

**ОБРАЗЕЦ**

**ТЕХНИЧЕСКО ПРЕДЛОЖЕНИЕ**

по обществена поръчка с предмет: „Доставка на радиоактивни лекарствени продукти, радиофармацевтици, радионуклидни генератори, китове и радионуклидни прекурсори за 2018 г.“ по прекратени обособени позиции

Предложението е по обособена позиция № 8 с предмет 125 Vit B 12 + фолиева киселина

Настоящото техническо предложение е подадено от:

„Данс Фарма“ ЕООД

*/наименование на участника/*

и подписано от: Даниела . пасова

*/три имена/*

в качеството му/им на: Управител

*/длъжност/*

**Забележка:** На основание чл. 47, ал. 9 от ППЗОП, когато участник подава оферта за повече от една обособена позиция, за всяка обособена позиция се представя отделно техническо предложение, окомплектовано със съответните приложения, за която се отнасят.

Съдържание:

1. Документ за упълномощаване, когато лицето, което подава офертата, не е законният представител на участника;
2. Предложение за изпълнение на поръчката в съответствие с техническите спецификации и изискванията на възложителя

**Приложения към техническото предложение по обособени позиции от № 1 до № 3, вкл.:**

- заверено копие на валидно разрешение за употреба в страната, издадено по реда на ЗЛПХМ или Регламент (ЕО) № 726/ 2004 г. на Европейския парламент и Съвета /чл. 23, ал.1 на ЗЛПХМ/. **Важно!** Приложенията, неразделна част от конкретното разрешение за употреба не следва да бъдат представяни от участниците като заверени копия. Необходимо е участниците да посочат в предложението за изпълнение на поръчката конкретен публичен регистър, в който са публикувани всички приложения към конкретното разрешение за употреба;
- Декларация от участника в съответствие с чл. 55, ал. 6 от ЗЛПХМ, че количествата за лекарствения продукт са налични, в случай на изтичане на срока на разрешението за употреба на лекарствен продукт през 2018 г. (ако е приложимо).

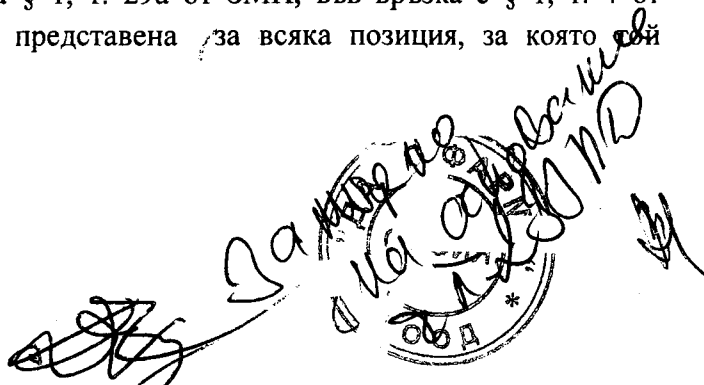
**Забележка:** На основание чл. 47, ал. 9 от ППЗОП, когато участник подава оферта за повече от една обособена позиция, за всяка обособена позиция се представят поотделно комплектувани документите по т. 2.1. с посочване на позицията, за която се отнасят.

**Приложения към техническото предложение по обособени позиции от № 4 до № 10, вкл.:**

- Декларация от участника, с приложено извлечение от Списъка по чл. 1, т. 1, буква „б“ от Наредбата за условията и реда за съставяне на списък на медицинските изделия по чл. 30а от ЗМИ и за определяне на стойността, до която те се заплащат (Наредбата), от което извлечение да е видна продажната цена по смисъла на § 1, т. 29а от ЗМИ, във връзка с § 1, т. 4 от допълнителните разпоредби на Наредбата, представена за всяка позиция, за която се кандидатства;



Даниела Христова Пасова



- Заверено копие на официален документ, издаден от ИАЛ, от който е видно, че за съответното медицинско изделие няма регистрирани данни в ИАЛ и/или EUDAMED за инциденти/потенциални инциденти през последните две години, както и блокирани или изтеглени партии от същото медицинско изделие през последните 2 години;
- Декларация, в която да бъде посочено медицинското изделие за което се участва и конкретният обществен фонд на съответната държава, по който се заплаща;
- Копие на декларация за съответствие с Директива 98/79/ЕС, издадена от производителя или упълномощен негов представител (придружено с превод на български език и заверено от участника);
- Копие на валиден сертификат по стандарт БДС EN ISO 13485 или еквивалентна система за управление на качеството, с обхват производство на медицински изделия, издаден на името на производителя.(придружено с превод на български език и заверено от участника).

3. Декларация за съгласие с клаузите на приложения проект на договор;
4. Декларация за срока на валидност на офертата.

ДАТА:02.08.2018 г.

ПОДПИС и ПЕЧАТ:



A handwritten signature or mark consisting of a few loops and a vertical stroke.

A handwritten signature or mark consisting of a large loop and a vertical stroke.

A handwritten signature or mark consisting of a few loops and a vertical stroke.

**ПРЕДЛОЖЕНИЕ ЗА ИЗПЪЛНЕНИЕ НА ПОРЪЧКАТА**  
за доставка на медицински изделия  
по обособена позиция от № 4 до № 10, вкл.

От: „Данс Фарма“ ЕООД

(наименование на участника)

**УВАЖАЕМИ ДАМИ И ГОСПОДА,**

С настоящото, Ви представяме нашето техническо предложение за изпълнение на обявената от Вас процедура за възлагане на обществена поръчка с предмет: „Доставка на радиоактивни лекарствени продукти, радиофармацевтици, радионуклидни генератори, китове и радионуклидни прекурсори за 2018 г.“ по прекратени обособени позиции

Предложението е по обособена позиция № 8 с предмет 125 Vit B 12 + фолиева киселина

1. Декларираме, че всяка отделна доставка по договора, ще се извършва ежеседмично, в рамките на утвърдената писмена заявка-разпределение от Министерството на здравеопазването според индивидуалните нужди на лечебните заведения.

2. Декларираме, че сме запознати, че Министерството на здравеопазването ще разпределя необходимите количества в до две утвърдени писмени заявки-разпределения, съобразени с разполагаемите бюджетни средства.

3. Декларираме, че до 28.02.2019 г. ще уведомим Министерството на здравеопазването, в случай, че утвърдената втора писмена заявка-разпределение няма да бъде изпълнена на 100%, поради липса на заявени нужди от лечебните заведения.

4. Гарантираме, че сме в състояние да изпълним качествено поръчката в пълно съответствие с изискванията на възложителя.

5. За изпълнение на поръчката предлагаме:

МЕДИЦИНСКИ ИЗДЕЛИЯ				
Изисквания на възложителя				Предложение на участника
№	Наименование, единична активност	Мярка	Количество ДО	Описание на предлаганото медицинско изделие, в което задължително се посочва Производител, наименование на изделието, каталожен номер, опаковка, брой проби и др. индивидуализираща информация
V	Радиофармацевтици за диагностика in vitro			
8	125 Vit B 12 + фолиева киселина	Оп x 1 бр.	12	125 Vit B 12 + фолиева киселина Производител: MP Biomedicals, LLC Кат. Номер: 06B257117 Брой проби: 12 теста

7. Декларираме, че сме запознати, че медицинските изделия (радиофармацевтици за диагностика in vitro) следва да имат минимален срок на годност не по-кратък от 80 % от обявения от производителя, към датата на всяка доставка, предоставена на крайните получатели /съответните лечебни заведения/.

8. Декларираме, че в случай на доставка на медицински изделия (радиофармацевтици за диагностика in vitro) с по-кратък от договорения срок на годност дължим неустойка, както следва:

- от 79,99% до 70% - 20% върху стойността на доставката;
- от 69,99% до 60% - 30% върху стойността на доставката;
- от 59,99% до 50% - 60% върху стойността на доставката;
- от 49,99% до 40% - 75% върху стойността на доставката;
- под 40% - 90% върху стойността на доставката.

9. Декларираме, че доставката на медицинско изделие с остатъчен срок на годност по-малък от 40 (четиридесет) на сто от обявения от производителя ще се извършва само с писмено съгласие на възложителя за конкретно количество, определено от него. Без изрично писмено съгласие на възложителя стоките няма да бъдат заплащани.

ДАТА: 02.08.2018 г.

ИМЕ, ПОДПИС и ПЕЧАТ:

Даниела Спасова- Управител

Даниела Спасова  
Управител  
БД  
ЕООД

## ДЕКЛАРАЦИЯ

От

Управителя и собственик на “ Данс Фарма “ ЕООД

Даниел

асова, Г

06.08.2018

от МВ

Аз, Даниела Анкова Спасова, в качеството ми на Управител и собственик на “Данс Фарма” ЕООД, декларирам че всички предлагани продукти в обществена поръчка с предмет: „Доставка на радиоактивни лекарствени продукти, радиофармацевтици, радионуклидни генератори, китове и радионуклидни прекурсори за 2018 г.“, по прекратени обособени позиции са регистрирани съгласно Наредбата за условията и реда за съставяне на списъка на медицинските изделия по чл. 30 а от ЗМИ и за определяне на стойността, до която те се заплащат.

Към тази декларация прилагаме извлечение на регистриран продукт на производителя MP Biomedicals, LLC, с който участваме в обществената поръчка за обособена позиция № 8

02.08.2018 г.

Декларатор: Даниела Анкова Спасова

(подписи)

### DANS PHARMA

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ  
Изпълнителна агенция по  
лекарствата

ЕЛЕКТРОННА БАЗА ДАННИ НА МЕДИЦИНСКИТЕ ИЗДЕЛИЯ,  
ЗАПЛАЩАНИ С ОБЩЕСТВЕНИ СРЕДСТВА



КОНТАКТИ
 ПРОФИЛ НА ЗАЯВИТЕЛ
 ИЗХОД
 УКАЗАНИЯ ЗА РАБОТА

НАЧАЛО

МЕДИЦИНСКИ ИЗДЕЛИЯ

ШАБЛОНИ И ДОКУМЕНТИ

НОРМАТИВНА УРЕДБА

НОВИНИ И СЪОБЩЕНИЯ

Търсене в сайта...

Търси в медицински изделия

Търси в сайта

## ПРОФИЛ

МП Биомедикълс, ЛЛЦ

Профил на заявител

Медицински изделия

Данни за мед. изделия

Заявления за регистрация

Профили

Промяна на парола

Начало / Данни за мед. изделия / Данни за мед. изделие

## ДАННИ ЗА МЕД. ИЗДЕЛИЕ

## ДАННИ ЗА ЗАПИСА / INFORMATION FOR THE RECORD

Номер на формуляр / Number	Дата на създаване / Creation date
41442	13/12/2014 08:40
Номер на заявител / Requestor number	Потребителско име / Username
1293	user_T3D9E8
Одобрено от / Approved from	
Kalinka Dimitrova	

## ДАННИ ЗА МЕД. ИЗДЕЛИЕ / DATA FOR MED. DEVICE

Тип заявление / Application type	PDF файл / PDF file
Първо предоставяне на информация / First application	Заявление
Тип идентификатор / Identity type	Идентификатор / Identity
Код на изделие в списъка / Medical device code	
06DV3134935526	

## ДАННИ ЗА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ / IDENTIFICATION OF THE MANUFACTURER

Име на производителя, пълно / Manufacturer name, long	
МП Биомедикълс, ЛЛЦ / MP Biomedicals, LLC	
Име на производителя, кратко / Name of the manufacturer, short	
МП Биомедикълс / MP Biomedicals	
Вид код / Code type	Код / Code
Друго / Other	00000
Вид на документ / Document type	
00000 / 00000	
Код на страната / Country code	
US	
Град / City	Пощенски код / Postal code
Солон / Solon	
Улица, номер / Street, number	Пощенска кутия / PO box
Лице за контакт / Contact person	Телефон / Phone
Милорад Вученович / Milorad Vucenovic	381 11 2648 458
Факс / Fax	E-mail / E-mail
	mvucenovic@mpbio.com

ДАННИ ЗА ЛИЦЕТО, КОЕТО ПУСКА ИЗДЕЛИЕТО НА ПАЗАРА / IDENTIFICATION OF THE PERSON  
PRODUCT ON THE MARKET

Име на лицето, което пуска изделието на пазара / Name of the person placing the product on the market

"Данс Фарма" ЕООД / Dans Pharma Ltd

Вид код / Code type

Код / Code

EИК / EIC

130868975

Код на страната / Country code

BG

Код на област / Region code

Община / Municipality

SOF

Столична / Stolicna

Град / City

Пощенски код / Postal code

София / Sofia

Улица, номер / Street, number

Пощенска кутия / PO box

Лице за контакт / Contact person

Телефон / Phone

Ели Чубриева / Ely Tchoubrieva

02 9367079

Факс / Fax

E-mail / E-mail

nic@danspharma.com

## ДАННИ ЗА ТЪРГОВЕЦА НА ЕДРО / IDENTIFICATION OF THE WHOLESALER

Име на търговеца / Wholesaler name

"Данс Фарма" ЕООД / Dans Pharma Ltd

Вид код / Code type

Код / Code

EИК / EIC

130868975

Код на страната / Country code

BG

Код на област / Region code

Община / Municipality

SOF

Столична / Stolicna

Град / City

Пощенски код / Postal code

София / Sofia

Улица, номер / Street, number

Пощенска кутия / PO box

Лице за контакт / Contact person

Телефон / Phone

Ели Чубриева / Ely Tchoubrieva

02 9367079

Факс / Fax

E-mail / E-mail

nic@danspharma.com

Номер на разрешение за търговия на едро с медицински изделия / Number of authorization/certificate for wholesale trade with medical devices

IV-P-T/MI-764

Дата на разрешение за търговия на едро с медицински изделия / Date of authorization/certificate for wholesale trade with medical devices

23/11/2011

## ОБЩИ МЕДИЦИНСКИ ДАННИ ЗА ИЗДЕЛИЕТО / GENERAL MEDICAL INFORMATION ABOUT THE DEVICE

Категория на медицинското изделие / Category of the medical device

06 - Ин витро диагностични изделия / In vitro diagnostic devices

Риск класификатор / Risk classification

Изделия от други групи (IVD others) / IVD others

Анатомична група / Anatomical group

Разни / Various

Тип код / Code type

Стойност на код / Code value

GMDN

31349

Генерична група / Generic group

Модел / Model

/

/

Име / Name

Алтернативно име / Alternative name

SimulTRAC B12/ Folate RRA / SimulTRAC B12/ Folate RRA

Витамин B12/ фолиева киселина / Vitamin B12/ Folate

ВЯРНО С  
ОРИГИНАЛА

## ОПИСАНИЕ НА МЕДИЦИНСКОТО ИЗДЕЛИЕ / DESCRIPTION OF THE MEDICAL DEVICE

Състав / Ingredient	Вид на материала / Material type
набор /	
Брой изделия в една опаковка / Number in one package	Големина / Volume
1	100 теста/ опаковка / 100 tests/ pack
Размер / Size	Тегло / Weight
/	/
Специфични означения / Specific indications	
125I, 57Co / 125I, 57Co	
Характеристики / Characteristics	
Стерилност / Sterility	
Измерващ / Measuring	
Лекарствено вещество / Drug substance	
Материал от животински произход / Material of animal origin	
Домашно предписание / Domestic prescription	
Болнично предписание / Hospital prescription	

## ПРЕДНАЗНАЧЕНО ДЕЙСТВИЕ, ОПРЕДЕЛЕНО ОТ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ / INTENDED ACTION BY THE MANUFACTURER

Предназначение / Purpose	Условия на съхранение / Storage conditions
Кит за едновременно количествено определяне на витамин В12 и фолиева киселина в серум и глазма чрез радиомунализ. /	2-8C /
Употреба / Usage	Други / Others
Еднократна употреба / Single use	/
Каталожен номер / Number in catalog	
06B257117	

## ПРИНАДЛЕЖНОСТИ, КОНСУМАТИВИ / ACCESSORIES, CONSUMABLES

Принадлежности, консумативи / Accessories, consumables

## ОБЩИ ТЪРГОВСКИ ДАННИ / GENERAL TRADE INFORMATION

Номер на регистрация в ИАЛ или уведомление до ИАЛ / BDA registration number	Дата на регистрация в ИАЛ или уведомление до ИАЛ / BDA registration date
Дата на пускане на пазара в Република България / Release date for the market in Republic Bulgaria	Дата на прекратяване на разрешение/удостоверение за търговия с медицински изделия / Date of termination of the permit / certificate of trade in medical devices
Продажна цена с ДДС (BGN) / Selling price with VAT (BGN)	Продажна цена с ДДС (EUR) / Selling price with VAT (EUR)
1177.44	600.73
Номер на CE сертификат / CE certificate number	Дата на изтичане на CE сертификат / CE certificate expiration date

ВЯРНО С  
ОРИГИНАЛА

Всички права запазени © 2018 ИЗПЪЛНИТЕЛНА АГЕНЦИЯ ПО ЛЕКАРСТВАТА

BG051PO001-6.2.14 "Създаване на електронна база данни на медицински изделия, заплащани с обществени средства"  
Проектът се осъществява с финансовата подкрепа на Оперативна Програма "Развитие на човешки ресурси", съфинансирана от  
Европейския социален фонд на Европейския съюз

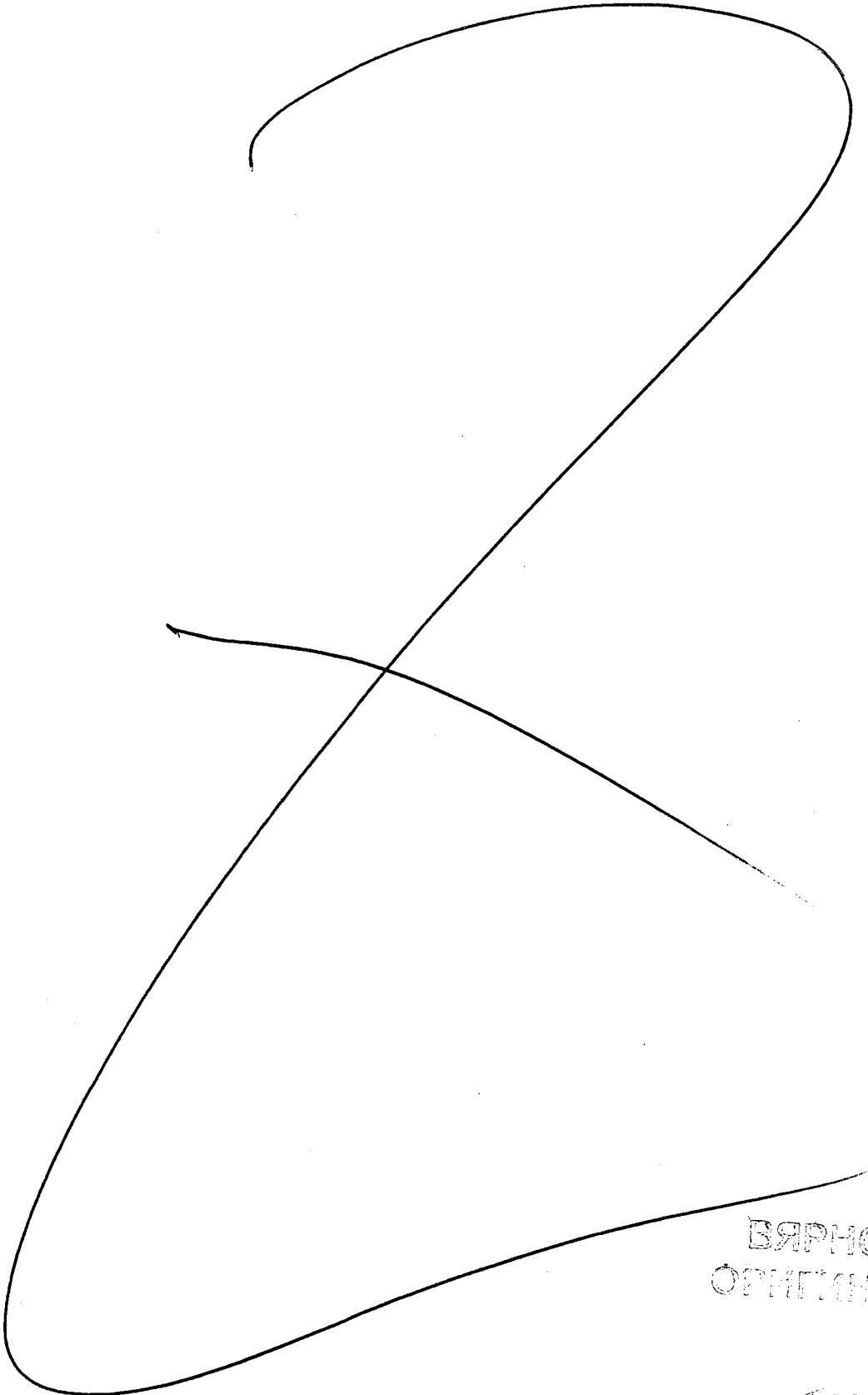
ЕСФ

ЕВРОПЕЙСКИ СОЦИАЛЕН ФОНД



ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ





ВЯРНО С  
ОРИГИНАЛА

A small, stylized handwritten signature in black ink.

An official circular stamp with illegible text around the perimeter. Overlaid on the stamp is handwritten text in Cyrillic: "Законно" (Legal), "Ма. 06.2017" (May 06, 2017), and "РА-2017-110".

A small handwritten mark or signature consisting of a circle with a horizontal line extending to the right.

A small handwritten mark consisting of a vertical line with a horizontal tick at the top.

A small handwritten mark consisting of a circle with a vertical line extending downwards.



РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ  
Изпълнителна агенция по лекарствата  
REPUBLIC OF BULGARIA  
Bulgarian Drug Agency



MAR-252261

14-06-2019

ДО  
Д-Р ДАНИЕЛА СПАСОВА  
УПРАВИТЕЛ НА  
„ДАНС ФАРМА“ ЕООД  
УЛ. „ИНДУСТРИАЛНА“ № 11  
ВАСИЛЕВ БИЗНЕС СГРАДА, ЕТ. 7  
1202 ГР. СОФИЯ

ОТНОСНО: искане с вх. № ИАЛ-23700/05.06.2018 г. за предоставяне на информация за регистрирани данни в Изпълнителната агенция по лекарства (ИАЛ) и EUDAMED за инциденти/потенциални инциденти с медицински изделия

**УВАЖАЕМА Д-Р СПАСОВА,**

В отговор на Ваше искане с горепосочения номер Ви уведомявам следното:

При направена справка към дата 06.06.2018 г. се установи, че през последните две години в ИАЛ и в EUDAMED няма регистрирани данни за инциденти/потенциални инциденти, както и за блокирани или изтеглени партиди за следните медицински изделия с търговски имена и производители:

Наименование на медицинско изделие	Производител	Кат. номер
FT3 KIT	Demeditec Diagnostics GmbH, Germany	DE06100
FT4 KIT	Demeditec Diagnostics GmbH, Germany	DE07100
TSH ( 96-100 проби) KIT IRMA	Demeditec Diagnostics GmbH, Germany	DE15100
beta 2 microglobulin	Demeditec Diagnostics GmbH, Germany	IT1113
Vit B 12 + фолиева киселина	MP Biomedicals, LLC, Diagnostics Division, United States	06B257117
anti TG antibody	Demeditec Diagnostics GmbH, Germany	DE47100
Ferritin KIT	Demeditec Diagnostics GmbH, Germany	DE34100

С уважение,

ДОЦ. АСЕНА СТОИМЕНОВА, ДФ  
Изпълнителен директор



Даниела Спасова  
14-06-2019

София 1303, ул. Дамян Груев № 8, тел.: (02) 8903 555, факс: (02) 8903434  
8, Damyan Gruev Str., 1303, Sofia, Bulgaria, tel: + 359 2 8903555, fax: + 359 2 8903434,  
e-mail: [bda@bda.bg](mailto:bda@bda.bg)

ВЯРНО С  
ОРИГИНАЛА

## ДЕКЛАРАЦИЯ

От

Управителя и собственик на “ДАНС ФАРМА” ЕООД

Даниел Анкова, - № 1

издадена на

*Заменило  
основане  
2.8.2018*

Аз, Даниела Анкова Спасова, в качеството ми на Управител и собственик на “Данс Фарма” ЕООД, декларирам че предлаганите медицински изделия се заплащат от следният обществен фонд в Германия: Kassenärztliche Bundesvereinigung.

02.08.2018 г.

Декларатор: Даниела Анкова

/ подпис и печат

*Заменило  
основане  
2.8.2018*



Превод от английски език

Бланка на МП /MP/

## ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА СЪОТВЕТВИЕ

Ние,

МП Биомедикълс Германия ГмбХ  
Тюрингер Страсе 15 (Thuringer Straße 15)  
Д-37269 Есвеге (Eschwege)  
Германия

Декларираме, че медицинските изделия

Наименование: Приложение I

са в съответствие с изискванията на Директива 98/79/ЕС, които се отнасят до тях.

Процедура за оценка на качеството: Декларация за съответствие на 98/79/ЕС,  
Приложение III


Есвеге (Eschwege), 07.01.2021 г.

/подпис – не се чете/

Ступас Димитриос (Stoupas Dimitrios)  
Мениджър продажби Германия/ Поддръжка & приложение EMEA

### Приложение I

Продукт	Кат. № (теста/опак.)	Регистрационен №
SimulTRAC-SNB Vitamin B12 / Folate RIA kit	06B 257117 06B 264806	DE/CA30/HE-0030-10148-000

Подписаният Пламен Константинов Грънчаров удостоверявам вярността на изваг  мен  
превод от английски на български език на приложения документ. Преводът е на  
страница.

Преводач:

Пламен Константинов Грънчаров

ВЪРНО С  
ОРИГИНАЛ



**Konformitätserklärung / Declaration de Conformite /  
Declaration of Conformity / Dichiarazione di Conformità**

Wir / Nous / We / Noi

Name und Adresse der Firma:

**MP Biomedicals Germany GmbH**

Nome + adresse de l'entreprise:

**Thüringer Straße 15**

Name + address of manufacturer:

**D-37269 Eschwege**

Nome + indirizzo della ditta:

**Germany**

erklären, dass das Medizinprodukt  
déclarons que le dispositif médical  
declare that the medical device  
dichiariamo che il dispositivo medico

Name / nom / name / nome:

⇒ **ANNEX I**

Type / type ou modèle /type or model / tipo o modello:

Los- oder Serien-Nr. / no. de lot d'échantillons ou de  
serie / lot or serial number / no. di lot o serie:

allen Anforderungen der Richtlinie 98/79/EG entspricht.  
remplit toutes les exigences de la 98/79EG qui le concernait.  
meets all the provisions of the Directive 98/79EEC which apply to him.  
adempi tutte le esigenze della Direttiva 98/79EG che lo riguardano.

Konformitätsbewertungsverfahren:

**EG-Konformitätserklärung 98/79/EG, Anhang III**

Procédure d'évaluation de la conformité:

Conformity assessment procedure:

Procedimento d'evaluazione della conformità:

Weissbart

Eschwege, 07.01.2021

Daniel Weissbart, Phd  
Product Specialist

Handwritten signature and circular stamp with Cyrillic text: "ДАМС" and "ВЕРНО С ОРИГИНАЛА".

Handwritten signature.

Stamp: ВЕРНО С ОРИГИНАЛА

Handwritten signature.

Handwritten signature.

Handwritten signature.



# ANNEX I

Product	Cat. no.	Registration no.
SimulTRAC® B <sub>12</sub> /Folate - SNB <sup>57</sup> Co/ <sup>125</sup> I RRA kit	06B-257117 – 06B-264806	DE/CA30 / HE - 0030 – 10148 - 000

*Handwritten signature*  
Circular stamp with illegible text  
BAPHO C  
OPHTHALMO

*Handwritten signature*

*Handwritten signature*

*Handwritten signature*

Превод от английски език

/ бланка на TUV Rheinland /

TBS ТРАДИКС ООД · учредено през 1996 г.  
TBS TRADIX LTD · established in 1996

ISO 9001:2008 & EN 15038:2006

## Сертификат

Сертифициращото тяло на  
TUV Rheinland Product Safety GmbH

с настоящето сертифицират, че организацията

MP Biomedicals, LLC  
Diagnostic Division  
29525 Fountain Parkway  
Solon OH 44139  
САЩ

има установена и прилага система за контрол на качеството за медицински изделия  
за следната област:

**Проектиране и разработване, производство и дистрибутиране на ин витро  
диагностични тест китове за ендокринен и неонатален анализ**  
(виж прикачения файл за допълнително включени места)

Дадено е доказателство, че изискванията на

**EN ISO 13485:2003 + AC:2007**

са изпълнени. Системата за контрол на качеството е обект на годишно наблюдение.

Регистрационен № на сертификата: SX 60025892 0001

№ на извършения одит: 30991115 001

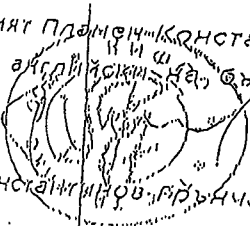
Този сертификат е валиден до: 30.09.2019

Лого на ZLC

Сертифициращо тяло  
Печат на TUV Rheinland / не се чете /  
Подпис / не се чете /  
Др. Х. Лудеман (Dr. H. Ludeman)

Дата 01.10.2016  
Кьолн

Подписаният Пламен Константинов Грънчаров удостоверявам вярността на извършения от мен  
превод от английски език на български език на приложения документ. Преводът се състои от:  
страница.  
Преводач:  
Пламен Константинов Грънчаров



*Handwritten signature of the translator: Пламен Константинов Грънчаров*

*Handwritten signature*

*Handwritten signature*



Product Service

# CERTIFICATE

No. Q1N 14 07 68207 025

**Holder of Certificate:** **MP Biomedicals Asia Pacific Pte Ltd**  
 2 Pioneer Place  
 Singapore 627885  
 SINGAPORE

**Facility(ies):** MP Biomedicals Asia Pacific Pte Ltd  
 2 Pioneer Place, Singapore 627885, SINGAPORE

**Certification Mark:**



*Handwritten signatures and stamps:*  
 J. Wirth  
 Director  
 TUV SUD

**Scope of Certificate:** **Design, Production, Storage and Distribution of In-vitro Diagnostics for the detection of infectious diseases and pregnancy; Distribution of Western Blot and ELISA Instruments; Production and Purification of Antigen and Protein**

**Applied Standard(s):**

EN ISO 13485:2012 + AC:2012  
 Medical devices - Quality management systems - Requirements for regulatory purposes (ISO 13485:2003 + Cor. 1:2009)  
 DIN EN ISO 13485:2012

The Certification Body of TÜV SÜD Product Service GmbH certifies that the company mentioned above has established and is maintaining a quality management system, which meets the requirements of the listed standard(s). See also notes overleaf.

