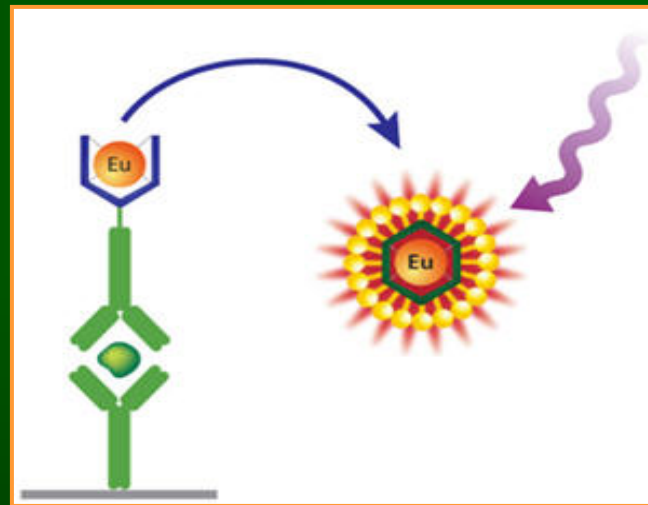


# DELFLIA

## Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent ImmunoAssay

- Fluoroimunoanalytická metoda
  - velmi citlivá metoda
  - specifická metoda
- Stanovení analytů
  - nízkomolekulárních
  - vysokomolekulárních
  - finská firma Wallac Oy



1	H	skupení prvků (20°C)	1	Li	skupení prvků (20°C)	2	He
2	Li	skupení prvků (20°C)	10	Ne	skupení prvků (20°C)	18	Ar
3	Na	skupení prvků (20°C)	18	Ar	skupení prvků (20°C)	36	Kr
4	K	skupení prvků (20°C)	36	Kr	skupení prvků (20°C)	54	Xe
5	Rb	skupení prvků (20°C)	54	Xe	skupení prvků (20°C)	72	Rn
6	Cs	skupení prvků (20°C)	72	Rn	skupení prvků (20°C)	90	
7	Fr	skupení prvků (20°C)	90		skupení prvků (20°C)	108	

lanthanoidy

aktinoidy

**Eu**

**Tb**

**Dy**

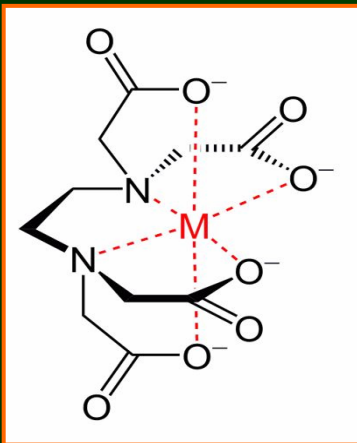
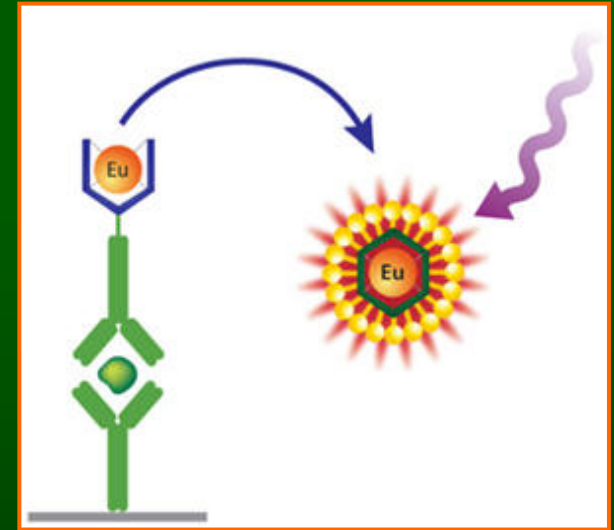
**Sm**

**Gd**

- využívá časově modulované měření fluorescence chelátu lanthanidů
  - Europium
  - Terbium
  - Samarium
  - Dysprosium

