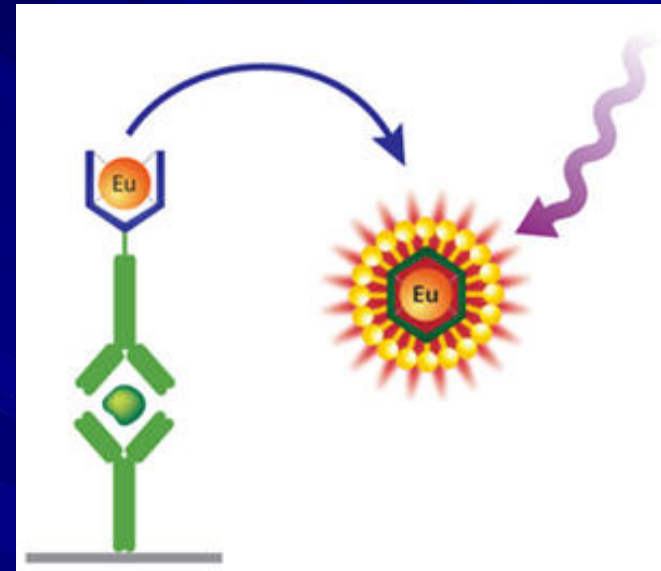


# DELFI A

## Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent ImmunoAssay

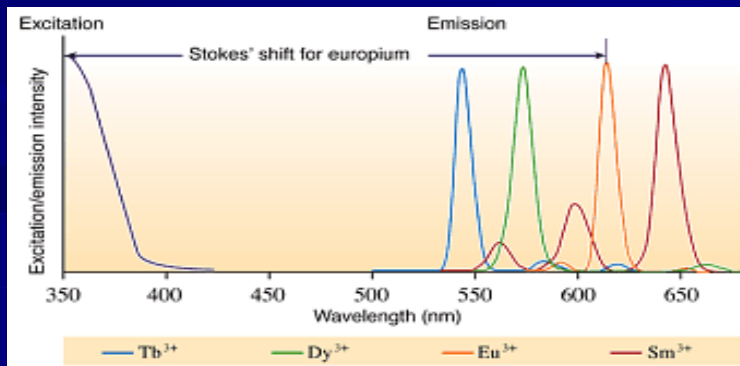
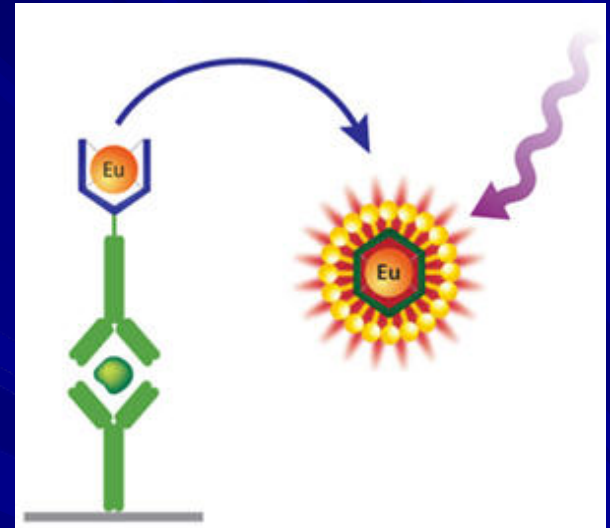
- Fluoroimunoanalytická metoda vyvinutá finskou firmou Wallac Oy (LKB Pharmacia), velmi citlivá a specifická metoda pro stanovení nízko- i vysokomolekulárních analytů.

- využívá časově modulované měření fluorescence chelátu lanthanidů - Europium, Terbium, Sammarium, příp. Dysprosium.



