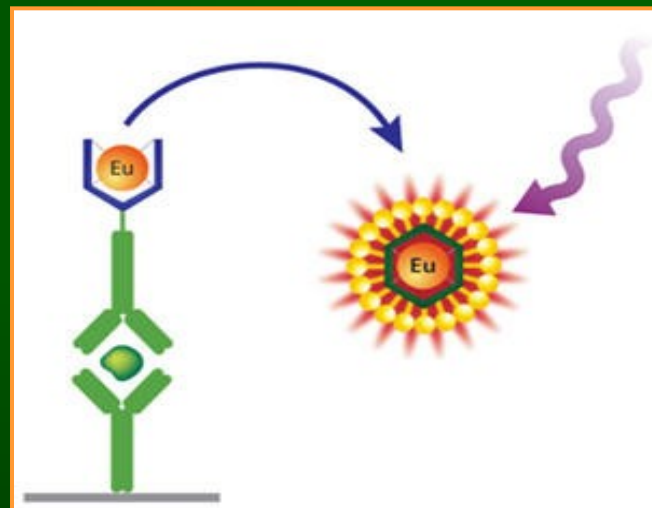


# DELFLIA

## Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent ImmunoAssay

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

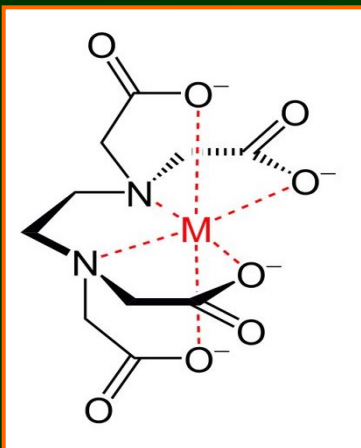
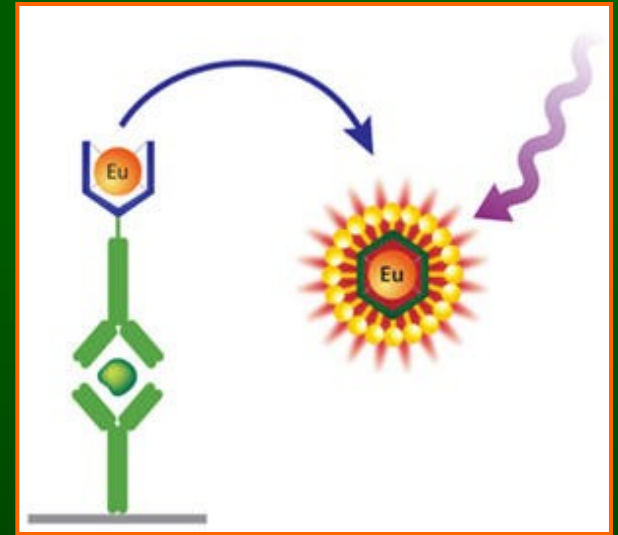