# DELFLIA - princip

- Protilátka nebo antigen označeny fluorescenční sondou – chelátem lanthanidu
  - nejčastěji **Eu**ropium
- Po proběhlé imunochemické reakci:
  - přidání „zesilovacího“ roztoku ke vzniklému komplexu
    - odtržení **Eu** z komplexu
    - přeměna **Eu** na nový intenzivně fluoreskující chelát



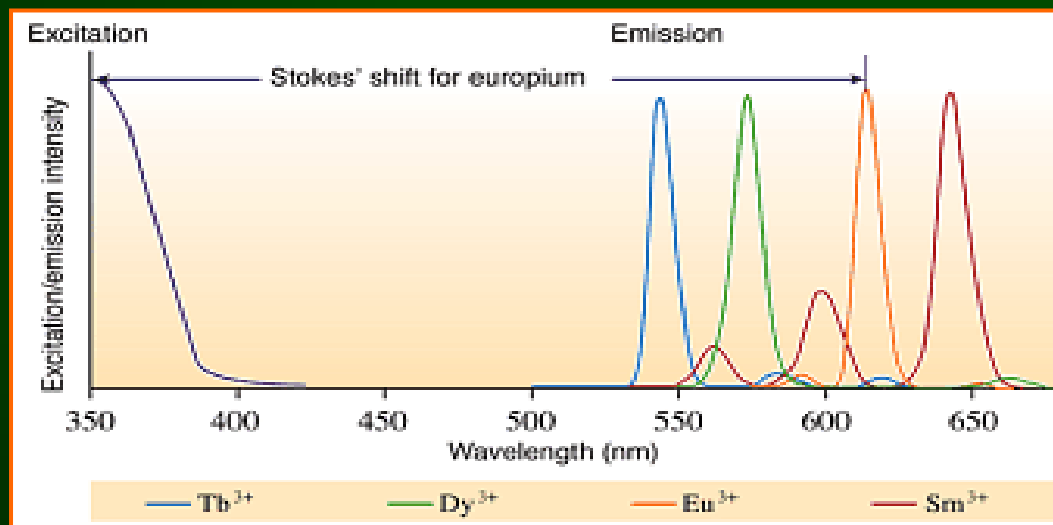
## Cheláty

- komplexní (koordinační) sloučeniny centrálního atomu a dvoj- nebo vícevazných ligandů
- ligandy tvoří s centrálním atomem cyklická uspořádání
  - chelátový efekt - významné zvýšení stability komplexů ve srovnání s jednovaznými ligandy

# DELFA

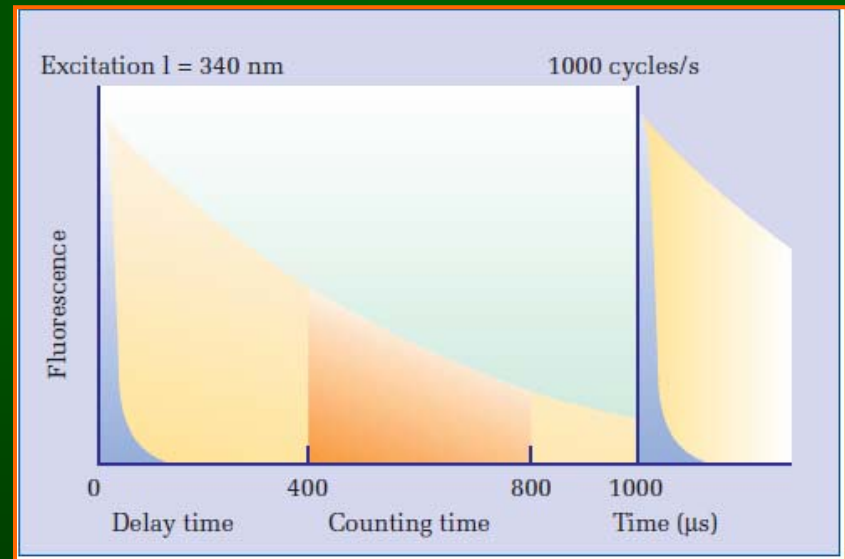
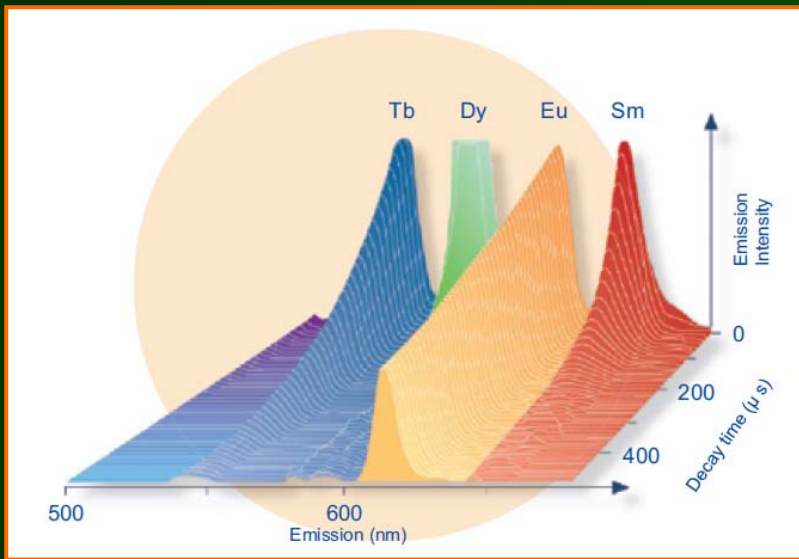
Fluoreskující chelát (s novým - luminogenním - ligandem):