# DELFLIA - princip

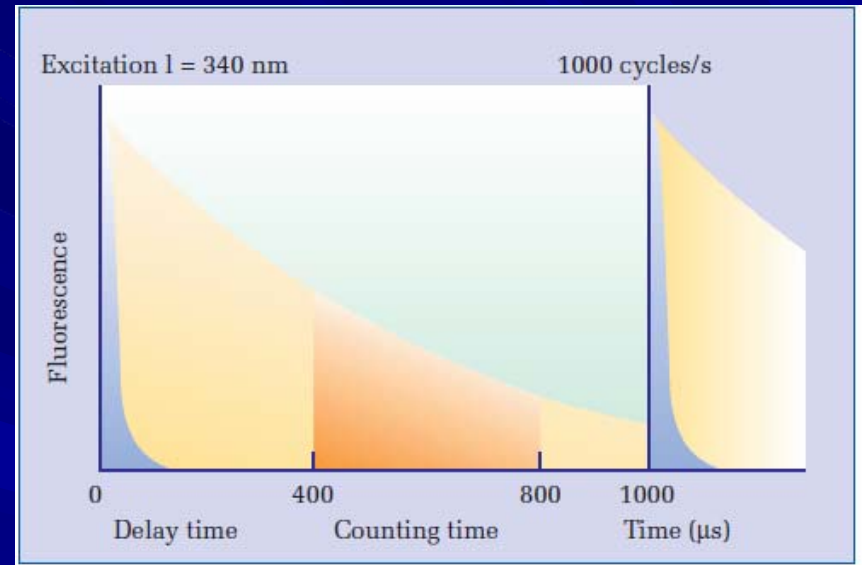
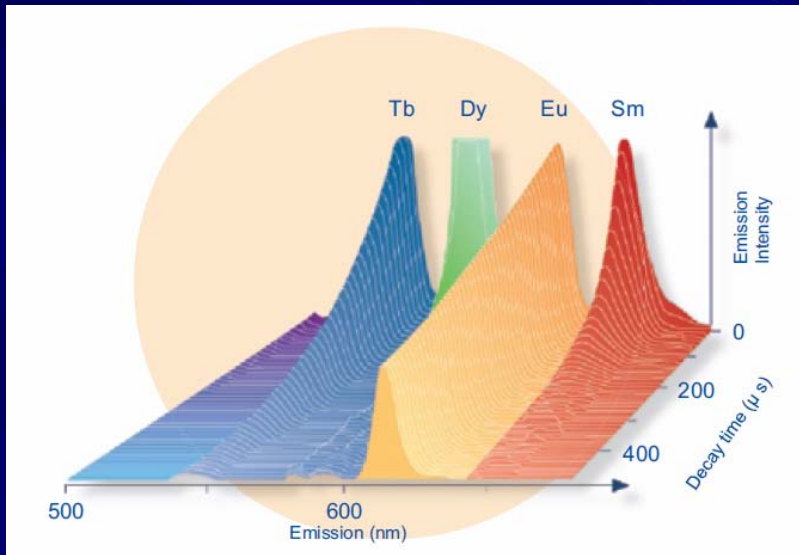
- Protilátka nebo antigen jsou označeny fluorescenční sondou – chelátem lanthanidu, nejčastěji **Europia**
- Po proběhlé imunochemické reakci se ke vzniklému komplexu přidává „zesilovací“ roztok, který odtrhne **Eu** z komplexu a přemění jej na nový intenzivně fluoreskující chelát
  - fluorescence s velkým Stokesovým posunem fluorescenčního spektra (rozdíl mezi vlnovou délkou excitace a fluorescence)



- Vzorek je pulsně excitován zářením o vlnové délce 340 nm
- Fluorescence se měří v dlouhovlnné části viditelného spektra (Europium 620 nm).