skupení prvku (př. 20°C)		atómové číslo		elektronová konfigurace	
prvok		prvok		značka	
1 H	2 He	11 Na	12 Mg	13 Al	14 Si
3 Li	4 Be	19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti
5 B	6 C	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe
7 N	8 O	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn
9 F	10 Ne	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se
11 Li	12 Be	35 Br	36 Kr	37 Rb	38 Sr
13 Na	14 Mg	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo
15 Al	16 Si	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd
17 Cl	18 Ar	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn
19 K	20 Ca	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe
21 Sc	22 Ti	55 Cs	56 Ba	57 La	58 Ce
23 V	24 Cr	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm
25 Mn	26 Fe	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy
27 Co	28 Ni	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb
29 Cu	30 Zn	71 Lu	72 Hf	73 Ta	74 W
31 Ga	32 Ge	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt
33 As	34 Se	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb
35 Br	36 Kr	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn
37 Rb	38 Sr	87 Fr	88 Ra	89 Ac	90 Th
39 Y	40 Zr	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu
41 Nb	42 Mo	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf
43 Tc	44 Ru	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No
45 Rh	46 Pd	103 Lr	104 Rf	105 Db	106 Sg
47 Ag	48 Cd	107 Bh	108 Hs	109 Mt	110 Ds
49 In	50 Sn	111 Uu	112 Uub	113 Uuc	114 Uuq
51 Sb	52 Te	115 Uuh	116 Uuo	117 Uuq	118 Uuh
53 I	54 Xe	119 Uuo	120 Uuq	121 Uuh	122 Uuo
55 Cs	56 Ba	123 Uuq	124 Uuh	125 Uuo	126 Uuq
57 La	58 Ce	127 Uuh	128 Uuo	129 Uuq	130 Uuh
59 Pr	60 Nd	131 Uuh	132 Uuo	133 Uuq	134 Uuh
61 Pm	62 Sm	135 Uuh	136 Uuo	137 Uuq	138 Uuh
63 Eu	64 Gd	139 Uuh	140 Uuo	141 Uuq	142 Uuh
65 Tb	66 Dy	143 Uuh	144 Uuo	145 Uuq	146 Uuh
67 Ho	68 Er	147 Uuh	148 Uuo	149 Uuq	150 Uuh
69 Tm	70 Yb	151 Uuh	152 Uuo	153 Uuq	154 Uuh
71 Lu	72 Hf	155 Uuh	156 Uuo	157 Uuq	158 Uuh
73 Ta	74 W	159 Uuh	160 Uuo	161 Uuq	162 Uuh
75 Re	76 Os	163 Uuh	164 Uuo	165 Uuq	166 Uuh
77 Ir	78 Pt	167 Uuh	168 Uuo	169 Uuq	170 Uuh
79 Au	80 Hg	171 Uuh	172 Uuo	173 Uuq	174 Uuh
81 Tl	82 Pb	175 Uuh	176 Uuo	177 Uuq	178 Uuh
83 Bi	84 Po	179 Uuh	180 Uuo	181 Uuq	182 Uuh
85 At	86 Rn	183 Uuh	184 Uuo	185 Uuq	186 Uuh
87 Fr	88 Ra	187 Uuh	188 Uuo	189 Uuq	190 Uuh
89 Ac	90 Th	191 Uuh	192 Uuo	193 Uuq	194 Uuh
91 Pa	92 U	195 Uuh	196 Uuo	197 Uuq	198 Uuh
93 Np	94 Pu	199 Uuh	200 Uuo	201 Uuq	202 Uuh
95 Am	96 Cm	203 Uuh	204 Uuo	205 Uuq	206 Uuh
97 Bk	98 Cf	207 Uuh	208 Uuo	209 Uuq	210 Uuh
99 Es	100 Fm	211 Uuh	212 Uuo	213 Uuq	214 Uuh
101 Md	102 No	215 Uuh	216 Uuo	217 Uuq	218 Uuh
103 Lr	104 Rf	219 Uuh	220 Uuo	221 Uuq	222 Uuh
105 Db	106 Sg	223 Uuh	224 Uuo	225 Uuq	226 Uuh
107 Bh	108 Hs	227 Uuh	228 Uuo	229 Uuq	230 Uuh
109 Mt	110 Ds	231 Uuh	232 Uuo	233 Uuq	234 Uuh
111 Uu	112 Uub	235 Uuh	236 Uuo	237 Uuq	238 Uuh
113 Uuc	114 Uuq	239 Uuh	240 Uuo	241 Uuq	242 Uuh
115 Uuh	116 Uuo	243 Uuh	244 Uuo	245 Uuq	246 Uuh
117 Uuq	118 Uuh	247 Uuh	248 Uuo	249 Uuq	250 Uuh
119 Uuo	120 Uuq	251 Uuh	252 Uuo	253 Uuq	254 Uuh
121 Uuh	122 Uuo	255 Uuh	256 Uuo	257 Uuq	258 Uuh
123 Uuh	124 Uuo	259 Uuh	260 Uuo	261 Uuq	262 Uuh
125 Uuq	126 Uuh	263 Uuh	264 Uuo	265 Uuq	266 Uuh
127 Uuh	128 Uuo	267 Uuh	268 Uuo	269 Uuq	270 Uuh
129 Uuq	130 Uuh	271 Uuh	272 Uuo	273 Uuq	274 Uuh
131 Uuh	132 Uuo	275 Uuh	276 Uuo	277 Uuq	278 Uuh
133 Uuq	134 Uuh	279 Uuh	280 Uuo	281 Uuq	282 Uuh
135 Uuh	136 Uuo	283 Uuh	284 Uuo	285 Uuq	286 Uuh
137 Uuq	138 Uuh	287 Uuh	288 Uuo	289 Uuq	290 Uuh
139 Uuh	140 Uuo	291 Uuh	292 Uuo	293 Uuq	294 Uuh
141 Uuq	142 Uuh	295 Uuh	296 Uuo	297 Uuq	298 Uuh
143 Uuh	144 Uuo	299 Uuh	300 Uuo	301 Uuq	302 Uuh
145 Uuq	146 Uuh	303 Uuh	304 Uuo	305 Uuq	306 Uuh
147 Uuh	148 Uuo	307 Uuh	308 Uuo	309 Uuq	310 Uuh
149 Uuq	150 Uuh	311 Uuh	312 Uuo	313 Uuq	314 Uuh
151 Uuh	152 Uuo	315 Uuh	316 Uuo	317 Uuq	318 Uuh
153 Uuq	154 Uuh	319 Uuh	320 Uuo	321 Uuq	322 Uuh
155 Uuh	156 Uuo	323 Uuh	324 Uuo	325 Uuq	326 Uuh
157 Uuq	158 Uuh	327 Uuh	328 Uuo	329 Uuq	330 Uuh
159 Uuh	160 Uuo	331 Uuh	332 Uuo	333 Uuq	334 Uuh
161 Uuq	162 Uuh	335 Uuh	336 Uuo	337 Uuq	338 Uuh
163 Uuh	164 Uuo	339 Uuh	340 Uuo	341 Uuq	342 Uuh
165 Uuq	166 Uuh	343 Uuh	344 Uuo	345 Uuq	346 Uuh
167 Uuh	168 Uuo	347 Uuh	348 Uuo	349 Uuq	350 Uuh
169 Uuq	170 Uuh	351 Uuh	352 Uuo	353 Uuq	354 Uuh
171 Uuh	172 Uuo	355 Uuh	356 Uuo	357 Uuq	358 Uuh
173 Uuq	174 Uuh	359 Uuh	360 Uuo	361 Uuq	362 Uuh
175 Uuh	176 Uuo	363 Uuh	364 Uuo	365 Uuq	366 Uuh
177 Uuq	178 Uuh	367 Uuh	368 Uuo	369 Uuq	370 Uuh
179 Uuh	180 Uuo	371 Uuh	372 Uuo	373 Uuq	374 Uuh
181 Uuq	182 Uuh	375 Uuh	376 Uuo	377 Uuq	378 Uuh
183 Uuh	184 Uuo	379 Uuh	380 Uuo	381 Uuq	382 Uuh
185 Uuq	186 Uuh	383 Uuh	384 Uuo	385 Uuq	386 Uuh
187 Uuh	188 Uuo	387 Uuh	388 Uuo	389 Uuq	390 Uuh
189 Uuq	190 Uuh	391 Uuh	392 Uuo	393 Uuq	394 Uuh
191 Uuh	192 Uuo	395 Uuh	396 Uuo	397 Uuq	398 Uuh
193 Uuq	194 Uuh	399 Uuh	400 Uuo	401 Uuq	402 Uuh
195 Uuh	196 Uuo	403 Uuh	404 Uuo	405 Uuq	406 Uuh
197 Uuq	198 Uuh	407 Uuh	408 Uuo	409 Uuq	410 Uuh
199 Uuh	200 Uuo	409 Uuq	410 Uuh	411 Uuh	412 Uuo

