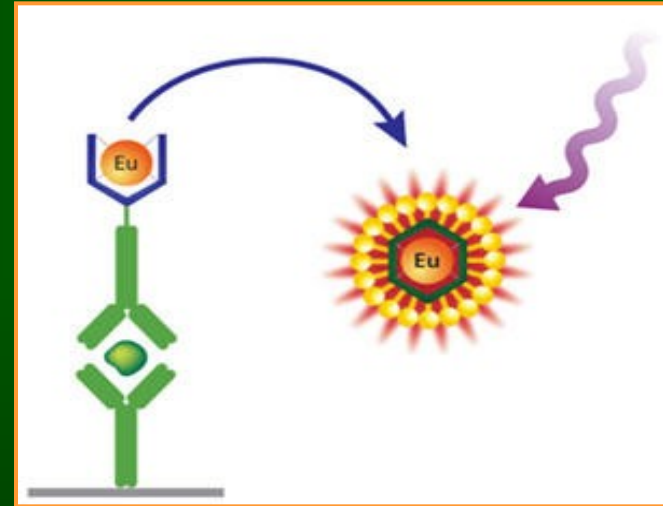


DELFLIA

Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent ImmunoAssay

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



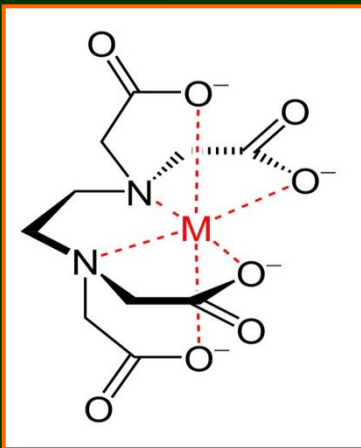
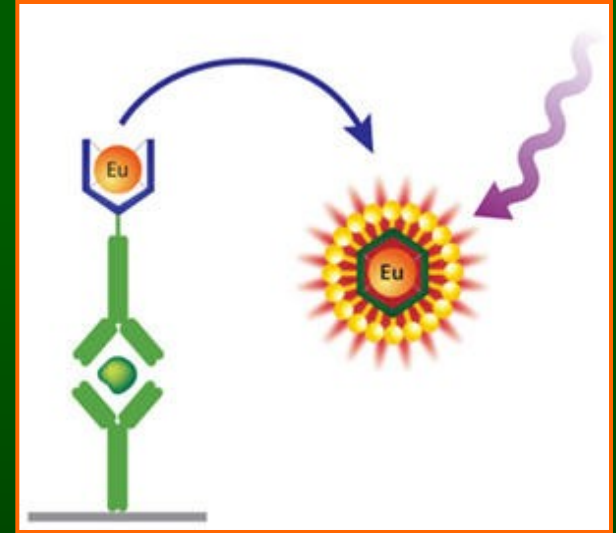
skupení prvku (př. 20°C)		oxidací číslo		elektronová konfigurace	
přímé		nepřímé		značka	
latinský název prvku		latinský název prvku		latinský název prvku	
hmotnostní číslo		hmotnostní číslo		hmotnostní číslo	
1	H	1	H	1	He
2	Li	2	Be	3	B
3	Na	4	Mg	4	Al
4	K	5	Ca	5	Sc
5	Rb	6	Sr	6	Zr
6	Cs	7	Ba	7	La
7	Fr	8	Ra	8	Ac
lanthanoidy		actinoidy			

Diagram of the periodic table with the lanthanide and actinide series highlighted. The lanthanide series (Ce to Lu) and actinide series (Th to Lr) are shown below the main table. The elements Sm, Eu, Gd, Tb, and Dy are circled in red in the lanthanide series.