# DELFLIA - Time-resolved fluorometry (TRF)

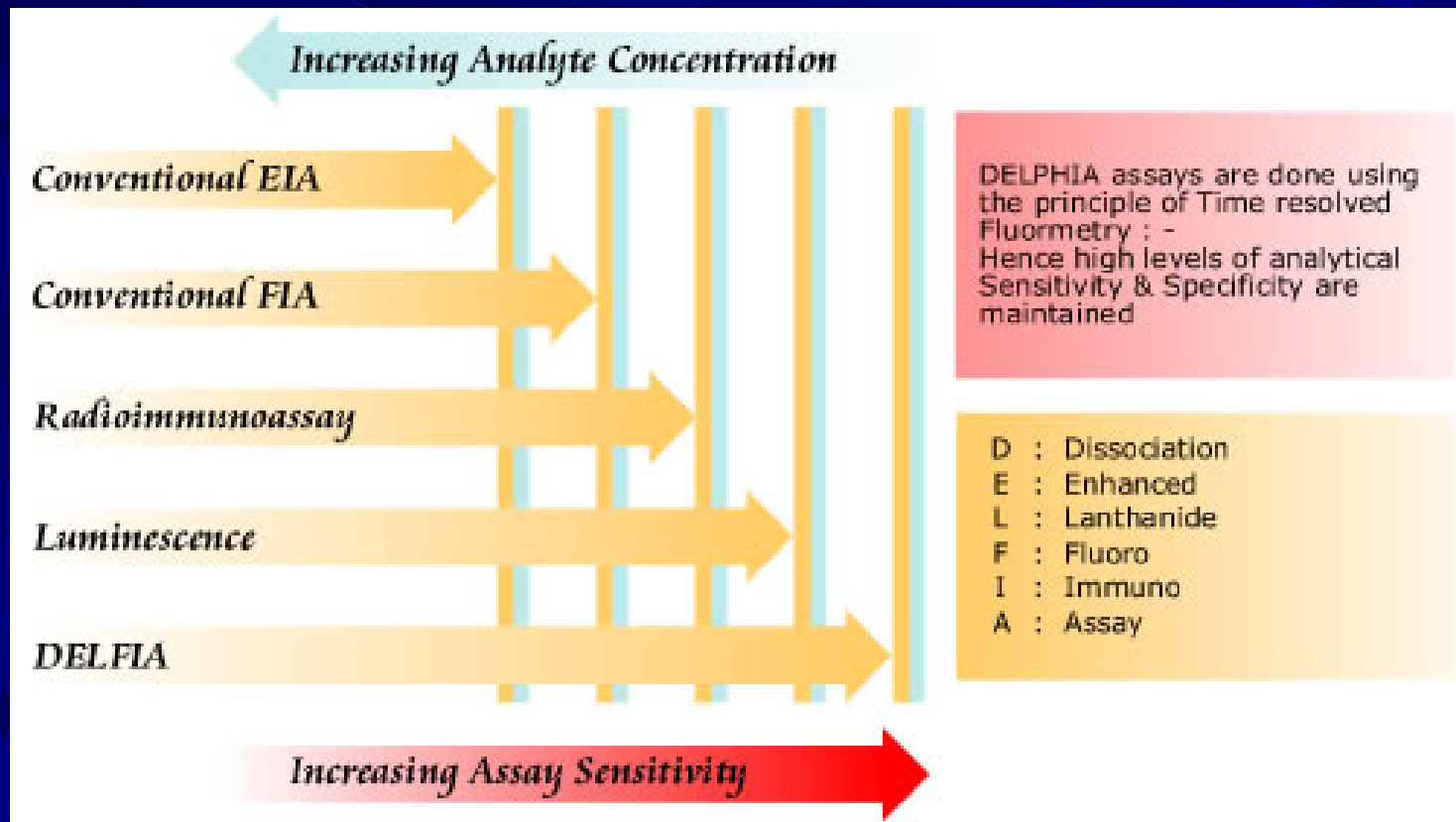
- fluorescence je **dlouhodobá** (doba emise delší než u běžných fluoroforů - řádově stovky mikrosekund)



- Fluorescenční záření se začne měřit se zpožděním stovek mikrosekund (začíná v době, kdy už vyhasla fluorescence pozadí, která je podstatně kratší – nanosekundy) a samotné měření trvá také 400 mikrosekund.
- Cyklus (pulsní excitace - prodleva - měření) trvá 1 milisekundu, během měření vzorku (1 sekunda) se tedy 1000x opakuje