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

# DELFI A - princip

- Protilátka nebo antigen označeny fluorescenční sondou – stabilním 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 (s novým - luminogenním ligandem)

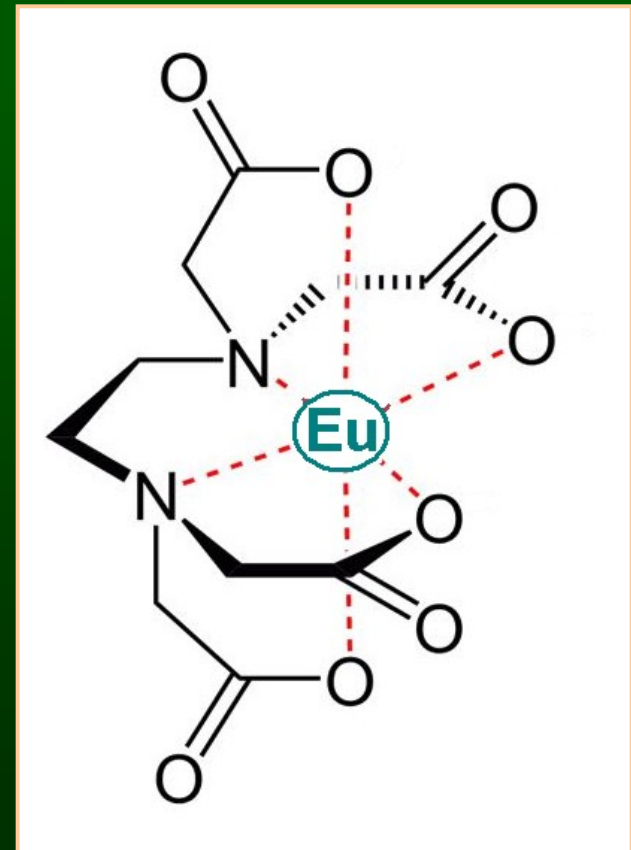
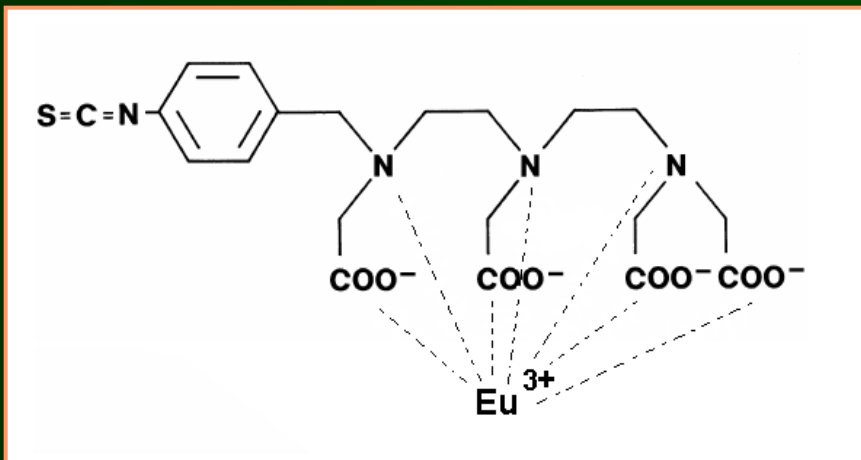
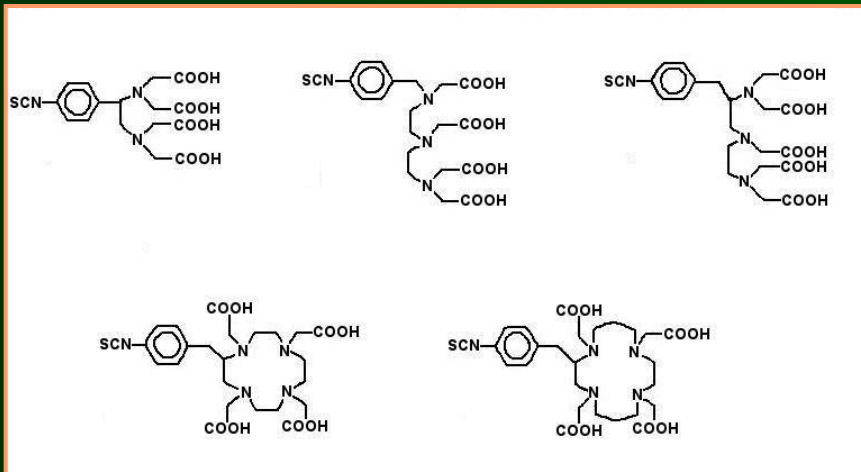