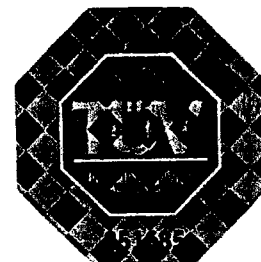
**Report No.:** 8017068/RA/2014

**Valid from:** 2016-10-01  
**Valid until:** 2019-09-30

*Handwritten signature*

*Handwritten signature: H.-H. Junker*

Hans-Heiner Junker



*Handwritten signature*

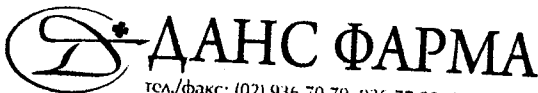
**Date,** 2016-10-01

Page 1 of 1

DAKKS Deutsche Akkreditierungsstelle D-ZM-11321-01-00



Поз. 8



тел./факс: (02) 936 70 79, 936 77 92, 936 67 51; 0886 60 10 77  
e-mail: info@danspharma.com; www.danspharma.com



1202 София, VASSILEV Business City  
ул. „Индустиална“ 11, ет. 7

ISO 9001

### Инструкция за употреба SimulTRAC-SNB

Комплект за радиоактивност Витамин В12 [57Co] / Фолат [125I]

Информация за поддръжка и техническа информация могат да бъдат получени в местните офиси на MP Biomedicals.  
SimulTRAC-SNB КИТ ВИТАМИН В12 [57Co] / FOLATE [125I]  
За едновременно количествено определяне на витамин В12 и фолиева киселина в серум и плазма.

#### I. РЕЗЮМЕ И ОБЯСНЕНИЕ НА ТЕСТА:

Витамин В12 и недостигът на фолати са две от трите хранителни вещества, липсата на които води до анемии при човека, третото е липсата на желязо. Дефицитът на фолиева киселина (фолиева киселина) се среща при около една трета от всички бременни жени, голямата част от алкохолиците, повечето от хората, които правят диета без сурови плодове и зеленчуци или пресни плодови сокове, много хора със структурни или функционални щети в горната трета на тънкото черво и в редица други ситуации. Измерването на фолатните нива представлява пряко и надеждно средство за определяне наличието на фолатна недостатъчност и този тест трябва да се извърши за всеки пациент който има мегалобластна анемия, както и всеки пациент, който има анемия, хиперсегментиране на гранулоцитните ядра и съвпадащи доказателства за желязото deficiency. Витамин В12 е от съществено значение за нормалния метаболизъм на фолиевата киселина. Препоръчително е да се определи серумния витамин В12 и фолиевата киселина на червените кръвни клетки в допълнение към серумния фолат, за да се установи, че диагнозата е дефицит на фолиева киселина, за която правилното лечение е фолиевата киселина. Ниски нива на фолат може също да означават, че пациентът има първичен дефицит на витамин В12, блокирайки способността на клетките да приемат фолат, в който случай подходящата терапия би била витамин В12, а не фолиева киселина. Дефицитът на витамин В12 най-често се свързва с канцерогенна анемия, стомашно увреждане, чревни увреждания и вегетарианство. Единствените значими хранителни продукти източници на витамин В12 са от животински произход; следователно, чисто вегетарианска диета ще доведе в крайна сметка до дефицит на витамин В12. Морфологичните промени на кръвните клетки, свързани с дефицит на витамин В12, са дефицит на фолиева киселина и определянето на серумното ниво на кобаламин. Необходимо е да се определи дали мегалопластозата се дължи на дефицит на В12 или фолат или и двата 2,4,6-8.

#### II. ПРИНЦИП НА ТЕСТА:

При компетитивно свързване на протеините, свързващото вещество трябва да има еднакъв афинитет към стандарта и веществото, което се намира в пробата на пациента. Набелязаният витамин В12 или фолат се конкурира със своите етикетирани видове за ограничен брой налични за свързвания места на своето специфично свързващо вещество, като по този начин се намалява количеството на белязания витамин В12 или фолат. Следователно нивото на радиоактивност е обратно свързано с концентрация в пробата или стандарта на пациента. В комплекта MP Biomedicals SimulTRAC-SNB, нивата на витамин В12 и фолат се определят едновременно в една тръба. Витамин В12 и фолиевите маркери, свързващите вещества и стандартите се доставят в

ВЪРХО С  
СЕРТИФИКАТ

комбинирана форма. Формата на птероилглутамовата киселина от фолат (PGA) се използва като стандартен и проследяващ агент в инкубационна смес при рН 9.5.

При това рН на свързване, както в 5-метилтетраhydroфолиевата киселина (МТФА) в пробата на пациента, така и PGA в стандартите имат еднакъв афинитет към свързващото вещество за мляко. Двата маркера, [57Co] за витамин В12 и [125I] за фолат, произвеждат енергия на нива, които могат лесно да бъдат разделени от много търговски двуканални броячи. Комплектът MP Biomedicals SimulTRAC-SNB използва пречистен вътрешен фактор. R протеинът, който има висок афинитет към кобаламин (витамин В12) има 2 аналози в човешката плазма, които могат да бъдат физически разделени чрез афинитетна хроматография. При отстраняване на R протеин само пречистен присъщ фактор е налице за свързване; тъй като е специфично за кобаламин, а "истинската" стойност на кобаламина се измерва 9,10. И пречистен присъщ фактор, и фолиево свързващо вещество са ковалентно свързани с твърда подложка. В тази процедура MP Biomedicals, ендогенните серумни свързващи вещества както за витамин В12, така и за витамин В12 фолат се разрушават след инкубиране с дитиотреитол в продължение на 15 минути чрез 10-минутна реакция на екстракция при алкално рН (12-13). Това премахва необходимостта от нагряване на пробата при 100 ° С. За да потвърдите недостига на фолиева киселина, този комплект може също да се използва за измерване на фолиева киселина от червени клетки.

### III. РЕАКТИВИ:

За in vitro диагностична употреба

A. SimulTRAC-SNB разтвор на дитиотреитол, DTT каталожен @ 06B229253.

Съдържа дитиотреитол във фосфатен буфер със стабилизатор. > 10 mL / флакон. един флакон/ комплект 100 тръби, 2 флакона / комплект 200 тръби. Съхранение: Охладете при 2-8 ° С; да се пази плътно затворен. Стабилност: Следете датата на изтичане на срока на годност на флакона.

Б. SimulTRAC-SNB витамин В12 / фолат тракер, 125I TRACER

Каталожен @ 06B257133. Бутилката съдържа <1,5 µCi (55,5 kBq) [57Co] Витамин В12 и <3 µCi (111 kBq) [125I] фолат в боратен буфер с човешки серумен албумин \*, декстран, калиев цианид, ендогенно свързващо вещество, багрило и консервант. Обем:> 10 mL / бутилка. Един комплект бутилки / 100 тръби, 2 бутилки / комплект 200 тръби. Съхранение: Охладете при 2-8 ° С; предпазвайте от силна светлина.

Стабилност: Отнесете се към датата на изтичане на срока на годност на бутилката.

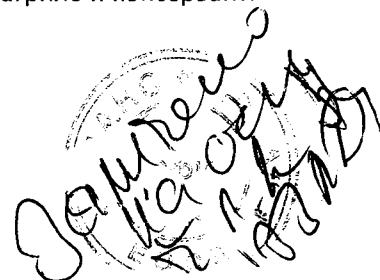
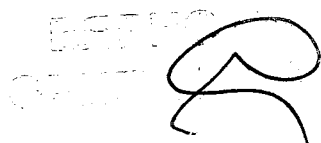
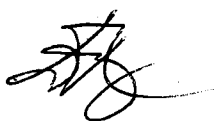
Работен разтвор на Tracer / DTT, Подготовка: Добавете съдържанието на един флакон от разтвор на дитиотреитол към една бутилка витамин В12

С. SimulTRAC-SNB Binder, BINDER Каталожен No. 06B257150. Съдържа пречистени фолиева киселина свързващо вещество от говеждо мляко и пречистен вътрешен фактор на свинете, свързан с твърда подложка в боратен буфер с натриев хлорид, боя и консервант. > 100 mL / бутилка. Един комплект бутилки / 100 тръби, 2 бутилки / комплект 200 тръби. Да се миксира енергично преди употреба.

Съхранение: Охладете при 2-8 ° С. Стабилност: вижте дата на изтичане на срока на годност върху бутилката.

D. SimulTRAC-SNB празен реагент, REAG BLANK Каталожен No. 06B254975,

съдържа твърда подложка без свързващо вещество, формулирана на същата твърда фаза концентрация като свързващо вещество, в боратен буфер с натриев хлорид, багрило и консервант.





тел./факс: (02) 936 70 79, 936 77 92, 936 67 51; 0886 60 10 77  
e-mail: info@danspharma.com; www.danspharma.com



1202 София, VASSILEV Business City  
ул. „Индустиална“ 11, ет. 7

ISO 9001

Обем: > 8 mL / бутилка. Един комплект бутилки / 100 тръби, или два комплекта бутилки / комплект 200 тръби. Съхранение: Охладете при 2-8 ° C. Стабилност: вижте дата на изтичане на срока на годност върху бутилката.

E. SimulTRAC-SNB Витамин B12 / Фолатни Стандарти A-F, STD 1-6 Витамин B12 (цианокобаламин) и фолиева киселина (PGA) в боратен буфер с човешки серум албумин \*, натриев хлорид, стабилизатор и консерванти. Един флакон всеки стандарт / комплект. Съхранение: Охладете при 2-8 ° C; предпазвайте от силна светлина.  
Стабилност: Обърнете се към датите на изтичане на срока на годност на флаконите.

F. Екстрахиращ реагент, REAG EXT Каталоген No. 06B257176, съдържа 1.0 N натриев хидроксид с органичен екстрахиращ енхансер и жълто багрило. Сила на звука: > 10 mL / бутилка. Един комплект бутилки / 100 тръби, 2 бутилки / комплект 200 тръби. съхранение: Хладилен при 2-8 ° C. Стабилност: Обърнете внимание на датата на изтичане на срока на годност на бутилката.

**ВНИМАНИЕ:** Избягвайте контакт с очите, кожата и дрехите. Вземете подходящи предпазни мерки при пипетиране на този реагент.

**ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ:** Уверете се, че не сте способни да предадете инфекция: Изходният материал, от който е получен този продукт, е доказано нереактивен за HBsAg и отрицателен за HIV антитела, когато се тества с лицензирани реагенти.  
Неизвестен метод за изпитване може да предложи уверение, че продуктите, получени от човешка кръв няма да бъдат заразени. Вж. CDC / NIH Биологична безопасност в микробиологични и микробиологични условия  
Биомедицинска лабораторна публикация (NHS публикация No. [CDC] 84-8395).

#### IV. РАДИОАКТИВЕН МАТЕРИАЛ

Този комплект MPM Biomedicals Radioassay Kit съдържа <3 микрочаса (111 килокерели) от [125I] и <1.5 микрочаса (55.5 килокекела) от [57Co] на флакон с маркер. Тези радиоактивни материали могат да бъдат получени, придобити, притежавани и използвани само от лекари, клинични лаборатории или болници и само за in vitro клинични или лабораторни тестове, които не включват вътрешни или външни приложение на материала или излъчването от него на хора или животни. Получаването, придобиването, притежаването, ползването и прехвърлянето са предмет на разпоредбите и общ лиценз на Комисията за ядрено регулиране на САЩ или на държава, с която разполага. Комисията сключи споразумение за упражняване на регулаторен орган. MP Biomedicals, LLC Придържането към основните правила на радиационната безопасност трябва да осигури адекватна защита. Потребителят се отнася до Ръководство № 92 на Националното бюро по стандартите "Безопасно боравене с радиоактивни вещества" Materials ", издаден на 9 март 1964 г., ръководител на документите, щатски печат Office, Washington, D.C. 20402. Следва резюме:  
Не яжте, не пийте, не пушете и не прилагайте козметика, където се използват радиоактивни материали! Не пипетирайте радиоактивни разтвори през устата. Избягвайте директен контакт с всички радиоактивни материали, използвайки защитни предмети като лабораторни палта и ръкавици за еднократна употреба. Трябва да се извършва цялата радиационна работа в определена зона далеч от трафика. Радиоактивните материали трябва да се съхраняват в техните оригинални

контейнери в определена зона. Регистър за получаване и изхвърляне на данни от всички радиоактивни материали трябва да се съхранява. Лабораторно оборудване и стъклария, които са подлежащи на замърсяване, трябва да се отделят, за да се предотврати кръстосано замърсяване на различни радиоизотопи. Всички радиоактивни разливи трябва да се обработят незабавно в съответствие с установени процедури. Всички радиоактивни материали трябва да се изхвърлят в съответствие с преобладаващите регламенти и насоки на агенциите, които имат юрисдикция над лабораторията. Нейонизираните контейнери могат да бъдат изхвърляни при нерадиоактивни отпадъци, при условие че са етикетирани и етикетиранието не е нарушено.

G. Оборудване и реагенти, които са необходими, но не са предоставени в комплекта:  
Градуирана стъклена тръба, 5 или 10 mL или евакуирана стъклена епруветка, съдържаща EDTA, 7 или 10 mL.

Тръби от полипропилен или полистирен (12 x 75 мм), за еднократна употреба.

Рафт за епруветки.

Всяка полуавтоматична пипета тип с върховете за еднократна употреба, способни да доставят 100 uL, 200 uL и 1.0 mL.

Vortex миксер.

Центрофуга, способна да постигне RCF най-малко 1000 x g.

Гама брояч за измерване на [125I] и [57Co] едновременно или последователно с регулируеми настройки на брояча, способни да разделят двата броя спектри.

3. Допълнително оборудване и реагенти, изисквани за анализ на фолиева киселина от червени клетки:

- Аскорбинова киселина, MP Biomedicals, каталожен @ 06B259110.

- Микро-хематокритна центрофуга.

- Капиларни епруветки с микро-хематокрит / хепаринизирани.

- Държач за запечатване и носене на микрокапитални тръби.

#### IV. СЪБИРАНЕ НА ПРОБИ:

Пробите трябва да бъдат събрани от хора на гладно, тъй като неотдавнашното приемане на храна може да повиши нивото на фолиева киселина значително. Лабораторията трябва да бъде уведомена за възможната радиоактивност в пробата.

Пробите не трябва да се събират при наличие на аскорбинова киселина или във високи концентрации на флуорид, тъй като всеки от тези два агента изглежда разрушава витамин B12.

Не използвайте хемолизирани проби за серумни или плазмени тестове.

A. Приготвяне на проба за анализ:

1. Серум или плазма

Съберете кръвта в 5 или 10 mL евакуирана стъклена тръба. Ако има серум да се събере, да се съсирва кръвта при стайна температура в затворена тръба за 30-60 минути. Използвайте EDTA, ако желаете плазма анализ. Центрофугирайте в продължение на 10 минути и събирайте серума или плазмата.

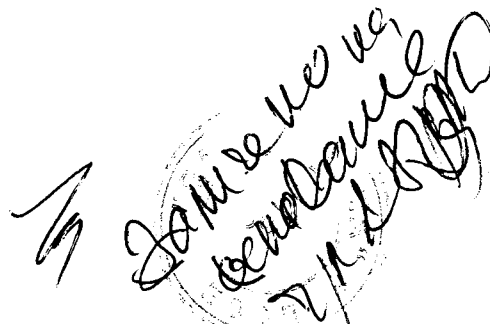
2. Хемолизат от цяла кръв (за анализ на фолиева киселина от червени клетки)

Съберете кръвта в 7 mL градуирана стъклена епруветка, съдържаща EDTA.

Определете и запишете стойността на хематокрита.



ИМЕНА  
СОБИРАТЕЛИ



Данс Фарма  
Серуми  
2/11/2010

Добавете 100 µL добре суспендирана кръв към 2 mL прясно приготвени 0.2% разтвор на аскорбинова киселина (тегло / обем). Това е разреждане 1:21. Смесва се чрез инверсия няколко пъти; избягвайте пяна. Нека хемолизата да стои при +20 до +25 °C в продължение на 60 до 90 минути преди анализа. Защитете от светлина през това време.

#### В. Доставка на екземпляри:

Внимателно опаковани серум и плазма трябва да бъдат изпратени и получени замразени.

#### С. Съхранение на пробите:

Съхранявайте пробите преди анализ при 2-8 °C. Ако се очаква складирането да надвиши 4 часа, пробата трябва да се съхранява при -20 °C или по-ниска температура. Пробите са стабилни за 6-8 седмици при тази температура. Не съхранявайте във фризери за да избегнете повторно замразяване и размразяване.

#### ПРОЦЕДУРА:

Ако броячът има два или повече канала, той трябва да бъде калибриран да отчита [125I] в един канал и [57Co] в друг канал. Ако броячът има един канал, трябва да бъде настроен така че различните настройки на броячите да отчитат един изотоп в даден момент. В последния случай, ще трябва да преброите епруветките два пъти, след като настроите брояч за [125I] и получаване на фолиевата крива и данните от извадката, след това задавате на брояч за [57Co], за да се получи кривата на витамин B12 и данните от извадката. Всички реактиви и пробите трябва да бъдат държани на стайна температура преди употреба. Спазвайте препоръчаната температурата на съхранение след употреба. Не използвайте други реагенти, освен тези, предвидени в този конкретен комплект. Витамин B12 и фолатите са чувствителни към светлина и трябва да бъдат изложени на въздействие само от дифузната светлина, за възможно най-кратък период от време. Препоръчително е да се внимава с епруветките за анализ по време на етапите на екстракция и свързване. В следващия протокол се препоръчва да се изпълняват стандартните точки двукратно. Пробите от пациента трябва да бъдат тествани в два екземпляра и приготвянето на стандартната крива и клиничните определяния трябва да се провеждат едновременно. Контролните серуми трябва да се пускат едновременно с пациентските проби.

#### А. Приготвяне на реагента:

1. Ако един флакон с проследяващ елемент може да се използва в рамките на 30 дни, добавете съдържанието на един флакон от DTT към него. Ако флаконът с проследяващ елемент трябва да се използва за период, по-дълъг от 30 дни, следвайте указанията по-долу.
2. Равни количества (100 µL всяка) на трак и дитиотреитола (DTT) са добавени в епруветка за анализ. Смесете маркера и дитиотреитола от 1 до 1 и използвайте 200 µL / епруветка. Алтернативно, маркерът и DTT могат да се пипетират отделно, 100 µL / тръба от всяка, като първо се пипетира проследяващото устройство, последвано от дитиотреитол.

#### Б. Процедура за анализ:

1. Брой 16 тръби за стандартите. Започвайки с 17, номер две тръби за всяка клинична проба.
2. Добавете стандарти и клинични проби в съответствие с очертанията, които следват.
3. Добавете 200 µL работен разтвор на Tracer / DTT разтвор (реагент B1) към всички епруветки включително тръбите Total Count (1 и 2). Vortex.



ДАНС ФАРМА  
1202 София, ул. „Индустиална“ 11, ет. 7



Данс Фарма  
на осигуряване  
1202 София, ул. „Индустиална“ 11, ет. 7

4. Инкубирайте в продължение на 15 минути при стайна температура. (18-25 ° C)
5. Добавете 100 µL от екстрахиращия реагент към епруветките 3-16 и всички епруветки за проби.
6. Инкубирайте в продължение на 10 минути при стайна температура. (18-25 ° C)
7. Размесете добре бутилката SimulTRAC-SNB Blank Reagent. Добави 1000 µL празен реагент в епруветки 3 и 4.
8. Разбъркайте добре бутилката SimulTRAC-SNB Binder. Внимание: Трябва да се разтърси енергично. Добавете 1000 µL свързващо вещество към епруветките 5-16 и всички тръби за проби. Vortex.
9. Инкубирайте епруветките 3-16 и всички тръби за проби при стайна температура (18 - 25 ° C) в продължение на 60 минути от времето на последното прибавяне на свързващото вещество. Покрийте кутията с тръби с алуминиево фолио, за да изключите светлината или да я задържите на тъмно място.
10. Центрофугирайте най-малко 1000 x g за 10 минути, за предпочитане на студено.
11. Внимателно декантирайте и изхвърлете супернатантата. Премахването на последната капка става с докосването на тръбата до хартиена кърпа или абсорбираща хартия.
12. Изчислете радиоактивността в пелетите и в тръби 1 и 2 последователно за една минута с гама брояч. Общият брой на минута за тръбите 1 и 2 за [57Co] трябва да бъдат между 10 000 и 25 000 и за [125I] между 15 000 и 35 000, в зависимост от инструмента и възрастта на маркера. Може да се използва по-кратко време за отчитане броевете в епруветките 1 и 2 са най-малко 10 000 (общ брой).

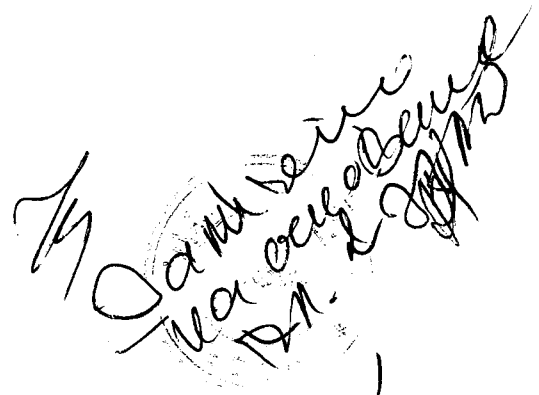
#### ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ:

- А. Серумен или плазмен Витамин В12 и Фолат
- Кривата и стойностите на витамин В12 се изчисляват въз основа на данните, получени от преброяване [57Co]; фолиевата крива и стойностите се изчисляват от [125I] е от значение.
1. Средно стойностите, установени в епруветките 3 и 4, "празни" тръби. Изваждам "Празен" от всички други бройки на тръби, за да получите коригираното количество. Използвайте само коригираните суми в изчисленията. ЗАБЕЛЕЖКА: Устройството на времето трябва да бъде постоянно за всички преброени тръби.
  2. Средно коригираните стойности за тръбите 1 и 2, за да се получи коригираното Общ брой за анализ.
  3. Разделете средната стойност на коригираните стойности за тръби 5 и 6 с коригиран Общ брой, за да дадете подвързаността за следене, Во. Тази стойност трябва да бъде по-голяма от 35%.
  4. Разделете коригираните стойности за всяка епруветка със средно коригираните стойности преброява се за епруветките 5 и 6, за да се получи% от следата за всяка тръба.
  5. Стандартната крива може да бъде графична, както следва: Използвайки logit-log хартия, зачертайте% от Trace Binding като ордината спрямо pg / mL витамин В12 или ng / mL фолат стандарт в логаритмичната скала. Типичният брой на данните и изчисленият % на свързване на проследявания компонент са дадени в таблица; стандартните криви, изображенията за тези данни, са показани на фигура 1. В практиката, може да е препоръчително да се начертае всяка стандартна крива отделно за да избегнете евентуално объркване.
  6. Концентрацията на витамин В12 или фолат в серума или плазмата е определена чрез интерполация от стандартната крива на % от Trace Свързване срещу или pg / mL витамин В12 или ng / mL фолат.

#### ОГРАНИЧЕНИЯ НА ПРОЦЕДУРАТА:



Данс Фарма  
на осигуряване  
ТМ.





тел./факс: (02) 936 70 79, 936 77 92, 936 67 51; 0886 60 10 77  
e-mail: info@danspharma.com; www.danspharma.com



1202 София, VASSILEV Business City  
ул. „Индустиална“ 11, ет. 7

ISO 9001

А. Методологията за радиоактивно определяне съдържанието на витамин В12 в пациентски пробите може да осигури стойности за популации с риск, различен от стойностите получени чрез използване на специфична микробиологична методология, тъй като всяка от тях има своя собствен референтен диапазон.

Б. Понякога се съобщават за изненадващи повишени серумни резултати от витамин В12 с няколко типа "No Boil" тестове.11,12 Съобщено е, че тези резултати може да се дължат на присъствието в пробата на антитела, блокиращи анти-вътрешния фактор или ендогенни свързващи вещества към витамин В12, които могат да бъдат ненапълно деактивирани от алкалните реагенти за денатурация. 12 Въпреки че този вид несъответствие се появява рядко, резултатите, получени с анализите "No Boil", трябва да се интерпретират с внимание; където е уместно, резултатът "No Boil" може да бъде потвърден от алтернативен метод "Boil" (MP Biomedicals каталожен @ 06B254819). При разминаване на резултатите с клинични находки или впечатления трябва да се направи клинична преценка и извършена допълнителна оценка.

В. Точното използване на комплекта SimulTRAC зависи от способността за гама противодействие на дискриминацията между дезинтеграцията на [125I] и [57Co]. Windows трябва да се настрои така, че да има минимална смущения от [57Co] в канала [125I] и обратно.

RECEIVED  
12/11/2010  
R

Handwritten signatures and a circular stamp. The stamp contains the text: "Данс Фарма", "качествена", "и надеждна".



Diagnostics Division  
29525 Fountain Parkway  
Solon, OH 44139  
<http://www.mpbio.com>

## SimulTRAC-SNB

**Radioassay Kit Vitamin B<sub>12</sub> [<sup>57</sup>Co]/  
Folate [<sup>125</sup>I]** **Page 1**

**SimulTRAC-SNB Radioassay Kit  
Vitamin B<sub>12</sub> [<sup>57</sup>Co]/Folsäure [<sup>125</sup>J]** **Seite 15**

**Coffret SimulTRAC-SNB pour Dosage  
Radio-Immunologique Vitamine B<sub>12</sub>  
[<sup>57</sup>Co]/Folates [<sup>125</sup>I]** **Page 30**

**Kit per il Radiodosaggio Simultaneo di  
Vitamina B<sub>12</sub> [<sup>57</sup>Co] Folato [<sup>125</sup>I] -  
SimulTRAC-SNB** **Pagina 45**

**Kit de Radioensayo SimulTRAC-SNB  
Vitamina B<sub>12</sub> [<sup>57</sup>Co]/Folato [<sup>125</sup>I]** **Página 57**

Customer support and technical information can be obtained at local MP Biomedicals offices.

Kundenberatung und technische Informationen bei den MP Biomedicals Niederlassungen erhältlich.

Pour toute aide et information techniques contactez votre agence locale de MP Biomedicals.

Per qualsiasi informazione o esigenza si prega di rivolgersi agli uffici locali della MP Biomedicals.

Para información y soporte técnico dirijase a las oficinas locales de MP Biomedicals

Catalog No.: 06B257117 - 100 Tube Kit  
Catalog No.: 06B264806 - 200 Tube Kit

Stamp: **MP BIO**  
Handwritten: *BRANTER*  
Handwritten: *21.11.2008*  
Handwritten: *BRANTER*

BRANTER





Standard	Cat. No.	Volume	Concentration - Vitamin B <sub>12</sub>		Concentration - Folic Acid	
			pg/mL	pmol/L	ng/mL	nmol/L
A	06B254851	6 mL	0	0	0	0
B	06B254860	3 mL	100	74	1.0	2.3
C	06B254878	3 mL	200	148	2.0	4.5
D	06B254886	3 mL	400	296	4.0	9.1
E	06B254916	3 mL	1000	740	10.0	23
F	06B254924	3 mL	2000	1480	20.0	45

F. Extracting Reagent, **REAG EXT** Catalog No. 06B257176, contains 1.0N sodium hydroxide with organic extracting enhancer and yellow dye. Volume: >10 mL/bottle. One bottle /100 tube kit, 2 bottles/200 tube kit. **Storage:** Refrigerate at 2-8°C. **Stability:** 24 months from date of manufacture.

**CAUTION:** Avoid contact with eyes, skin and clothing. Take appropriate safety precautions when pipetting this reagent.

**\*WARNING: HANDLE AS IF CAPABLE OF TRANSMITTING INFECTION:** Source material from which this product was derived was found nonreactive for HBsAg and negative for HIV antibody when tested with licensed reagents. No known test method can offer assurance that products derived from human blood will not be infectious. Refer to CDC/NIH Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories Publication (IHS Publication No. [CDC] 84-8395).

**WARNING: CONTAINS RADIOACTIVE MATERIAL**

This MP Biomedicals Radioassay Kit contains <3 microcuries (111 kilobecquerels) of [<sup>125</sup>I] and <1.5 microcuries (55.5 kilobecquerels) of [<sup>57</sup>Co] per vial of tracer. This radioactive material may be received, acquired, possessed and used only by physicians, clinical laboratories or hospitals and only for *in vitro* clinical or laboratory tests not involving internal or external administration of the material, or the radiation therefrom, to human beings or animals. Its receipt, acquisition, possession, use and transfer are subject to the regulations and a general license of the U.S. Nuclear Regulatory Commission or a State with which the Commission has entered into an agreement for the exercise of regulatory authority.