# DELPHIA

- Vysoká citlivost a špecifita



# DELFLIA

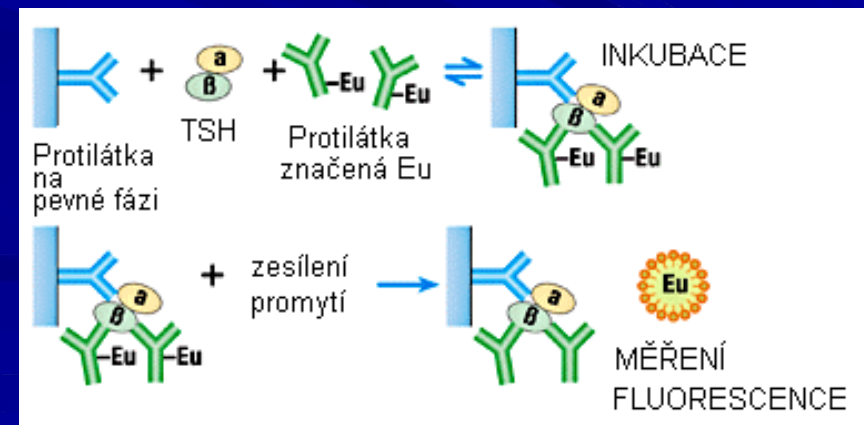
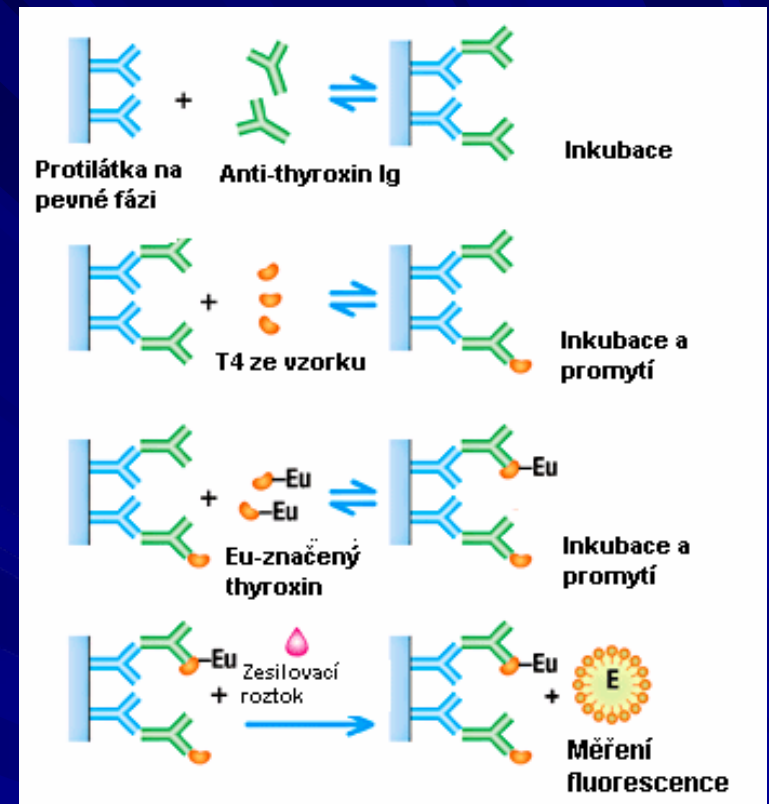
## Uspořádání imunochemické reakce:

### - kompetitivní:

- fluorescenční sondou značený antigen
- intenzita fluorescence nepřímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku

### - nekompetitivní (sendvičové):

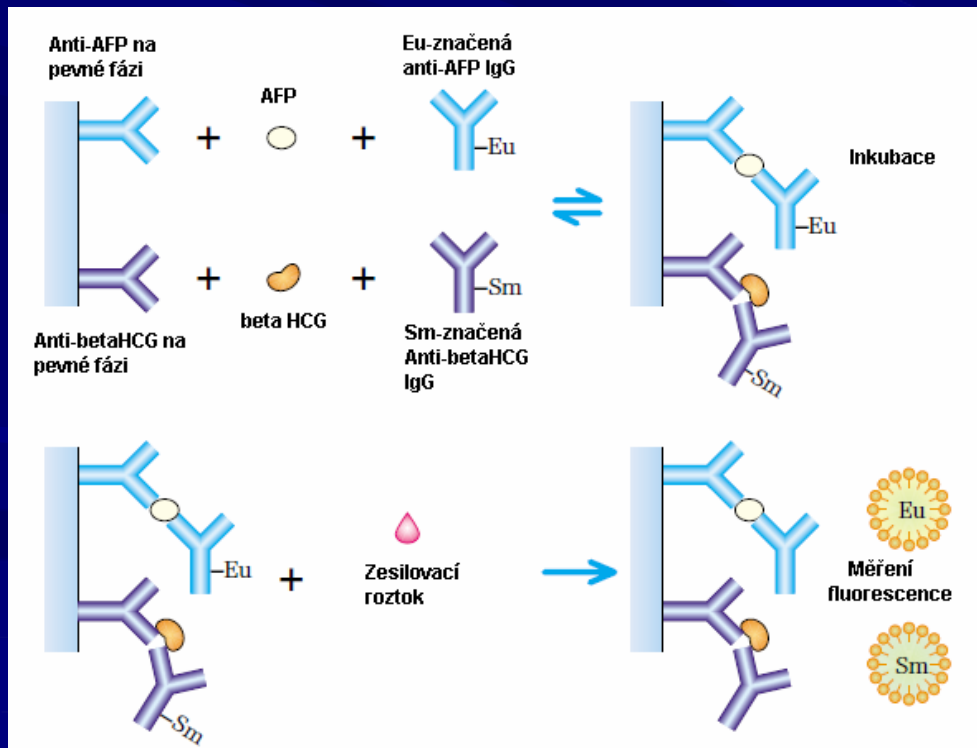
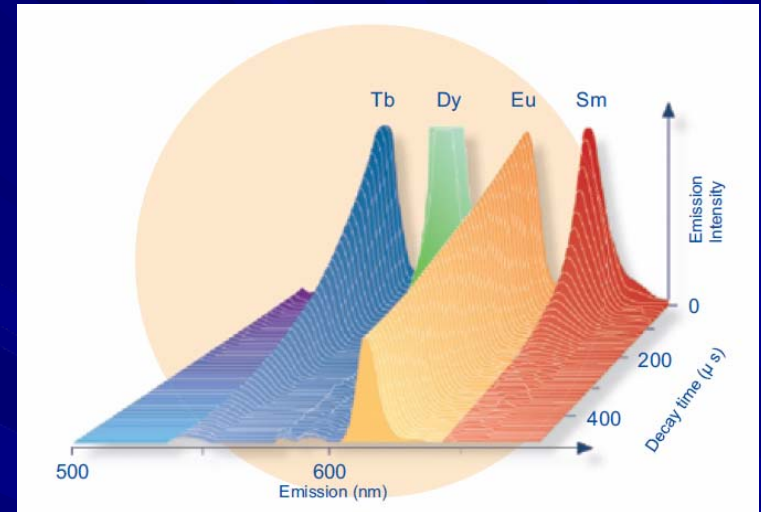
- fluorescenční sondou značená protilátka
- intenzita fluorescence přímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku



# DELFLIA - současné stanovení více analytů

Fluorescence lanthanidů:

- Úzké emisní píky při různých vlnových délkách (Eu 613 nm, Sm 643 nm)
- Různá doba trvání fluorescence Eu, Sm



- Při měření se nepřekrývají vlnové délky ani časy odečtu fluorescence Eu a Sm - umožňuje současné stanovení dvou analytů

# DELFI A - využití

DELFI A lze použít pro široké spektrum analytů (v principu lze lanthanidem označit každou stabilní sloučeninu obsahující aminoskupinu):

- Proteiny
- Peptidy
- Oligonukleotidy
- Malé organické molekuly (steroidy, aminokyseliny, léky,...)