## Cheláty

- 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

# DELFIA - Chelátové značení protilátek

- nejčastěji cheláty lanthanidu s izothiokyanátový deriváty polyaminopolyoctových kyselin (EDTA, DTTA, DTPA,...)

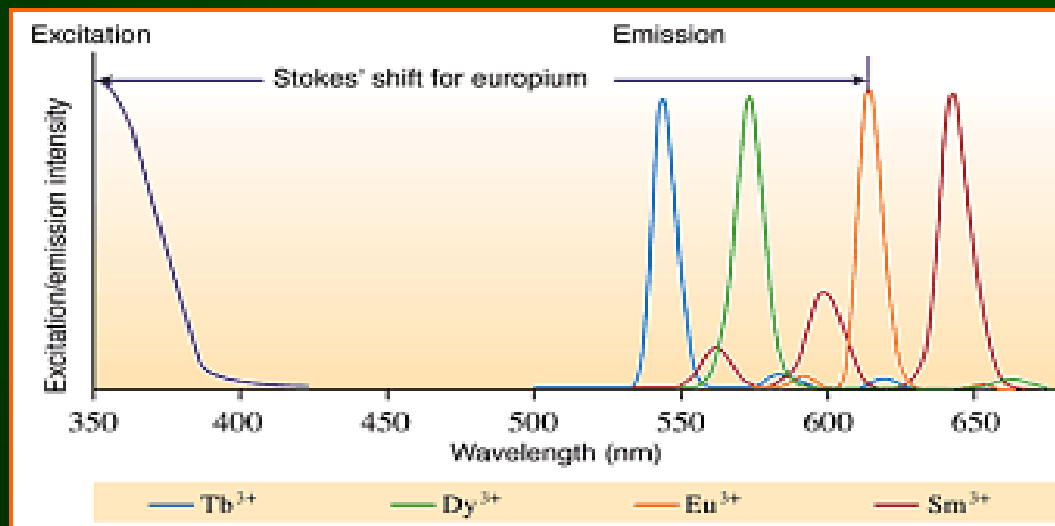


# DELFIA

Po proběhlé imunochemické reakci vzniká

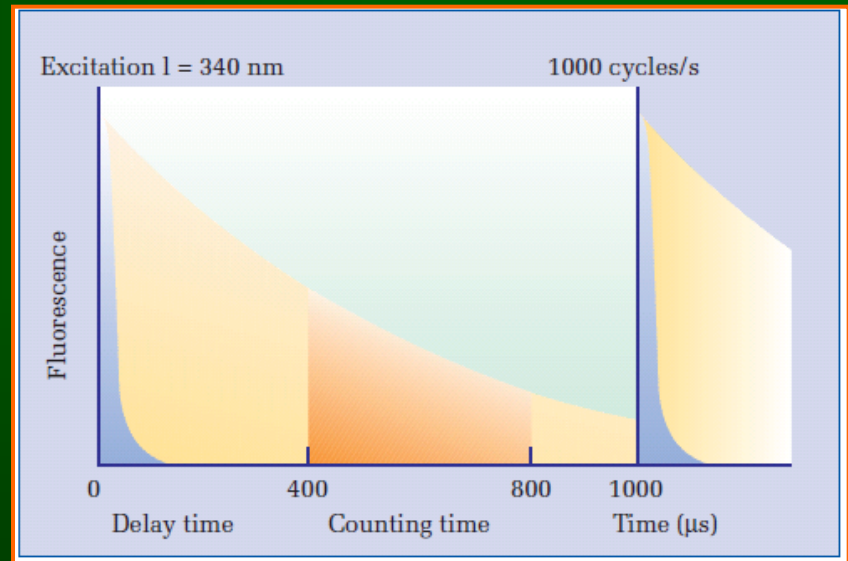
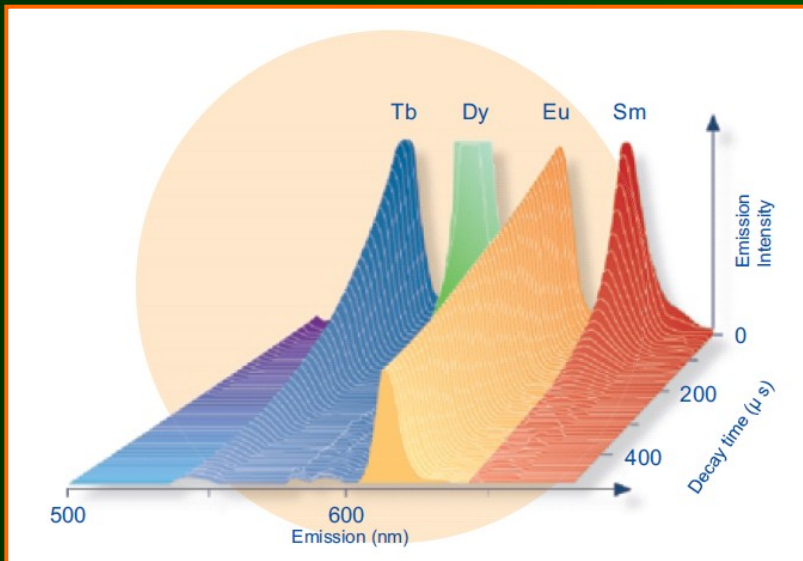
Fluoreskující chelát (s novým - luminogenním - ligandem):