MP Biomedicals, LLC

Adherence to the basic rules of radiation safety should provide adequate protection. The user is referred to National Bureau of Standards Handbook No. 92, "Safe Handling of Radioactive Materials", issued March 9, 1964, Superintendent of Documents, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C. 20402. A summary follows:

♦ Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics where radioactive materials are used. ♦ Do not pipet radioactive solutions by mouth. ♦ Avoid direct contact with all radioactive materials by using protective articles such as lab coats and disposable gloves. ♦ All radiological work should be done in a designated area away from traffic. ♦ Radioactive materials should be stored in their original containers in a designated area. ♦ A record book for logging receipt and disposal of all radioactive materials should be kept. ♦ Laboratory equipment and glassware which are subject to contamination should be segregated to prevent cross-contamination of different radioisotopes. ♦ Any radioactive spills should be taken care of immediately in accordance with established procedures. ♦ All radioactive materials must be disposed of in accordance with the prevailing regulations and guidelines of the agencies

3

holding jurisdiction over the laboratory. ♦ Uncontaminated containers may be discarded in non-radioactive waste providing that labels and labeling are defaced.

G. Equipment and Reagents Required but Not Provided in Kit:

Evacuated glass tube, 5 or 10 mL or Evacuated glass tube containing EDTA, 7 or 10 mL.

Polypropylene or polystyrene tubes (12 x 75 mm), disposable.

Test tube rack.

Any type semi-automatic pipette with disposable tips capable of delivering 100 µL, 200 µL and 1.0 mL.

Vortex mixer.

Centrifuge capable of achieving an RCF of at least 1000 x g.

Gamma counter for measuring [<sup>125</sup>I] and [<sup>57</sup>Co] simultaneously or sequentially with adjustable counter settings capable of separating the two counting spectra.

H. Additional Equipment and Reagents Required for Red Cell Folate Assay:

- Ascorbic acid, MP Biomedicals, Catalog No. 06B259110.
- Micro-Hematocrit Centrifuge.
- Micro-Hematocrit Capillary Tubes/Heparinized.
- Holder for sealing and carrying microcapillary tubes.

IV. SPECIMEN COLLECTION:

Samples should be collected from fasting individuals, since recent food intake may increase the folic acid level appreciably. The laboratory should be advised of possible radioactivity in the sample.

Samples must not be collected in ascorbic acid or in high concentrations of fluoride, since either of these two agents appears to destroy vitamin B<sub>12</sub>.

Do not use hemolyzed specimens for serum or plasma assays.

A. Preparation of specimen for analysis:

1. **Serum or Plasma**  
Collect the blood in a 5 or 10 mL evacuated glass tube. If serum is being collected, allow the blood to clot at room temperature in the closed tube for 30-60 minutes. Use EDTA if plasma is desired for analysis. Centrifuge for 10 minutes and collect the serum or plasma.
2. **Whole Blood Hemolysate (for red cell folate assay)**  
Collect the blood in a 7 mL evacuated glass tube containing EDTA. Determine and record the hematocrit value.  
Add 100 µL well-suspended blood to 2 mL of freshly prepared 0.2% ascorbic acid solution (w/v). This is a 1:21 dilution. Mix by inversion several times; avoid foaming.  
Let the hemolysate stand at +20 to +25°C for 60 to 90 minutes prior to assay. Protect from light during this time.

4

*Sample received via evacuated tube 11/2/84*

*[Handwritten signatures and initials]*

**MP BIOMEDICALS**

**LABORATORY**

*[Handwritten signature]*

- B. Shipping of Specimens:  
Carefully packed serum and plasma should be shipped and received frozen.
- C. Storage of Samples:  
Store samples before analysis at 2-8°C. If storage is expected to exceed 4 hours, the sample should be stored at -20°C or below. Samples are stable for 6-8 weeks at this temperature. Do not store in freezers with an automatic defrost cycle in order to avoid repeated freezing and thawing.

V. PROCEDURE:

If the counter has two or more channels it should be calibrated to count [<sup>125</sup>I] in one channel and [<sup>57</sup>Co] in another channel. If the counter has one channel it should be calibrated so that different counter settings will count one isotope at a time. In the case of the latter, it will be necessary to count the tubes twice, once setting the counter for [<sup>125</sup>I] and obtaining the folate curve and sample data, then setting the counter for [<sup>57</sup>Co] to obtain the vitamin B<sub>12</sub> curve and sample data. All reagents and samples must be brought to room temperature before use. Return to recommended storage temperature after use. Do not use reagents other than those provided in this particular kit. Vitamin B<sub>12</sub> and folates are light sensitive and should be exposed to diffused light only, for as short a period of time as possible. It is advisable to cover the rack of assay tubes during the extraction and binding steps.

In the following protocol it is recommended that the standard level points be run in duplicate. Patient samples must be assayed in duplicate and the preparation of the standard curve and the clinical determinations must be run simultaneously. Control sera should be run at the same time as patient samples.

- A. Reagent Preparation:
- If one bottle of tracer can be used within 30 days, add the contents of one vial of DTT to a bottle of tracer. If the same bottle of tracer is to be used for periods longer than 30 days, follow the directions below.
  - Equal amounts (100 µL each) of tracer and dithiothreitol (DTT) are added per assay tube. Mix tracer and dithiothreitol 1 to 1 and use 200 µL/tube. Alternatively the tracer and DTT may be pipetted separately, 100 µL/tube of each, pipetting the tracer first followed by the dithiothreitol.
- B. Assay Procedure:
- Number 16 tubes for the standards. Beginning with 17, number two tubes for each clinical sample.
  - Add standards and clinical samples according to the outline which follows.
  - Add 200 µL Working Tracer/ DTT Solution (Reagent B1) to all tubes including the Total Count tubes (1 and 2). Vortex.
  - Incubate for 15 minutes at room temperature. (18 - 25°C)
  - Add 100 µL Extracting Reagent to tubes 3-16 and all sample tubes. Vortex.
  - Incubate for 10 minutes at room temperature. (18 - 25°C)
  - Thoroughly mix the bottle of SimulTRAC-SNB Blank Reagent. Add 1000 µL blank reagent to tubes 3 and 4.
  - Thoroughly mix the bottle of SimulTRAC-SNB Binder. **Caution: Must be shaken vigorously.** Add 1000 µL binder to tubes 5-16 and all sample tubes. Vortex.
  - Incubate tubes 3-16 and all sample tubes at room temperature (18 - 25°C) for 60 minutes from the time of the last addition of the binder. Cover the rack of tubes with aluminum foil to exclude light, or keep in

a dark location.

- Centrifuge at a minimum of 1000 x g for 10 minutes, preferably in the cold.
- Gently decant and discard each supernatant. Remove the last drop by touching the tube to a paper towel or absorbent paper.
- Count the radioactivity in the pellets and in tubes 1 and 2 in sequence for one minute with a gamma counter. The total count per minute for tubes 1 and 2 for [<sup>57</sup>Co] should be between 10,000 and 25,000 and for [<sup>125</sup>I] between 15,000 and 35,000, depending on the instrument and age of the tracer. A shorter counting time may be used provided the counts in tubes 1 and 2 are at least 10,000 (total count).

SimulTRAC-SNB RADIOASSAY

Tube	Standard or Sample (µL)	Working Tracer Solution (µL)	Incubate	Extracting Reagent (µL)	Incubate	Blank Reagent (µL)	Binder (µL)	Incubate	Centrifuge
1, 2	---	200	Vortex.	---	Vortex.	---	---	Vortex.	Centrifuge
3, 4	200A	200	Incubate	100	Incubate	1000	---	Incubate	all tubes
5, 6	200A	200	all tubes	100	all tubes	---	1000	all tubes	(except 1
7, 8	200B	200	at room	100	at room	---	1000	at room	and 2) at
9, 10	200C	200	temper-	100	temper-	---	1000	temper-	1000 x g for
11, 12	200D	200	ature (18	100	ature (18	---	1000	ature (18	10 min.
13, 14	200E	200	- 25°C)	100	- 25°C)	---	1000	- 25°C)	
15, 16	200F	200	for 15	100	for 10	---	1000	for 60	
min.					min.			min.	
Patient Samples	200	200		100		---	1000		

After centrifugation, decant the supernatants and count the radioactivity in the pellets.

Calculate. Draw standard curve and determine patient assay values.

VI. CALCULATION OF RESULTS:

A. Serum or Plasma Vitamin B<sub>12</sub> and Folate:

The Vitamin B<sub>12</sub> curve and values are calculated from the data obtained by counting [<sup>57</sup>Co]; the folate curve and values are calculated from the [<sup>125</sup>I] counts.

1. Average the counts found in tubes 3 and 4, the "Blank" tubes. Subtract the "Blank" from all other tube counts to obtain the corrected counts. Use only the corrected counts in the calculations. **NOTE:** The unit of time must be constant for all tubes counted.
2. Average the corrected counts for tubes 1 and 2 to give the corrected Total Count per assay.
3. Divide the average of the corrected counts for tubes 5 and 6 by the corrected Total Count to give the Trace Binding, B<sub>0</sub>. This value should be greater than 35%.
4. Divide the corrected counts for each tube by the average corrected counts for tubes 5 and 6 to give the % of Trace Binding for each tube. A Standard Curve may be plotted as follows:  
Using logit-log paper, plot % of Trace Binding as the ordinate versus pg/mL vitamin B<sub>12</sub> or ng/mL folate standard on the log scale. Typical counting data and calculated % of Trace Binding are given in Table 1; the standard curves plotted for these data are shown in Figure 1. In practice, it may be advisable to plot each standard curve on a separate sheet to avoid possible confusion.
6. The concentration of vitamin B<sub>12</sub> or folate in serum or plasma is determined by interpolation from the standard curve of % of Trace Binding versus either pg/mL vitamin B<sub>12</sub> or ng/mL folate (Figure 1).
7. Example:
  - a. The following example is for a B<sub>12</sub> sample. The same calculation procedure is used for folate:

$$\text{Blank} = \frac{\text{counts tube 3} + \text{counts tube 4}}{2} = \frac{750 + 728}{2} = 739$$

$$\text{Corrected Total Count} = \frac{\text{Counts (tube 1-Blank)} + (\text{tube 2-Blank})}{2} = \frac{(23319 - 739) + (23716 - 739)}{2} = 22778$$

$$B_0 = \text{Trace Binding} = \frac{\text{av. corr. counts for tubes 5 \& 6}}{\text{corrected Total count}} \times 100 = \frac{10632}{22778} \times 100 = 46.7\%$$

% of Trace Binding

$$\text{calculation for Tube 7} = \frac{(\text{counts tube 7} - \text{Blank})}{\text{av. corr. counts for tubes 5 \& 6}} \times 100 = \frac{(9914 - 739)}{10632} \times 100 = 86.2\%$$

Sample Calculation for a Patient Specimen:

$$\text{Count (found)} = 7324$$

$$\text{Blank} = 739$$

$$\% \text{ of Trace Binding} = \frac{7324 - 739}{10632} \times 100 = 61.9\%$$

The logit-log Standard Curve (Figure 1) shows that 61.9% corresponds to a B<sub>12</sub> concentration of 470 pg/mL.

The average of this value and the value for the duplicate determination is reported as the B<sub>12</sub> concentration in pg/mL for the patient sample.

B. Red Cell Folate:

1. Calculate the % of Trace Binding for the hemolysate (Step A-4)
2. Obtain the concentration of folate by interpolation from the Standard Curve (Step A-6).
3. Multiply the folate concentration by 21. (A 1:21 dilution of whole blood was made in preparing the specimen.) This gives the folate concentration in ng/mL of whole blood.
4. Divide the folate concentration of whole blood by the hematocrit expressed as a decimal. This gives the folate concentration in ng/mL of packed red cells.

$$\text{ng/mL of packed red cells} = \frac{(\text{ng/mL of hemolysate}) \times 21}{\% \text{ hematocrit}/100}$$

Sample Calculation for Red Cell Folate:

$$\text{Count (found)} = 11271$$

$$\text{Blank} = 1321$$

$$\% \text{ of Trace Binding} = 56.3$$

The logit-log Standard Curve (Figure 1) shows that 56.3% corresponds to a folate concentration of 4.6 ng/mL.

$$\text{Patient hematocrit} = 42\%$$

$$\text{ng/mL of packed red cells} = \frac{4.6 \times 21}{0.42} = 230 \text{ ng/mL}$$

The average of this value and the value for the duplicate determination is reported as the red cell folate concentration in ng/mL for the patient sample.



For serum vitamin B<sub>12</sub> ("true" cobalamin) expected values, two populations were used. The first population consisted of 38 vitamin B<sub>12</sub> deficient subjects with confirmed diagnoses including pernicious anemia, gastric or intestinal damage, or disease states associated with B<sub>12</sub> deficiency. The estimated 99 percentile of this population defined the upper limit of the deficient (low) range.

The second population consisted of 121 healthy male and female volunteers ranging in age from 19 to 60, with no unusual dietary habits. These volunteers were judged to be hematologically normal by standard laboratory criteria. The central 95 percent of this population defined the expected range (normal). The indeterminate range is defined as the range of values between deficient and normal populations.

Interpretation	Vitamin B <sub>12</sub> pg/mL	(pmol/L)
Low	<120	<88
Indeterminate	120 - 160	88 - 118
Normal	160 - 970	118 - 716
High	>970	>716

In another study specimens were compared by the SimulTRAC-SNB assay and the *Euglena gracilis* microbiological assay. This is shown in Figure 2.

Serum vitamin B<sub>12</sub> levels well above 1000 pg/mL are suggestive of either liver disease or a myeloproliferative disorder such as polycythemia vera, myeloid metaplasia or chronic granulocytic leukemia. Levels above 4000 pg/mL are unusual in liver disease, but are common in myeloproliferative disorders<sup>6,13,14</sup>.

IX. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS:

A. Accuracy:

1. A comparison of the results obtained for vitamin B<sub>12</sub> with this kit and those obtained using the SimulTRAC-S Radioassay kit gave these regression data:

$$(x = \text{SimulTRAC-S}, y = \text{SimulTRAC-SNB})$$

Number of samples = 160      Correlation coefficient = 0.98  
Slope = 0.93      Y-Intercept = -26 pg/mL

2. Comparison of results with those obtained by microbiological assay with *Euglena gracilis*<sup>15</sup> gave the following calculated regression.

$$(x = \text{microbiological assay}, y = \text{SimulTRAC-SNB}):$$

Number of samples = 132      Correlation coefficient = 0.96  
Slope = 1.1      Y-Intercept = -32 pg/mL

3. A comparison of the serum folate results obtained in this kit with those obtained using the SimulTRAC-S kit gave the following results:

Number of samples = 160      Correlation coefficient = 0.97  
Slope = 1.03      Y-Intercept = -0.01 ng/mL

B. Precision:

1. Intra-assay variation:

a. Vitamin B<sub>12</sub>

Specimen	N	Mean pg/mL	S.D.	% C.V.
Control 1	20	318	19.5	6.1
Control 2	22	444	14.1	3.2
Control 3	20	593	26.3	4.4
Control 4	20	1203	69	5.7
Serum Pool	20	169	19	11.2

b. Folate

Specimen	N	Mean ng/mL	S.D.	% C.V.
Control 1	20	1.87	0.16	8.6
Control 2	22	2.16	0.15	6.9
Control 3	20	4.89	0.25	5.1
Control 4	20	12.1	0.54	4.5
Serum Pool	20	6.10	0.25	4.1

2. Inter-assay variation:

a. Vitamin B<sub>12</sub>

Specimen	N	Mean pg/mL	S.D.	% C.V.
Control 1	35	313	25.6	8.2
Control 2	44	432	27.9	6.4
Control 3	52	555	38	6.8
Control 4	52	1106	47	4.2
Serum Pool	30	151	18.6	12.3

b. Folate

Specimen	N	Mean ng/mL	S.D.	% C.V.
Control 1	35	1.62	0.19	11.7
Control 2	44	1.96	0.16	8.2
Control 3	52	4.50	0.34	7.5
Control 4	52	10.4	1.0	9.6
Serum Pool	30	6.60	0.47	7.1

Handwritten signature and notes at the bottom of page 12, including a circular stamp and the text "W. A. R. 2 8 0 120".

C. Recovery:

One serum sample was spiked with cyanocobalamin and one with MTFA. The MTFA was calibrated by UV spectrophotometry and spiked into the sample. Recoveries were calculated as:

$$\frac{\text{found} - \text{endogenous}}{\text{spike}} \times 100$$

Vitamin B <sub>12</sub>				MTFA			
Spike	Found	Expected	% Recovery	Spike	Found	Expected	% Recovery
0	340	---	---	0	0.9	---	---
200	541	540	100	2	3.03	2.9	107
400	763	740	106	4	4.95	4.9	101
1000	1297	1340	96	10	10.66	10.9	98

D. Linearity

A serum sample was diluted with standard A to test for linearity. Linearity was calculated as:

$$\frac{\text{found}}{\text{expected}} \times 100$$

Vitamin B <sub>12</sub>				Folate			
Dilution	Found	Expected	%	Dilution	Found	Expected	%
0	398	---	---	0	19.48	---	---
1.33	273	299	91	1.33	14.40	14.6	99
2	195	199	98	2	10.17	9.74	104
4	100	100	101	4	5.49	4.87	113
8	50.0	50	100	8	2.68	2.44	110

E. Specificity

5-Methyltetrahydrofolic acid and pteroylglutamic acid have equal affinity for the binder in this assay.

The porcine Intrinsic Factor used in this kit has been purified by affinity chromatography and contains less than 4% R protein. The purity has been established according to criteria proposed by the National Committee for Clinical Laboratory Standards<sup>18</sup>.

The intrinsic factor in the MP Biomedicals SimuTRAC-SNB Radioassay Kit measures 10,000 pg/mL of cobinamide as less than 75 pg/mL when read against a standard curve constructed from cobalamin standards. In addition, vitamin B<sub>12</sub> binding is more than 95% inhibited by specific anti-IF blocking antibody.

Additional studies have shown that when using the MP Biomedicals SimuTRAC-SNB Kit, cobinamide (a vitamin B<sub>12</sub> analogue) is less than 0.01% cross-reactive.

F. Sensitivity:

Sensitivity as defined by the concentration at 90% trace binding is 75 pg/mL for B<sub>12</sub> and 0.6 ng/mL for folate.

Handwritten signature and stamp at the bottom of page 14. The stamp is circular and contains the text "VITAMIN B12" and "COBALAMIN".

## SimulTRAC-SNB Radioassay Kit Vitamin B<sub>12</sub> [<sup>57</sup>Co]/Folsäure [<sup>125</sup>J]

Zur gleichzeitigen quantitativen Bestimmung von Vitamin B<sub>12</sub> und Folsäure in Serum und Plasma.

### Zusammenfassung und Erläuterung des Tests

Mangel an Vitamin B<sub>12</sub> und Folsäure stellen zwei der drei eindeutig nahrungsbedingten Anämien beim Menschen dar. Die dritte Form ist der Eisenmangel<sup>1</sup>.

Folsäuremangel wurde bei ca. einem Drittel aller Schwangeren und einer großen Zahl Alkoholiker festgestellt, außerdem bei der Mehrzahl von Personen, die sich ohne frisches Obst oder Gemüse sowie frische Fruchtsäfte ernähren, bei vielen Menschen mit strukturellen oder Funktionsstörungen im oberen Drittel des Dünndarms sowie in einer Vielzahl anderer Fälle<sup>2</sup>. Die Messung des Folsäurespiegels stellt ein direktes und verlässliches Mittel zur Bestimmung eines vorliegenden Folsäuremangels dar<sup>3</sup>. Dieser Test sollte durchgeführt werden bei Patienten mit megaloblastischer Anämie aber auch bei Patienten mit Anämie, bei der eine Hypersegmentation der Granulozyten und gleichzeitiger Eisenmangel vorliegen<sup>4</sup>.

Vitamin B<sub>12</sub> ist für den normalen Folsäurestoffwechsel notwendig. Es empfiehlt sich deshalb, Vitamin B<sub>12</sub> im Serum, Folsäure in den Erythrozyten sowie Folsäure im Serum zu bestimmen, um sicherzustellen, daß Folsäuremangel vorliegt. Die richtige Behandlung ist die Gabe von Folsäure. Ein niedriger Folsäurespiegel in den Erythrozyten kann ebenfalls bedeuten, daß der Patient hauptsächlich an Vitamin B<sub>12</sub>-Mangel leidet, wobei die Folsäureaufnahme der Zelle blockiert ist. In diesem Fall würde die richtige Therapie eher mit Vitamin B<sub>12</sub> als mit Folsäure durchgeführt werden.

Vitamin B<sub>12</sub>-Mangel geht sehr häufig mit perniziöser Anämie, Schäden am Gastrointestinaltrakt und rein vegetarischer Ernährung einher. Die einzigen nennenswerten Vorkommen an Vitamin B<sub>12</sub> in der Nahrung sind tierischen Ursprungs; deshalb führt eine rein vegetarisch ausgerichtete Ernährung schließlich zu Vitamin B<sub>12</sub>-Mangel. Morphologische Veränderungen der Blutzellen, die mit Vitamin B<sub>12</sub>-Mangel einhergehen, werden ebenfalls durch Folsäuremangel hervorgerufen. Die Bestimmung des Cobalamin-Spiegels im Serum ist notwendig, um festzustellen, ob eine Megaloblastose durch Vitamin B<sub>12</sub>-Mangel oder Folsäuremangel oder durch beide bedingt ist<sup>2,4,5,6</sup>.

### Testprinzip

Bei einem kompetitiven Proteinbindungsassay sollte das Bindungsprotein die gleiche Affinität sowohl für den Standard als auch für den Analyten in der Patientenprobe haben. Das nichtmarkierte B<sub>12</sub> bzw. die Folsäure konkurriert mit dem entsprechenden radioaktiven Analogon um die begrenzte Anzahl von Bindungsstellen an dem spezifischen Bindungsprotein, und reduziert somit die Menge an gebundenem radioaktivem Folat bzw. Vitamin B<sub>12</sub>. Entsprechend ist die Menge an gebundener Radioaktivität umgekehrt proportional zur Konzentration in der Patientenprobe oder dem Standard.

In diesem SimulTRAC-SNB Radioassay von MP Biomedicals werden Vitamin B<sub>12</sub> und Folsäure parallel in einem Röhrchen bestimmt. Die Tracer, die Bindungsproteine und Standards werden für Vitamin B<sub>12</sub> und Folsäure in kombinierter Form geliefert. Die Pteroylglutaminsäure Form des Folats (PGS) wird sowohl für den Standard als auch den Tracer in einer Inkubationslösung bei einem pH von 9,5 verwendet. Bei diesem pH-Wert haben sowohl die 5-Methyltetrahydrofolsäure (MTFS) aus der Patientenprobe als auch die PGS aus den Standards die gleiche Affinität zu dem Bindungsprotein. Die beiden Tracer - <sup>57</sup>Co für Vitamin B<sub>12</sub> und <sup>125</sup>J für Folaterzeugen Energiespektren in Bereichen, die von den üblichen 2-Kanal-Meßgeräten gut getrennt gemessen werden können.

Der MP Biomedicals SimulTRAC-SNB Test arbeitet mit gereinigtem Intrinsic-Faktor. Das R-Protein, das eine hohe Affinität zu Cobalamin-Analogen im menschlichen Plasma hat, wurde durch Affinitäts-chromatographie entfernt. Da das R-Protein entfernt ist, steht nur der Intrinsic-Faktor als Bindungsprotein zur Verfügung; da dieser spezifisch ist für Cobalamin (B<sub>12</sub>), wird die "unverfälschte" Cobalamin-Konzentration gemessen<sup>9,10</sup>. Sowohl der gereinigte Intrinsic-Faktor als auch das Folat-Bindungsprotein sind kovalent an einen festen Träger gebunden.

In diesem MP Biomedicals Verfahren werden die endogenen Serumbindungsproteine für Vitamin B<sub>12</sub> und Folat zerstört, und zwar durch 15-minütige Inkubation mit der Tracer/DTT-Lösung und anschließender Extraktion bei pH 12-13 für 10 Minuten. Dieses Verfahren macht ein Erhitzen der Probe auf 100°C überflüssig.

Um einen Folsäuremangel zu bestätigen, kann dieser Test auch zur Bestimmung von Folat in den Erythrozyten eingesetzt werden.

### Reagenzien

Zur Erstellung der *In-Vitro*-Diagnose.

1. **SimulTRAC-SNB Dithiothreitol-Lösung**. [DTT] enthält Dithiothreitol in Phosphatpuffer mit Stabilisator. Mindestens 10 ml pro Fläschchen; ein Fläschchen pro 100 Röhrchen Kit, 2 Fläschchen pro 200 Röhrchen Kit. Lagerung: gekühlt bei 2 bis 8°C aufbewahren, gut verschließen. Haltbarkeit: gemäß Verfallsdatum auf dem Fläschchen.
2. **SimulTRAC-SNB Vitamin B<sub>12</sub>/Folsäure-Tracer**. [<sup>125</sup>J] [TRACER] Eine Flasche enthält <1,5 µCi (55,5 kBq) [<sup>57</sup>Co] Vitamin B<sub>12</sub> und <3 µCi (111 kBq) [<sup>125</sup>J] Folsäure in Boratpuffer mit humanem Serumalbumin\*, Dextran, Kaliumcyanid, endogenem Bindungs-Blocker, Farb- und Konservierungsstoffen. Volumen: >10 ml pro Flasche. Eine Flasche pro 100 Röhrchen Kit, 2 Flaschen pro 200 Röhrchen Kit. Lagerung: gekühlt bei 2 bis 8°C, vor Licht schützen. Haltbarkeit: gemäß Verfallsdatum auf der Flasche.
  - a. **Tracer/DTT-Arbeits-Lösung Vorbereitung**: Geben Sie den Inhalt eines Fläschchens Dithiothreitol-Lösung zu einer Flasche Vitamin B<sub>12</sub>/Folsäure-Tracer. Diese Menge ist ausreichend für 100 Röhrchen. Wenn der gesamte Inhalt einer Flasche Tracer nicht innerhalb von 30 Tagen nach DTT-Zugabe verbraucht werden kann, verdünnen Sie nur einen Teil der Dithiothreitol-Lösung mit einem Teil des Tracers. Lagerung: gekühlt bei 2 bis 8°C, vor Licht schützen. Haltbarkeit: Bis zu 30 Tagen nach Ansetzen der Lösung.
3. **SimulTRAC-SNB-Bindungs-protein**. [BINDER] Enthält gereinigtes Folsäure-Bindungsprotein aus Kuhmilch und gereinigten Schweine-Intrinsic-Faktor, gebunden an einen festen Träger in Boratpuffer mit Natriumchlorid, Farb und Konservierungsstoffen. >100 ml pro Flaschen. Eine Flasche pro 100 Röhrchen Kit, 2 Flaschen pro 200 Röhrchen Kit. Vor Gebrauch sehr gut mischen. Lagerung: gekühlt bei 2 bis 8°C. Haltbarkeit: gemäß Verfallsdatum auf der Flasche.

*[Handwritten signatures and a circular stamp]*

Stamp: **LABOR**  
Date: *11.11.1988*  
Name: *W. Beck*

*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*



4. **SimuTRAC-SNB Nutri-Reagenz, REAG BLANK** enthält festen Träger ohne Bindungsprotein, in Boratpuffer mit Natriumchlorid, Farbstoff und Konservierungsstoffen. Volumen: >8 ml pro Flasche; eine Flasche pro 100 Röhrchen Kit, 2 Flaschen pro 200 Röhrchen Kit. **Lagerung:** gekühlt bei 2 bis 8°C aufbewahren. **Haltbarkeit:** gemäß Verfallsdatum auf der Flasche.
5. **SimuTRAC-SNB Vitamin B<sub>12</sub>/Folsäure-Standards A-F, STD 1-6** Vitamin B<sub>12</sub> (Cyano-Cobalamin) und Folsäure (PGS) in Boratpuffer mit humanem Serumalbumin\*, Natriumchlorid, Stabilisator und Konservierungsstoffen. Ein Fläschchen pro Standard/Kit. **Lagerung:** gekühlt bei 2 bis 8°C, vor Licht schützen. **Haltbarkeit:** gemäß Verfallsdatum auf den Fläschchen.

Std.	Volumen	Konzentration Vitamin B <sub>12</sub>		Konzentration Folsäure	
		pg/ml	pmol/l	ng/ml	nmol/l
A	6 ml	0	0	0	0
B	3 ml	100	74	1,0	2,3
C	3 ml	200	148	2,0	4,5
D	3 ml	400	296	4,0	9,1
E	3 ml	1000	740	10,0	23
F	3 ml	2000	1480	20,0	45

6. **Extraktions-Reagenz, REAG EXT** enthält 1,0 N Natriumhydroxid mit organischem Extraktionsverstärker und gelbem Farbstoff. Volumen: >10 ml pro Flasche; eine Flasche pro Kit. **Lagerung:** gekühlt bei 2 bis 8°C aufbewahren. **Haltbarkeit:** gemäß Verfallsdatum auf der Flasche.

**VORSICHT:** Nicht mit den Augen, der Haut oder der Kleidung in Berührung bringen. Treffen Sie geeignete Sicherheitsvorkehrungen, wenn Sie dieses Reagenz pipettieren.

**\*ACHTUNG: DAS PRODUKT SO HANDHABEN, ALS KÖNNE ES INFIZIERTEN ÜBERTRAGEN:** Das Ausgangsmaterial, aus dem dieses Produkt hergestellt wurde, reagierte negativ auf HBsAg und auf HIV-Antikörper bei Versuchen mit zugelassenen Reagenzien. Keine bekannte Testmethode kann gewährleisten, daß Stoffe, die aus Humanblut hergestellt werden, nicht infektiös sind. Siehe dazu CDC/NIH Veröffentlichung über Biologische Sicherheit in mikrobiologischen und biomedizinischen Laboratorien (HHS Veröffentlichung Nr. 84-8395).