- Fluorescence s velkým **Stokesovým posunem** fluorescenčního spektra (rozdíl mezi vlnovou délkou excitace a fluorescence)
- Vzorek pulzně excitován zářením o vlnové délce 340 nm
- Fluorescence měřena v dlouhovlnné části viditelného spektra (Eu - 620 nm)
  - eliminace pozadí (případná fluorescence matrice se projevuje pouze v krátkovlnnější oblasti)



# DELFLIA - Time-resolved fluorometry (TRF)

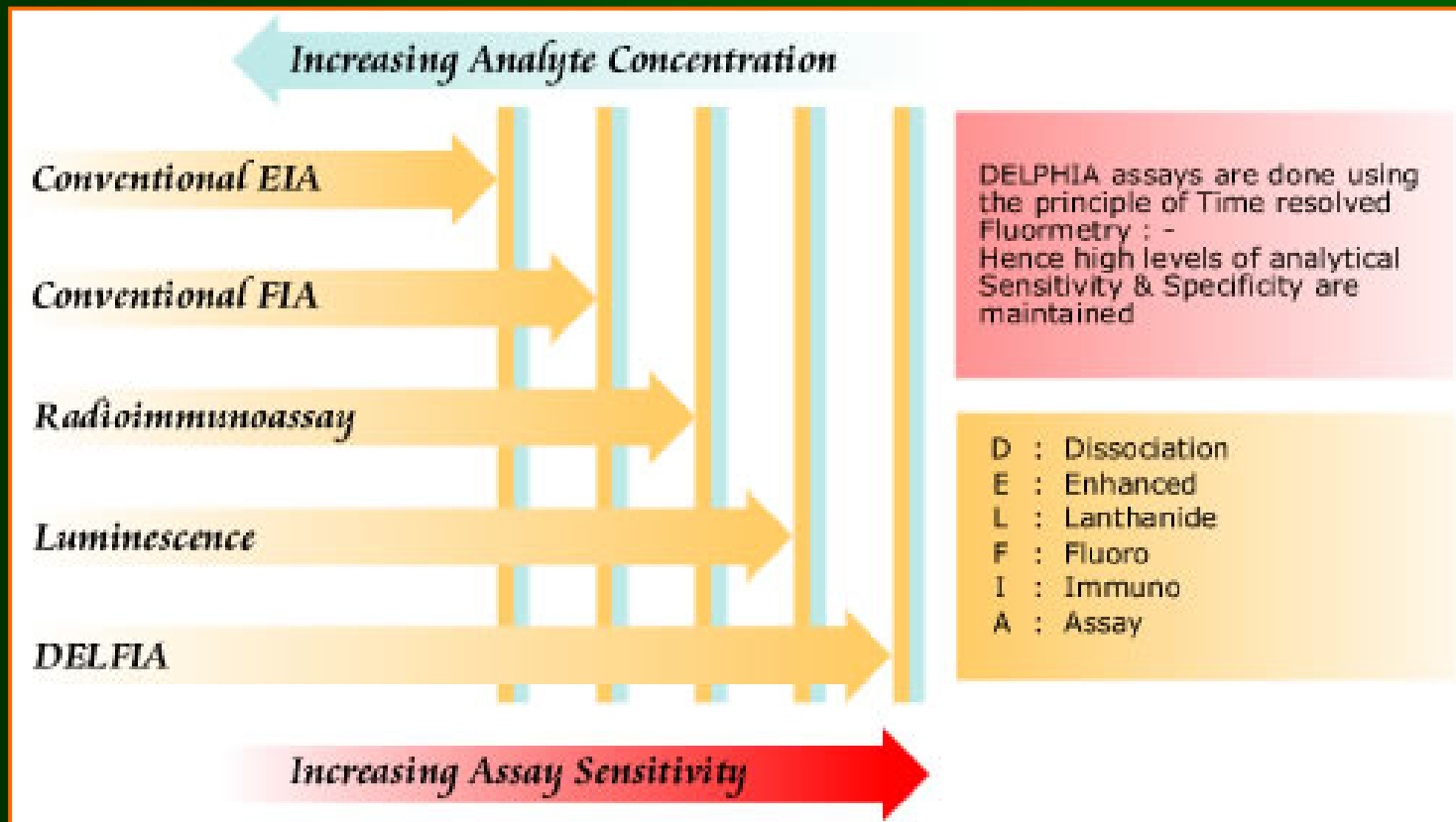
- fluorescence je **dlouhodobá**
  - doba emise delší než u běžných fluoroforů - řádově stovky mikrosekund