- 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)

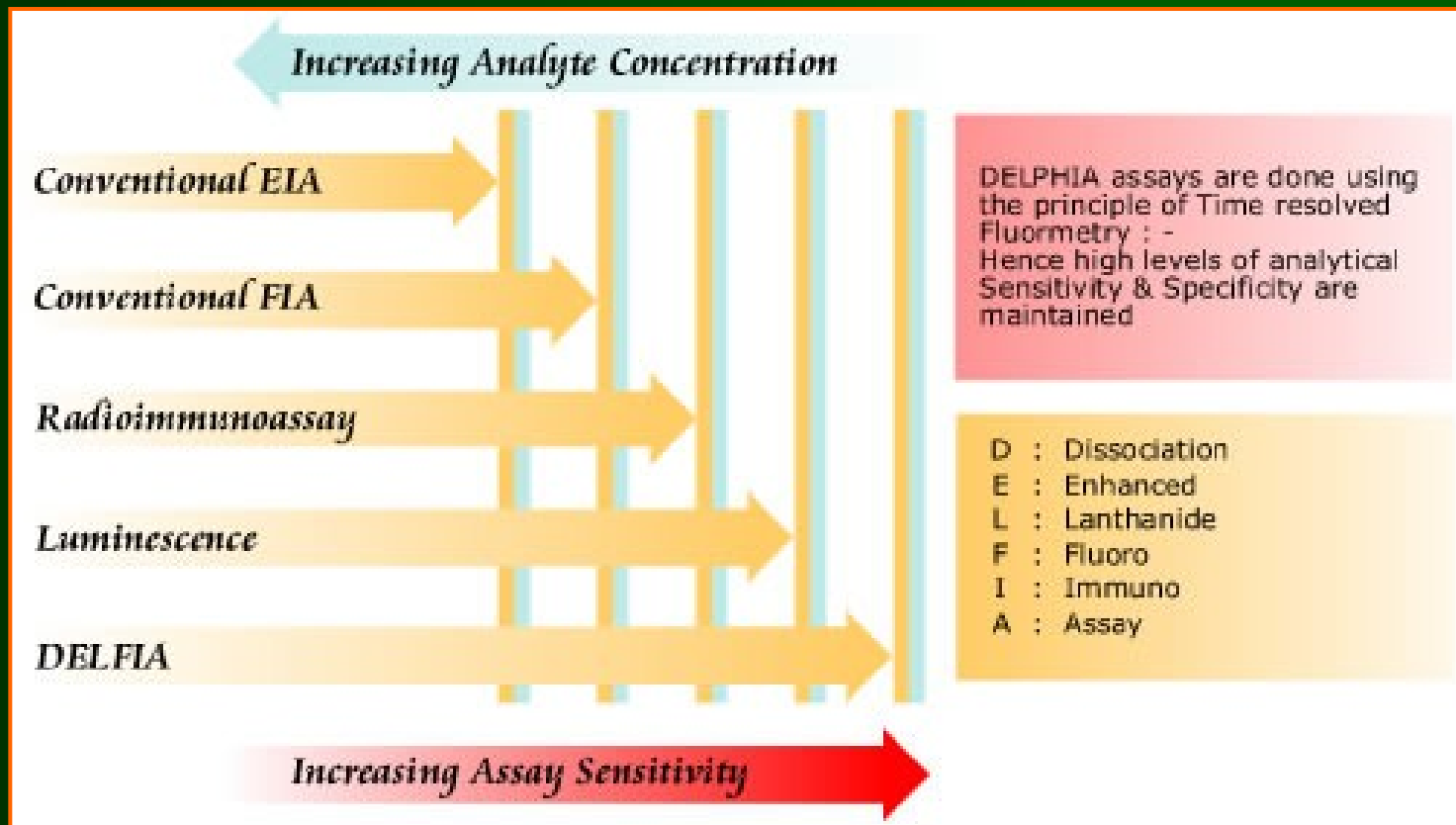
- fluorescence je **dlouhodobá**
  - doba emise delší než u běžných fluoroforů - řádově stovky mikrosekund