**ACHTUNG: ENTHÄLT RADIOAKTIVES MATERIAL**

Dieser MP Biomedicals Radioassay Kit enthält weniger als 111 kBq (3 Microcurie) an [<sup>125</sup>J] und weniger als 55,5 kBq (1,5 Microcurie) an [<sup>57</sup>Co] pro Tracer-Fläschchen. Dieses radioaktive Material darf nur durch Ärzte, klinische Laboratorien, oder Krankenhäuser bezogen, gelagert oder verwendet werden. Es ist für klinische In-Vitro- oder Laboratoriumstests bestimmt, die nicht mit der inneren oder äußeren Applikation des Materials oder seiner Strahlung an Mensch und Tier in Zusammenhang stehen. Die Annahme, der Erwerb, der Besitz, die Verwendung und der Transport dieses Materials unterliegen der Aufsicht und bedürfen einer Umgangsgenehmigung der zuständigen Behörden.

MP Biomedicals, LLC

Werden grundsätzliche Regeln zur Strahlensicherheit befolgt, bietet dies ausreichenden Schutz. Der Benutzer wird dazu auf das Handbuch Nr. 92 des National Bureau of Standards "Safe Handling of Radioactive Materials" verwiesen, erschienen am 9.3.1964, Superintendent

of Documents, U.S. Government Printing Office, Washington D.C. 20402. Siehe dazu die folgende Zusammenfassung:

♦ Wo mit radioaktivem Material gearbeitet wird, darf weder gegessen, getrunken, geraucht, noch dürfen Kosmetika benutzt werden. ♦ Radioaktives Material darf nicht mit dem Mund pipettiert werden. ♦ Der direkte Kontakt mit radioaktivem Material ist durch Verwendung von Sicherheitsmaßnahmen wie Laborkleidung und Einmalhandschuhen zu verhindern. ♦ Mit Radioaktivität sollte nur in einem abgetrennten Raum gearbeitet werden. ♦ Radioaktives Material sollte in den Originalbehältern in einem gekennzeichneten Raum aufbewahrt werden. ♦ In einem Berichtsheft sollen Eingang und Entsorgung des radioaktiven Materials verzeichnet werden. ♦ Kontaminierte Laboreinrichtungen und Glasgeräte sind auszusondern, um eine mehrfache Kontamination mit verschiedenen Radioisotopen zu vermeiden. ♦ Verschüttetes radioaktives Material muß mit Vorsicht, dem festgelegten Verfahren entsprechend, entsorgt werden. ♦ Nicht kontaminierte Behälter können in nichtradioaktivem Abfall beseitigt werden, vorausgesetzt, daß Aufschrift und Etiketten unkenntlich gemacht worden sind.

**Erforderliches Zubehör und Reagenzien, die im Kit jedoch nicht mitgeliefert werden:**

1. Evakuierte Glasröhrchen, 5 oder 10 ml, oder Evakuierte Glasröhrchen mit EDTA, 7 oder 10 ml.
2. Einweg-Röhrchen aus Polypropylen oder Polystyrol (12 x 75 mm).
3. Ständer für Teströhrchen
4. Eine beliebige halbautomatische Pipette mit Einweg-Spitzen für die Volumina 100 µl, 200 µl und 1,0 ml.
5. Vortex-Mixer
6. Zentrifuge, die mindestens 1000 x g erreicht.
7. Gamma-Counter zur Messung von [<sup>125</sup>J] und [<sup>57</sup>Co]. Die Messung kann gleichzeitig oder nacheinander vorgenommen werden. Die Meßkanäle für beide Isotope sollten getrennt einstellbar sein.

**Zubehör und erforderliche Reagenzien für die Erythrozyten-Folsäure-Bestimmung**

1. Ascorbinsäure, MP Biomedicals, Bestell-Nr. 06B259110.
2. Mikro-Hämatokrit Zentrifuge.
3. Mikro-Hämatokrit Kapillar-Röhrchen mit Heparin.
4. Halter zum Verschließen und Halten der Mikrokapillar-Röhrchen.

**Probenentnahme**

Die Proben sollten von nüchternen Personen entnommen werden, da eine erst kürzlich erfolgte Nahrungsaufnahme den Folsäurespiegel deutlich erhöhen kann. Das Laboratorium sollte über eventuell vorhandene Radioaktivität in der Blutprobe informiert werden.

Die Proben dürfen nicht mit Ascorbinsäure oder konzentrierten Fluorverbindungen versetzt werden, da beide Reagenzien Vitamin B<sub>12</sub> zerstören können. Keine hämolysierten Proben für Serum- oder Plasmaansatz verwenden.

*[Handwritten signature]*

*[Circular stamp: LABORATORIUM NA CENOBANKA]*

*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*

## 1. Vorbereitung der Proben zur Analyse

- a. **Serum oder Plasma**  
Entnehmen Sie das Blut in ein 5 oder 10 ml evakuiertes Glasröhrchen. Wenn Serum entnommen wird, lassen Sie das Blut im geschlossenen Röhrchen 30 bis 60 Minuten lang bei Raumtemperatur gerinnen. Verwenden Sie EDTA, wenn Plasma für die Analyse gewünscht wird. Zentrifugieren Sie 10 Minuten lang und entnehmen Sie das Serum oder Plasma.
- b. **Gesamtblut Hämolyat (für den Erythrozyten-Folsäure-Assay)**  
Entnehmen Sie das Blut in ein 7 ml evakuiertes Glasröhrchen mit EDTA.

Bestimmen und notieren Sie den Hämatokrit-Wert.

Geben Sie 100 µl gut suspendiertes Blut zu 2 ml frisch angesetzter, 0,2%-iger Ascorbinsäurelösung hinzu (w/v).

Dies ist eine 1:21 Verdünnung. Mischen Sie durch mehrmaliges Umdrehen und vermeiden Sie eine Schaumbildung.

Lassen Sie das Hämolyat bei 20 bis 25°C vor dem Test 60 bis 90 Minuten stehen. Schützen Sie es während dieser Zeit vor Lichteinwirkung.

2. **Versand der Proben:** Sorgfältig verpacktes Serum und Plasma sollte gefroren verschickt werden und auch so ankommen.
3. **Lagerung der Proben:** Die Proben vor der Analyse bei 2 bis 8°C aufbewahren. Wenn die Lagerung 4 Stunden überschreitet, sollten die Proben bei -20°C oder darunter gelagert werden. Die Proben halten sich bei dieser Temperatur 6 bis 8 Wochen. Nicht in Gefriergeräten mit automatischen Ablaufvorrichtungen lagern, um ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen zu vermeiden.

## Verfahren

Wenn das Zählgerät zwei oder mehr Kanäle besitzt, dann sollte es so geeicht werden, daß es auf dem einen Kanal [<sup>125</sup>I] und auf dem anderen Kanal [<sup>57</sup>Co] mißt. Wenn das Zählgerät nur über einen Kanal verfügt, sollte es so geeicht werden, daß bei einer bestimmten Zählleistung immer ein Isotop gemessen wird. Hat das Gerät nur einen Kanal, müssen alle Röhrchen zweimal gemessen werden, wobei das Zählgerät einmal für [<sup>125</sup>I] eingestellt wird, um die Folsäure zu bestimmen. Danach wird das Gerät für [<sup>57</sup>Co] eingestellt, um die Vitamin B<sub>12</sub>-Kurve und die Probenwerte zu ermitteln.

Alle Reagenzien und Proben müssen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmt werden; allerdings sollten sie nicht länger als erforderlich dieser Temperatur ausgesetzt werden. Verwenden Sie keine anderen Reagenzien, als die, die in diesem speziellen Kit mitgeliefert werden.

**VORSICHT:** Vitamin B<sub>12</sub> und Folsäure sind lichtempfindlich und sollten daher Licht nicht länger als unbedingt notwendig ausgesetzt werden. Es ist ratsam, den Ständer der Test-Röhrchen während der Extraktions- und Bindungsschritte abzudecken.

Das folgende Protokoll empfiehlt, die einzelnen Standards und Proben in Doppelbestimmung zu messen. Messung der Standards und Patientenproben müssen zu gleicher Zeit erfolgen. Kontrollserien sollten ebenfalls parallel dazu angesetzt werden.

19

## Vorbereitung der Reagenzien

1. Wenn eine Flasche Tracer innerhalb von 30 Tagen verbraucht werden kann, geben Sie den Inhalt eines Fläschchens DTT zu einer Flasche mit Tracer. Wenn die Flasche mit Tracer länger als 30 Tage lang verwendet werden soll, befolgen Sie bitte die untenstehenden Anweisungen.
2. Gleiche Mengen (jeweils 100 µl) an Tracer und Dithiothreitol (DTT) werden pro Teströhrchen hinzugegeben. Mischen Sie deshalb Tracer und Dithiothreitol im Verhältnis 1:1 und verwenden Sie davon 200 µl pro Röhrchen. Alternativ können Tracer und DTT getrennt pipettiert werden jeweils 100 µl pro Röhrchen, wobei zuerst der Tracer und dann das Dithiothreitol pipettiert wird.

## Testansatz

1. Nummerieren Sie 16 Röhrchen für die Standards. Bei Nr. 17 beginnend nummerieren Sie zwei weitere Röhrchen für jede klinische Probe.
2. Geben Sie Standards und klinische Proben gemäß dem untenstehenden Ablaufschema hinzu.
3. Geben Sie 200 µl Tracer/ DTT-Arbeits-Lösung (Reagenz 2A) zu allen Röhrchen, einschließlich der Röhrchen für die Totalaktivität (1 und 2). Gut mischen. Inkubieren Sie 15 Minuten bei Raumtemperatur. (18 - 25°C)
4. Geben Sie 100 µl Extraktions-reagenz in die Röhrchen 3 bis 16 und alle Proben-Röhrchen. Gut mischen.
5. Inkubieren Sie 10 Minuten bei Raumtemperatur. (18 - 25°C)
6. Mischen Sie den Inhalt des SimulTRAC-SNB-Null-Reagenzes gut durch. Geben Sie 1000 µl Null-Reagenz in die Röhrchen 3 und 4.
7. Mischen Sie den Inhalt der SimulTRAC-SNB Bindungsprotein-Flasche gut durch. **Achtung: Sehr gut mischen.** Geben Sie 1000 µl Binder in die Röhrchen 5 bis 16 und in alle Proben-Röhrchen. Gut mischen.
8. Inkubieren Sie die Röhrchen 3 bis 16 und alle Proben-Röhrchen nach der letzten Zugabe 60 Minuten bei Raumtemperatur. (18 - 25°C) Reagenz-glasständer mit Aluminiumfolie abdecken oder an einen dunklen Ort stellen, um Licht abzuhalten.
9. Bei mindestens 1000 x g für 10 Minuten zentrifugieren, vorzugsweise gekühlt.
10. Vorsichtig dekantieren und jeden Überstand verwerfen. Den letzten Tropfen entleeren, indem Sie das Röhrchen auf einem Papierhandtuch oder Löschpapier abstreifen.
11. Messen Sie die Radioaktivität im Präzipitat und in den Röhrchen 1 und 2 jeweils eine Minute mit einem Gamma-Counter. Die Gesamtimpulszahl pro Minute für die Röhrchen 1 und 2 für [<sup>57</sup>Co] sollte zwischen 10000 und 25000 Impulsen liegen, die für [<sup>125</sup>I] zwischen 15000 und 35000 Impulsen, abhängig vom Gerätetyp und Alter des Tracers. Es kann auch eine kürzere Zählzeit verwendet werden, vorausgesetzt, daß die Impulse in den Röhrchen 1 und 2 mindestens 10000 (Gesamtaktivität) erreichen.

20

**SimuTRAC-SNB Radioassay**

Röhrchen	Standard oder Probe (µl)	Tracer Arbeits-Lösung (µL)	Inku-bieren	Extrak-tionsre-agenz (µl)	Inku-bieren	Null Reagenz (µl)	Binder (µl)	Inku-bieren	Zentrifugieren
1, 2	---	200	---	---	---	---	---	---	---
3, 4	200A	200	Alle	100	Alle	1000	---	Alle	Alle
5, 6	200A	200	Röhrchen bei	100	Röhrchen bei	---	1000	Röhrchen bei	Röhrchen
7, 8	200B	200	Raumtemperatur (18-25°C)	100	Raumtemperatur (18-25°C)	---	1000	Raumtemperatur (18-25°C)	außer 1 und 2
9, 10	200C	200	15 Minuten	100	10 Minuten	---	1000	1000 x g 10 Minuten	
11, 12	200D	200		100		---	1000		
13, 14	200E	200		100		---	1000		
15, 16	200F	200		100		---	1000		
Patientenproben	200	200		100		---	1000		

Nach dem Zentrifugieren die Überstände dekantieren und die Radioaktivität in dem Präzipitat messen. Berechnen. Zeichnen Sie die Standard-Kurve und ermitteln Sie die Patientenwerte.

**Berechnung der Ergebnisse**

1. Vitamin B<sub>12</sub> und Folsäure im Serum oder Plasma

Die Vitamin B<sub>12</sub>-Kurve undwerte werden mit den Angaben erstellt, die man bei der Messung von <sup>57</sup>Co erhält, die Folsäure-Kurve undwerte aus den Impulsen von <sup>125</sup>I.

- Bestimmen Sie den Mittelwert der in Röhrchen 3 und 4, den "USB"-Röhrchen, gemessenen Impulse (USB="Unspezifische Bindung"). Subtrahieren Sie diesen "USB"-Wert von den Impulsen aller anderen Röhrchen, um die korrigierten Werte zu erhalten. Verwenden Sie für die Berechnung nur die korrigierten Werte. Anmerkung: Die Zählzeit muß für alle gemessenen Röhrchen gleich sein.
- Bestimmen Sie den Mittelwert der korrigierten Impulswerte für die Röhrchen 1 und 2, um den korrigierten Gesamtimpulswert pro Test anzugeben.
- Dividieren Sie den Mittelwert der korrigierten Impulswerte der Röhrchen 5 und 6 durch die korrigierte Gesamtimpulszahl, um die Bindung B<sub>0</sub> anzugeben. Dieser Wert sollte mehr als 35% betragen.
- Dividieren Sie die korrigierten Impulswerte für jedes Röhrchen durch die korrigierten Mittelwerte der Röhrchen 5 und 6, um den Prozentanteil der Bindung (% B/B<sub>0</sub>) für jedes Röhrchen anzugeben.

- Eine Standard-Kurve kann wie folgt gezeichnet werden: Bei Verwendung von Logit-Log-Papier den Prozentsatz an Bindung als Ordinate gegen pg/ml Vitamin B<sub>12</sub> oder ng/ml Folsäure-Standard auf der Log-Skala eintragen. Typische Zähldaten und berechnete Prozentanteile der Bindung sind in Tabelle 1, aufgeführt; die Standardkurve für diese Angaben sind in Abbildung 1, dargestellt. In der Praxis kann es ratsam sein, jede Standardkurve auf einem separaten Blatt zu zeichnen, um etwaige Verwirrung zu vermeiden.
- Die Konzentration von Vitamin B<sub>12</sub> oder Folsäure im Serum oder Plasma wird durch Interpolation aus der Standardkurve der prozentualen Bindung gegen pg/ml Vitamin B<sub>12</sub> bzw Folsäure bestimmt (Abbildung 1).
- Beispiel: Das folgende Beispiel gilt für eine B<sub>12</sub>-Probe. Die gleiche Berechnung wird für Folsäure angewendet.

$$\text{"Blank"} = \frac{\text{Impulse Röhrchen 3} + \text{Impulse Röhrchen 4}}{2} = \frac{750 + 728}{2} = 739$$

Korrigierter Gesamtimpulswert

$$= \frac{(\text{Impulse Röhrchen 1} - \text{"Blank"}) + (\text{Impulse Röhrchen 2} - \text{"Blank"})}{2}$$

$$= \frac{(23319 - 739) + (23716 - 739)}{2} = 22778$$

$$B_0 = \frac{\text{Korrigierte Durchschnittswerte der Röhrchen 5 und 6} \times 100}{\text{Korrigierter Gesamtimpulswert}} = \frac{10632 \times 100}{22778} = 46,7\%$$

Berechnung der prozentualen Bindung für Röhrchen 7

$$B_0 = \frac{(\text{Impulse Röhrchen 7} - \text{"Blank"}) \times 100}{\text{Korrigierte Mittelwerte für Röhrchen 5 und 6}} = \frac{9914 - 739}{10632} \times 100 = 86,2\%$$

Berechnung für eine Patientenprobe:

(Gefundene) Impulse = 7324

"Blank" = 739

Prozentuale Bindung =  $\frac{7324 - 739}{10632} \times 100 = 61,9\%$

Die Logit-Log-Standard-Kurve (Abbildung 1) zeigt, daß 61,9% einer Vitamin B<sub>12</sub> Konzentration von 470 pg/ml entsprechen. Der Mittelwert beider Replikate wird als die B<sub>12</sub>-Konzentration in pg/ml für die Patientenprobe angegeben.

## 2. Erythrozyten-Folsäure

- Um die % Bindung für das Hämolystat anzugeben, teilen Sie die korrigierten Impulse für das Hämolystat durch die gemittelten korrigierten Impulse für Röhren 5 und 6.
- Ermitteln Sie die Folsäure-Konzentration durch Interpolation aus der Standard-Kurven.
- Multiplizieren Sie die Folsäure-Konzentration mit 21. Eine 1:21 Verdünnung von Gesamtblut wurde bei der Vorbereitung der Proben gemacht. Dies ergibt die Folsäure-Konzentration in ng/ml an Gesamtblut.
- Dividieren Sie die Folsäure-Konzentration im Gesamtblut durch den Hämatokrit, der als Dezimale ausgedrückt ist. Dies ergibt die Folsäure-Konzentration in ng/ml Erythrozyten.

$$\text{ng/ml Erythrozyten} = \frac{(\text{ng/ml Hämolystat}) \times 21}{\% \text{ Hämatokrit}/100}$$

Proben-Berechnung für Erythrozyten-Folsäure:

(Gemessene) Impulse = 11271

"Blank" = 1321

% Bindung = 56,3

Die Logit-Log-Standard-Kurve (Abbildung 1) zeigt, daß 56,3% einer Folsäure-Konzentration von 4,6 ng/ml entsprechen.

Hämatokrit = 42%

$$\text{ng/ml Erythrozyten} = \frac{4,6 \times 21}{0,42} = 230 \text{ ng/ml}$$

Der Mittelwert beider Replikate wird als Erythrozyten-Folsäure-Konzentration in ng/ml für die Patientenprobe angegeben.

23

Anmerkung: Es ist nicht immer notwendig, Berichtigungen in Bezug auf die Serum/Plasma-Folsäure vorzunehmen, da dieser Wert im Vergleich zum Wert der Erythrozyten-Folsäure sehr gering ist. Es werden gelegentlich erhöhte Serum oder Plasma-Folsäure-Spiegel auftreten. Wenn die Konzentration der Serum oder Plasma-Folsäure mehr als 10% der errechneten Erythrozyten-Folsäure-Konzentration beträgt, sollte eine Berichtigung für das Serum wie folgt durchgeführt werden:

$$\text{ng/ml Erythrozyten} = \frac{(\text{ng/ml} \times 21) - \left[ \frac{\text{Serum-Folsäure}}{1 - \% \text{ Hämatokrit}} \right]}{\% \text{ Hämatokrit}/100}$$

Proben-Berechnung:

- Konzentration der Serum oder Plasma-Folsäure = 32 ng/ml
- Folsäure-Konzentration des Hämolystats = 3,0 ng/ml
- Hämatokrit dieses Patienten = 30%
- Korrigierte Erythrozyten-Folsäure-Konzentration:  $\frac{3,0 \text{ ng/ml} \times 21}{0,30} = 210 \text{ ng/ml}$

Da 32 ng/ml mehr als 10% von 210 ng/ml sind, muß die Konzentration der Erythrozyten-Folsäure wie folgt korrigiert werden:

$$\text{Korrigierte ng/ml Erythrozyten} = \frac{(3,0 \text{ ng/ml} \times 21) - [32 \text{ ng/ml} (1 - 0,3)]}{0,30}$$

Korrigierte Erythrozyten-Folsäure = 135 ng/ml

## Grenzen des Verfahrens

- Die radioimmunologischen Methoden zur Bestimmung der Vitamin B<sub>12</sub>-Konzentration in Patientenproben können für Risikogruppen Ergebnisse liefern, die sich von denen unterscheiden, die mit mikrobiologischen Methoden bestimmt wurden, da jede ihre eigenen Referenzbereiche hat.
- Gelegentlich sind falsch erhöhte Vitamin B<sub>12</sub> - Werte im Serum durch blockierende Antikörper oder endogene Bindungsproteine gegen Vitamin B<sub>12</sub> in der Probe ermittelt worden, welche möglicherweise nur unvollständig durch das alkalische Denaturierungs-Reagenz inaktiviert worden sind. Obwohl diese Diskrepanz nur selten erscheint, sollten doch die Resultate die durch den "No Boil" Assay erhalten wurden mit Vorsicht interpretiert werden; wo angemessen kann der "No Boil" Assay mit dem alternativen "Boil" Assay bestätigt werden (MP Biomedicals Katalog Nr.: 06B254819). Sollten die Ergebnisse den klinischen Befunden oder Eindrücken widersprechen, muß der klinische Befund überprüft und zusätzliche Auswertungen unternommen werden.
- Eine sichere Anwendung des SimuTRAC Kits hängt von der Fähigkeit des Gamma-Counter ab, zwischen [<sup>125</sup>I] und [<sup>57</sup>Co] unterscheiden zu können. Die Fenster müssen so eingestellt werden, daß nur ein minimaler Einfluß von [<sup>57</sup>Co] auf den Kanal für [<sup>125</sup>I] und umgekehrt entsteht (Spillover).

24

*Handwritten signature and stamp:*  
"IAAH"  
Handwritten text: "Zakaria wa...", "PA-1...", "1990"  
Circular stamp: "IAAH" with other illegible text.

*Handwritten signature:*

*Handwritten signature:*

*Handwritten signature:*

Diese Methode kann zur Bestimmung des "Spillover" verwendet werden.

- a. Stellen Sie den Gamma-Counter zur Messung von [<sup>125</sup>J] ein
  1. Messen Sie die [<sup>125</sup>J] Quelle = A
  2. Messen Sie die [<sup>57</sup>Co] Quelle im Kanal für [<sup>125</sup>J] = B
- b. Stellen Sie den Gamma-Counter zur Messung von [<sup>57</sup>Co] ein
  1. Messen Sie die [<sup>57</sup>Co] Quelle = C
  2. Messen Sie die [<sup>125</sup>J] Quelle im Kanal für [<sup>57</sup>Co] = D
- c. Berechnen Sie den "Spillover"
  1. für [<sup>57</sup>Co] in [<sup>125</sup>J] =  $\frac{B}{C} \times 100$
  2. für [<sup>125</sup>J] in [<sup>57</sup>Co] =  $\frac{D}{A} \times 100$

Auf keinem Kanal sollte der "Spillover" mehr als 3% ausmachen. Wenn mehr als 3% gemessen werden, muß die Fenstereinstellung verkleinert oder eine mathematische Berichtigungsmethode angewandt werden. [<sup>57</sup>Co] Quellen können auf Anforderung zur Verfügung gestellt werden.

4. Klinische Proben, die aus vorhergehenden Behandlungen oder Untersuchungen Radioaktivität enthalten, können zu verfälschten Ergebnissen führen.
5. Bei der Auswahl handelsüblicher Folsäure-Kontrollseren sollte man Vorsicht walten lassen. Manche Kontrollseren können mit instabiler 5-Methyltetrahydrofolsäure (MFTA) zubereitet sein. Dieses kann zu unerwartet niedrigen Werten führen kann. Andere Seren, die mit Pteroylglutamin-Säure zubereitet sind, die jedoch bei einem pH-Wert von 7,4 mit MFTA-Standards analysiert werden, werden vom Hersteller mit einem zu hohen Folsäure-Wert ausgezeichnet. Diese Kontrollseren werden einen Folsäure-Wert ergeben, der niedriger ist als der, der auf der Packungsbeilage angegeben ist.
6. Erwartete Werte und Kontroll-bereiche, die durch eine Methode oder eine Berechnung ermittelt werden, sind möglicherweise nicht mit denen identisch, die durch eine andere Methode bestimmt werden. Damit man zu einer größeren Genauigkeit gelangt, ist es empfehlenswert, durchgängig eine einzige Datenreduktionsmethode zu verwenden.

**Erwartete Werte**

Jedes Laboratorium muß seine eigenen Kriterien zur Interpretation der Ergebnisse festlegen; die hier gezeigten erwarteten Bereiche können jedoch als Anleitung dienen.

Der Normalbereich für Folsäure im Serum (1,5 - 16,9 ng/ml) wurde aus den Werten ermittelt, die dem 95% Vertrauensbereich einer Normalverteilung entsprachen. Diese Verteilung entstand aus 121 Proben von Freiwilligen, die nach gängigen Laborkriterien hämatologisch gesund waren.

Der erwartete Bereich für ErythrozytenFolsäure wurde aus Gesamtblut-Hämolyisaten von 117 Personen bestimmt, die hämatologisch gesund waren. Der zentrale 95%-Bereich dieser Gruppe lag bei 120 - 860 ng/ml (272 - 1952 nmol/l).

Interpretation	Serum Folsäure		Erythrozyten Folsäure	
	ng/ml	(nmol/l)	ng/ml	(nmol/l)
niedrig	<1,5	<3,4	<120	<272
normal	>1,5	>3,4	>120	>272

Für die erwarteten Werte von Vitamin B<sub>12</sub> im Serum ("echtes" Cobalamin) wurden zwei Versuchsgruppen verwendet. Die erste Gruppe bestand aus 38 Personen mit Vitamin B<sub>12</sub>-Mangel mit bestätigten Diagnosen, darunter perniziöse Anämie, Magen-Darm-Störungen sowie Krankheitszustände, die mit B<sub>12</sub>-Mangel verbunden sind. Das erwartete 99% Perzentil dieser

Gruppe bestimmte die obere Grenze des Mangel- (Niedrig-) Bereichs. Die zweite Versuchsgruppe bestand aus 121 gesunden freiwilligen Männern und Frauen, die zwischen 19 und 60 Jahren alt waren und die keine außergewöhnlichen Ernährungsgewohnheiten hatten. Diese Versuchspersonen wurden aufgrund der gängigen Labor-Kriterien als hämatologisch gesund beurteilt. Der 95% Vertrauensbereich dieser Versuchsgruppe bestimmte den Normalbereich. Der Graubereich ist definiert als der Bereich zwischen der gesunden und der anaemischen Gruppe.

Interpretation	Vitamin B <sub>12</sub> pg/ml	(pmol/l)
Niedrig	<120	<88
Graubereich	120 - 160	88 - 118
Normal	160 - 970	118 - 716
Erhöhte	>970	>716

In einer anderen Studie wurden Proben mit dem SimulTRAC-SNB und dem mikrobiologischen Euglena gracilis Test verglichen. Dies wird in Abbildung 2, dargestellt.

Vitamin B<sub>12</sub>-Werte im Serum, die deutlich über 1000 pg/ml liegen, lassen entweder auf eine Lebererkrankung oder auf eine myeloproliferative Störung, wie zum Beispiel "Polycythaemia vera", myeloide Metaplasie oder chronische granulozytische Leukämie schließen.

Werte über 4000 pg/ml sind bei Lebererkrankungen ungewöhnlich, jedoch bei myeloproliferativen Störungen durchaus üblich.<sup>8,9,13,14</sup> Spezifische Leistungsmerkmale

**Genauigkeit:**

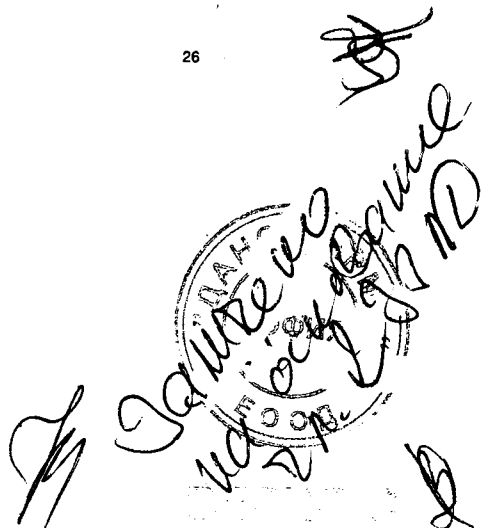
1. Ein Vergleich der Ergebnisse für Vitamin B<sub>12</sub>, die mit diesem Kit bestimmt wurden, mit denen aus dem SimulTRAC-S Radioassay Kit ergaben die folgenden Regressionsdaten:

$x = \text{SimulTRAC-S}, y = \text{SimulTRAC-SNB}$

Anzahl der Proben = 160      Korrelationskoeffizient = 0,98  
 Steigung = 0,93      Y-Abschnitt = -26 pg/mL

2. Ein Vergleich der Ergebnisse mit denen, die durch den mikrobiologischen Assay mit Euglena gracilis<sup>16</sup> erhalten wurden, ergaben die folgende berechnete Regression,  $x = \text{mikrobiologischer Assay}, y = \text{SimulTRAC-SNB}$ :

Anzahl der Proben = 132      Korrelationskoeffizient = 0,96  
 Steigung = 1,1      Y-Abschnitt = -32 pg/mL



3. Ein Vergleich der Folsäure-Ergebnisse im Serum, die mit diesem Kit bestimmt wurden, mit denen, die mit dem SimulTRAC-S Kit ermittelt wurden, führten zu folgenden Ergebnissen:

Anzahl der Proben = 160      Korrelationskoeffizient = 0,97  
Steigung = 1,03      Y-Abschnitt = -0,01 ng/mL

**Präzision:**

1. Intra-Assay Variation:  
a. Vitamin B<sub>12</sub>

	N	Mittelwert pg/ml	Standard-abweichung	% C.V.
Kontrolle 1	20	318	19,5	6,1
Kontrolle 2	22	444	14,1	3,2
Kontrolle 3	20	593	26,3	4,4
Kontrolle 4	20	1203	69	5,7
Serum-Pool	20	169	19	11,2

b. Folsäure

	N	Mittelwert ng/ml	Standard-abweichung	% C.V.
Kontrolle 1	20	1,87	0,16	8,6
Kontrolle 2	22	2,16	0,15	6,9
Kontrolle 3	20	4,89	0,25	5,1
Kontrolle 4	20	12,1	0,54	4,5
Serum-Pool	20	6,1	0,25	4,1

2. Inter-Assay Variation:  
a. Vitamin B<sub>12</sub>

	N	Mittelwert pg/ml	Standard-abweichung	% C.V.
Kontrolle 1	35	313	25,6	8,2
Kontrolle 2	44	432	27,9	6,4
Kontrolle 3	52	555	38	6,8
Kontrolle 4	52	1106	47	4,2
Serum-Pool	30	151	18,6	12,3

b. Folsäure

	N	Mittelwert ng/ml	Standard-abweichung	% C.V.
Kontrolle 1	35	1,62	0,19	11,7
Kontrolle 2	44	1,96	0,16	8,2
Kontrolle 3	52	4,50	0,34	7,5
Kontrolle 4	52	10,4	1,0	9,6
Serum-Pool	30	6,6	0,47	7,1

**Wiederfindung:**

Eine Serum-Probe wurde mit Cyanocobalamin und eine andere mit MFTS versetzt. MFTS wurde mit UV-Spektrophotometrie bestimmt und in das Serum gegeben. Die Wiederfindung wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Gefunden} - \text{endogen}}{\text{zugegeben}} \times 100$$

Vitamin B <sub>12</sub>				MFTS			
Zugegeben	Gefunden	Erwartet	Wiederfindung in %	Zugegeben	Gefunden	Erwartet	Wiederfindung in %
0	340	---	---	0	0,9	---	---
200	541	540	100	2	3,03	2,9	107
400	763	740	106	4	4,95	4,9	101
1000	1297	1340	96	10	10,66	10,9	98

**Linearität:**

Eine Serum-Probe wurde mit Standard A verdünnt, um die Linearität zu untersuchen. Die Linearität wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Gefunden}}{\text{erwartet}} \times 100$$

Vitamin B <sub>12</sub>				Folsäure			
Verdünnung	Gefunden	Erwartet	%	Verdünnung	Gefunden	Erwartet	%
0	398	---	---	0	19,48	---	---
1,33	273	299	91	1,33	14,40	14,61	99
2	195	199	98	2	10,17	9,74	104
4	100	100	101	4	5,49	4,87	113
8	50	50	100	8	2,68	2,44	110

**Sppezifität:**

5-Methyltetrahydrofolsäure und Pteroylglutaminsäure haben in diesem Assay die gleiche Affinität zu dem Binder.