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

DELFI A - 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

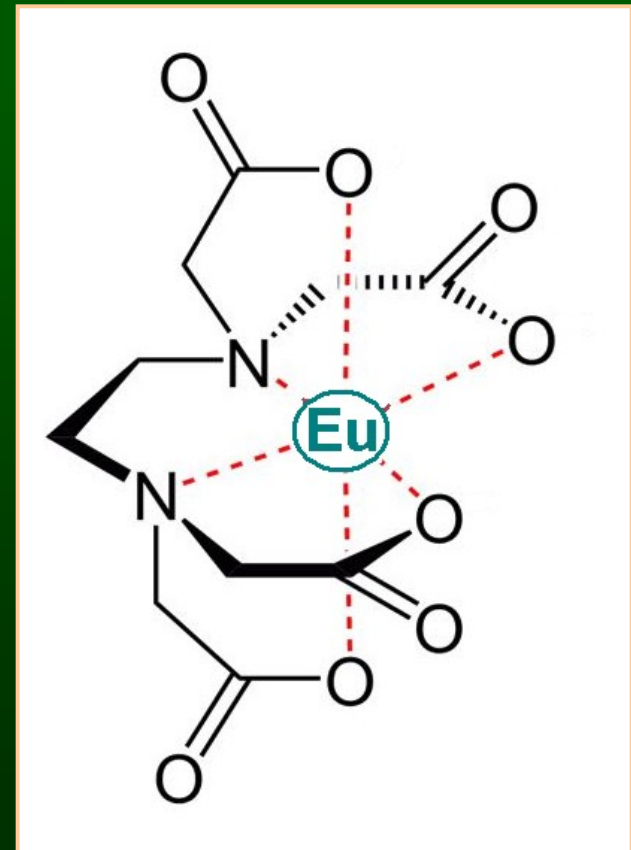
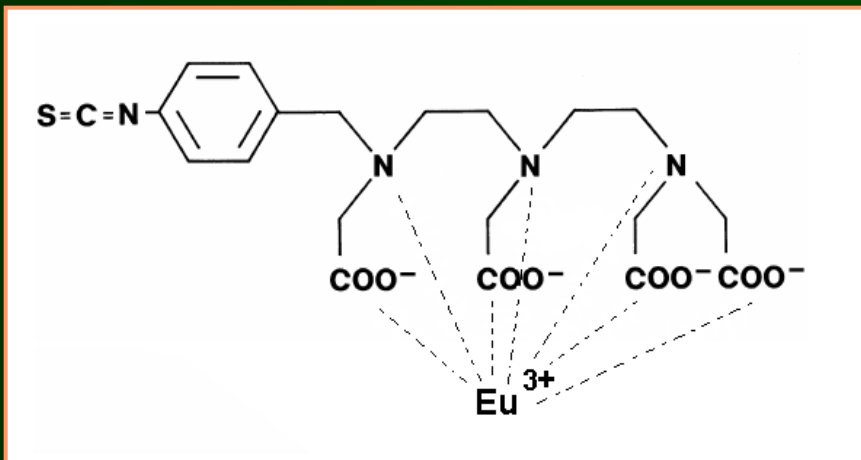
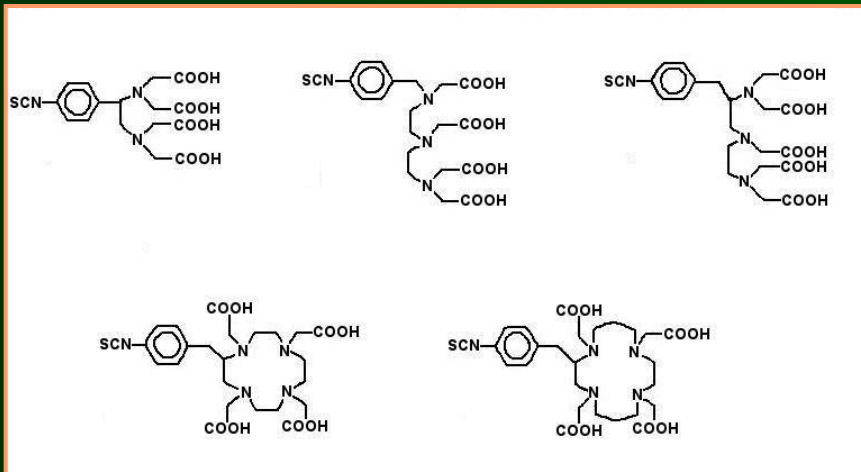