- 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

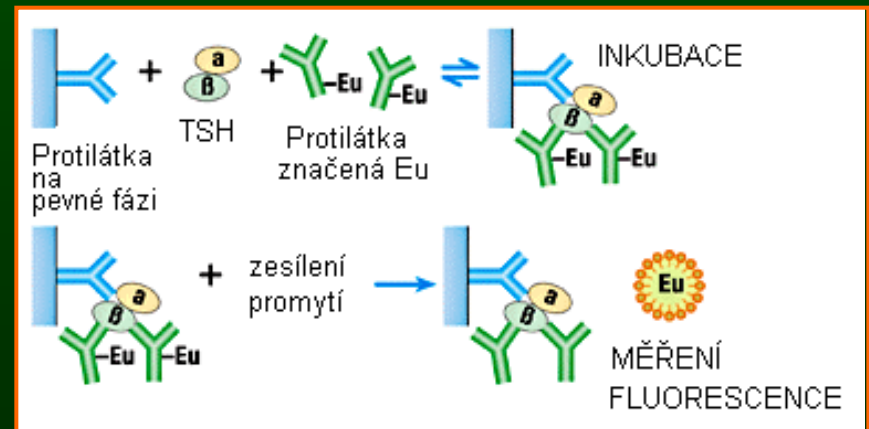
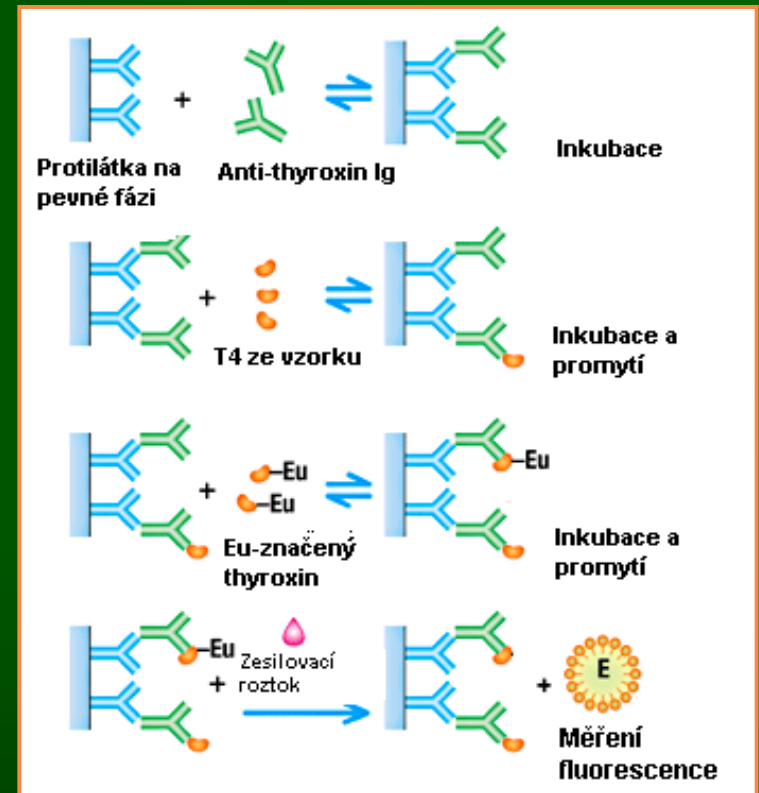
## Uspořádání imunochemické reakce:

### - 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

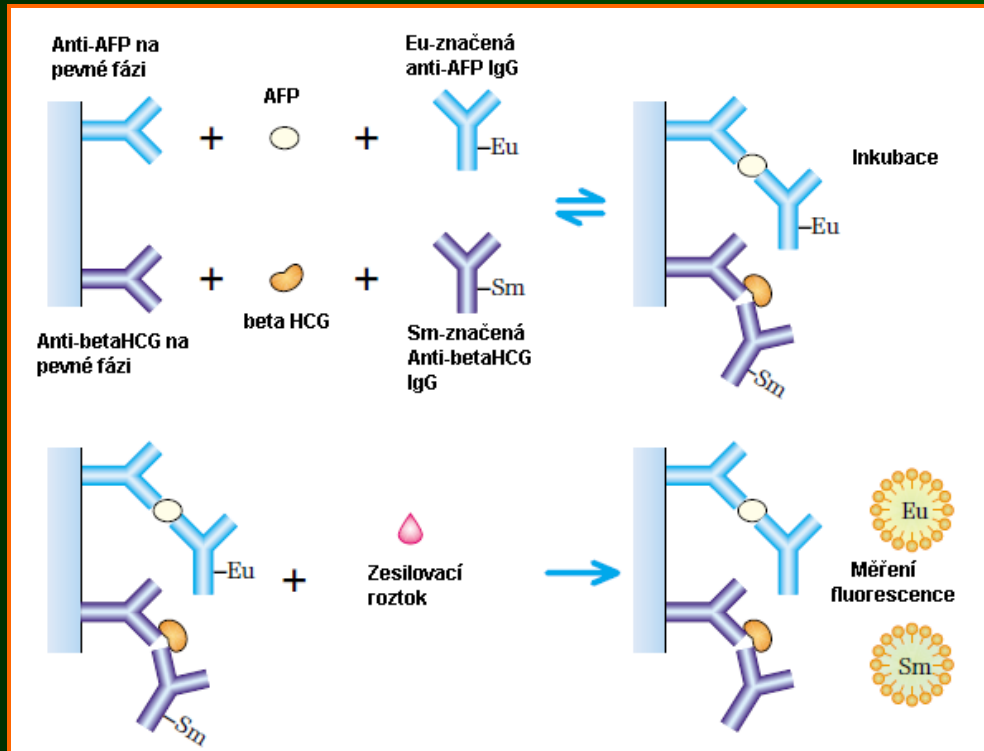
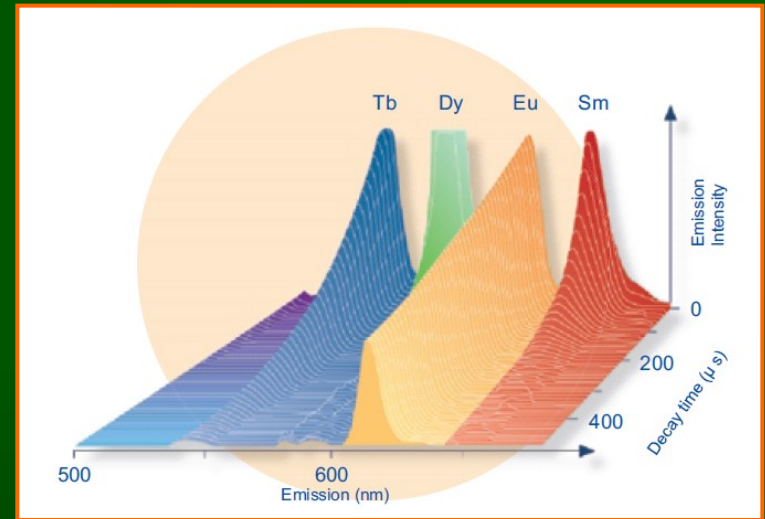