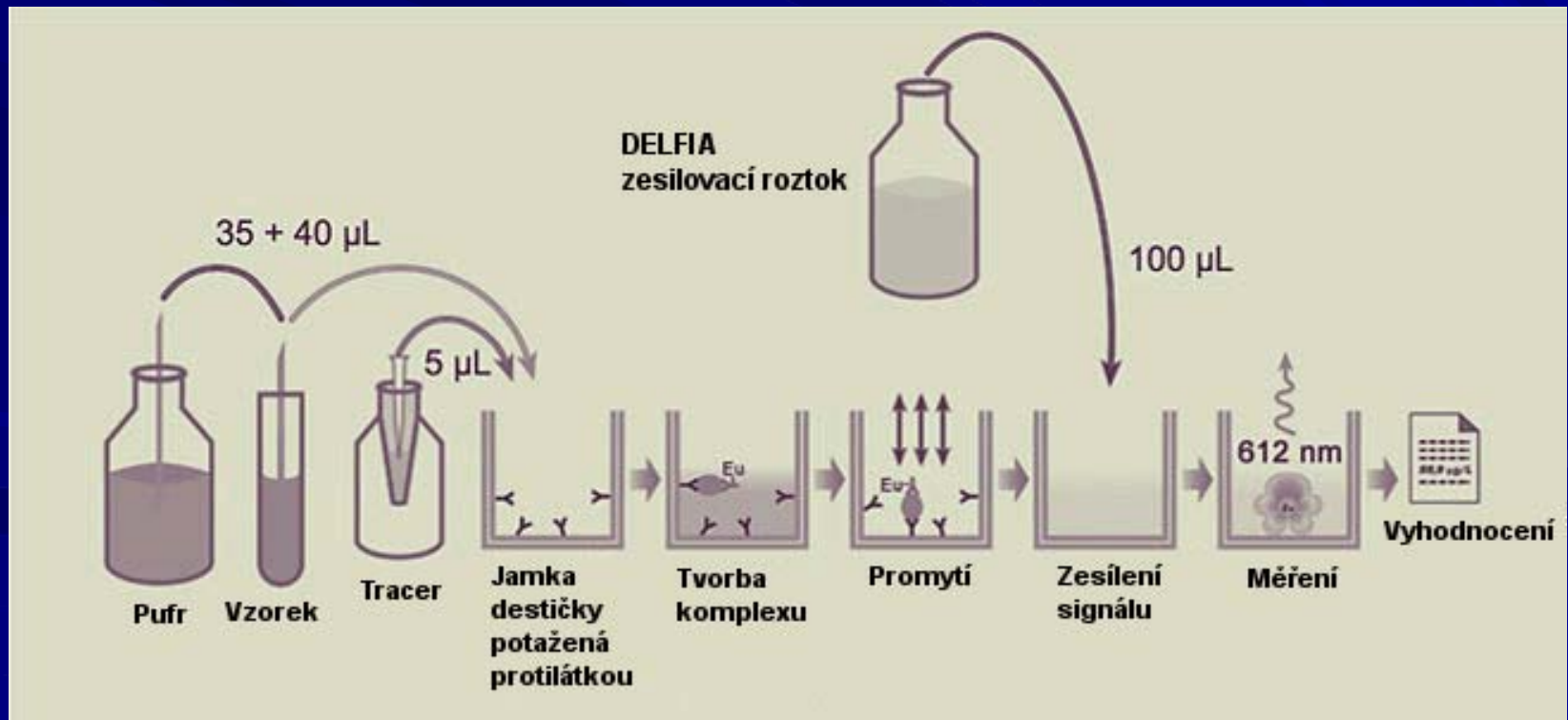
Novorozenecký screening (stanovení ze suché krevní skvrny):

- TSH (kongenitální hypotyreóza)
- 17-hydroxy-progesteron (kongenitální adrenální hyperplázie)
- Imunoreaktivní trypsinogen IRT (cystická fibróza)

# DELFI

## praktické provedení

- Pracuje se v mikrotitračních destičkách v uspořádání 8x12 jamek se specifickou protilátkou (obvykle monoklonální) vázanou na pevné fázi