Cheláty

- 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

DELFLA - Chelátové značení protilátek

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



DELFLIA

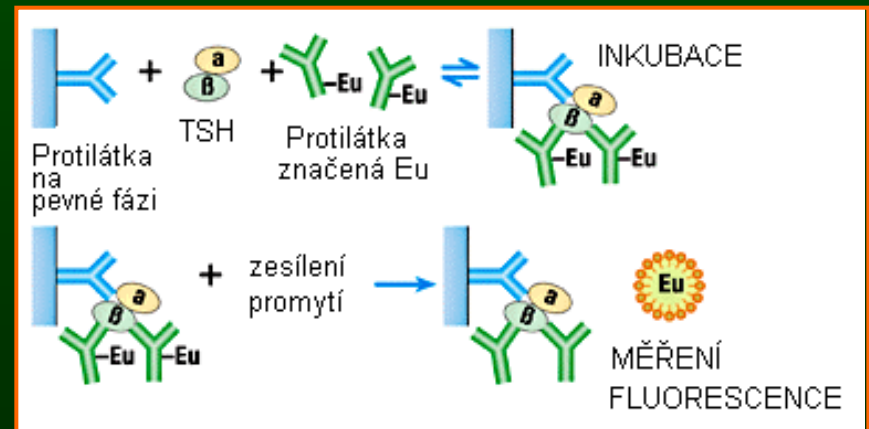
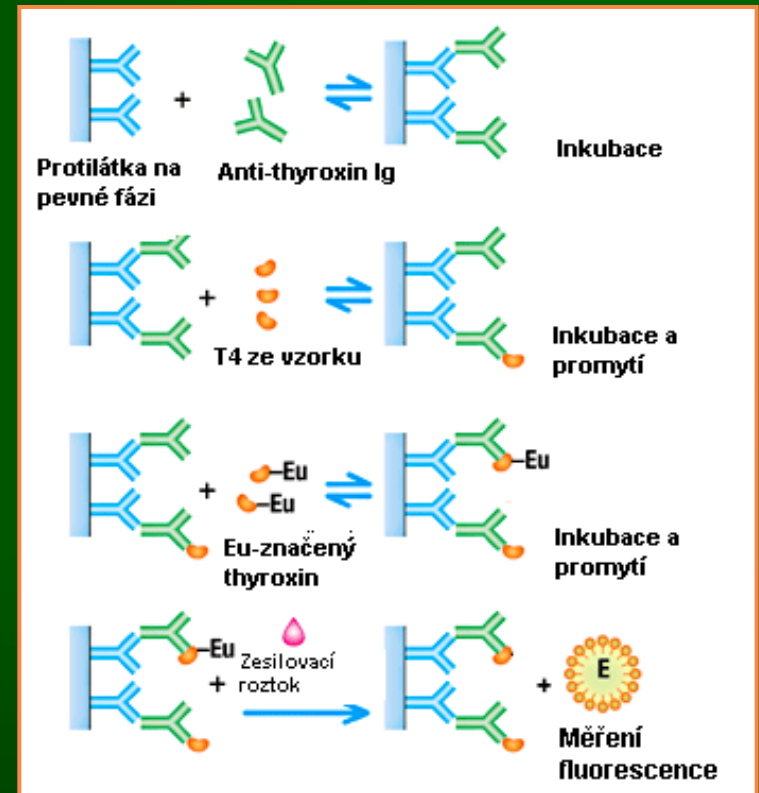
Uspořádání imunochemické reakce:

- 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

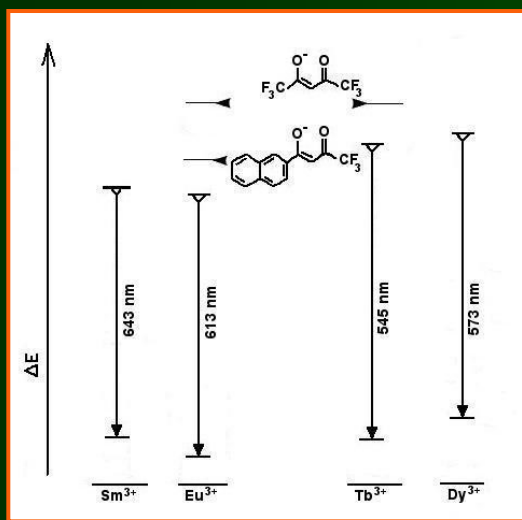


DELFA - disociace lanthanidu z komplexu, vznik fluorescenčních chelátů

- ion lanthanidu z komplexu odtržen vlivem kyselého pH
- přeměněn na vysoce fluorescenční chelát přidáním přebytku luminogenního ligandu
- vhodnými ligandy jsou β -diketony:



- R1... světlo absorbující aromatická skupina, např. naftyl-, benzofuryl-, furyl-, thienyl-, atd.
- R2... fluorovaný uhlovodíkový zbytek, v molekule zajišťuje optimální rozložení elektronové hustoty pro tvorbu komplexu
- ligand se váže na koordinační místo lanthanidu svými dvěma ketoskupinami