# DELFLIA - současné stanovení více analytů

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,...)

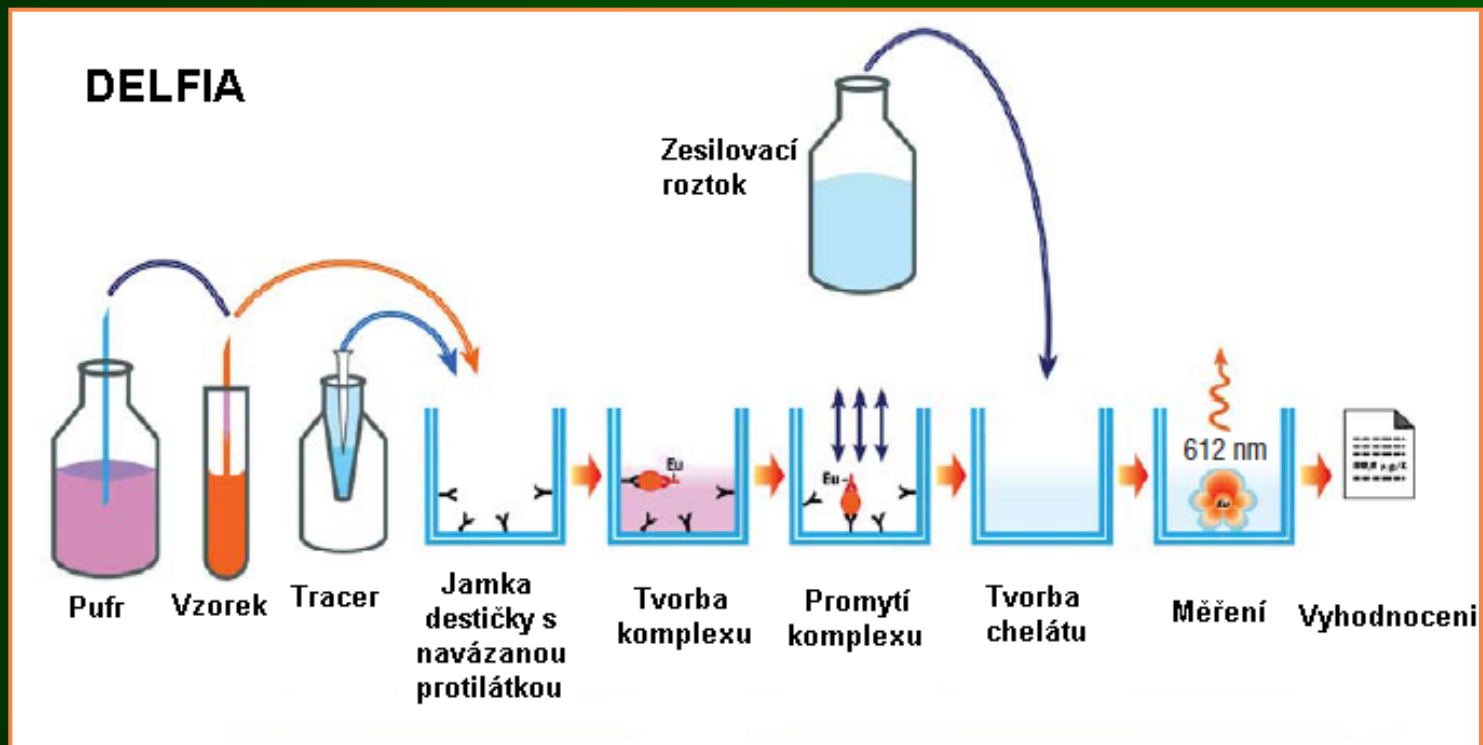
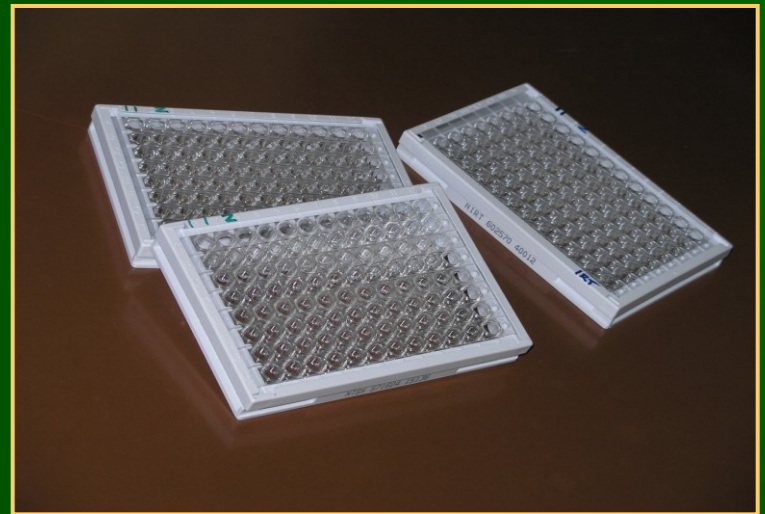
**Novorozenecký screening** (stanovení ze suché krevní skvrny):