- 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 citlivosť a špecifita



# DELFLIA

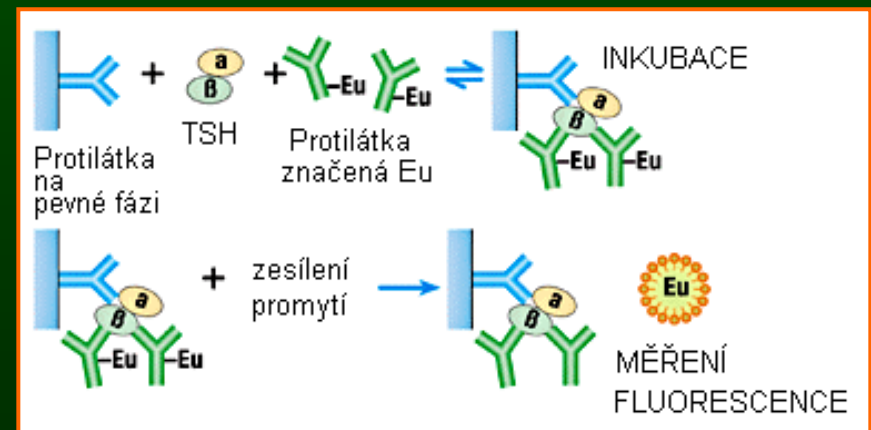
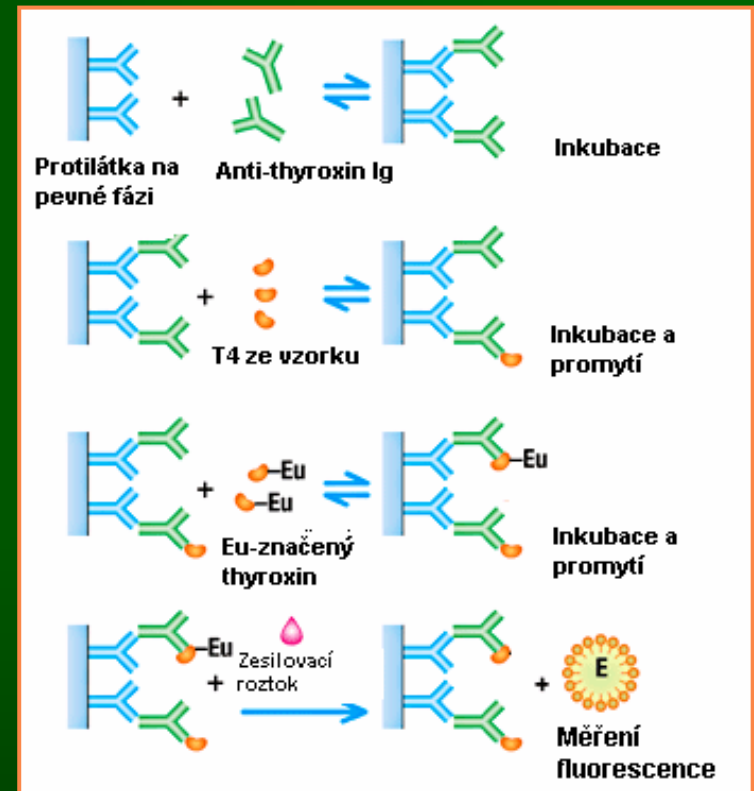
## Uspořádání imunochemické reakce:

### - kompetitivní:

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

### - nekompetitivní (sendvičové):

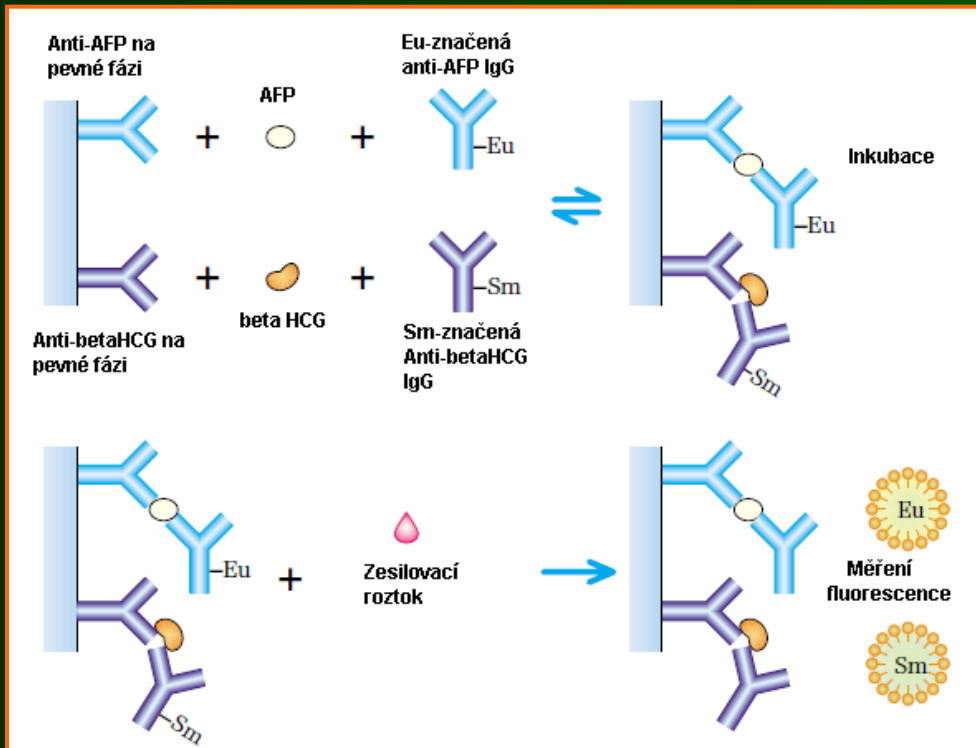
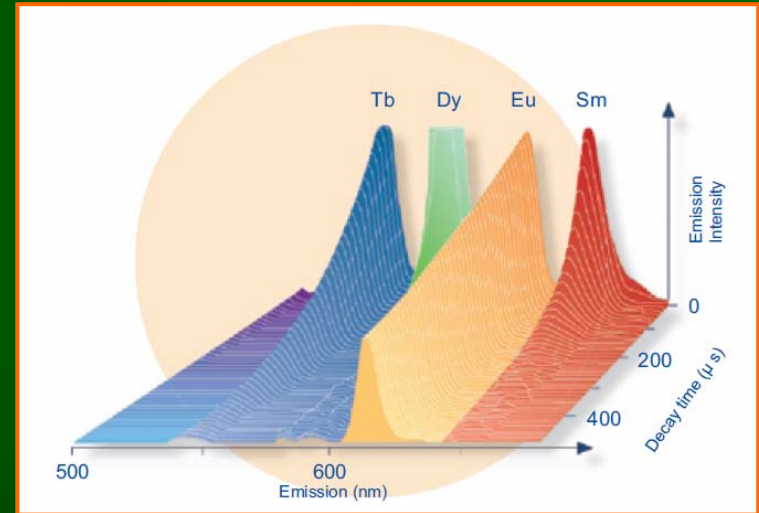
- fluorescenční sondou značená protilátka
- intenzita fluorescence přímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku



# 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

# DELFLA - využití

DELFLA 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):

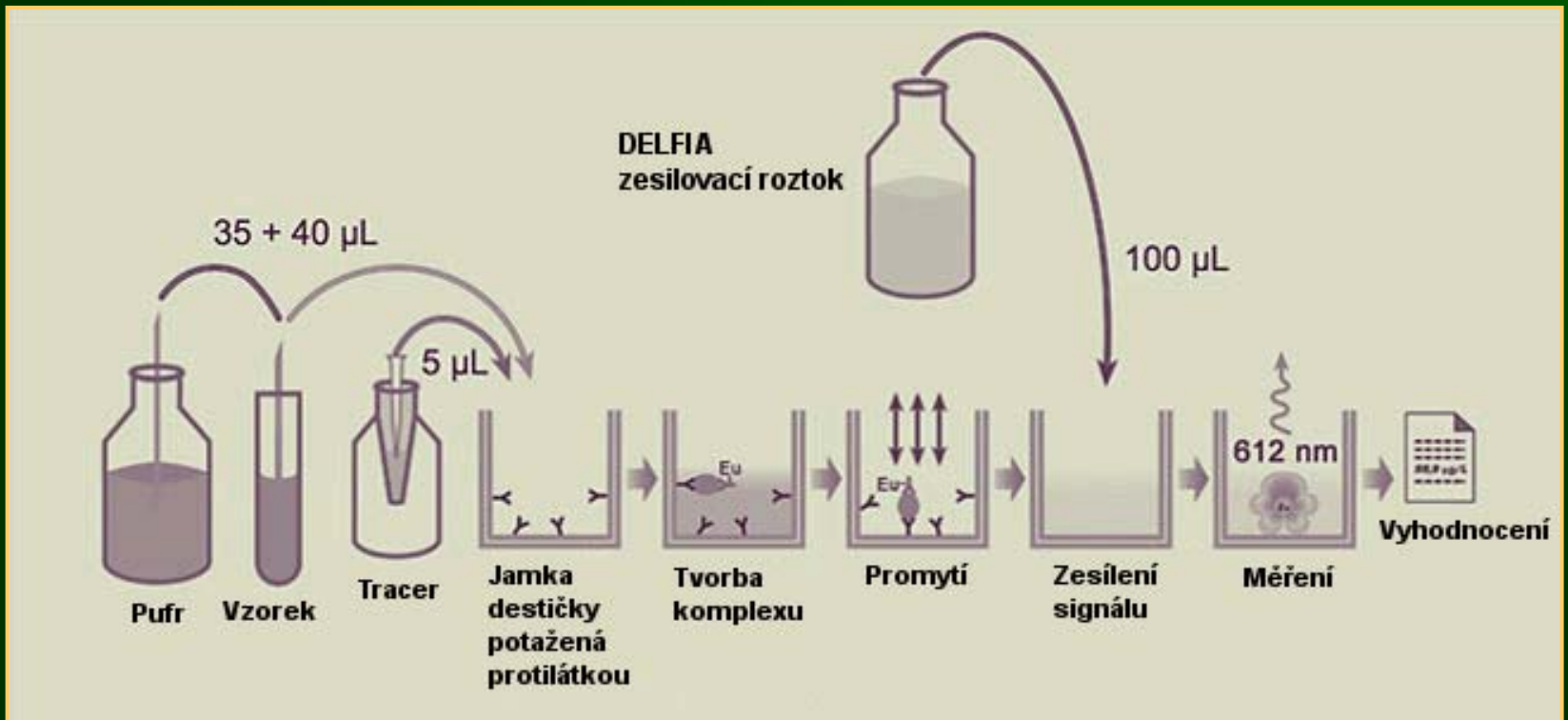
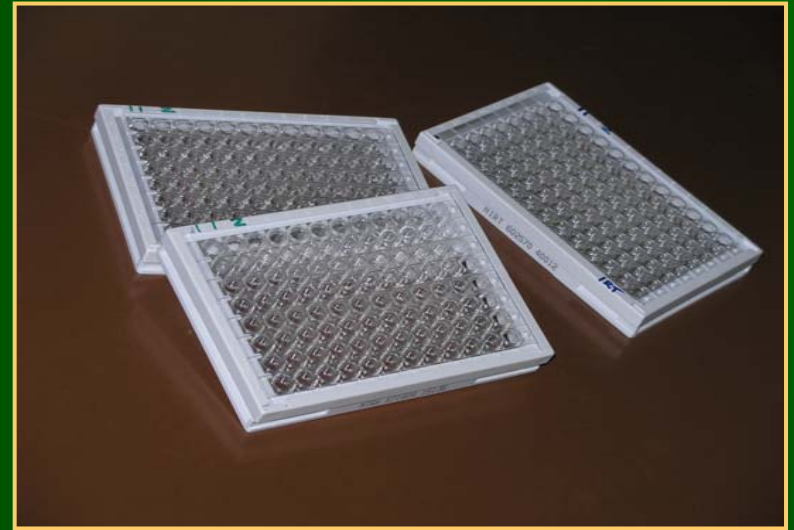
- TSH (kongenitální hypotyreóza)
- 17-hydroxy-progesteron (kongenitální adrenální hyperplázie)
- Imunoreaktivní trypsinogen IRT (cystická fibróza)