Der Schweine-Intrinsik-Faktor, der in diesem Kit verwendet wird, wurde durch Affinitätschromatographie gereinigt und enthält weniger als 4% R-Protein. Der Reinheitsgrad wurde gemäß den Kriterien aufgestellt, die vom National Committee for Clinical Laboratory Standards<sup>16</sup> vorgeschlagen wurden.

Der Intrinsik-Faktor im MP Biomedicals SimuTRAC-SNB Radioassay Kit mißt eine Konzentration von 10000 pg/ml Cobinamid mit weniger als 75 pg/ml, wenn es aus einer Standard-Kurve bestimmt wird, die mit Cobalamin-Standards erstellt ist. Darüber hinaus wird die Vitamin B<sub>12</sub>-Bindung zu mehr als 95% durch einen besonderen Anti-IF blockierenden Antikörper verhindert.

Zusätzliche Versuche haben gezeigt, daß bei der Verwendung des MP Biomedicals SimuTRAC-SNB Kits das Cobinamid (ein Vitamin B<sub>12</sub>-Analogon) eine unter 0,01% liegende Kreuzreaktivität aufweist.

**Empfindlichkeit:**

Die Empfindlichkeit, definiert bei 90% Bindung beträgt 75 pg/ml für B<sub>12</sub> und 0,6 ng/ml für Folsäure.

Literaturnachweis: Siehe References.

**Coffret SimuTRAC-SNB pour Dosage Radio-Immunistique Vitamine B<sub>12</sub> [<sup>57</sup>Co]/Folates [<sup>125</sup>I]**

Destiné au dosage quantitatif et simultané de la Vitamine B<sub>12</sub> et des Folates dans du sérum et du plasma.

**Explication sommaire du test**

Les carences en vitamine B<sub>12</sub> et en folates représentent deux des trois anémies nutritionnelles sans équivoque dont peut être atteint l'homme, la troisième étant due à une carence en fer<sup>1</sup>.

On trouve une carence en folates (acide folique) chez environ un tiers des femmes enceintes, chez la plupart des alcooliques et chez la majorité des individus qui ont un régime dépourvu de légumes et de fruits crus ou de jus de fruits frais, chez de nombreuses personnes ayant des lésions structurelles ou fonctionnelles du tiers supérieur de leur intestin grêle, ainsi que dans un certain nombre d'autres cas<sup>2</sup>. La mesure des taux de folates constitue un moyen direct et fiable permettant d'établir l'existence d'une carence en folates<sup>3</sup>, et ce test doit être pratiqué chez tout patient souffrant d'une anémie mégaloblastique, ainsi que chez tout patient atteint d'anémie, d'hypersegmentation des noyaux granulocytaires, et de carence en fer prouvée<sup>4</sup>.

La vitamine B<sub>12</sub> est essentielle pour un métabolisme normal de l'acide folique. Il est conseillé de doser la vitamine B<sub>12</sub> sérique et les folates érythrocytaires en plus des folates sériques pour vérifier un diagnostic de carence en folates, dont le traitement consistera à administrer de l'acide folique. Un taux de folates érythrocytaires faible peut également indiquer que le patient souffre d'une carence primaire en vitamine B<sub>12</sub> qui bloque la capacité des cellules à fixer les folates, et dans ce cas, le traitement consiste à administrer de la vitamine B<sub>12</sub> et non pas de l'acide folique<sup>5</sup>.

La carence en vitamine B<sub>12</sub> est en général associée à des anémies pernicieuses, des lésions gastriques, des lésions de l'intestin et des régimes végétariens stricts. Du point de vue diététique, on ne trouve de la vitamine B<sub>12</sub> en quantité significative que dans des produits d'origine animale; par conséquent, un régime purement végétarien entraînera, à long terme, une carence en vitamine B<sub>12</sub>.

Les modifications morphologiques des érythrocytes associées aux carences en vitamine B<sub>12</sub> s'observent également dans les carences en acide folique, et il est nécessaire de doser le taux de cobalamine sérique pour pouvoir déterminer si la mégaloblastose est due à une carence en B<sub>12</sub>, en folates ou aux deux à la fois<sup>2,4,6,7</sup>.

**Principe du test**

Dans une analyse par compétition, le réactif de liaison doit avoir une affinité égale pour l'étalon et pour la substance présente dans l'échantillon. La vitamine B<sub>12</sub> ou les folates non marqués entrent en compétition avec leurs homologues marqués sur le nombre restreint de sites de fixation disponibles sur l'agent de fixation, ce qui réduit la quantité de vitamine B<sub>12</sub> ou de folates marqués liés au réactif. Par conséquent, le taux de radioactivité liée est inversement proportionnel à la concentration de l'échantillon du patient ou de l'étalon.

Dans le cas du test radio-immunistique SimuTRAC-SNB de MP Biomedicals, les taux de vitamine B<sub>12</sub> et de folates sont déterminés simultanément dans un seul tube. Les marqueurs de la vitamine B<sub>12</sub> et des folates, les réactifs de liaison et les étalons sont fournis sous forme combinée. Les folates sous forme d'acide pteroylglutamique (PGA) sont utilisés à la fois comme étalon et comme marqueur dans un mélange pour incubation dont le pH est de 9,5. A ce pH de liaison, l'acide 5-méthyl-tétrahydrofolique (MTFA) de l'échantillon du patient et le PGA des étalons ont une affinité égale pour le réactif de liaison lacté. Les deux marqueurs: [<sup>57</sup>Co] pour la vitamine B<sub>12</sub> et [<sup>125</sup>I] pour les folates produisent chacun une énergie à des taux existant sur le marché.

Le coffret SimuTRAC-SNB de MP Biomedicals utilise un facteur intrinsèque purifié. La protéine R, qui a une forte affinité pour les analogues de la cobalamine (vitamine B<sub>12</sub>) dans le

plasma humain, a été retirée par chromatographie d'affinité. Une fois que la protéine R a été retirée, seul le facteur intrinsèque purifié est disponible pour la liaison; étant donné qu'il est spécifique pour la cobalamine, on peut mesurer un "vrai" taux de cobalamine<sup>9,10</sup>. Le facteur intrinsèque purifié et le réactif de liaison des folates ont été fixés de façon covalente sur un support solide. Au cours de cette procédure de MP Biomedicals, les réactifs de liaison sériques endogènes pour la vitamine B<sub>12</sub> et pour les folates sont détruits après une incubation de 15 minutes avec le marqueur/DTT, suivie d'une réaction d'extraction durant 10 minutes à un pH alcalin<sup>12,13</sup>. Par conséquent, il n'est pas nécessaire de chauffer l'échantillon à 100°C.

Pour confirmer une carence en folates, on peut également utiliser ce coffret et mesurer le taux de folates érythrocytaires.

#### Réactifs

A utiliser pour un diagnostic *in vitro*

- Solution de Dithiothreitol SimuTRAC-SNB [DTT]** - N° réf.: 06B229253. Contient du Dithiothreitol dans un tampon phosphate avec un stabilisateur. >10 ml/flacon. Un flacon par coffret. **Conservation:** Au réfrigérateur, entre 2 et 8°C; bien refermer le flacon après usage. **Date de péremption:** Se reporter à la date indiquée sur le flacon.
- Marqueur Vitamine B<sub>12</sub>/Folates SimuTRAC-SNB [125I] [TRACER]** - N° réf.: 06B257133. Chaque flacon contient moins de 1,5 µCi (55,5 kBq) de complexe [<sup>125</sup>I] vitamine B<sub>12</sub> et moins de 3 µCi (111 kBq) de complexe [<sup>125</sup>I] folates avec un tampon de borate dans de la sérumalbumine humaine\*, du dextran, du cyanure de potassium, un réactif de blocage de liaison endogène, un colorant et un agent de conservation. Volume: >10 ml/flacon. Un flacon par 100 tube coffret, 2 flacon par 200 tube coffret. **Conservation:** Au réfrigérateur entre 2 et 8°C, à l'abri de toute lumière intense. **Date de péremption:** Se reporter à la date indiquée sur le flacon.
  - Solution active de marquage/ DTT** - Préparation: ajouter le contenu d'un flacon de solution de Dithiothreitol dans un flacon de marqueur Vitamine B<sub>12</sub>/Folates permet de traiter 100 tubes. Si on ne peut pas utiliser la totalité du contenu du flacon de marqueur dans les 30 jours qui suivent l'ajout du DTT, diluer une part de solution de Dithiothreitol pour une part de solution de marquage. **Conservation:** Au réfrigérateur entre 2 et 8°C, à l'abri de toute lumière intense. **Stabilité:** Trente jours après préparation.
- Réactif de liaison SimuTRAC-SNB [BINDER]** N° réf.: 06B257150. Contient un réactif de liaison du folate purifié élaboré à partir de lait de vache et d'un facteur intrinsèque de porc purifié fixé sur un support solide dans un tampon au borate contenant du chlorure de sodium, un colorant et un agent de conservation. > 100 ml/flacon. Un flacon par 100 tube coffret, 2 flacon par 200 tube coffret. **Bien agiter avant usage.** **Conservation:** Au réfrigérateur entre 2 et 8°C. **Date de péremption:** Se reporter à la date indiquée sur le flacon.
- Réactif neutre SimuTRAC-SNB [REAG BLANK]** - N° réf.: 06B254975. Contient un support solide sans agent de liaison, formulé à la même concentration en phase solide que l'agent de liaison, dans un tampon au borate avec du chlorure de sodium, un colorant et un agent de conservation. Volume >8 ml/flacon. Un flacon par 100 tube coffret, 2 flacon par 200 tube coffret. **Conservation:** au réfrigérateur entre 2 et 8°C. **Date de péremption:** se reporter à la date indiquée sur le flacon.

31

- Etalons A-F de vitamine B<sub>12</sub>/folates SimuTRAC-SNB [STD 1-6]** La vitamine B<sub>12</sub> (cyanocobalamine) et l'acide folique (PGA) en tampon au borate sont dilués dans de la sérumalbumine\* humaine, du chlorure de sodium, un agent stabilisateur et des agents de conservation. Un flacon par étalon dans chaque coffret. **Conservation:** au réfrigérateur, entre 2 et 8°C; à l'abri de toute lumière intense. **Date de péremption:** se reporter aux dates indiquées sur les flacons.

Etalon	N° référence	Volume	Concentration Vitamine B <sub>12</sub>		Concentration Acide folique	
			pg/ml	pmol/l	ng/ml	nmol/l
A	06B254851	6 ml	0	0	0	0
B	06B254860	3 ml	100	74	1,0	2,3
C	06B254878	3 ml	200	148	2,0	4,5
D	06B254886	3 ml	400	296	4,0	9,1
E	06B254916	3 ml	1000	740	10,0	23
F	06B254924	3 ml	2000	1480	20,0	45

- Agent d'extraction [REAG EXT]** - N° réf. 06B257176. Contient de la soude 1N ainsi qu'un amplificateur d'extraction organique et un colorant jaune. Volume: > 10 ml/flacon. Un flacon par coffret. **Conservation:** au réfrigérateur entre 2 et 8°C. **Date de péremption:** se reporter à la date indiquée sur le flacon.

**MISE EN GARDE:** Eviter tout contact avec les yeux, la peau et les vêtements. Prendre toutes les mesures de sécurité nécessaires lors du pipetage de ce réactif.

**ATTENTION: A MANIPULER COMME AGENT POTENTIELLEMENT INFECTIEUX:** Les matières premières d'origine humaine utilisées pour la fabrication des composants de cette trousses ont été analysées et révélées négatives en antigène HBs, anticorps VIH 1/2 et anticorps VHC lors de tests réalisés avec des réactifs homologues. Toutefois, aucune méthode d'analyse connue ne pouvant garantir l'absence totale d'agents pathogènes dans des produits d'origine humaine, il faut les manipuler comme des agents potentiellement infectieux.

#### ATTENTION: COMPOSANT RADIOACTIF

Ce système de dosage radio-immunologique de MP Biomedicals contient moins de 3 microcuries (111 kilobecquerels) d'Iode 125 et moins de 1,5 microcuries (55,5 kilobecquerels) de Cobalt 57 par flacon de marqueur.

Ce produit radioactif ne peut être reçu, acquis, détenu et utilisé que par des médecins, des laboratoires cliniques ou des hôpitaux pour des analyses cliniques ou de laboratoire *in vitro* qui ne demandent pas l'administration interne ni externe du produit ou des radiations émises par celui-ci à l'homme ou à l'animal. Sa réception, son acquisition, sa détention, son utilisation et sa transmission sont soumises aux réglementations de la législation française.

MP Biomedicals, LLC

32

R

Handwritten signatures and a circular stamp. The stamp contains the text "MP Biomedicals" and "La Cellulaire".



Pour information, nous indiquons ci-après un résumé des réglementations américaines:

- ◆ Ne pas manger, boire, fumer ni se maquiller dans le local où les produits radioactifs sont utilisés.
- ◆ Ne pas se servir de pipettes à aspiration par la bouche pour des solutions radioactives.
- ◆ Eviter tout contact direct avec tout produit radioactif: utiliser des blouses de laboratoire et des gants à usage unique.
- ◆ Tout travail radiologique doit être effectué dans un endroit spécial à l'écart de toute circulation.
- ◆ Les produits radioactifs doivent être stockés dans leur emballage d'origine en un lieu spécifique.
- ◆ Tenir un journal dans lequel on indiquera l'entrée et la sortie de tout produit radioactif.
- ◆ Le matériel de laboratoire et la verrerie qui sont soumis à contamination doivent être tenus à l'écart pour éviter toute contamination croisée par les différents isotopes radioactifs.
- ◆ S'il se produit un débordement de liquide radioactif, procéder immédiatement au nettoyage conformément aux dispositions prévues à cet effet.
- ◆ Tout produit radioactif doit être mis au rebut conformément aux réglementations légales.
- ◆ Les récipients non contaminés peuvent être jetés comme du matériel non radioactif, à condition que les étiquettes et toutes autres marques d'identification soient retirées.

#### Matériel et réactifs nécessaires mais non fournis dans le coffret

1. Tube en verre sous vide, de 5 ou 10 ml, ou tube contenant de l'EDTA, de 7 ou 10 ml.
2. Tubes en polypropylène ou en polystyrène (12 x 75 mm), à usage unique.
3. Portoir pour tubes
4. Pipette semi-automatique (au choix de l'utilisateur), à pointes à usage unique pouvant prélever 100 µl, 200 µl et 1,0 ml.
5. Agitateur Vortex
6. Centrifugeuse pouvant atteindre une force centrifuge d'au moins 1000 x g.
7. Compteur gamma capable de mesurer simultanément ou successivement l'Iode 125 et le Cobalt 57, et disposant de valeurs réglables permettant de séparer les deux spectres de comptage.

#### Matériel et réactifs supplémentaires nécessaires pour le dosage des folates érythrocytaires

1. Acide ascorbique, MP Biomedicals, N° réf. 06B259110.
2. Centrifugeuse pour micro-hématocrite.
3. Tubes capillaires héparinés pour micro-hématocrite.
4. Support utilisé pour l'obturation et le transport des tubes microcapillaires.

#### Prélèvement de l'échantillon

Les échantillons doivent être prélevés chez des individus à jeun, étant donné qu'une absorption alimentaire récente risque d'accroître de façon significative le taux d'acide folique. Le laboratoire doit être informé, le cas échéant, de la présence de radioactivité dans l'échantillon. Les échantillons ne doivent pas être prélevés dans de l'acide ascorbique ni dans du fluorure en concentration élevée, étant donné que ces deux agents semblent détruire la vitamine B<sub>12</sub>.

Ne pas utiliser d'échantillons hémolysés pour des dosages de sérum ou de plasma.

#### 1. Préparation de l'échantillon pour analyse

##### a. Sérum ou plasma

Prélever le sang dans un tube en verre sous vide de 5 ou 10 ml. Si on prélève du sérum, laisser le sang former un caillot à température ambiante dans le tube fermé pendant 30 à 60 mn. Utiliser de l'EDTA si l'on veut faire une analyse sur plasma. Centrifuger pendant 10 minutes et prélever le sérum ou le plasma.

Hémolysat de sang total (pour dosage des folates érythrocytaires).

Prélever le sang dans un tube en verre sous vide de 7 ml contenant de l'EDTA (bouchon lavande).

Mesurer et noter la valeur de l'hématocrite.

Ajouter 100 µl de sang en suspension à 2 ml de solution récente d'acide

ascorbique à 0,2%. La dilution est alors de 1 pour 21. Renverser plusieurs fois pour bien mélanger; éviter la formation de mousse.

Laisser reposer l'hémolysat entre 20 et 25°C pendant 60 à 90 mn avant analyse. Tenir à l'abri de la lumière pendant ce laps de temps.

2. Transport des échantillons: Le sérum et le plasma soigneusement emballés doivent être transportés congelés du départ à l'arrivée.
3. Conservation des échantillons: Avant analyse, conserver les échantillons entre 2 et 8°C. Si l'on doit garder un échantillon plus de 4 heures, il faut le conserver à -20°C minimum. A cette température, les échantillons sont stables pendant 6 à 8 semaines. Ne pas stocker les échantillons dans des congélateurs à dégivrage automatique pour éviter de les soumettre à des cycles de congélation-décongélation.

#### Procédure de dosage

Si le compteur possède deux canaux ou plus, il convient de l'étalonner pour compter l'Iode 125 dans un canal et le Cobalt 57 dans un autre.

Si le compteur n'a qu'un canal, il faut l'étalonner de façon à ce que les différents réglages du compteur permettent de compter un seul isotope à la fois. Dans ce cas, il faudra passer les tubes deux fois: la première fois, le compteur étant réglé pour l'Iode 125, on obtiendra la courbe des folates et les résultats de l'échantillon, et la seconde fois, le compteur étant réglé pour le Cobalt 57, on obtiendra la courbe de la vitamine B<sub>12</sub> et les résultats de l'échantillon.

Tous les réactifs et les échantillons doivent être amenés à température ambiante avant utilisation, mais pour minimiser tout risque de détérioration, éviter de les laisser à cette température plus longtemps que nécessaire. Ne pas mélanger des réactifs provenant de différents coffrets, pour un même dosage.

**ATTENTION:** La vitamine B<sub>12</sub> et les folates sont sensibles à la lumière, et ne doivent être soumis qu'à une lumière diffuse, et ce pendant un laps de temps aussi court que possible.

Dans le protocole suivant, il est conseillé d'effectuer les mesures des étalons en double. Les échantillons des patients doivent être dosés en double, et la préparation de la courbe étalon ainsi que les dosages cliniques doivent se dérouler simultanément. Les sérums de contrôle seront analysés en même temps que les échantillons des patients.

#### Préparation des réactifs

1. Si l'on doit utiliser un flacon de marqueur dans les 30 jours, verser le contenu d'un flacon de DTT dans un flacon de marqueur. Si ce flacon doit servir plus longtemps, suivre les indications données ci-dessous.
2. Il faut ajouter la même quantité de marqueur et de dithiothreitol (DTT) (100 µl de chaque) par tube à doser. Mélanger le marqueur et le dithiothreitol en proportions égales, et utiliser 200 µl/tube. On peut également pipetter séparément le marqueur et le DTT (100 µl/tube), en ajoutant d'abord le marqueur puis le dithiothreitol.

*[Signature]*  
*[Signature]*  
 JAMBOUG  
 ASUC-BANQUE  
 2012

*[Signature]*

**Procédure de dosage**

1. Numéroté 16 tubes pour la courbe étalon. A partir du numéro 17, numéroté deux tubes supplémentaires pour chaque échantillon clinique.
2. Ajouter les étalons et les échantillons cliniques conformément aux indications données dans le tableau suivant.
3. Ajouter 200 µl de solution active de marquage/DTT (réactif 2A) dans chaque tube, y compris les tubes 1 et 2. Agiter les tubes au Vortex.
4. Incuber à température ambiante (18 - 25°C) pendant 15 minutes.
5. Ajouter 100 µl de réactif d'extraction aux tubes 3 - 16 et aux tubes contenant des échantillons. Agiter les tubes au Vortex.
6. Incuber à température ambiante (18 - 25°C) pendant 10 minutes.
7. Bien agiter le flacon de réactif neutre SimuTRAC-SNB. Ajouter 1000 µl de réactif neutre aux tubes 3 et 4.
8. Bien agiter le flacon de réactif de liaison SimuTRAC-SNB. **Attention: Bien agiter.** Ajouter 1000 µl de réactif de liaison aux tubes 5-16 et aux tubes contenant des échantillons. Agiter les tubes au Vortex.
9. Incuber les tubes 3-16 et tous les tubes échantillons à température ambiante (18 - 25°C) pendant 60 minutes à partir du dernier ajout de réactif de liaison. Recouvrir le portoir de papier aluminium pour protéger de la lumière, ou le placer dans un endroit sombre.
10. Centrifuger à au moins 1000 x g pendant 10 minutes, de préférence au frais.
11. Décarter avec précaution, et jeter le surnageant. Retirer la dernière goutte en posant les tubes sur un papier absorbant.
12. Compter la radioactivité dans les pellets et dans les tubes 1 et 2, l'un après l'autre à l'aide d'un compteur gamma. Le nombre de coups total par minutes pour les tubes 1 et 2 doit se situer entre 10 000 et 25 000 pour le Cobalt 57, et entre 15 000 et 35 000 pour l'iodé 125, en fonction de l'appareil et de l'âge du marqueur. On peut utiliser un temps de mesure plus court, à condition que les nombres de coups pour les tubes 1 et 2 soient au moins de 10 000 (nombre de coups total).

**Dosage radio-immunologique SimuTRAC-SNB**

Tubes	Etalons ou éch. (µl)	Solution active marqu. (µl)	Incub.	Solution extract. (µl)	Incub.	Réactif neutre (µl)	Réactif liaison (µl)	Incub.	Centrif.
1, 2	---	200	---	---	---	---	---	---	---
3, 4	200A	200	Incuber tous les tubes à tempér.	100	Incuber tous les tubes à tempér.	1000	---	Incuber tous les tubes à tempér.	Centrif. tous les tubes (sf 1 et 2) à 1000 x g pendant 10 mn
5, 6	200A	200	tous les tubes à tempér. ambiante (18-25°C) pendant 15 mn	100	tous les tubes à tempér. ambiante (18-25°C) pendant 10 mn	---	1000	1000	1000
7, 8	200B	200		100		1000			
9, 10	200C	200	1000	100	1000	---	1000	1000	1000
11, 12	200D	200		100		1000			
13, 14	200E	200		100		1000			
15, 16	200F	200	100	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Ech. clin.	200	200	100	100	1000	---	1000	---	---

Après centrifugation, décanter le surnageant et compter la radioactivité dans les pellets.  
 Faire les calculs.  
 Tracer la courbe étalon et déterminer les résultats des dosages cliniques.  
 moyenne nb/c/mn corrigée tubes 5 et 6

**Calcul des résultats**

1. **Vitamine B<sub>12</sub> et folates sériques ou plasmatiques**  
 La courbe pour la vitamine B<sub>12</sub> et les résultats sont calculés à partir des résultats obtenus par comptage du Cobalt 57; la courbe pour les folates et les résultats sont calculés à partir des valeurs obtenues par comptage de l'iodé 125.
  - a. Faire la moyenne des mesures des tubes 3 et 4, qui sont des tubes "neutres". Soustraire la valeur "neutre" de toutes les autres mesures pour obtenir des mesures corrigées. Utiliser uniquement des mesures corrigées pour les calculs. Remarque: l'unité de temps doit être identique pour tous les tubes.
  - b. Faire la moyenne des mesures corrigées des tubes 1 et 2 pour obtenir le nombre de coups total corrigé pour chaque dosage.
  - c. Diviser la moyenne des mesures corrigées des tubes 5 et 6 par le Nombre de coups total corrigé de façon à obtenir le coefficient de niveau de marquage B<sub>12</sub>; ce coefficient ne doit pas dépasser 36%.
  - d. Diviser les mesures corrigées de chaque tube par la moyenne corrigée des tubes 5 et 6 pour obtenir le pourcentage de niveau de marquage de chaque tube.
  - e. On peut tracer une courbe étalon comme suit: Utiliser du papier logit-log, noter le pourcentage de niveau de marquage par rapport aux valeurs en pg/ml des étalons de vitamine B<sub>12</sub> ou en ng/ml des étalons de folates sur l'échelle logarithmique. On trouvera dans le Tableau 1, des valeurs types de nombres de coups et des pourcentages obtenus par calcul. La courbe étalon tracée à partir de ces données est indiquée en Figure 1. Dans la pratique, il est préférable de tracer chaque courbe étalon sur une feuille différente pour éviter tout risque de confusion.
  - f. La concentration en vitamine B<sub>12</sub> ou en folates dans le sérum ou le plasma est déterminée par extrapolation à partir de la courbe étalon donnant le pourcentage de niveau de marquage par rapport à la valeur en pg/ml de vitamine B<sub>12</sub> ou la valeur en ng/ml de folates (Figure 1).
  - g. Exemple: L'exemple suivant est donné pour un échantillon de B<sub>12</sub>; pour les folates, on suit la même procédure de calcul.

$$\text{Neutre} = \frac{c/mn \text{ tube } 3 + c/mn \text{ tube } 4}{2} = \frac{750 + 728}{2} = 739$$

Nb coups total corrigé

$$= \frac{(c/mn \text{ tube } 1 - \text{neutre}) + (c/mn \text{ tube } 2 - \text{neutre})}{2}$$

$$= \frac{(23\ 319 - 739) + (23\ 716 - 739)}{2} = 22\ 778$$

$$B_{12} = \text{Niveau marquage} = \frac{\text{Moyenne nb c/mn corrigés tubes 5 et 6}}{\text{Nb c/mn total corrigé}} \times 100 = \frac{10\ 632}{22\ 778} \times 100 = 46,7\%$$

*[Handwritten signature and stamp]*

*[Handwritten scribble]*

*[Handwritten scribble]*

*[Handwritten scribble]*

Calcul du % de marquage

$$\text{pour le tube 7: } = \frac{(\text{nb c/mn tube 7} - \text{neutre})}{\text{moyenne nb/c/mn corrigée tubes 5 et 6}} \times 100 = \frac{(9\ 917 - 739)}{10\ 632} \times 100 = 86,2\%$$

Exemple de calcul pour un échantillon clinique:

$$\begin{aligned} \text{Nb c/mn (trouvé)} &= 7\ 324 \\ \text{Neutre} &= 739 \\ \text{\% marquage} &= \frac{7\ 324 - 739}{10\ 632} \times 100 = 61,9\% \end{aligned}$$

La courbe étalon logit-log (Figure 1) indique que 61,9% correspond à une concentration de B<sub>12</sub> de 470 pg/ml.

#### 1. Folates érythrocytaires

- Calculer le pourcentage de marquage de l'hémolysat (Etape A.4.)
- Obtenir la concentration en folates par extrapolation à partir de la courbe étalon (Etape A.6.).
- Multiplier la concentration en folates par 21. (Une dilution de sang total dans un rapport 1 pour 21 a été faite lors de la préparation de l'échantillon). Ceci donne la concentration des folates en ng/ml de sang total.
- Diviser la concentration des folates dans le sang total par l'hématocrite exprimé sous forme décimale. Ceci donne la concentration en folates érythrocytaires en ng/ml.

$$\text{ng/ml érythrocytaire} = \frac{(\text{ng/ml d'hémolysat}) \times 21}{\% \text{ hématocrite} / 100}$$

Exemple de calcul pour folates érythrocytaires

$$\begin{aligned} \text{Nb c/mn (trouvé)} &= 11\ 271 \\ \text{Neutre} &= 1\ 321 \\ \text{\% marquage} &= 56,3 \end{aligned}$$

La courbe étalon logit-log (Figure 1) indique que 56,3% correspond à une concentration en folates de 4,6 ng/ml.

$$\begin{aligned} \text{Hématocrite du patient} &= 42\% \\ \text{ng/ml érythrocytaire} &= \frac{4,6 \times 21}{0,42} = 230 \text{ ng/ml} \end{aligned}$$

La moyenne de cette valeur et de celle du deuxième dosage effectué en double donnera la concentration des folates érythrocytaires en ng/ml de l'échantillon du patient.