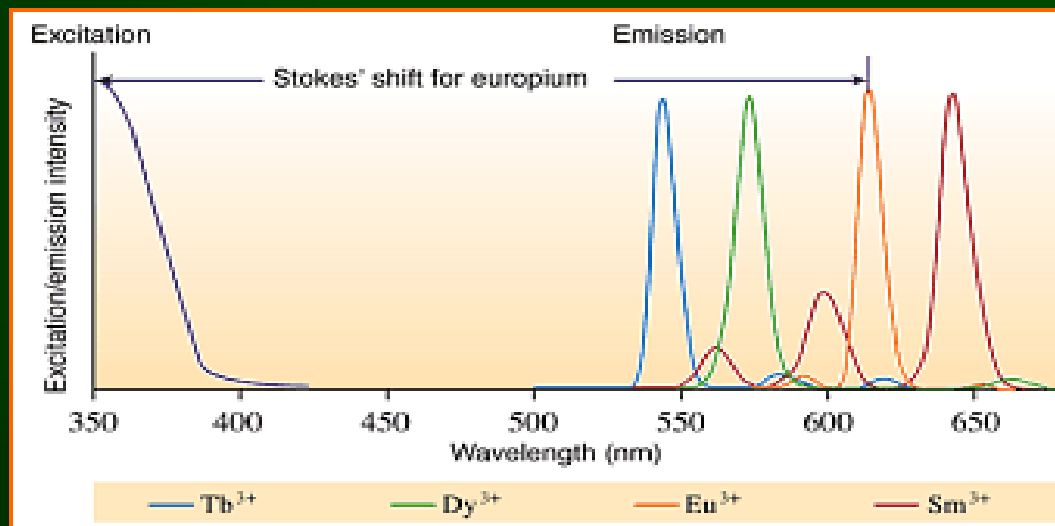
- výběr luminogenního ligandu závisí na energetických požadavcích konkrétního lanthanidu
- Kyselý „zesilovací“ roztok kromě ligandů obsahuje
 - detergent
 - pomocné reagensie
 - udržují výsledný chelát ve formě micel

DELFIA

Po proběhlé imunochemické reakci vzniká

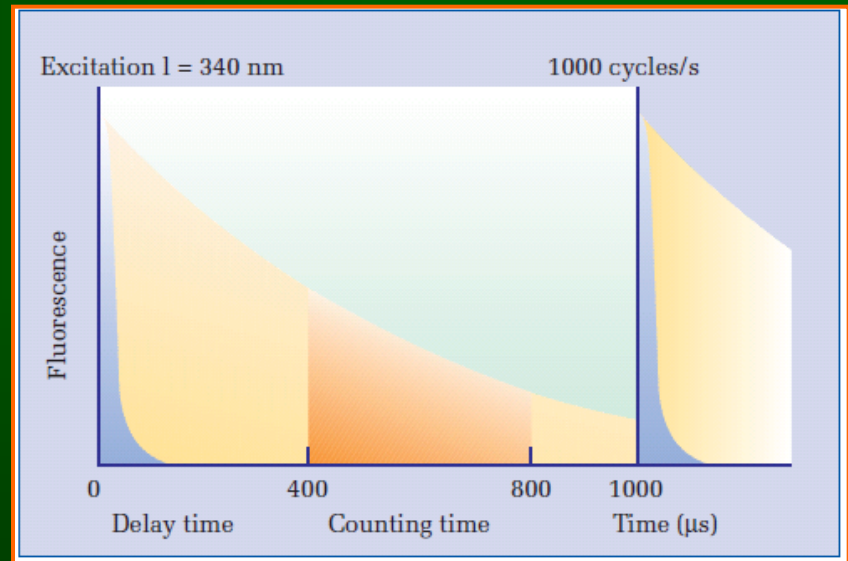
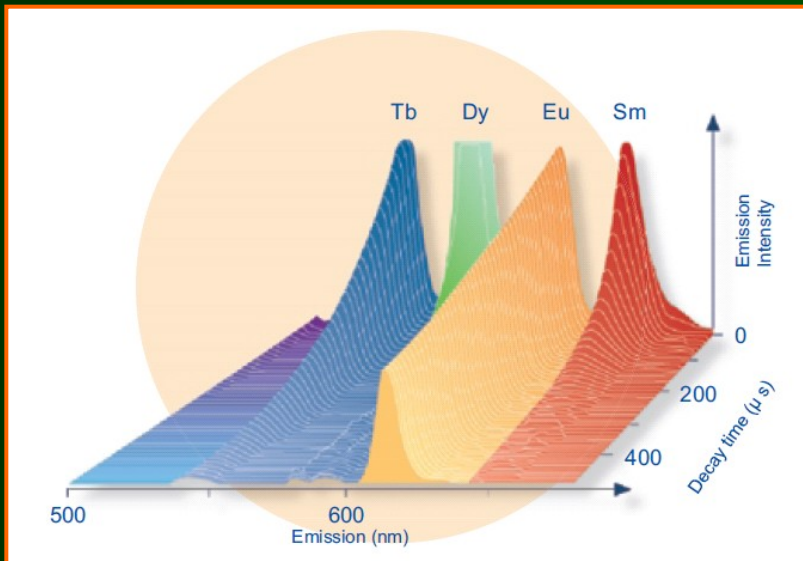
Fluoreskující chelát (s novým - luminogenním - ligandem):