# DELFLA

## 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)



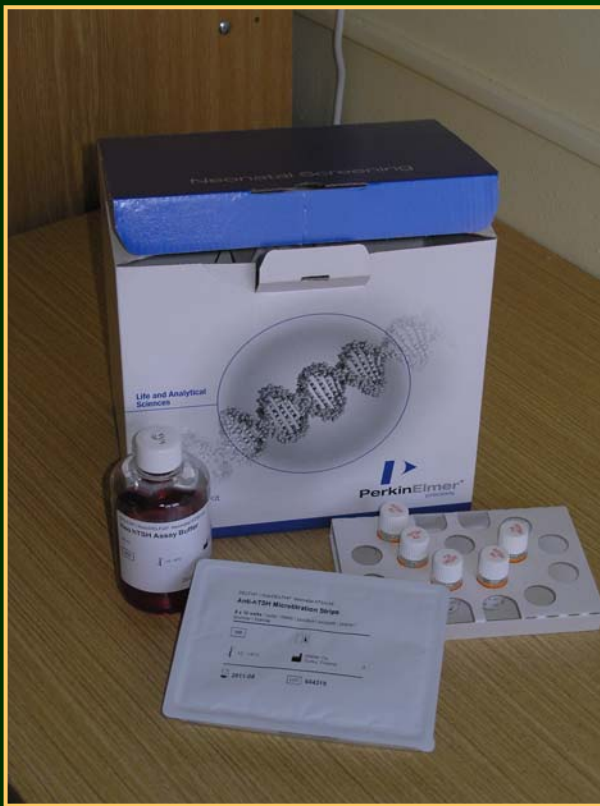
5 Promytí destičky (promývačka)