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

# DELFLIA

## 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





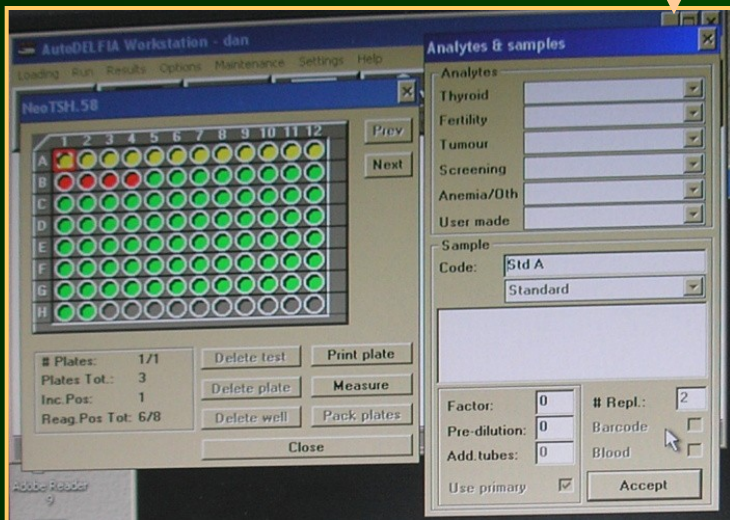
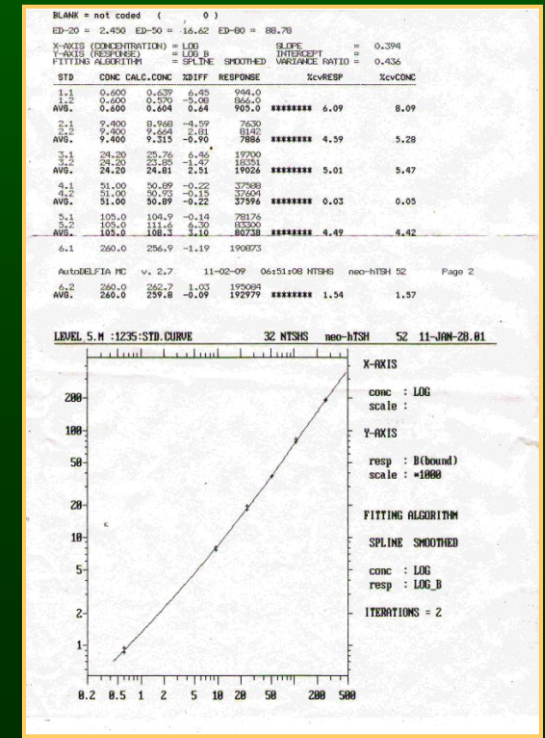
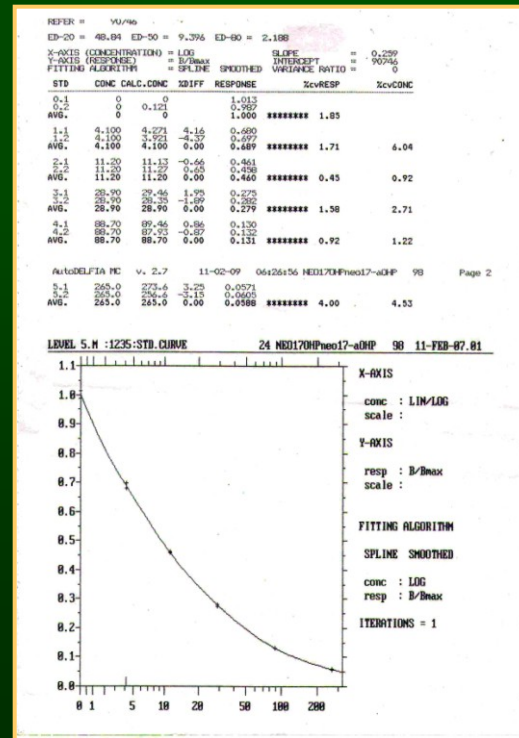
# DELFI – suchá krevní skvrna



← 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 AutoDELFLIA

„Manuální“ linka DELFIA



Analyzátor AutoDELFLIA



- 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 terčků)



*Děkuji za pozornost...*

*...a za to, že  
k dané  
problematicke  
nepřístupujete  
tímto způsobem...*