- 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)

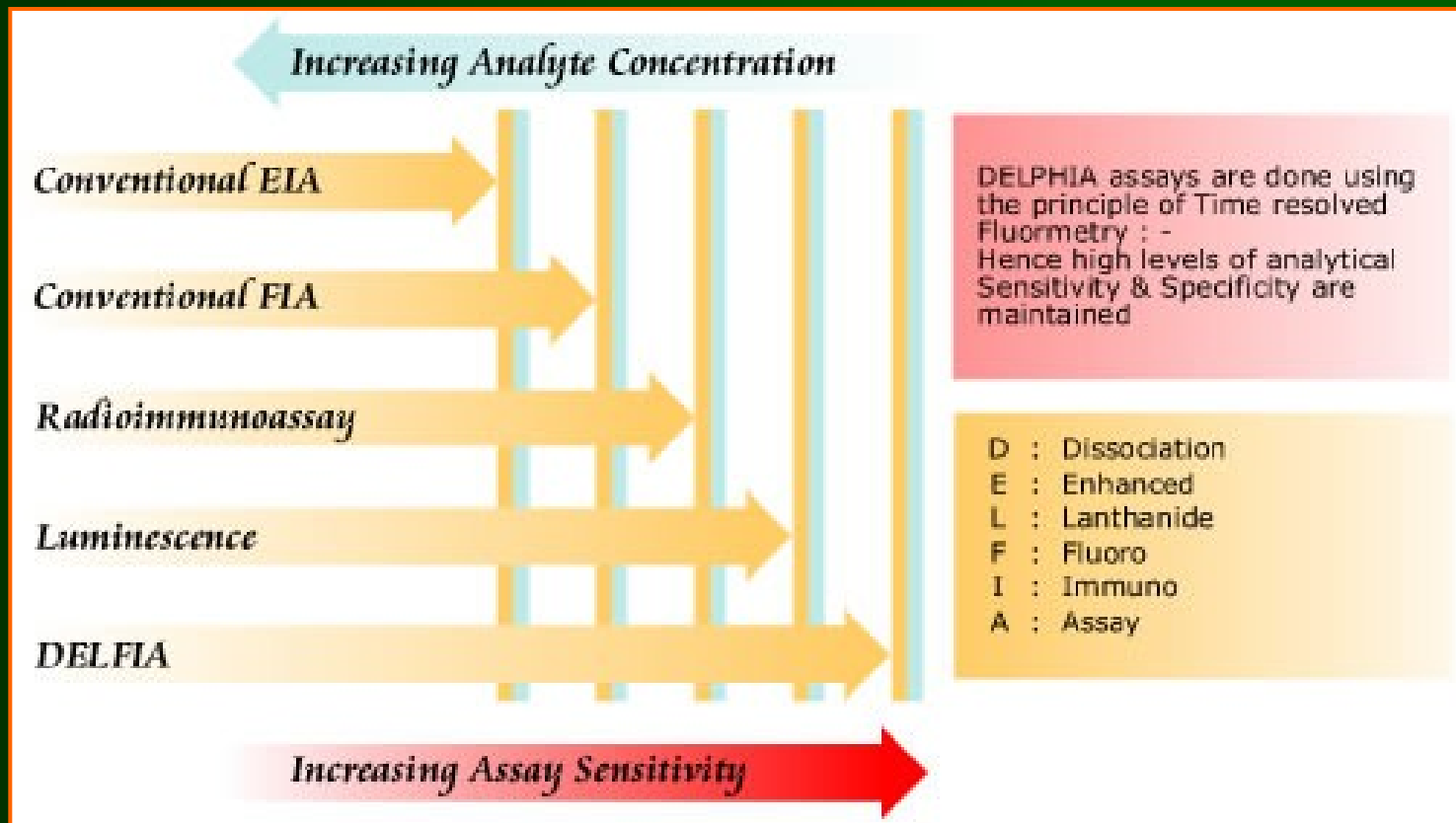
- fluorescence je **dlouhodobá**
 - doba emise delší než u běžných fluoroforů - řádově stovky mikrosekund



