электрофореза со спектрофотометрическим и флуоресцентным детекторами "Нанофор-01" и "Нанофор-02", анализаторах нуклеиновых кислот АНК-16, АНК-32, АНК-96, анализаторе последовательности нуклеиновых кислот (АНПК), анализаторе "Лазерный иммунолюминесцентный анализатор клеток", хемосенсорных анализаторах "Sen" и " μ Sen".

Список литературы

1. *Иммуноферментный анализ* (Под ред. Т. Т. Нго, Г. Ленхофф) (М.: Мир, 1988)
2. Егоров А. М. и др. *Теория и практика иммуноферментного анализа* (М.: Высшая школа, 1991)
3. Widder K. J. et al. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **14** 395 (1979)
4. King L. V. *Proc. R. Soc. London Ser. A* **147** 212 (1934)
5. Yosioka K., Kawasima Y. *Acustica* **5** (3) 167 (1955)
6. Горьков Л. П. *ДАН СССР* **140** (1) 88 (1961)
7. Князьков Н. Н. Дисс. ... канд. техн. наук (Пушино: Институт биологической физики АН СССР, 1983)
8. Зарембо Л. К., Красильников В. А. *Введение в нелинейную акустику* (М.: Наука, 1966)
9. *Методические рекомендации по получению и применению иммуноглобулинового сепарозного диагностикума для индикации возбудителя орнитоза (пситткоза) и двух видов хламидий* (М.: Минздрав СССР, 1981) с. 15
10. Блохин К. В. и др. "Способ постановки серологической реакции", Авт. свид. СССР 1208916, приоритет от 30.11.83 (1985)
11. Князьков Н. Н., Курочкин В. Е. "Способ выявления иммуноактивных объектов", Авт. свид. СССР 1250576, приоритет от 13.01.84 (1986)
12. Князьков Н. Н., Курочкин В. Е. *Бюлл. экспериментальной биологии и медицины* (5) 586 (1996)
13. Spengler J. F. et al. *Bioseparation* **9** 329 (2000)
14. Morgan J. et al. *Toxicology in Vitro* **18** 115 (2004)
15. Hawkes J. J. et al. *Biosensors Bioelectron.* **19** 1021 (2004)
16. Евстапов А. А., Курочкин В. Е., Макарова Е. Д. *Научное приборостроение* **1** (4) 22 (1991)
17. Гершун А. А. *Избранные труды по фотометрии и светотехнике* (М.: ГИФМЛ, 1958)
18. Розенберг Г. В. *УФН* **69** (1) 57 (1959)
19. Розенберг Г. В. *УФН* **91** (4) 569 (1967)
20. Зега Э. П., Иванов А. П., Кацев И. Л. *Перенос изображения в рассеивающей среде* (Минск: Наука и техника, 1985)
21. Иванов А. П. *Оптика рассеивающих сред* (Минск: Наука и техника, 1969)
22. Лойко В. А., в кн. *Рассеяние и поглощение света в природных и искусственных дисперсных средах* (Под ред. А. П. Иванова) (Минск: Институт физики им. Б. И. Степанова АН БССР, 1991) с. 355
23. Евстапов А. А., Курочкин В. Е. *Оптический журн.* **62** (5) 50 (1995)
24. Евстапов А. А., Курочкин В. Е. *Оптический журн.* **62** (5) 40 (1995)
25. Курочкин В. Е., Макарова Е. Д. *Analytical Commun.* **33** 115 (1996)
26. Бурьлов Д. А. и др. *Журн. аналитической химии* **52** 551 (1997)
27. Буляница А. Л., Курочкин В. Е. *Автоматика и телемеханика* (9) 187 (1999)
28. Буляница А. Л., Курочкин В. Е., Бурьлов Д. А. *Радиотехника и электроника* **47** 343 (2002)
29. Буляница А. Л., Курочкин В. Е. *Научное приборостроение* **12** (2) 30 (2002)
30. Цыпкин Я. З., Поляк Б. Т. *Динамика систем* (12) 22 (1977)
31. Бедельбаева А. А. *Автоматика и телемеханика* (1) 87 (1978)
32. Курочкин В. Е., Евстапов А. А., Макарова Е. Д. "Оптическое устройство для химического анализа", Патент РФ 2157987, Приоритет от 21.05.1996 (2000)
33. Федоров А. А. и др. *Докл. РАН* **405** (1) 133 (2005)