# DELFLIA (suchá krevní skvrna)

1 Vyrážení terčků (razička)



2 Dávkování činidel



3 Inkubace, třepání



4 Odstranění terčků z jamek (vakuová odsávačka)



5 Promytí destičky (promývačka)



6 Měření na fluorometru po přidání zesilovacího roztoku

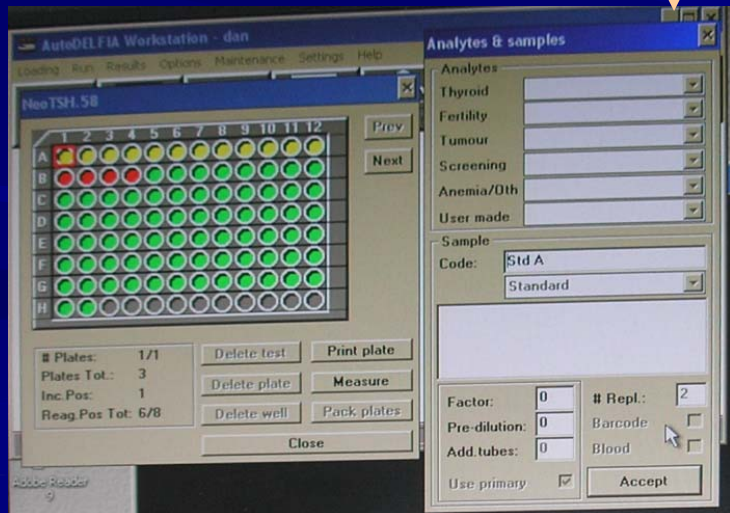
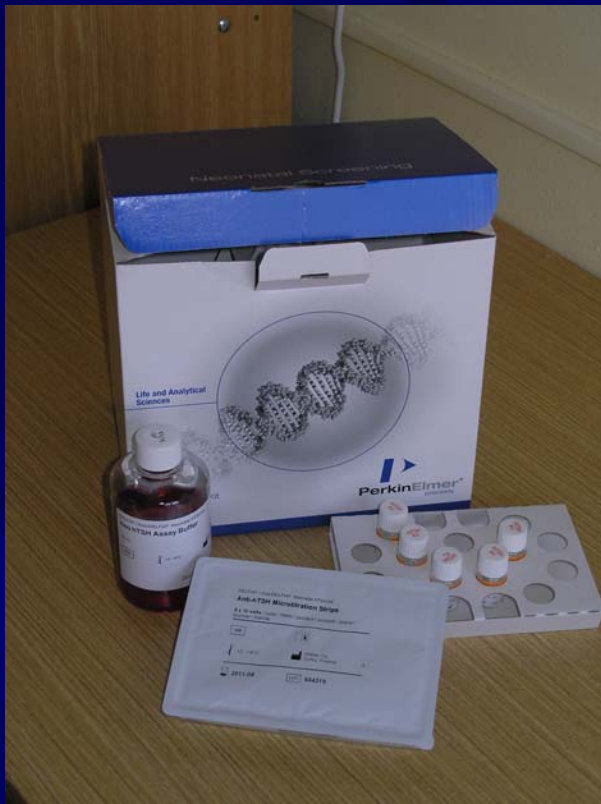


# DELFLIA – suchá krevní skvrna

← Diagnostický set obsahuje mikrotitrační destičky, roztoky, kalibrátory a kontroly (ve formě suché krevní skvrny)

Umístění kalibrátorů, kontrol a patientských vzorků na destičce ● kalibrátor ● kontrola ● pacient

Softwarově zpracovaná kalibrační křivka:  
 kompetitivní uspořádání      sendvičové uspořádání

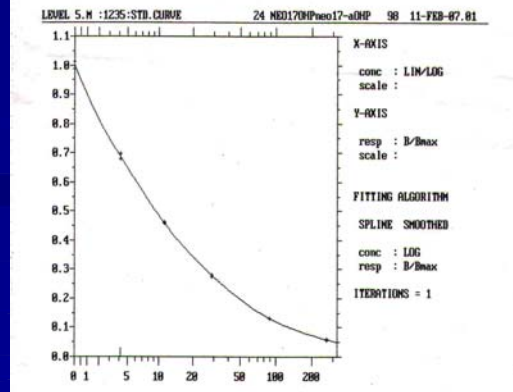


```

NEFSE = 10/10
ED-20 = 48.84 ED-50 = 9.296 ED-80 = 2.188
Y-AXIS (CONCENTRATION) = LOG SLOPE = 0.259
Y-AXIS (RESPONSE) = S/SMAX INTERCEPT = 9094
FITTING ALGORITHM = SPLINE SMOOTHED VARIANCE RATIO = 0
    
```