- 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

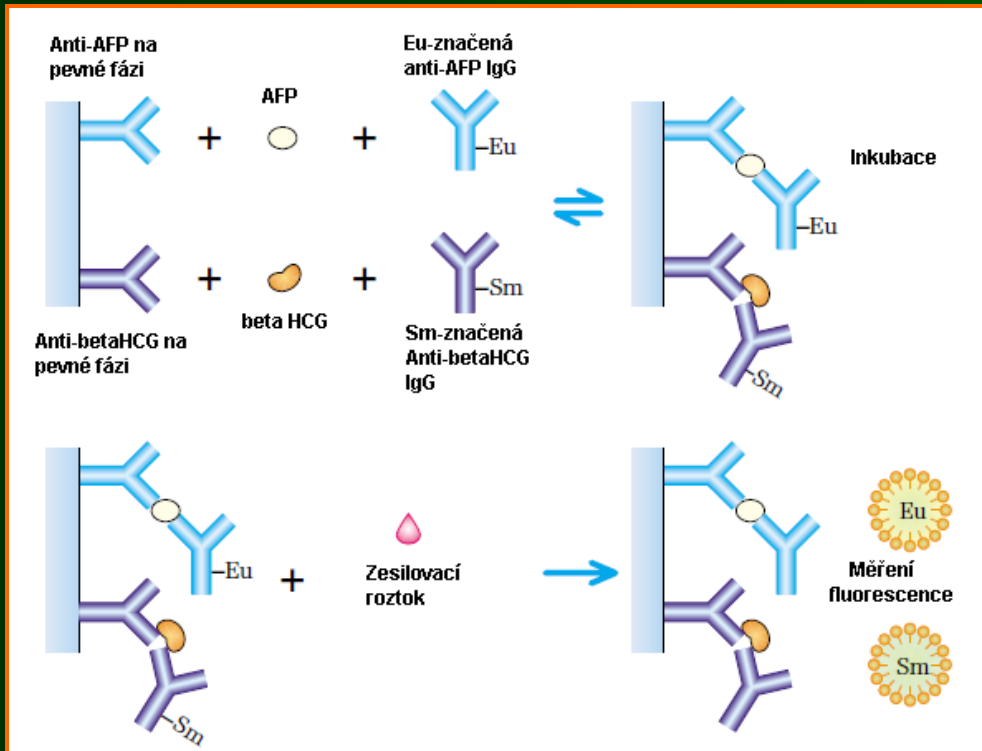
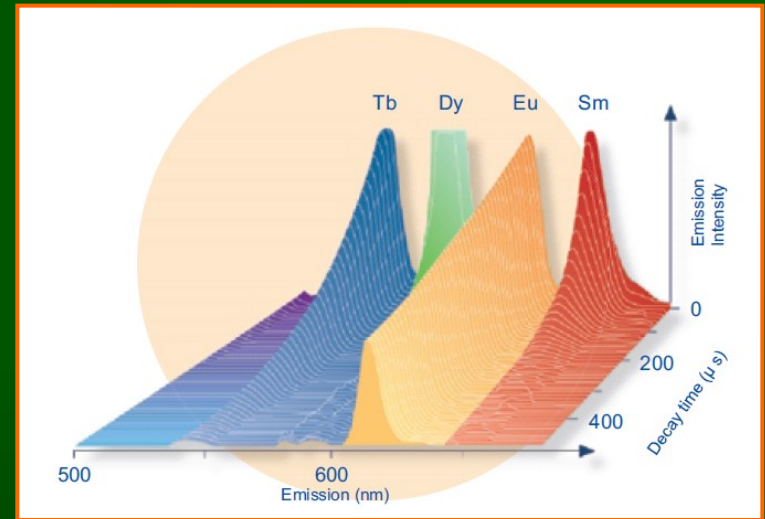
- Vysoká citlivosť a špecifita



DELFLIA - 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,...)

DELFLA umožňuje stanovení analytů i ze **suché krevní skvrny**

- Kapka kapilární krve nanesená na testovací kartičku filtračního papíru a vysušená
 - odběr z prstu
 - ušního lalůčku
 - z patičky (u novorozenců)



Využití DELFIA – novorozenecký screening

DELFIA + suchá krevní skvrna

- kapka kapilární krve z patičky novorozenců odebrána na kartičku filtračního papíru
 - ze suché krevní kapky vyražen terčík
 - extrakce analytu z terčíku
 - použití extraktu k analýze