37

**Remarque:** En règle générale, il n'est pas nécessaire de corriger les folates sériques plasmatiques étant donné que cette valeur est très faible comparée à celle des folates érythrocytaires. On observe parfois des taux de folates élevés dans le sérum ou dans le plasma. Si la concentration de folates dans le sérum ou le plasma est supérieure à 10% de la concentration en folates érythrocytaires calculée, il convient de procéder à une correction sérique comme suit:

ng/ml érythrocytaire

$$= \frac{(\text{ng/ml} \times 21) - [\text{folates sériques (1-\% hématocrite/100)}]}{\% \text{ hématocrite}/100}$$

Exemple de calcul:

- Concentration en folates sériques ou plasmatiques = 32 ng/ml
- Concentration en folates de l'hémolysat = 3,0 ng/ml
- Hématocrite pour le patient en question = 30%

$$\text{Concentration en folates érythrocytaires non corrigée: } \frac{3,0 \text{ ng/ml} \times 21}{0,30} = 210 \text{ ng/ml}$$

Étant donné que 32 ng/ml est supérieur à 10% de 210 ng/ml la concentration en folates érythrocytaires doit être corrigée comme suit:

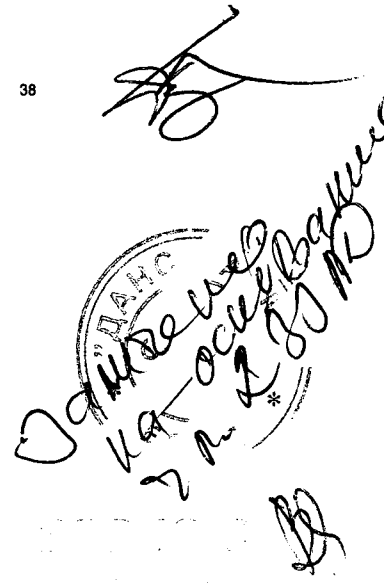
$$\text{ng/ml érythrocytaire corrigé} = \frac{(3,0 \text{ ng/ml} \times 21) - [32 \text{ ng/ml} (1-0,3)]}{0,30}$$

$$\text{folates érythrocytaires corrigées} = 135 \text{ ng/ml}$$

#### Limites de la procédure

- Les méthodes radioimmuno-logiques permettant de doser la vitamine B<sub>12</sub> dans un échantillon clinique peuvent donner, pour certaines populations à risques, des valeurs différentes de celles obtenues lorsqu'on utilise des méthodologies microbiologiques spécifiques, étant donné que chacune a sa propre zone de référence.
- On a parfois constaté des résultats de vitamine B<sub>12</sub> sérique faussés par excès en raison de la présence dans l'échantillon d'anticorps bloquants ou d'agents de liaison endogènes de la vitamine B<sub>12</sub> qui ne sont parfois pas complètement inactivés par les réactifs de dénaturation alcalins<sup>12</sup>. Quoique ce genre de désaccord se présente rarement, s'il se produit, les résultats obtenus avec le "No Boil" doit être interprété avec précaution. Quand c'est approprié, confirmer les résultats du "No Boil" par l'alternatif de la méthodologie du "Boil" (MP Biomedicals N° de référence 06B254819). Lorsque les résultats ne sont pas en accord avec les signes cliniques, il convient de se fier à l'opinion clinique et de demander des analyses supplémentaires.
- L'exactitude des résultats obtenus avec le coffret SimuTRAC dépend de la capacité du compteur gamma à faire la différence entre les désintégrations de l'ode 125 et celles du Cobalt 57. Il faut établir des fenêtres de façon à ce que le Cobalt 57 produise le minimum d'interférence sur le canal prévu pour l'ode 125 et vice-versa.

38



On peut utiliser la méthode suivante pour évaluer les chevauchements.

- a. Régler le compteur gamma pour comptage de l'ode 125.
  1. Mesurer la source d'ode  
 $125 = A$
  2. Mesurer la source de Cobalt 57 avec le réglage lode 125 = B
- b. Régler le compteur gamma pour comptage du Cobalt 57.
  1. Mesurer la source de Cobalt 57 = C
  2. Mesurer la source d'ode 125 avec le réglage Cobalt 57 = D
- c. Calculer le chevauchement:
  1. du Cobalt 57 sur l'ode 125 =  $\frac{B}{C} \times 100$
  2. de l'ode 125 sur le Cobalt 57 =  $\frac{D}{A} \times 100$

Le chevauchement ne doit pas dépasser 3% pour l'un ou l'autre des canaux. Si on détecte un chevauchement supérieur à 3%, le réglage de la fenêtre doit être réduit, sinon il faut appliquer une méthode de correction mathématique. Les sources de Cobalt 57 peuvent être fournies sur demande.

4. Les échantillons cliniques contenant une certaine radioactivité provenant de traitement ou d'études antérieurs risquent d'entraîner des résultats erronés.
5. Il faut être vigilant dans le choix des sérums de contrôle pour folates que l'on trouve dans le commerce. En effet, certains d'entre eux ont été préparés à partir de 5-méthyl-tétrahydrofolate (MFTA) instable, qui entraîne des résultats particulièrement bas. D'autres sérums, préparés à partir d'acide ptéroylglutamique mais analysés à un pH de 7,4 avec des étalons de MTFA se verront attribuer un taux de folates trop élevé par le fabricant. Ces sérums de contrôle donneront un taux de folates inférieur à celui indiqué dans la notice d'emploi.
6. Les valeurs prévues et les zones de normalité déterminées par une méthode donnée ou un calcul donné risquent de ne pas être identiques à celles déterminées par une autre méthode. Il est conseillé d'utiliser à chaque fois la même méthode de réduction des données pour assurer la meilleure précision possible.

Pour tout renseignement, et pour obtenir une assistance technique, s'adresser à MP Biomedicals, Division Diagnostic.

#### Valeurs prévues

Il est conseillé à chaque laboratoire d'établir lui-même ses propres normes pour interpréter ses résultats, mais les zones de normalité indiquées ci-après peuvent servir de guide.

La zone de normalité pour les folates sériques a été déterminée à partir des valeurs centrales obtenues sur 95% d'une population normale, 1,5 - 16,9 ng/ml (3,4 - 38,4 nmol/l). La population normale était constituée de 121 échantillons de sang venant d'être prélevés sur des volontaires considérés comme normaux sur le plan hématologique.

La zone prévue pour les folates érythrocytaires a été déterminée par dosage des hémolyats de sang total de 117 individus considérés comme normaux sur le plan hématologique. 95% des valeurs normales se situaient entre 120 et 860 ng/ml (272 - 1952 nmol/l).

Interprétation	Folates sériques		Folates érythrocytaires	
	ng/ml	(nmol/l)	ng/ml	(nmol/l)
Faible	<1,5	<3,4	<120	<272
Normal	>1,5	>3,4	>120	>272

Pour les valeurs prévues pour la vitamine B<sub>12</sub> sérique (cobalamine "vraie"), deux populations ont été utilisées. La première était constituée de 38 individus souffrant de carences en vitamine B<sub>12</sub>, et dont le diagnostic avait été confirmé, que ce soit des anémies pernicieuses, des lésions gastriques ou intestinales, ou des états pathologiques associés à une carence en vitamine B<sub>12</sub>.

On a utilisé le percentile 99 estimé sur cette population pour définir la limite supérieure de la zone de carence. La seconde population était constituée de 121 hommes et femmes volontaires sains âgés de 19 à 60 ans, ne suivant pas de régime alimentaire particulier. Ces volontaires ont été jugés normaux sur le plan hématologique par rapport aux critères de laboratoire habituels. La zone normale a été définie à partir de 95% des résultats centraux de cette population. La zone d'indétermination a été définie comme étant la zone située entre la zone de carence et la zone de normalité.

Interprétation	Vitamine B <sub>12</sub> pg/ml	Vitamine B <sub>12</sub> (pmol/l)
Faible	<120	<88
Indéterminé	120 - 160	88 - 118
Normal	160 - 970	118 - 716
Elevé	>970	>716

Une étude comparative a mis en parallèle le dosage SimuTRAC-SNB et le dosage microbiologique par *Euglena gracilis*. Ces résultats sont donnés en Figure 2.

Des taux de vitamine B<sub>12</sub> sérique très supérieurs à 1000 pg/ml indiquent soit une affection hépatique, soit un syndrome myéloprolifératif tel que la polyglobulie, la métaplasie myéloïde ou la leucémie myéloïde chronique. Des taux supérieurs à 4000 pg/ml sont rares dans les affections hépatiques, mais sont courants dans les syndromes myéloprolifératifs<sup>13,14</sup>.

#### Caractéristiques et performances spécifiques

##### Exactitude:

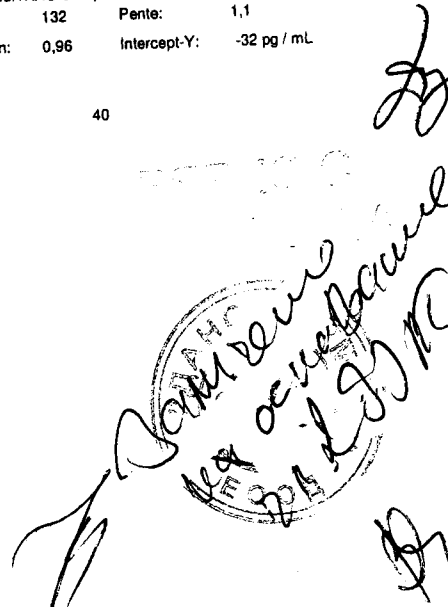
1. La comparaison des résultats obtenus pour la vitamine B<sub>12</sub> avec ce coffret et de ceux obtenus avec le coffret de dosage RIA SimuTRAC-S a donné les résultats d'analyse de régression suivants:

$$(x = \text{SimuTRAC-S}, y = \text{SimuTRAC-SNB})$$

Nombre d'échantillons: 160      Pente: 0,93  
Coefficient de corrélation: 0,98      Intercept-Y: -26 pg / mL

2. La comparaison des résultats obtenus avec le dosage microbiologique avec *Euglena gracilis*<sup>15</sup> a donné les résultats d'analyse de régression suivants (x = dosage microbiologique, y = SimuTRAC-SNB):

Nombre d'échantillons: 132      Pente: 1,1  
Coefficient de corrélation: 0,96      Intercept-Y: -32 pg / mL



3. La comparaison des résultats du folate sérique obtenu avec ce coffret et de ceux obtenus avec le coffret SimulTRAC-S a donné les résultats suivants:

Nombre d'échantillons: 160      Pente: 1,03  
 Coefficient de corrélation: 0,97      Intercept-Y: -0,01 ng / mL

**Précision:**

1. Variation intra-dosage  
 a. Vitamine B<sub>12</sub>

	N	Moyenne pg/ml	Ecart-type	C.V. %
Contrôle 1	20	318	19,5	6,1
Contrôle 2	22	444	14,1	3,2
Contrôle 3	20	593	26,3	4,4
Contrôle 4	20	1203	69	5,7
Pool sérique	20	169	19	11,2

b. Folate

	N	Moyenne ng/ml	Ecart-type	C.V. %
Contrôle 1	20	1,87	0,16	8,6
Contrôle 2	22	2,16	0,15	6,9
Contrôle 3	20	4,89	0,25	5,1
Contrôle 4	20	12,1	0,54	4,5
Pool sérique	20	6,1	0,25	4,1

2. Variation inter-dosages  
 a. Vitamine B<sub>12</sub>

	N	Moyenne pg/ml	Ecart-type	C.V. %
Contrôle 1	35	313	25,6	8,2
Contrôle 2	44	432	27,9	6,4
Contrôle 3	52	555	38	6,8
Contrôle 4	52	1106	47	4,2
Pool sérique	30	151	18,6	12,3

b. Folate

	N	Moyenne ng/ml	Ecart-type	C.V. %
Contrôle 1	35	1,82	0,19	11,7
Contrôle 2	44	1,96	0,16	8,2
Contrôle 3	52	4,50	0,34	7,5
Contrôle 4	52	10,4	1,0	9,6
Pool sérique	30	6,6	0,47	7,1

**Récupération:**

Un échantillon de sérum a été additionné de cyanocobalamine et un autre de MTFA. Le MTFA a été étalonné par spectrophotométrie aux U.V. et ajouté à l'échantillon. On a calculé le pourcentage de récupération selon la formule suivante:

$$\frac{\text{Trouvé} - \text{Endogène}}{\text{Ajouté}} \times 100$$

Vitamine B <sub>12</sub>				MTFA			
Ajoutée	Trouvée	Prévue	% Récupér.	Ajoutée	Trouvée	Prévue	% Récupér.
0	340	---	---	0	0,9	---	---
200	541	540	100	2	3,03	2,9	107
400	763	740	106	4	4,95	4,9	101
1000	1297	1340	96	10	10,66	10,9	98

**Linéarité:**

Un échantillon sérique a été dilué avec l'étalon A pour vérifier la linéarité. La linéarité a été calculée selon la formule suivante:

$$\frac{\text{trouvé/prévu}}{\text{}} \times 100$$

Vitamine B <sub>12</sub>				Folate			
Dilution	Trouvée	Prévue	%	Dilution	Trouvée	Prévue	%
0	398	---	---	0	19,48	---	---
1,33	273	299	91	1,33	14,40	14,61	99
2	195	199	98	2	10,17	9,74	104
4	100	100	101	4	5,49	4,87	113
8	50	50	100	8	2,68	2,44	110

*[Handwritten signature]*  
 "LABCO"  
 [Handwritten text and signatures]

#### Spécificité:

L'acide 5-méthyl-tétrahydrofolique et l'acide pteroylglutamique ont, dans ce dosage, une affinité égale pour le réactif de liaison.

Le facteur intrinsèque de porc utilisé dans ce coffret a été purifié par chromatographie d'affinité et contient moins de 4% de protéine R. La pureté a été définie par rapport aux critères proposés par le National Committee for Clinical Laboratory Standards<sup>16</sup>.

Le facteur intrinsèque du coffret de dosage radio-immunologique SimuTRAC-SNB de MP Biomedicals mesure 10 000 pg/ml de cobinamide comme inférieur à 75 pg/ml lorsqu'on effectue la mesure par rapport à la courbe étalon tracée à partir des étalons de cobalamine. De plus, la liaison de la vitamine B<sub>12</sub> est inhibée à plus de 95% par un anticorps bloquant spécifique anti-FI.

D'autres études ont démontré que lorsqu'on utilisait le coffret SimuTRAC-SNB de MP Biomedicals, la cobinamide (qui est un analogue de la vitamine B<sub>12</sub>) avait une réactivité croisée inférieure à 0,01%.

#### Sensibilité:

La sensibilité définie avec une concentration à 90% du marquage est de 75 pg/ml pour la B<sub>12</sub> et de 0,6 ng/ml pour les folates.

Bibliographie: Voir la indice Références du texte anglais 13.

#### Kit per il Radiodosaggio Simultaneo di Vitamina B<sub>12</sub> [<sup>57</sup>Co] Folato [<sup>125</sup>I] - SimuTRAC-SNB

Per la determinazione quantitativa simultanea della Vitamina B<sub>12</sub> e del Folato in siero o plasma.

#### Generalità e Metodologia di Dosaggio

Le carenze di Vitamina B<sub>12</sub> e Folato costituiscono due delle tre anemie nutrizionali dell'uomo, essendo la terza dovuta a carenze di ferro<sup>1</sup>.

L'insufficienza di folato (acido folico) è presente in circa un terzo delle donne gravide, nella grande maggioranza degli etilisti, nella maggioranza delle persone che rispettano una dieta priva di frutti freschi e vegetali freschi crudi o succhi di frutta, in molte persone presentanti danni strutturali o funzionali a livello del terzo superiore dell'intestino nonché in un certo numero di altre situazioni<sup>2</sup>. La determinazione dei livelli di folato costituisce il mezzo più diretto ed affidabile per rilevare l'esistenza di carenza in folato<sup>3</sup>, e questo test dovrebbe essere eseguito per tutti quei pazienti che presentano anemia megaloblastica, così come per tutti i pazienti che presentano anemia, ipersegmentazione dei nuclei granulocitari e contemporaneamente presentano manifestazioni correlate alla carenza di ferro<sup>4</sup>.

La vitamina B<sub>12</sub> è essenziale per il normale metabolismo dell'acido folico. E' consigliabile determinare la vitamina B<sub>12</sub> e il folato eritrocitario in aggiunta al folato serico al fine di accertare che la diagnosi sia carenza in folato per cui l'idoneo trattamento terapeutico consiste nell'acido folico. Bassi livelli di folato eritrocitario possono inoltre significare che il paziente presenta primariamente carenza in vitamina B<sub>12</sub> bloccando quindi la capacità delle cellule di assorbire il folato nel cui caso la terapia opportuna sarebbe la vitamina B<sub>12</sub> anziché l'acido folico<sup>5</sup>.

Le più frequenti cause di carenza in vitamina B<sub>12</sub> consistono nel danno gastrico, nel danno intestinale, nell'anemia perniciosa e nel vegetarianismo puro. Le uniche sorgenti significative di vitamina B<sub>12</sub> sono di origine animale, quindi una dieta puramente vegetariana può condurre a carenze in vitamina B<sub>12</sub>.

Alterazioni morfologiche delle cellule del sangue associate a carenza in vitamina B<sub>12</sub> sono prodotte anche da carenza in acido folico, quindi la determinazione del livello di cobalamina serica è necessaria per determinare se la megaloblastosi è dovuta a carenza di B<sub>12</sub> o di folato o di entrambe<sup>2,4,6,8</sup>.

#### Principio di Dosaggio

Nel dosaggio per competizione di legame proteico, il legante dovrebbe presentare uguale affinità per la forma standard e per l'analita presente nel campione. La vitamina B<sub>12</sub> o il folato non marcati competono con le forme marcate per il numero limitato di siti sulle proteine leganti specifiche, riducendo quindi la quantità di vitamina B<sub>12</sub> o folato marcati legati. Ne consegue che il livello di radioattività legata è inversamente correlato alla concentrazione nel campione o nello standard.

Nel kit MP Biomedicals SimuTRAC-SNB, i livelli di vitamina B<sub>12</sub> e folato vengono simultaneamente determinati in una singola provetta. I traccianti, le proteine leganti e gli standard sono forniti in forma combinata. L'acido pteroylglutamico (PGA) è impiegato a pH 9,5 come standard e come tracciante per il dosaggio del folato. A questo pH di legame, infatti, sia l'acido 5-metiltetraidrofolico (MTFA) del campione che il PGA degli standard presentano uguale affinità per la proteina legante. I due traccianti, [<sup>57</sup>Co] per la vitamina B<sub>12</sub> e [<sup>125</sup>I] per il folato, emettono ad energie i cui livelli possono essere facilmente distinti in parecchi contatori a due canali del commercio.

Il kit MP Biomedicals SimuTRAC-SNB impiega fattore intrinseco purificato. La proteina R, dotata di alta affinità per gli analoghi della cobalamina (vitamina B<sub>12</sub>) presenti nel plasma umano, è stata rimossa tramite cromatografia d'affinità. Una volta rimossa la proteina R, solo il fattore intrinseco puro è disponibile al legame; grazie alla specificità per la vitamina B<sub>12</sub> che

*[Handwritten signatures and stamps]*  
Stampato in Italia  
2010

il fattore intrinseco presenta, la misura diviene correlata alla concentrazione "vera" di cobalamina<sup>10</sup>, il fattore intrinseco purificato e la proteina legante il folato sono legati covalentemente a un supporto solido. Nel procedimento MP Biomedicals, le proteine endogene leganti vitamina B<sub>12</sub> e folato vengono distrutte dopo incubazione con tracciante/DTT per 15 minuti seguita da estrazione per 10 minuti a pH alcalino (12-13). Ciò consente di evitare il riscaldamento del campione a 100°C.

Al fine di confermare lo stato di carenza in folato, questo kit può anche trovare impiego per la determinazione del folato eritrocitario.

#### Reagenti

Per uso diagnostico *in vitro*

- SimulTRAC-SNB Soluzione di Ditiotretolo, [DTT]** Catalogo n° 06B229253. Contenente ditiotretolo in tampone fosfato con stabilizzante. Volume: >10 ml per flacone. Un flacone per kit da 100 provette, 2 flaconi per kit da 200 provette. **Conservazione:** refrigerare a 2-8°C; mantenere ben chiuso. **Stabilità:** vedi la data di scadenza sul flacone.
- SimulTRAC-SNB Tracciante Vitamina B<sub>12</sub>/Folato, [TRACER]** Catalogo n° 06B257133. Un flacone contiene <1,5 µCi (55,5 kBq) di vitamina B<sub>12</sub> [<sup>57</sup>Co] e <3 µCi (111 kBq) di folato [<sup>125</sup>I] in tampone borato con siero albumina umana\*, destrano, cianuro di potassio, bloccante dei legami endogeni, colorante e conservante. Volume: >10 ml per flacone. Un flacone per kit da 100 provette, 2 flaconi per kit da 200 provette kit. **Conservazione:** refrigerare a 2-8°C. Proteggere dalla luce. **Stabilità:** vedi la data di scadenza sul flacone.
  - Tracciante di lavoro/Soluzione DTT.** Preparazione: aggiungere il contenuto di un flacone di soluzione di ditiotretolo ad un flacone di tracciante vitamina B<sub>12</sub>/folato. Questo volume è sufficiente per l'allestimento di 100 provette. Qualora sia sufficiente una quantità minore di un flacone, diluire una parte di soluzione di ditiotretolo con una parte di tracciante. **Conservazione:** Refrigerare a 2-8°C. Proteggere dalla luce. **Stabilità:** 30 giorni dopo la preparazione.
- SimulTRAC-SNB Legante, [BINDER]** Catalogo n° 06B257150. Contenente proteina legante il folato derivata da latte bovino e fattore intrinseco porcino purificato, legati a supporto solido in tampone borato con cloruro di sodio, colorante e conservante. Volume: >100 ml per flacone. Un flacone per kit da 100 provette, 2 flaconi per kit da 200 provette. Agitare vigorosamente prima dell'uso. **Conservazione:** Refrigerare a 2-8°C. **Stabilità:** vedi la data di scadenza sul flacone.
- SimulTRAC-SNB Reagente per Bianco [REAG BLANK]** Catalogo n° 06B254975. Contenente supporto solido senza proteine leganti, formulato alla stessa concentrazione in fase solida dellegante, in tampone borato con cloruro di sodio, colorante e conservante. Volume: >8 ml per flacone. Un flacone per 100 provette kit, 2 flacone per 200 provette kit. **Conservazione:** Refrigerare a 2-8°C. **Stabilità:** vedi la data di scadenza sul flacone.

45

- SimulTRAC-SNB Vitamina B<sub>12</sub>/Folato Standard A-F, [STD 1-6]** Vitamina B<sub>12</sub> (cianocobalamina) e acido folico (PGA) in tampone borato con siero albumina umana\*, cloruro di sodio, stabilizzante e conservanti. Un flacone di ogni standard per kit. **Conservazione:** refrigerare a 2-8°C. Proteggere dalla luce. **Stabilità:** vedi le date di scadenza sui flaconi.

Standard	Catalogo n°	Volume	Concentrazione Vitamina B <sub>12</sub>		Concentrazione Acido folico	
			pg/ml	pmol/l	ng/ml	nmol/l
A	06B254851	6 ml	0	0	0	0
B	06B254860	3 ml	100	74	1,0	2,3
C	06B254878	3 ml	200	148	2,0	4,5
D	06B254886	3 ml	400	296	4,0	9,1
E	06B254916	3 ml	1000	740	10,0	23
F	06B254924	3 ml	2000	1480	20,0	45

- Reagente Estrattivo, [REAG EXT]** Catalogo n° 06B257176. Contiene idrossido di sodio 1,0N con adiuvante estrattivo e colorante giallo. Volume: >10 ml per flacone. Un flacone per kit. **Conservazione:** Refrigerare a 2-8°C.

**Stabilità:** vedi la data di scadenza sul flacone.

**ATTENZIONE:** evitare contatti con gli occhi, la pelle e gli abiti. Adottare precauzioni cautelative pipettando questo reagente.

**\*ATTENZIONE: MANEGGIARE COME SE FOSSE CAPACE DI TRASMETTERE INFEZIONE.** Il materiale da cui è derivato questo prodotto è stato trovato non reattivo per HBsAg e negativo per l'anticorpo Anti-HIV quando testato con reagenti autorizzati. Nessun test può offrire garanzia che i prodotti derivati da sangue umano non siano infettivi. Fare riferimento alla pubblicazione CDC/NIH sulla Biosicurezza Nei Laboratori di Microbiologia e Biomedica (Pubblicazione HHS n. CDC 84-8395).

#### IMPIEGO DI MATERIALE RADIOATTIVO: AVVERTENZE

L'acquisto, la ricezione, la detenzione, l'uso, il trasferimento e lo smaltimento di materiale radioattivo, sono soggetti ai regolamenti ed ai permessi previsti dalle autorità legislative. Nella manipolazione di sostanze radioattive devono essere osservate le seguenti precauzioni:

Il materiale radioattivo deve essere conservato e manipolato in un'area del laboratorio specificatamente designata a tale uso. L'ambiente di lavoro deve essere ben illuminato e arieggiato. Le superfici di lavoro devono essere non porose in modo da ridurre al minimo la contaminazione dovuta allo spargimento di liquidi radioattivi. Considerata la piccola radioattività contenuta nel flacone del tracciante (circa 1,5 µCi di vitamina B<sub>12</sub> e 3 µCi di folato), l'uso del kit non pone alcun problema di pericolo di radiazioni. Tuttavia per evitare inalazione o ingestione di materiale radioattivo è necessario rispettare le buone norme generali di laboratorio. In particolare si raccomanda di: non pipettare con la bocca soluzioni radioattive; non mangiare, bere, fumare o usare cosmetici nell'area di lavoro designata; pulire immediatamente le superfici di lavoro dei materiali radioattivi eventualmente versati; raccogliere il materiale contaminato solido e liquido in appositi contenitori ed effettuare lo smaltimento secondo le procedure previste; lavarsi accuratamente le mani dopo l'uso di materiale radioattivo.

46

*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*  
 [Circular stamp: LABORATORIO...]  
 [Handwritten date: 21/10/10]

*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*

#### Attrezzature e reagenti richiesti non forniti nel kit

1. Provette ematologiche da 5 o 10 ml o provette ematologiche da 7 o 10 ml con EDTA.
2. Provette di polipropilene o polistirene (12 x 75 mm).
3. Portaprovette.
4. Pipette semiautomatiche in grado di dispensare 100 µl, 200 µl e 1.0 ml.
5. Agitatore tipo VORTEX.
6. Centrifuga in grado di operare ad almeno 1000 x g.
7. Contatore a scintillazione in grado di determinare le radiazioni di  $^{125}\text{I}$  e  $^{57}\text{Co}$  simultaneamente o sequenzialmente munito di dispositivo capace di separare i due spettri di conteggio.

#### Attrezzature e reagenti per il dosaggio del folato eritrocitario

1. Acido ascorbico, MP Biomedicals catalogo n° 06B259110.
2. Centrifuga per microemato-crito tipo.
3. Capillari per microemato-crito eparinati tipo.
4. Pasta per otturazione capillari (tipo).

#### Raccolta dei Campioni

I campioni dovrebbero essere prelevati da soggetti a digiuno poiché l'ingestione recente di cibo può aumentare il livello di acido folico. Il laboratorio dovrebbe essere avvisato della possibile presenza di radioattività nei campioni.

I campioni non dovrebbero essere raccolti in acido ascorbico o in presenza di alte concentrazioni di fluoruro poiché queste due sostanze sembrano distruggere la vitamina B<sub>12</sub>.

Non usare campioni emolizzati.

1. **Preparazione dei campioni per l'analisi**
  - a. Siero o plasma: Raccogliere il sangue in provetta da 5 o 10 ml. Attendere la coagulazione a temperatura ambiente. Usare EDTA qualora si desideri operare su plasma. Centrifugare per 10 minuti e raccogliere il siero o il plasma.
  - b. Emolizzato di sangue intero (per il dosaggio del folato eritrocitario).

Raccogliere il sangue in provetta da 7 ml contenente EDTA.

Determinare e registrare il valore dell'ematocrito.

Aggiungere 100 µl di sospensione di sangue a 2 ml di soluzione di acido ascorbico allo 0,2% (p/v). Ciò corrisponde ad una diluizione 1:21.

Mescolare parecchie volte per inversione; evitare la formazione di schiuma. Mantenere l'emolizzato a 20-25°C per 60-90 minuti prima del dosaggio. Proteggere dalla luce durante questo tempo.

2. **Spedizione dei campioni:** I campioni di siero o plasma devono essere spediti o ricevuti congelati.

3. **Conservazione dei campioni:** La conservazione dei campioni prima dell'analisi può essere effettuata refrigerando a 2-8°C. Se il tempo di attesa prima del dosaggio supera le 4 ore, il campione deve essere conservato ad almeno -20°C. I campioni sono stabili per 6-8 settimane a questa temperatura.

Non conservare i campioni nel congelatore provvisti di sistemi di sbrinamento automatico al fine di evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti.