STD	CONC	CALC.CONC	SDIFF	RESPONSE	%cvRESP	%cvCONC
0-1	0	0	0	1.013		
0-2	0	0.121	0	0.907		
AVG:	0	0	0	1.000	*****	1.83
1-1	4.100	4.021	-0.16	0.600		
1-2	4.100	4.125	0.025	0.697		
AVG:	4.100	4.100	0.00	0.689	*****	1.71
2-1	11.20	11.13	-0.46	0.461		6.04
2-2	11.20	11.20	0.00	0.459		
AVG:	11.20	11.20	0.00	0.460	*****	0.45
3-1	28.90	29.46	1.75	0.275		0.92
3-2	28.90	28.78	-0.09	0.266		
AVG:	28.90	28.90	0.00	0.279	*****	1.98
4-1	88.70	89.46	0.86	0.130		2.71
4-2	88.70	87.70	-0.99	0.132		
AVG:	88.70	88.70	0.00	0.131	*****	0.92
AVG:	260.0	273.4	3.23	0.0271		
AVG:	260.0	265.0	0.00	0.0588	*****	4.00

AutoDELFLIA PC v. 2.7 11-02-09 06z26156 NE0170HFW017-aRHP 98 Page 2

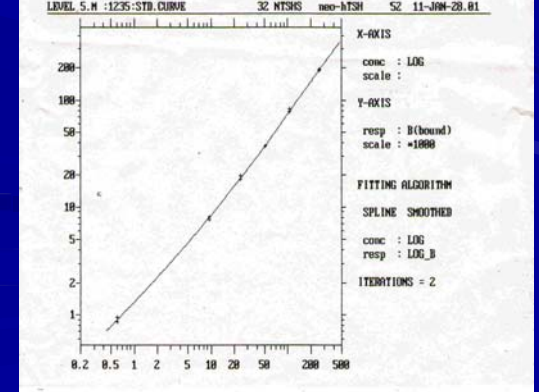


```

BLANK = not coded ( 0 )
ED-20 = 2.450 ED-50 = 16.62 ED-80 = 80.70
Y-AXIS (CONCENTRATION) = LOG SLOPE = 0.394
Y-AXIS (RESPONSE) = LOG_B INTERCEPT = 9094
FITTING ALGORITHM = SPLINE SMOOTHED VARIANCE RATIO = 0.436
    
```

STD	CONC	CALC.CONC	SDIFF	RESPONSE	%cvRESP	%cvCONC
1-1	0.600	0.639	0.40	994.0		
1-2	0.600	0.700	0.50	864.0		
AVG:	0.600	0.604	0.44	905.0	*****	6.09
2-1	0.400	0.958	-4.59	7620		8.09
2-2	0.400	0.668	-2.81	8142		
AVG:	0.400	0.813	-0.90	7884	*****	4.59
3-1	28.20	25.76	-4.46	19700		5.28
3-2	28.20	22.89	-1.47	18331		
AVG:	28.20	24.81	-2.51	19026	*****	3.01
4-1	31.00	50.89	-0.22	37988		5.47
4-2	31.00	50.92	-0.12	37694		
AVG:	31.00	50.89	-0.22	37594	*****	0.03
5-1	105.0	104.9	-0.14	78176		0.05
5-2	105.0	111.6	6.70	82262		
AVG:	105.0	108.3	5.10	80719	*****	4.49
AVG:	260.0	256.9	-1.19	190073		

AutoDELFLIA PC v. 2.7 11-02-09 06z15108 NTSHS neo-NTSH 52 Page 2



# DELFIA X AutoDELFLA

„Manuální“ linka DELFIA



Metodu DELFIA lze plně automatizovat při práci s kapalným materiálem (plasma, sérum). Při práci se suchou krevní skvrnou není dosud běžná automatizace prvního kroku (vyrážení terčů).

Analyzátor AutoDELFLA