1963 - poprvé použita suchá krevní skvrna

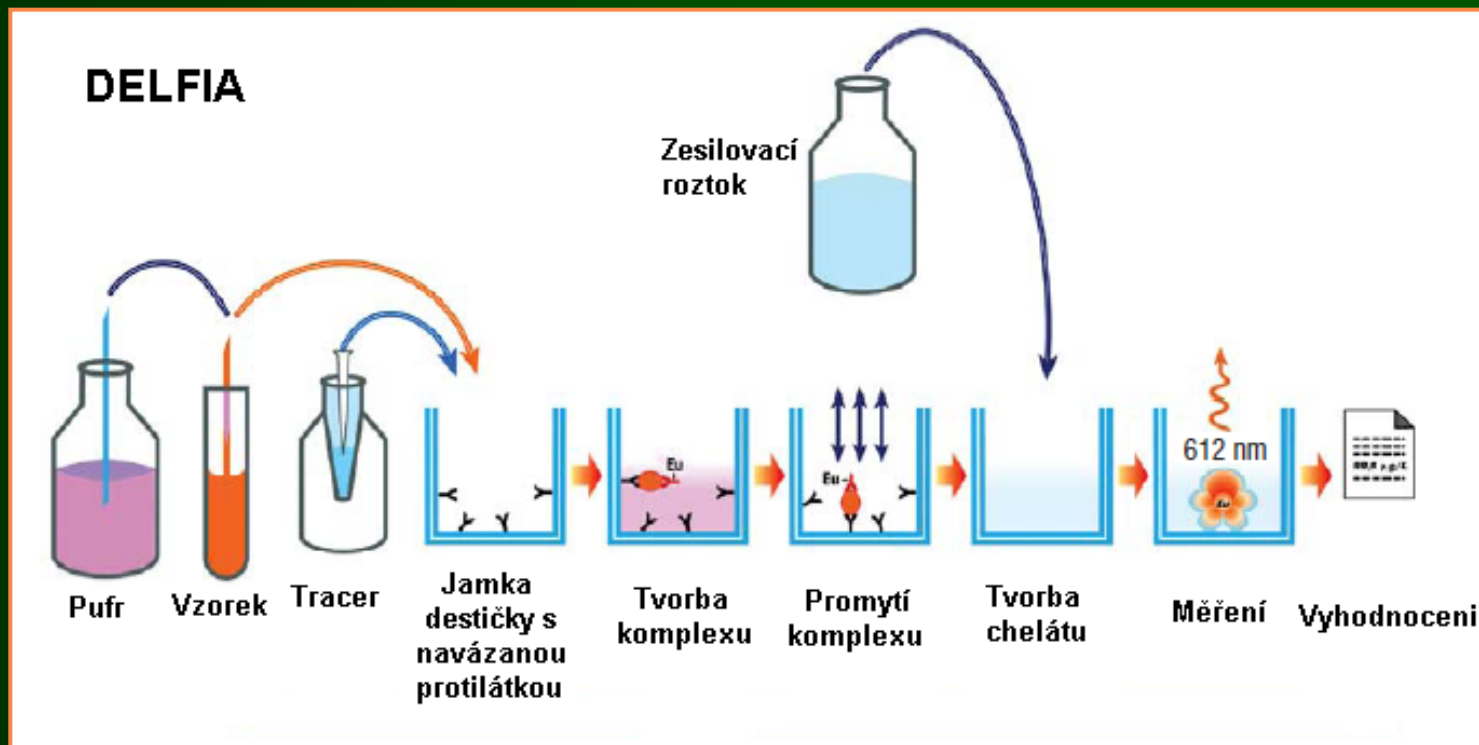
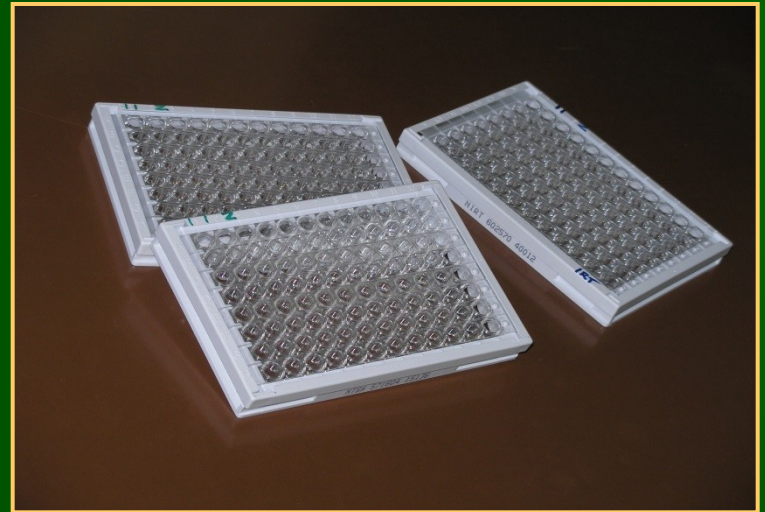
(screening metabolických poruch novorozenců) - prof. Guthrie (USA)