6 Měření na fluorometru po přidání zesilovacího roztoku



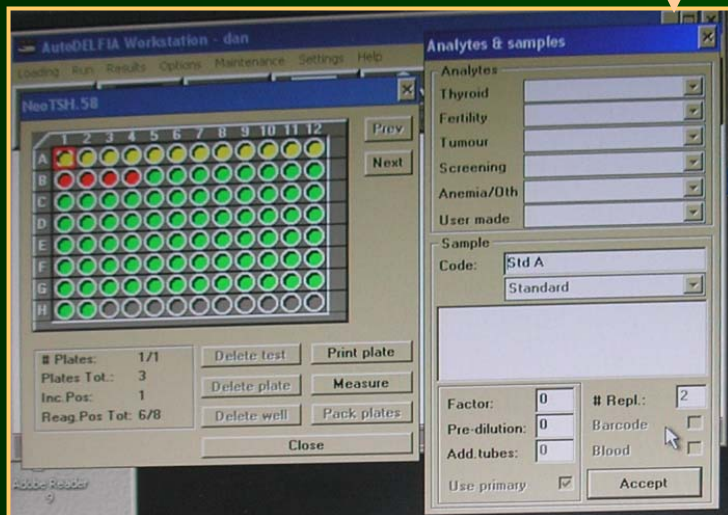
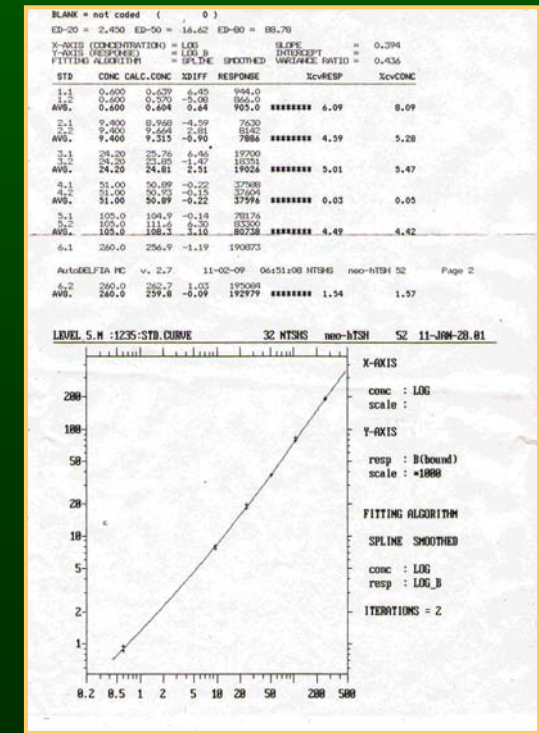
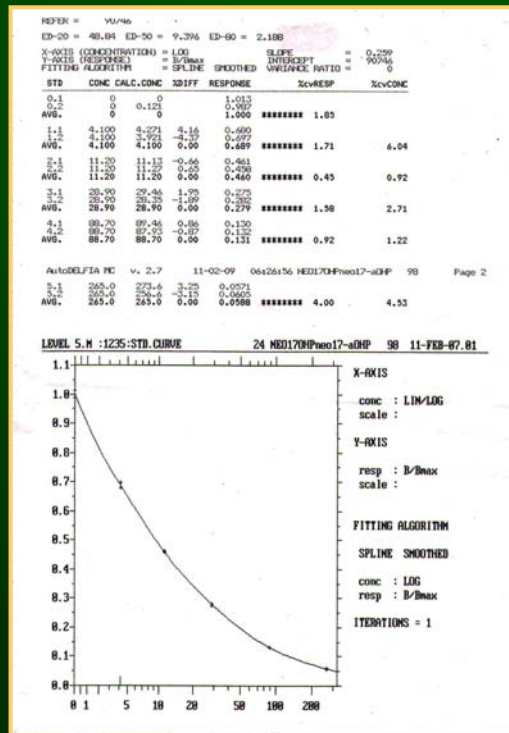
# DELFLIA – suchá krevní skvrna



← 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



# DELFIA X AutoDELFLA

„Manuální“ linka DELFIA



Analyzátor AutoDELFLA



- 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)