47

#### Procedimento

Se il contatore dispone di due o più canali, esso dovrebbe essere calibrato per contare lo  $^{125}\text{I}$  in un canale e il  $^{57}\text{Co}$  in un altro canale. Se il contatore dispone di un solo canale, esso dovrebbe essere calibrato in modo da contare un isotopo per volta. In questo ultimo caso, sarà necessario contare le provette due volte, la prima predisponendo il conteggio per lo  $^{125}\text{I}$  ottenendo la curva standard del folato e i dati relativi ai campioni quindi predisponendo il conteggio per il  $^{57}\text{Co}$  così da ottenere la curva standard della vitamina B<sub>12</sub> ed i dati relativi ai campioni.

Tutti i reagenti ed i campioni devono essere portati a temperatura ambiente prima dell'uso ma non devono essere mantenuti a questa temperatura più del tempo necessario. Non usare reagenti diversi da quelli forniti in questo kit.

**ATTENZIONE:** La vitamina B<sub>12</sub> e il folato sono fotosensibili e dovrebbero essere esposti soltanto a luce diffusa per il minor tempo possibile. Si consiglia di coprire il portaprovette sia durante l'estrazione che durante l'incubazione.

Si consiglia di eseguire le analisi in duplicato. L'allestimento delle provette dei campioni e degli standard, così come dei controlli, deve essere effettuato simultaneamente.

#### Preparazione dei reagenti

1. Se un flacone di tracciante si prevede venga utilizzato entro 30 giorni, aggiungere il contenuto di un flacone di DTT ad un flacone di traccianti. Se lo stesso flacone di tracciante si prevede venga utilizzato per un periodo superiore a 30 giorni, attenersi alle istruzioni che seguono.
2. Quantità uguali di tracciante e DTT (100 µl ognuno) sono aggiunte ad ogni provetta. Mescolare tracciante e DTT 1 a 1 e usare 200 µL per provetta. Alternativamente, il tracciante e il DTT possono essere aggiunti separatamente, 100 µl per provetta di ciascuno, pipettando il tracciante per primo.

#### Procedimento di dosaggio

1. Numerare 16 provette per gli standard. Cominciando da 17 numerare due provette per ogni campione.
2. Aggiungere standard e campioni secondo lo schema che segue.
3. Aggiungere 200 µl di soluzione tracciante/DTT (reagente 2A) a tutte le provette incluse le provette dell'Attività Totale (1 e 2). Mescolare.
4. Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente (18 - 25°C).
5. Aggiungere 100 µl di Reagente Estrattivo alle provette 3-16 e a tutte le provette dei campioni. Mescolare.
6. Incubare per 10 minuti a temperatura ambiente (18 - 25°C).
7. Mescolare vigorosamente il flacone di SimulTRAC-SNB reagente per bianco. Aggiungere 1000 µl di reagente per bianco alle provette 3 e 4.
8. Mescolare vigorosamente il flacone di SimulTRAC-SNB Legante. **Attenzione deve essere agitato vigorosamente.** Aggiungere 1000 µl di legante alle provette 5-16 e a tutte le provette dei campioni. Mescolare.
9. Incubare le provette 3-16 e tutte le provette dei campioni a temperatura ambiente (18 - 25°C) per 60 minuti dal momento dell'ultima aggiunta del legante. Coprire i portaprovette con un foglio di alluminio per riparare dalla luce oppure mantenere al buio.
10. Centrifugare ad almeno 1000 x g per 10 minuti, preferibilmente al freddo.
11. Decantare delicatamente e scartare il surrinate. Togliere l'ultima goccia capovolgendo le provette su un foglio di carta da filtro.
12. Determinare la radioattività di tutte le provette in sequenza per un minuto in un contatore gamma. Il conteggio totale per minuto per le provette 1 e 2 per il  $^{57}\text{Co}$  dovrebbe essere compreso fra 10.000 e 25.000; e per  $^{125}\text{I}$  dovrebbe essere compreso fra 15.000 e 35.000 a seconda dello strumento e della freschezza del tracciante. Un

48

The bottom of the page contains several handwritten signatures and a circular stamp. The stamp is partially legible and appears to contain the text 'LABORATORIO' and 'FOLATO'. There are also some faint, illegible markings and another signature to the right.



minore tempo di conteggio può essere usato purchè i conteggi nelle provette 1 e 2 siano almeno 10.000 colpi.

**RADIODOSAGGIO SimulTRAC-SNB**

Provette	Standard o campione (µl)	Soluzione tracciante di lavoro (µl)	Incubazione	Reagente estrattivo (µl)	Incubazione	Reagente per bianco (µl)	Legante (µl)	Incubazione	Centrifugazione
1, 2	---	200	Mescolare.	---	Mescolare	---	---	Mescolare.	Centrifugare tutte le provette
3, 4	200A	200	Incubare	100	Incubare	1000	---	Incubare	la (scatolo 1 e 2) a
5, 6	200A	200	tutte le	100	tutte le	---	1000	tutte le	1000 x g
7, 8	200B	200	provetta a	100	provetta a	---	1000	tem. amb.	per 10
9, 10	200C	200	tem. amb.	100	tem. amb.	---	1000	(18-25°C)	minut.
11, 12	200D	200	(18-25°C)	100	(18-25°C)	---	1000	per 60 min.	
13, 14	200E	200	per 15 min.	100	per 10 min.	---	1000		
15, 16	200F	200		100		---	1000		
Campione	200	200		100		---	1000		

- Dopo la centrifugazione, decantare il surnatante e determinare la radioattività di tutte le provette.
- Procedere al calcolo.
- Tracciare la curva standard e determinare il valore di dosaggio dei campioni.

**Calcolo dei risultati**

**1. Vitamina B<sub>12</sub> e Folato serici o plasmatici**

La curva della vitamina B<sub>12</sub> e i valori sono calcolati sulla base dei dati ottenuti contando [<sup>57</sup>Co]; la curva del Folato e i valori sono calcolati sulla base dei dati ottenuti contando [<sup>125</sup>I].

- Calcolare la media dei conteggi delle provette 3 e 4, provette del "bianco". Sottrarre il bianco da tutti gli altri conteggi così da ottenere i conteggi corretti. Utilizzare soltanto i conteggi corretti nei calcoli. Nota: l'unità di tempo deve essere costante per tutte le provette contate.
- Calcolare la media dei conteggi corretti per le provette così da ottenere "l'Attività Totale".
- Dividere la media dei conteggi corretti delle provette 5 e 6 per l'Attività Totale corretta così da ottenere la capacità legante B<sub>12</sub>. Questo valore dovrebbe essere superiore al 35%.
- Dividere i conteggi corretti di ogni provetta per la media dei conteggi corretti delle provette 5 e 6 così da ottenere la percentuale di legame per ogni provetta.

- La curva standard può essere riportata su grafico come segue: utilizzando un grafico in coordinate logit-log, riportare la percentuale di legame in ordinate in funzione di pg/ml di vitamina B<sub>12</sub> standard o ng/ml di folato standard sulla scala logaritmica. In Tabella 1, è riportata una tabella di dati tipici di conteggio e calcolo. Le curve standard ricavate da questi dati sono illustrate in Figura 1. In pratica, è consigliabile riportare ogni curva standard su un foglio separato al fine di evitare confusione.
- La concentrazione di vitamina B<sub>12</sub> o di folato nel siero o plasma è determinata per interpolazione sulle curve standard dei valori delle percentuali di legame in funzione dei pg/ml di vitamina B<sub>12</sub> o ng/ml di folato (Figura 1).
- Esempio: l'esempio seguente riguarda un campione di vitamina B<sub>12</sub>. Lo stesso procedimento di calcolo deve essere usato nel caso del folato:

$$\text{Bianco} = \frac{\text{cont. prov. 3} + \text{cont. prov. 4}}{2} = \frac{750 + 728}{2} = 739$$

$$\text{Attività Totale corretta} = \frac{(\text{cont. prov. 1} - \text{Bianco}) + (\text{cont. prov. 2} - \text{Bianco})}{2}$$

$$= \frac{(23319 - 739) + (23716 - 739)}{2} = 22778$$

$$\text{Capacità Legante} = \frac{\text{media conteggi corretti provette 5 e 6}}{\text{Attività Totale corretta}} \times 100 = \frac{10632}{22778} \times 100 = 46,7\%$$

$$\text{percentuale di legame (calcolo per la provetta n° 7)} = \frac{\text{cont. prov. 7} - \text{Bianco}}{\text{media conteggi corretti prov. 5 e 6}} \times 100 = \frac{(8914 - 739)}{10632} \times 100 = 86,2\%$$

Esempio di calcolo per un campione:

$$\text{Conteggio (trovato)} = 7324$$

$$\text{Bianco} = 739$$

$$\text{Percentuale di legame} = \frac{7324 - 739}{10632} \times 100 = 61,9\%$$

La curva standard in coordinate logit-log di figura 1 mostra che 61,9% corrisponde ad una concentrazione di vitamina B<sub>12</sub> di 470 pg/ml.

La media fra questo valore ed il valore del duplicato è riportata in termini di concentrazione di vitamina B<sub>12</sub> in pg/ml per il campione.

*[Handwritten signature]*

*[Circular stamp: "LABORATORIO..."]*

*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*

**1. Folato eritrocitario**

- Calcolare la percentuale di legame per l'emolisato (passaggio A-4).
- Calcolare la concentrazione di folato per interpolazione sulla curva standard (passaggio A-6).
- Moltiplicare la concentrazione di folato per 21 (una diluizione 1:21 del sangue intero era stata eseguita durante la preparazione del campione). In questo modo, si ottiene la concentrazione di folato in ng/ml di sangue intero.
- Dividere la concentrazione di folato del sangue intero per l'ematocrito espresso come decimale. Si ottiene così la concentrazione eritrocitaria di folato in ng/ml.

$$\text{ng/ml (concentrazione) eritrocitaria} = \frac{(\text{ng/ml di emolisato}) \times 21}{\% \text{ ematocrito}/100}$$

Esempio di calcolo per il folato eritrocitario:

Conteggio (trovato) = 11271  
 Bianco = 1321  
 Percentuale di legame = 56,3

La curva standard in coordinate logit-log (figura 1) dimostra che 56,3% corrisponde ad una concentrazione di folato di 4,6 ng/ml.

Ematocrito del paziente = 42%  
 ng/ml (concentrazione) =  $\frac{4,6 \times 21}{0,42}$  = 230 ng/ml

La media fra questo valore ed il valore del duplicato è riportata in termini di concentrazione eritrocitaria di folato in ng/ml.

Non è solitamente necessario correggere per il folato serico o plasmatico poiché questo valore è molto piccolo rispetto a quello del folato eritrocitario. Occasionalmente possono presentarsi livelli di folato plasmatico o serico elevati. Se la concentrazione del folato serico o plasmatico è maggiore del 10% del folato eritrocitario è possibile operare la seguente correzione:

$$\text{ng/ml (concentrazione eritrocitaria)} = \frac{(\text{ng/ml} \times 21) - [(\text{folato serico}) (1 - \% \text{ ematocrito}/100)]}{\% \text{ ematocrito}/100}$$

Calcolo per un campione:

- Concentrazione di folato serico o plasmatico = 32 ng/ml
- Concentrazione di folato dell'emolisato = 3,0 ng/ml
- Ematocrito del paziente = 30%
- Concentrazione non corretta di folato eritrocitario:  
 $\frac{3,0 \text{ ng/ml} \times 21}{0,30} = 210 \text{ ng/ml}$

Poiché 32 ng/ml è maggiore del 10% di 210 ng/ml, la concentrazione di folato eritrocitario deve essere corretta come segue:

$$\text{ng/ml (concentrazione eritrocitaria)} = \frac{(3,0 \text{ ng/ml} \times 21) - [32 \text{ ng/ml} (1 - 0,3)]}{0,30}$$

ng/ml (concentrazione eritrocitaria) = 135 ng/ml

**Limitazioni Procedurali**

- Le metodologie di radiodosaggio per la determinazione della vitamina B<sub>12</sub> possono fornire, per popolazioni a rischio, valori diversi dai valori ottenuti impiegando specifiche metodologie microbiologiche, poiché ogni metodo presenta propri range di riferimento.
- Con vari tipi di dosaggi "No Boil" si possono occasionalmente presentare valori falsamente elevati di Vitamina B<sub>12</sub> nel siero.<sup>11,12</sup> È stato riportato che questi risultati possono essere dovuti alla presenza nel campione di anticorpi bloccanti il fattore intrinseco, o di leganti endogeni della Vitamina B<sub>12</sub> che non vengono completamente inattivati dai reagenti basici denaturanti.<sup>12</sup> Sebbene questo tipo di discrepanza appaia raramente, i risultati ottenuti con un kit "No Boil" dovrebbero essere interpretati con cautela; ove necessario, detti risultati possono essere confermati usando un metodo "Boil" (MP Biomedicals Cat.n° 06B-254819). Qualora i risultati risultino in contrasto con il referto clinico, quest'ultimo dovrebbe essere seguito e dovrebbero essere predisposte ulteriori indagini.
- L'appropriato impiego del kit SimulTRAC dipende dalla capacità del contatore gamma di discriminare fra le radiazioni di [<sup>125</sup>I] e di [<sup>57</sup>Co]. Le finestre dovrebbero essere impostate in modo da minimizzare l'interferenza reciproca delle due radiazioni. Al fine di determinare l'interferenza si può usare il seguente metodo:
  - impostare il contatore gamma per il conteggio [<sup>125</sup>I]
    - contare una sorgente [<sup>125</sup>I] = A
    - contare una sorgente [<sup>57</sup>Co] nel canale [<sup>125</sup>I] = B
  - impostare il contatore gamma per il conteggio [<sup>57</sup>Co]
    - contare una sorgente [<sup>57</sup>Co] = C
    - contare una sorgente [<sup>125</sup>I] nel canale [<sup>57</sup>Co] = D
  - calcolare l'interferenza di [<sup>57</sup>Co] su [<sup>125</sup>I]
    - $= \frac{B}{C} \times 100$
    - di [<sup>125</sup>I] su [<sup>57</sup>Co]
      - $= \frac{D}{A} \times 100$
- L'interferenza non dovrebbe superare il 3% per ogni canale. Qualora l'interferenza superi il 3%, le finestre dovrebbero essere ristrette oppure dovrebbe essere applicato un metodo di correzione matematica. A richiesta, sono disponibili sorgenti di [<sup>57</sup>Co].
- Campioni contenenti radioattività residua da trattamenti precedenti possono ingenerare risultati errati.

*[Handwritten signatures and a circular stamp with illegible text are present at the bottom of the page.]*

- La scelta dei sieri di controllo di origine commerciale deve essere molto attenta. Alcuni controlli possono essere stati preparati con 5-metilteetraidrolfolato (MTFA) instabile originando quindi sottostima dei valori. Altri sieri preparati con acido pteroilglutamico ma analizzati a pH 7,4 utilizzando standards MTFA possono originare una sottostima rispetto ai valori indicati dal produttore.
- Valori attesi e sieri di controllo determinati in accordo ad un metodo possono non essere identici a quelli determinati impiegando un metodo alternativo. Si raccomanda attenzione nella scelta del sistema di elaborazione dei dati.

#### Valori Attesi

Ogni laboratorio dovrebbe definire i propri parametri di interpretazione dei risultati in termini di confronto con valori normali.

L'intervallo di normalità per il folato sierico è stato determinato sulla base dei valori ottenuti per una popolazione normale 1,5 - 16,9 ng/ml (3,4 - 38,4 nmol/l) al 95%. I campioni erano stati prelevati a 125 volontari ematologicamente normali secondo criteri laboratoristici standard.

I valori attesi per il folato eritrocitario sono stati determinati dosando emolizzati di sangue intero di 117 soggetti ematologicamente normali. L'intervallo al 95% è risultato: 120 - 860 ng/ml (272 - 1952 nmol/l).

Interpretazione	Folato sierico		Folato eritrocitario	
	ng/ml	(nmol/l)	ng/ml	(nmol/l)
Basso	<1,5	<3,4	<120	<272
Normale	>1,5	>3,4	>120	>272

Per la determinazione dei valori attesi di vitamina B<sub>12</sub> sierica (cobalamina "vera") sono stati studiati due gruppi. Il primo gruppo consisteva in 38 soggetti carenti in vitamina B<sub>12</sub> con diagnosi confermata, includente anemia perniziosa, danno gastrico o intestinale o stati patologici associati a carenza in vitamina B<sub>12</sub>. Il 99° percentile di questo gruppo ha fornito il limite superiore dell'intervallo di carenza. Il secondo gruppo comprendeva 121 volontari sani, maschi e femmine, di età compresa fra 10 e 60 anni con normali abitudini alimentari. Tutti questi soggetti sono risultati ematologicamente normali secondo criteri laboratoristici standard. L'intervallo di normalità è stato definito al 95% dei valori di questo gruppo. L'intervallo di indeterminazione risulta definito come intervallo di valori fra popolazione normale e carente.

Interpretazione	Vitamina B <sub>12</sub> pg/ml	Vitamina B <sub>12</sub> (pmol/l)
Bassa	<120	<88
Indeterminata	120 - 160	88 - 118
Normale	160 - 970	118 - 716
Alta	>970	>716

In un ulteriore studio, i risultati ottenuti tramite dosaggio con SimulTRAC-SNB, sono stati confrontati con i risultati ottenuti tramite dosaggio microbiologico (*Euglena gracilis*). Vedi fig. 2.

Livelli di vitamina B<sub>12</sub> sierica superiori a 1000 pg/ml (738 pmol/l) sono indicativi sia di malattia epatica sia di manifestazioni mieloproliferative quali la policitemia vera, metaplasia mieloide o leucemia granulocitaria. Livelli maggiori di 4000 pg/ml (2952 pmol/l) non sono solitamente imputabili a malattia epatica ma si ritrovano comunemente in caso di disordini mieloproliferativi<sup>1,9,12,14</sup>.

#### Caratteristiche del controllo di qualità

##### Accuratezza:

- Il confronto fra i risultati ottenuti per la vitamina B<sub>12</sub> utilizzando questo kit e il kit SimulTRAC-S ha dato i seguenti risultati:  
x = SimulTRAC-S; y = SimulTRAC-SNB

Numero di campioni = 160      Pendenza = 0.93  
Coefficiente di correlazione = 0.98      Ordinata all'origine = -26 pg/ml

- Il confronto fra i risultati ottenuti con il dosaggio microbiologico (*Euglena gracilis*), ha dato i seguenti risultati: x = dosaggio microbiologico; y = SimulTRAC-SNB

Numero di campioni = 132      Pendenza = 1.1  
Coefficiente di correlazione = 0.96      Ordinata all'origine = -32 pg/ml

- Il confronto fra i risultati ottenuti per il folato sierico con questo kit e quelli ottenuti con il kit SimulTRAC-S ha dato i seguenti risultati:

Numero di campioni = 160      Pendenza = 1.03  
Coefficiente di correlazione = 0.97      Ordinata all'origine = -0.01 ng/ml

##### Preclación:

- Variación "nel saggio"  
a. Vitamina B<sub>12</sub>

	N°	Media pg/ml	D.S.	C.V. %
Controllo 1	20	318	19,5	6,1
Controllo 2	22	444	14,1	3,2
Controllo 3	20	593	26,3	4,4
Controllo 4	20	1203	69	5,7
Pool di sieri	20	169	19	11,2

*[Handwritten signatures and stamps]*

*[Circular stamp: LABORATORIO DI COBALAMINE]*

*[Handwritten signature: Santoro]*

*[Handwritten signature: M. Santoro]*

*[Handwritten signature: M. Santoro]*

*[Handwritten signature: M. Santoro]*

b. Folato

	N°	Media ng/ml	D.S.	C.V. %
Controllo 1	20	1,87	0,16	8,6
Controllo 2	22	2,16	0,15	6,9
Controllo 3	20	4,89	0,25	5,1
Controllo 4	20	12,1	0,54	4,5
Pool di sieri	20	6,1	0,25	4,1

2. Variazione "fra i saggi"

a. Vitamina B<sub>12</sub>

	N°	Media pg/ml	D.S.	C.V. %
Controllo 1	35	313	25,6	8,2
Controllo 2	44	432	27,9	6,4
Controllo 3	52	555	38	6,8
Controllo 4	52	1106	47	4,2
Pool di sieri	30	151	18,6	12,3

b. Folato

	N°	Media ng/ml	D.S.	C.V. %
Controllo 1	35	1,62	0,19	11,7
Controllo 2	44	1,96	0,16	8,2
Controllo 3	52	4,50	0,34	7,5
Controllo 4	52	10,4	1,0	9,6
Pool di sieri	30	6,6	0,47	7,1

Recupero:

Un campione di siero è stato arricchito con cianocobalamina e uno con MTFA. Il MTFA è stato calibrato con spettrofotometria UV e aggiunto al campione. I recuperi sono stati calcolati come:

$$\frac{\text{trovato} - \text{endogeno}}{\text{aggiunto}} \times 100$$

Vitamina B <sub>12</sub>				MTFA			
Aggiunto	Trovato	Atteso	% di Recupero	Aggiunto	Trovato	Atteso	% di Recupero
0	340	---	---	0	0,9	---	---
200	541	540	100	2	3,03	2,9	107
400	763	740	106	4	4,95	4,9	101
1000	1297	1340	96	10	10,66	10,9	98

Linearità:

Il siero di un campione è stato diluito con standard A per verificare la linearità. La linearità è stata così determinata:

$$\text{trovato/atteso} \times 100$$

Vitamina B <sub>12</sub>				Folato			
Diluzione	Trovato	Atteso	%	Diluzione	Trovato	Atteso	%
0	398	---	---	0	19,48	---	---
1,33	273	299	91	1,33	14,40	14,61	99
2	195	199	98	2	10,17	9,74	104
4	100	100	101	4	5,49	4,87	113
8	50	50	100	8	2,68	2,44	110

Specificità:

L'acido 5-metiltetraidrofolico e l'acido pteroilglutamico presentano uguale affinità per il legante in questo dosaggio.

Il fattore intrinseco porcino usato in questo kit è stato purificato tramite cromatografia d'affinità e contiene meno del 4% in proteina R. La purezza è stata stabilita secondo i criteri proposti dal Comitato Nazionale per gli Standard Clinici di Laboratorio<sup>18</sup>.

Il fattore intrinseco nel kit MP Biomedicals SimulTRAC-SNB misura 10.000 pg/ml di cobinamide come meno di 75 pg/ml se letto su una curva di taratura costruita con standard di cobalamina. Inoltre il legame della vitamina B<sub>12</sub> è inibito per più del 95% da anticorpi specifici bloccanti il fattore intrinseco.

Ulteriori studi dimostrano che usando il kit MP Biomedicals SimulTRAC-SNB, la cobinamide (un'analogo della vitamina B<sub>12</sub>) interferisce per meno dello 0,01%.

Sensibilità:

La sensibilità definita come concentrazione al 90% della percentuale di legame è 75 pg/ml per la vitamina B<sub>12</sub> e 0,6 ng/ml per il folato. Bibliografia: Vedere Riferimenti a.

*Handwritten signatures and stamps:*  
 A large signature at the top right.  
 A circular stamp with text: "MP Biomedicals", "VITAMINA B12", "FOLATO", "RIFERIMENTI".  
 Another signature below the stamp.  
 A signature at the bottom right.

## Kit de Radioensayo SimuTRAC-SNB Vitamina B<sub>12</sub> [<sup>57</sup>Co]/Folato [<sup>125</sup>I]

Para determinación cuantitativa simultánea de Vitamina B<sub>12</sub> y Folato en suero y plasma.

### Resumen y explicación de la prueba

Las deficiencias de Vitamina B<sub>12</sub> y folato son dos de las tres anemias humanas nutricionales inequívocas, siendo la tercera, la falta de hierro.

La deficiencia de folato se encuentra presente en aproximadamente la tercera parte de las mujeres embarazadas, la inmensa mayoría de los alcohólicos, la mayor parte de las personas cuya dieta carece de frutas y vegetales crudos o zumos de frutas frescas, en muchas personas con alteraciones funcionales del tercio superior del intestino delgado y en muchas otras situaciones<sup>2</sup>. La determinación de los niveles de folato constituye un medio directo y fiable de descubrir una deficiencia de folato<sup>3</sup>, y es una prueba que debe realizarse a todo paciente de anemia megaloblástica, así como a los que padezcan anemia, hipersegmentación de núcleos granulocíticos y evidencia coincidente de deficiencia férrica<sup>4</sup>.

La vitamina B<sub>12</sub> es esencial para el metabolismo normal del ácido fólico. Se aconseja determinar la vitamina B<sub>12</sub> sérica y folato de los glóbulos rojos, además del folato sérico, para saber si el diagnóstico es una deficiencia de folato, cuyo tratamiento adecuado sería el ácido fólico. Si el folato de los glóbulos rojos es bajo, puede significar también que el paciente tiene una deficiencia primaria de vitamina B<sub>12</sub>, que bloquea la capacidad celular para captar folato, en cuyo caso la terapia adecuada sería la vitamina B<sub>12</sub>, en lugar del ácido fólico<sup>5</sup>.

La deficiencia de vitamina B<sub>12</sub> suele ir asociada frecuentemente a la anemia perniciosa, alteración gástrica e intestinal y vegetarianismo puro. La única fuente de vitamina B<sub>12</sub> en la dieta es de origen animal; por lo tanto, una dieta puramente vegetariana puede producir eventualmente deficiencia de vitamina B<sub>12</sub>.

También hay alteraciones morfológicas de las células sanguíneas asociadas a la deficiencia de vitamina B<sub>12</sub>, que son producidas por deficiencia del ácido fólico, por lo que es preciso determinar el nivel de cobalamina sérica para saber si la megaloblastosis se debe a deficiencia de B<sub>12</sub> o de folato o a ambas<sup>1,4,6,8</sup>.

### Fundamento de la prueba

En la fijación competitiva de proteínas, la que se une debe tener igual afinidad por el estándar y por la sustancia presente en la muestra. La Vitamina B<sub>12</sub> o folato sin marcar compiten con sus equivalentes marcadas por el limitado número de lugares de unión disponibles en su ligadora específica, con lo que se reduce la cantidad ligada de vitamina B<sub>12</sub> o folato marcados. Por lo tanto, el nivel de radiactividad ligada es inversamente proporcional a la concentración en la muestra de paciente o el estándar.

En el Kit para Radioensayo SimuTRAC-SNB de MP Biomedicals, se determinan simultáneamente los niveles de vitamina B<sub>12</sub> y folato, en un único tubo. Los trazadores de vitamina B<sub>12</sub> y folato, los fijadores y estándares se suministran en forma combinada. El folato (como ácido pteroilglutámico-PGA) se utiliza como estándar y trazador en una mezcla de incubación a pH 9,5. A ese pH de fijación tanto el ácido metiltetrahidrofólico (MTFA) en la muestra del paciente, como el PGA de los estándares tienen una afinidad igual por el fijador de la leche. Los dos trazadores [<sup>57</sup>Co] para la vitamina B<sub>12</sub> y [<sup>125</sup>I] para el folato, producen niveles de energía fácilmente separables por muchos contadores comerciales de 2 canales.

El kit SimuTRAC-SNB de MP Biomedicals utiliza factor intrínseco purificado. La proteína R, que tiene una gran afinidad por los análogos de cobalamina (vitamina B<sub>12</sub>) del plasma humano, se ha eliminado físicamente por cromatografía de afinidad; de ese modo ya sólo queda disponible para fijación el factor intrínseco purificado. Y, como es específico para la cobalamina, se determina el valor "real" de cobalamina<sup>9,10</sup>. Tanto el factor intrínseco purificado como el folato fijador se han unido de forma covalente a un soporte sólido.

En este método de MP Biomedicals se destruyen los fijadores séricos endógenos de vitamina B<sub>12</sub> y folato, después de incubar con trazador/DTT durante 15 minutos y realizar a continuación una extracción de 10 minutos a pH alcalino<sup>12,13</sup>. Con esto se evita el tener que calentar la muestra a 100°C.

Para confirmar la deficiencia de folato, este kit puede utilizarse también para medir el folato de los glóbulos rojos.

### Reactivos

Para uso diagnóstico *in vitro*

- Solución de Dilitreitolo SimuTRAC-SNB, [DTT]** N°. de Catálogo 06B229253. Contiene Dilitreitolo en tampón fosfato con estabilizador. >10 ml por vial. 1 vial/100 tubo kit, 2 vials/200 tubo kit. **Conservación:** Refrigerar a 2-8°C; mantenerlo bien cerrado. **Estabilidad:** Consultar la fecha de caducidad en el vial.
- Trazador SimuTRAC-SNB Vitamina B<sub>12</sub>/Folato [<sup>125</sup>I] TRACER** N°. de Catálogo 06B257133. Un frasco contiene < 1,5 µCi (55,5 kBq) [<sup>57</sup>Co] Vitamina B<sub>12</sub> y < 3 µCi (111 kBq) [<sup>125</sup>I] folato en tampón borato con sero-albúmina humana\*, dextrano, cianuro potásico, bloqueante de fijador endógeno, colorante y conservante. **Volumen:** >10 ml/frasco. 1 frasco/100 tubo kit, 2 frasco/200 tubo kit. **Conservación:** Refrigerar a 2-8°C; proteger de la luz fuerte. **Estabilidad:** Consultar la fecha de caducidad en el frasco.
  - Solución de Uso Trazador/DTT Preparación:** Añadir el contenido de un vial de Solución de Dilitreitolo a un frasco de trazador de Vitamina B<sub>12</sub>/Folato. Este volumen es suficiente para 100 tubos. Si no se puede utilizar el contenido completo de un frasco de trazador en los 30 días siguientes a la adición del DTT, diluir una parte de Solución de Dilitreitolo con una parte de trazador. **Conservación:** Refrigerar a 2-8°C; proteger de la luz intensa. **Estabilidad:** 30 días, después de la preparación.
- Fijador SimuTRAC-SNB, [BINDER]** N°. de Catálogo 06B257150. Contiene fijador de folato purificado obtenido de leche bovina y factor intrínseco porcino purificado, ligado a un soporte sólido en tampón borato con cloruro sódico, colorante y conservante. **Volumen:** 1 frasco/kit 100 tubos, 2 vials/kit 200 tubos. **Conservación:** Refrigerar a 2-8°C. **Estabilidad:** Consultar la fecha de caducidad del frasco.
- Reactivo Blanco SimuTRAC-SNB, [REAG BLANK]** N°. de Catálogo 06B254975, contiene soporte sólido sin fijador formulado a la misma concentración de fase sólida que el fijador, en tampón borato con cloruro sódico, colorante y conservante. **Volumen:** >8 ml/vial. 1 vial/kit 100 tubos, 2 vials/kit 200 tubos. **Conservación:** Refrigerar a 2-8°C. **Estabilidad:** Consultar la fecha de caducidad del vial.
- Estándares A-F SimuTRAC-SNB Vitamina B<sub>12</sub>/Folato, Vitamina B<sub>12</sub> [STD 1-6]** (cianocobalamina) y Acido Fólico (PGA) en tampón borato con sero-albúmina humana\*, cloruro sódico, estabilizador y conservantes. 1 vial de cada standard/kit. **Conservación:** Refrigerar a 2-8°C; proteger de la luz intensa. **Estabilidad:** Consultar la fecha de caducidad en los viales.