- **NS** - vyhledávání novorozenců se zvýšeným rizikem některých vzácných onemocnění
 - odběr krve všem novorozencům 3. den po narození
 - stanovení specifických markerů pro vyhledávané choroby - v ČR 18 (20) chorob (MS/MS, DELFIA)
- **Novorozenecký screening metodou DELFIA (v ČR 3 choroby):**
 - TSH - kongenitální hypotyreóza - vrozená snížená funkce štítné žlázy
 - 17-hydroxy-progesteron - kongenitální adrenální hyperplazie - vrozená nedostatečnost tvorby hormonů nadledvin
 - Imunoreaktivní trypsinogen IRT - cystická fibróza - vrozená porucha transportu chloridů

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



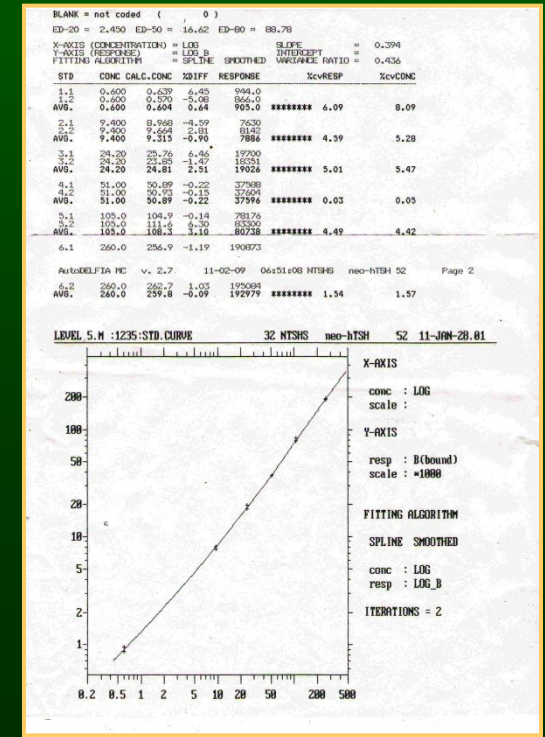
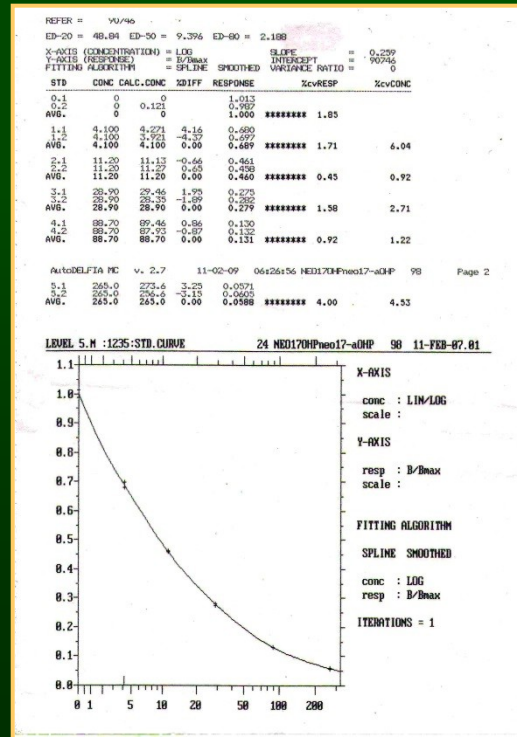
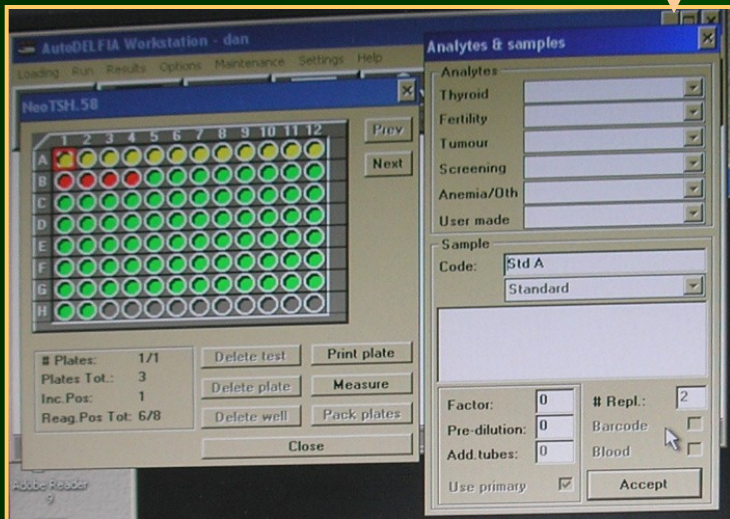
DELFA – suchá krevní skvrna



← 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 AutoDELFIA

„Manuální“ linka DELFIA



Analyzátor AutoDELFIA



- 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...



*...ale i těm,
kteří se
nudili !*

*...těm, které
problematika
zajímala...*