Sanitizado  
por el personal  
a 20/01/10

Estándar	N° Catálogo	Volumen	Concentración Vitamina B <sub>12</sub>		Concentración Fólico	
			pg/ml	pmol/l	ng/ml	nmol/l
A	06B254851	6 ml	0	0	0	0
B	06B254860	3 ml	100	74	1,0	2,3
C	06B254878	3 ml	200	148	2,0	4,5
D	06B254886	3 ml	400	296	4,0	9,1
E	06B254916	3 ml	1000	740	10,0	23
F	06B254924	3 ml	2000	1480	20,0	45

6. Reactivo Extractor, [REAG] [EXT] N°. de Catálogo 06B257176, contiene hidróxido sódico 1,0N con potenciador orgánico de la extracción y colorante amarillo. Volumen: >10 ml/vial. 1 vial/kit. Conservación: Refrigerar a 2-8°C. Estabilidad: Consultar la fecha de caducidad en el vial.

**PRECAUCIÓN:** Evitar el contacto con los ojos, la piel y la ropa. Tomar las precauciones de seguridad apropiadas, al pipetear este reactivo.

**\*PRECAUCIÓN: MANIPULAR COMO POSIBLE TRANSMISOR DE INFECCIONES:** El material original del que se ha obtenido este producto no reaccionaba frente a HBsAg y era negativo en anticuerpos anti-HIV cuando se analizó con reactivos autorizados. No se conoce ningún método que asegure que los productos derivados de sangre humana no sean infecciosos. Consultar CDC/NIH, Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (Publicación HHS N° CDC 84-8395).

**ADVERTENCIA: CONTIENE MATERIAL RADIATIVO**

Este Kit para Radioensayo de MP Biomedicals contiene <3 microcurios (111 kBq) de [<sup>125</sup>I] y <1,5 microcurios (55,5 kBq) de [<sup>57</sup>Co] por vial de trazador. Este material radiactivo sólo pueden recibirlo, adquirirlo, poseerlo y utilizarlo los médicos, laboratorios clínicos u hospitales, y solamente para pruebas clínicas o de laboratorio in vitro, que no impliquen la administración interna o externa del producto, o de sus radiaciones, a los seres humanos o animales. Su recepción, adquisición, posesión, utilización y transferencia, están sometidas a las normas y regulaciones de la legislación española.

MP Biomedicals, LLC

El cumplimiento de las normas básicas para seguridad de las radiaciones proporcionará una protección adecuada. Dichas normas pueden obtenerse de la junta de Seguridad Nuclear, Madrid. A continuación recogemos un resumen del mismo:

♦ No comer, beber, fumar o aplicarse cosméticos donde se utilicen materiales radiactivos. ♦ No pipetear soluciones radiactivas oralmente. ♦ Evitar el contacto directo con todo material radiactivo, utilizando artículos protectores tales como batas de laboratorio y guantes desechables. ♦ Todo trabajo radiológico se realizará en zonas especiales, que no sean de paso. ♦ Los materiales radiactivos deben almacenarse en sus envases originales en una zona especial. ♦ Debe llevarse un libro de registro con las entradas y salidas originales de material radiactivo. ♦ El equipo de laboratorio y material de vidrio, sometido a contaminación, debe estar separado de forma que se evite la contaminación cruzada de diferentes radioisótopos. Cualquier posible contaminación por material radiactivo se tratará inmediatamente según los métodos establecidos. ♦ El material radiactivo será eliminado de acuerdo con las normas y regulaciones de las agencias que tengan jurisdicción sobre el laboratorio. ♦ Los envases no contaminados se desecharán junto con el material no radiactivo, después de destruir sus etiquetas.

**Equipo y reactivos necesarios pero no suministrados con el kit:**

1. Tubo de Vidrio con vacío de 5 ó 10 ml; o Tubo de Vidrio con vacío con EDTA, de 7 ó 10 ml.

59

2. Tubos de polipropileno o poliestireno (12 x 75 mm), desechables.
3. Gradilla para tubos.
4. Cualquier tipo de pipeta semiautomática con puntas desechables y capacidad de 100 µl, 200 µl y 1,0 ml.
5. Agitador Vortex.
6. Centrifuga capaz de alcanzar un RCF de 1000 x g como mínimo.
7. Contador gamma para medir [<sup>125</sup>I] y [<sup>57</sup>Co] simultánea o secuencialmente con contador ajustable, capaz de separar los 2 espectros de recuento.

**Equipo y reactivos necesarios para el ensayo del folato Intraeritrocitario**

1. Acido ascórbico, MP Biomedicals N° de Catálogo 06B259110.
2. Centrifuga Micro-Hematocrito.
3. Tubos capilares Micro-Hematocrito/ Heparinizados.
4. Soporte para cerrar y transportar tubos microcapilares.

**Obtención de muestras**

Las muestras se deben obtener estando los pacientes en ayunas, ya que la ingestión reciente de alimentos puede incrementar de modo apreciable el nivel de ácido fólico. Debe advertirse al laboratorio de la posible radiactividad de la muestra.

Las muestras no se deben recoger en ácido ascórbico o concentraciones altas de fluoruros, porque parece que cualquiera de esos reactivos destruye la Vitamina B<sub>12</sub>.

No utilizar muestras hemolizadas en los análisis de suero o plasma.

1. Preparación de muestras para análisis
  - a. Suero o plasma

Recoger la sangre en un Tubo de Vidrio con vacío de 5 ó 10 ml. Si se recoge suero, dejar que la sangre se coagule a temperatura ambiente en el tubo cerrado durante 30-60 minutos. Utilizar EDTA si de desea analizar plasma. Centrifugar durante 10 minutos y recoger el suero o plasma.

2. Hemolizado de sangre completa (para ensayo de folato de eritrocitos). Recoger la sangre en un Tubo de Vidrio con vacío de que contenga EDTA (tapón azul-lavanda). Determinar y registrar el valor de hematocrito. Añadir 100 µl de sangre bien suspendida a 2 ml de solución de ácido ascórbico al 0,2% recién preparada (p/v). Esta es una dilución al 1:21. Mezclar por inversión varias veces; evitar la formación de espuma. Dejar reposar el hemolizado durante 60 a 90 minutos a 20-25°C, antes del ensayo. Protegerlo de la luz durante ese tiempo.

- a. **Traslado de muestras:** El suero y plasma, envasados cuidadosamente, deben enviarse y recibirse congelados.
- b. **Conservación de las muestras:** Conservarlas antes de su análisis a 2-8°C. Si se espera que ese período superará las 4 horas, deben mantenerse a -20°C o menos. Las muestras son estables a esa temperatura durante 6-8 semanas. No conservarlas en congeladores con ciclo automático de descongelación para evitar la congelación y descongelación repetidas.

60

*[Handwritten signature]*

*[Circular stamp: LABORATORIO DE ANALISIS CLINICOS]*

*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*

**Procedimiento**

Si el contador tiene dos o más canales, debe calibrarse para que cuente [<sup>125</sup>I] en un canal y [<sup>57</sup>Co] en otro. Si sólo tiene un canal, debe calibrarse de modo que los diferentes ajustes del contador cuenten un isótopo cada vez. En este último caso será necesario contar los tubos dos veces, una ajustándolo para [<sup>125</sup>I], y obteniendo la curva de folato y datos de las muestras. el contador para [<sup>57</sup>Co], obteniendo la curva de vitamina B<sub>12</sub> y datos de las muestras.

Todos los reactivos y muestras deben llevarse a temperatura ambiente antes de usarlos, pero no se dejarán a esa temperatura más tiempo del necesario. No utilizar reactivos distintos a los que lleva este kit.

**PRECAUCIÓN:** La vitamina B<sub>12</sub> y los folatos son sensibles a la luz y deben exponerse solamente a la luz difusa, durante el menor tiempo posible. Es aconsejable tapar la gradilla de tubos de ensayo durante los pasos de extracción y fijación.

En el protocolo siguiente se recomienda analizar por duplicado los puntos de nivel de los estándares. Las muestras de pacientes deben analizarse por duplicado y la preparación de la curva patrón y las determinaciones clínicas deben ser simultáneas. Los sueros control deben analizarse a la vez que las muestras del paciente.

**Preparación de reactivos**

1. Si se puede utilizar un vial de marcador en 30 días, añadir el contenido de un vial de DTT a uno de marcador. Si se va a utilizar durante períodos superiores a 30 días, seguir las instrucciones que se dan a continuación.
2. Se añaden cantidades iguales (de 100 µl cada una) de marcador y ditiotreitól (DTT) por tubo de ensayo. Mezclar marcador y ditiotreitól 1:1 y usar 200 µl/tubo. Alternativamente, se puede pipetear separadamente el marcador y DTT, 100 µl/tubo de cada, pipeteando primero el marcador y luego el DTT.

**Procedimiento del ensayo**

1. Numerar 16 tubos para los estándares. Numerar 2 tubos para cada muestra clínica, empezando por el 17.
2. Añadir estándares y muestras clínicas de acuerdo con el esquema que sigue.
3. Añadir 200 µl de Solución de Uso Trazador/DTT (Reactivo 2A) a todos los tubos incluyendo los de recuento total (1 y 2). Vortex.
4. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente (18 - 25°C).
5. Añadir 100 µl de Reactivo Extractor a los tubos 3-16 y a todos los de muestra. Vortex.
6. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente (18 - 25°C).
7. Mezclar bien el frasco de Reactivo Blanco SimulTRAC-SNB. Añadir 1000 µl de reactivo blanco a los tubos 3 y 4.
8. Mezclar bien el vial de fijador SimulTRAC-SNB. **Precaución: debere ser agitado vigorosamente.** Añadir 1000 µl de fijador a los tubos 5-16 y a todos los tubos de muestra. Vortex.
9. Incubar los tubos 3-16 y todas las muestras a temperatura ambiente (18 - 25°C) durante 60 minutos, desde el momento de la última adición del fijador. Cubrir la gradilla de los tubos con papel de aluminio para protegerlos de la luz, o mantenerlos en un sitio oscuro. Centrifugar a un mínimo de 1000 x g durante 10 minutos, preferentemente en frío.
10. Decantar con cuidado y desechar cada sobrenadante. Eliminar la última gota, tocando el tubo con papel absorbente o una toalla de papel.
- 11.

12. Contar la radiactividad en los sedimentos y en los tubos 1 y 2, consecutivamente, durante 1 minuto, con un contador gamma. Las cuentas totales por minuto en los tubos 1 y 2 para [<sup>125</sup>I] deben estar entre 10.000 y 25.000 y para el [<sup>57</sup>Co] entre 15.000 y 35.000, dependiendo del instrumento y de la edad del trazador. Puede utilizarse un tiempo de recuento más corto, si las cuentas en los tubos 1 y 2 son 10.000 como mínimo (cuenta total).

**Radioensayo SimulTRAC-SNB**

Tubo	Estándar o Muestra (µl)	Solución de uso del trazador (µl)	Incubar	Reactivo extractor (µl)	Incubar	Reactivo blanco (µl)	Fijador (µl)	Incubar	Centrifugar
1, 2	---	200	Vortex.	---	Vortex.	---	---	Vortex.	Centrifugar
3, 4	200A	200	Incubar todos los tubos 15 min a t° ambiente (18 - 25°C)	100	Incubar todos los tubos 10 min a t° ambiente (18 - 25°C)	1000	---	Incubar todos los tubos a t° ambiente (18 - 25°C) durante 60 min.	todos los tubos (excepto 1 y 2) a 1000 g durante 10 min.
5, 6	200B	200		100		---	---		
7, 8	200C	200		100		---	---		
9, 10	200D	200		100		---	---		
11, 12	200E	200		100		---	---		
13, 14	200F	200		100		---	---		
15, 16						---	---		
Muestras de pacientes	200	200		100		---	1000		

Después de centrifugar, decantar los sobrenadantes y contar la radiactividad de los "sedimentos". Calcular. Trazar la curva estándar y determinar los valores del ensayo.

**Cálculo de Resultados**

**1. Vitamina B<sub>12</sub> y Folato en Suero y Plasma**

- Se calculan la curva y valores de vitamina B<sub>12</sub> a partir de los datos obtenidos del recuento de [<sup>57</sup>Co]; la curva y valores de folato se calculan a partir del recuento de [<sup>125</sup>I].
- a. Para obtener las cuentas corregidas, promediar las obtenidas en los tubos 3 y 4 y los "Blancos". Sustraer el "Blanco" de todos los demás recuentos. Utilizar sólo valores corregidos para los cálculos. **Note:** La unidad de tiempo debe ser constante para todos los tubos contados.
  - b. Promediar los recuentos de los tubos 1 y 2 para obtener las cuentas totales corregidas por ensayo.
  - c. Dividir el promedio de las cuentas corregidas para los tubos 5 y 6 por las cuentas totales corregidas, para obtener la fijación del trazador B<sub>12</sub>. Este valor debe ser superior al 35%.
  - d. Dividir las cuentas corregidas para cada tubo por las cuentas corregidas promedio para los tubos 5 y 6 y se obtendrá el % de fijación del trazador para cada tubo. Se puede trazar la curva estándar de este modo: Utilizando papel logit-log, poner en ordenadas el % de fijación del trazador frente a los pg/ml de vitamina B<sub>12</sub> o ng/ml de Folato estándar en la escala log. En la Tabla 1, se muestran unos datos típicos de recuento y el % calculado de fijación del trazador y en la Fig. 1, las curvas patrón trazadas con esos datos. En la práctica es aconsejable trazar cada curva patrón en una hoja aparte para evitar posibles confusiones.
  - e. La concentración de vitamina B<sub>12</sub> o folato en suero o plasma se determina por interpolación en la curva patrón del % de fijación del trazador frente a pg/ml de vitamina B<sub>12</sub> o ng/ml del folato (Figura 1).  
Ejemplo: El ejemplo siguiente es para una muestra de B<sub>12</sub>. Para el folato se utiliza el mismo sistema de cálculos.

$$\text{Blanco} = \frac{\text{cuentas tubo 3} + \text{cuentas tubo 4}}{2} = \frac{750 + 728}{2} = 739$$

*[Handwritten signatures and notes at the bottom of the page, including a large signature and a circular stamp with text.]*

$$\begin{aligned} \text{Cuentas totales corregidas} &= \frac{(\text{cuentas tubo 1-Blanco}) + (\text{cuentas tubo 2-Blanco})}{2} \\ &= \frac{(23319 - 739) + (23716 - 739)}{2} = 22778 \end{aligned}$$

$$B_6 = \text{Fijación del trazador} = \frac{\text{cuentas promedio corregidas para tubos 5 y 6} \times 100 - 10632 \times 100}{\text{cuentas totales corregidas} \times 100} = 46,7\%$$

Cálculo % de Fijación del

$$\text{trazador para el tubo 7} = \frac{(\text{cuentas tubo 7 - blanco}) \times 100 - (9914 - 739) \times 100}{\text{cuentas promedio corregidas para tubos 5 y 6} \times 100} = 86,2\%$$

Cálculo para una muestra de paciente

$$\begin{aligned} \text{cuentas halladas} &= 7324 \\ \text{Blanco} &= 739 \\ \% \text{ fijación del trazador} &= \frac{7324 - 739}{10632} \times 100 = 61,9\% \end{aligned}$$

La curva Estándar logit-log (Figura 1) muestra que el 61,9% corresponde a una concentración de 470 pg/ml de B<sub>12</sub>.

El promedio de este valor y el de la determinación duplicada se considera como la concentración de B<sub>12</sub> en pg/ml para la muestra del paciente.

#### 1. Folato Intraeritrocitario

- Calcular el % de fijación del trazador para el hemolizado (Paso A-4).
- Obtener la concentración de folato, interpolando en la Curva Patrón (Paso A-6).
- Multiplicar la concentración de folato por 21. (Al preparar la muestra se hizo una dilución 1:21 de sangre completa). Así se obtiene la concentración de folato en ng/ml de sangre completa.

63

- Dividir la concentración de folato de la sangre completa por el hematocrito expresado con decimal. Así se obtiene la concentración de folato en ng/ml del paquete de eritrocitos.

$$\begin{aligned} \text{ng/ml del paquete de glóbulos rojos} &= \frac{(\text{ng/ml de hemolizado}) \times 21}{\% \text{ hematocrito}/100} \end{aligned}$$

Cálculo del Folato intraeritrocitario en la muestra:

$$\begin{aligned} \text{Cuentas halladas} &= 11271 \\ \text{Blanco} &= 1321 \\ \% \text{ de Fijación del trazador} &= 56,3 \end{aligned}$$

La Curva Estándar logit-log (Figura 1) muestra que un 56,3% corresponde a una concentración de folato de 4,6 ng/ml.

$$\begin{aligned} \text{Hematocrito del paciente} &= 42\% \\ \text{ng/ml del paquete de glóbulos rojos} &= \frac{4,6 \times 21}{0,42} = 230 \text{ ng/ml} \end{aligned}$$

El promedio de este valor y el de la determinación duplicada se considera como la concentración del folato intraeritrocitario en ng/ml para la muestra del paciente.

**Note:** No es necesario corregir rutinariamente el folato del suero/plasma porque este valor es muy pequeño en comparación con el del folato intraeritrocitario. Ocasionalmente se darán niveles altos de folato en suero o plasma. Si fuera superior al 10% del folato intraeritrocitario calculado, se hará una corrección del suero, como sigue:

ng/ml del paquete de glóbulos rojos

$$= \frac{(\text{ng/ml} \times 21) - ((\text{folato sérico}) \times (1 - \% \text{ hematocrito}/100))}{\% \text{ hematocrito}/100}$$

Cálculo ejemplo

- Concentración de folato en suero o plasma = 32 ng/ml
- Concentración de folato del hemolizado = 3,0 ng/ml
- Hematocrito para este paciente = 30%
- Concentración del folato intraeritrocitario sin corregir:

$$\frac{3,0 \text{ ng/ml} \times 21}{0,30} = 210 \text{ ng/ml}$$

64

Handwritten signature and a circular stamp with illegible text. There are also other handwritten marks and scribbles on the page.



Como 32 ng/ml es mayor del 10% de 210 ng/ml, hay que corregir la concentración del folato intraeritrocitario como sigue:

$$\text{ng/ml del paquete de eritrocitos corregido} = \frac{(3,0 \text{ ng/ml} \times 21) - [(32 \text{ ng/ml}) \times (1-0,3)]}{0,30}$$

folato eritrocitos corregido = 135 ng/ml

**Limitaciones del Procedimiento**

1. Las metodologías de radioensayo para determinar el contenido de vitamina B<sub>12</sub> en muestras de pacientes pueden proporcionar valores para poblaciones de riesgo diferentes de los que se obtienen con métodos microbiológicos específicos, ya que cada uno tiene sus propias gamas de referencia.
  2. En ocasiones se han obtenido resultados de vitamina B<sub>12</sub> en suero demasiado elevados, debido a la presencia de anticuerpos bloqueantes o fijadores endógenos de vitamina B<sub>12</sub> en la muestra, que pueden no haberse in-activado totalmente con los reactivos alcalinos desnaturalizantes<sup>12</sup>. A pesar que esta diferencia parece ser rara, resultados de esta magnitud obtenidos con el método de "No Hervir" como alternativa (MP Biomedicals Catalog No.: 06B254819). Cuando los resultados estén en desacuerdo con los datos o impresiones clínicas, debe aplicarse un criterio clínico y realizar una valoración adicional.
  3. La precisión del kit SimuTRAC depende de la capacidad del contador gamma para discriminar entre desintegraciones de <sup>57</sup>Co y <sup>125</sup>I. Deben ajustarse ventanas para que las interferencias de <sup>57</sup>Co en el canal de <sup>125</sup>I y a la inversa, sean mínimas. Este método sirve para determinar el "solapamiento"
    - a. Ajustar el contador gamma para <sup>125</sup>I
      1. Contar fuente <sup>125</sup>I = A
      2. Contar fuente <sup>57</sup>Co en ajuste <sup>125</sup>I = B
    - b. Ajustar el contador gamma para <sup>57</sup>Co
      1. Contar fuente <sup>57</sup>Co = C
      2. Contar fuente <sup>125</sup>I en ajuste <sup>57</sup>Co = D
    - c. Calcular el "solapamiento":
      1. De <sup>57</sup>Co en <sup>125</sup>I
 
$$= \frac{B}{C} \times 100$$
      2. De <sup>125</sup>I en <sup>57</sup>Co
 
$$= \frac{D}{A} \times 100$$
- El "solapamiento" no debe exceder del 3% para ninguno de los 2 canales. Si se detectara más del 3%, debe estrecharse el ajuste de ventana o aplicar un método matemático de corrección. Si se solicitan, se pueden suministrar fuentes de <sup>57</sup>Co.
4. Las muestras clínicas que contengan radiactividad procedente de tratamientos o estudios anteriores pueden conducir a resultados erróneos.

5. Hay que tener precaución al seleccionar los sueros comerciales testigos de folato. Algunos pueden haber sido preparados con 5-metilteetrahidrofolato (MTFA) y se obtendrán valores inesperadamente bajos. Otros sueros preparados con ácido pteroil-glutámico, pero analizados a pH 7,4 con estándares de MFTA, el fabricante les asignará un valor de folato demasiado alto. Esos sueros testigo darán un valor de folato inferior al indicado en sus folletos de instrucciones.
6. Los valores esperados y las gamas de control determinados por un método de cálculo pueden no ser idénticos a los obtenidos con otro método.

Se recomienda utilizar un método de reducción de datos, para mayor precisión.

**Valores esperados**

Cada laboratorio debe definir su modo particular de interpretar los resultados, pero pueden servir de guía las gamas siguientes.

La gama normal para folato sérico se determinó a partir de los valores obtenidos del 95% central de una población normal, 1,5-16,9 ng/ml (3,4 -38,4 nmol/l). La población normal constaba de 121 muestras recién obtenidas de voluntarios considerados hematológicamente normales sobre la base de criterios de laboratorio.

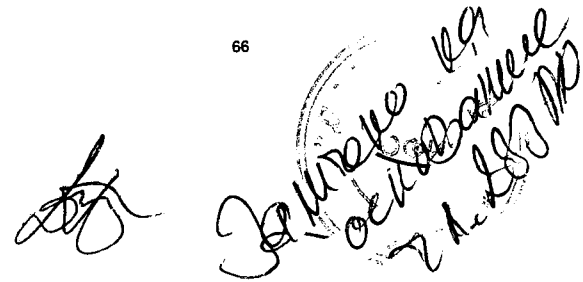
La gama esperada para el folato intraeritrocitario se determinó analizando hemolizados de sangre completa de 117 sujetos hematológicamente normales. El 95% central de todos los normales ensayados resultó ser 120 - 860 ng/ml (272 - 1952 nmol/l).


Interpretación	Folato serico		Folato Eritrocitos	
	ng/ml	(nmol/l)	ng/ml	(nmol/l)
Bajo	<1,5	<3,4	<120	<272
Normal	>1,5	>3,4	>120	>272

Para los valores esperados de vitamina B<sub>12</sub> sérica (cobalamina "real"), se utilizaron dos poblaciones. La primera constaba de 38 individuos deficientes en vitamina B<sub>12</sub>, con diagnósticos confirmados entre los que se incluía la anemia perniciosa, alteración gástrica o intestinal o enfermedades asociadas a deficiencia en vitamina B<sub>12</sub>. El percentil 99 de esta población definía el límite superior de la gama deficiente (baja). La segunda población constaba de 121 voluntarios sanos (hombres y mujeres) con edades entre 19 y 60 años, sin hábitos de dieta inusuales. Se consideraban hematológicamente normales, según los criterios de laboratorio. El 95% central de esta población definía la gama esperada (normal). La gama indeterminada se define como la de los valores entre las poblaciones deficiente y normal.

Interpretación	Vitamina B <sub>12</sub> pg/ml	Vitamina B <sub>12</sub> (pmol/l)
Bajo	<120	<88
Indeterminado	120 - 160	88 - 118
Normal	160 - 970	118 - 716
Alto	>970	>716

En otro estudio se compararon las muestras con el ensayo SimuTRAC-SNB y el microbiológico de *Evulena gracilis*. En la Figura 2, se muestra esa comparación. Los niveles de vitamina B<sub>12</sub> sérica muy superiores a los 1000 pg/ml indican una enfermedad hepática o alteración mieloproliferativa como la policitemia vera, metaplasia mieloide o leucemia granulocítica crónica. Los niveles superiores a 4000 pg/ml no son usuales en la enfermedad hepática, pero sí frecuentes en procesos mieloproliferativos<sup>8,9,13,14</sup>.





**Características específicas de la prueba**

**Exactitud:**

- Por comparación de los resultados obtenidos para vitamina B<sub>12</sub> con este kit y los obtenidos con el kit de Radioensayo SimulTRAC-S se obtuvieron los siguientes datos de regresión: (x = SimulTRAC-S), y = SimulTRAC-SNB)

Número de muestras: 160      Pendiente: 0,93  
 Coeficiente correlación: 0,98      Intercepción-y: -26 pg/mL

- Comparación de resultados con los obtenidos por ensayo microbiológico con *Euglena gracilis*<sup>15</sup>. Se obtuvo la regresión calculada siguiente (x = ensayo microbiológico, y = SimulTRAC-SNB):

Número de muestras: 132      Pendiente: 1,1  
 Coeficiente correlación: 0,96      Intercepción-y: -32 pg/mL

- Comparación de resultados de folato obtenidos con este kit y los obtenidos con el kit SimulTRAC-S. Se obtuvieron los resultados siguientes:

Número de muestras: 160      Pendiente: 1,03  
 Coeficiente correlación: 0,97      Intercepción-y: -0,01 ng/mL

**Precisión:**

- Variación intra-ensayo:

a. **Vitamina B<sub>12</sub>**

	N	media pg/ml	D.S.	% C.V.
Control 1	20	318	19,5	6,1
Control 2	22	444	14,1	3,2
Control 3	20	593	26,3	4,4
Control 4	20	1203	69	5,7
Suero	20	169	19	11,2

b. **Folato**

	N	media ng/ml	D.S.	% C.V.
Control 1	20	1,87	0,16	8,6
Control 2	22	2,16	0,15	6,9
Control 3	20	4,89	0,25	5,1
Control 4	20	12,1	0,54	4,5
Suero	20	6,1	0,25	4,1

- Variación inter-ensayo:

a. **Vitamina B<sub>12</sub>**

	N	media pg/ml	D.S.	% C.V.
Control 1	35	313	25,6	8,2
Control 2	44	432	27,9	6,4
Control 3	52	555	38	6,8
Control 4	52	1106	47	4,2
Suero	30	151	18,6	12,3

b. **Folato**

	N	media ng/ml	D.S.	% C.V.
Control 1	35	1,62	0,19	11,7
Control 2	44	1,96	0,16	8,2
Control 3	52	4,50	0,34	7,5
Control 4	52	10,4	1,0	9,6
Suero	30	6,6	0,47	7,1

**Recuperación:**

Se mezcló una muestra de suero con cianocobalamina y otra con MTFA. El MTFA se calibró por espectrofotometría UV y se añadió a la muestra. Las recuperaciones se calcularon como:

$$\frac{\text{encontrado} - \text{endógeno}}{\text{añadido}} \times 100$$

Añadida	Vitamina B <sub>12</sub>				MTFA			
	Encon-trada	Esperada	% Recu-peración		Añadida	Encon-trada	Esperada	% Recu-peración
0	340	---	---		0	0,9	---	---
200	541	540	100		2	3,03	2,9	107
400	763	740	106		4	4,95	4,9	101
1000	1297	1340	96		10	10,66	10,9	98

*[Handwritten signatures and stamps]*

*[Circular stamp: INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE Y SALUD PÚBLICA]*

*[Handwritten signature: J. M. ...]*

*[Handwritten signature: ...]*

*[Handwritten signature: ...]*

**Linealidad:**

Se diluía una muestra de suero con standard A, para probar la linealidad, que se calculaba como:

encontrada/esperada x 100

Vitamina B <sub>12</sub>				Folato			
Dilución	Encontrada	Esperada	%	Dilución	Encontrada	Esperada	%
0	398	---	---	0	19,48	---	---
1,33	273	299	91	1,33	14,40	14,61	99
2	195	199	98	2	10,17	9,74	104
4	100	100	101	4	5,49	4,87	113
8	50	50	100	8	2,68	2,44	110

**Especificidad:**

El ácido 5-metilteetrahidrofólico y el pteroilglutámico tienen igual afinidad por el fijador en este ensayo. El factor intrínseco porcino utilizado en este kit ha sido purificado por cromatografía de afinidad y contiene menos del 4% de proteína R. La pureza se ha establecido de acuerdo con los criterios propuestos por el Comité Nacional para Standards de Laboratorios Clínicos<sup>19</sup>.

El factor intrínseco del Kit de Radioensayo SimuTRAC-SNB de MP Biomedicals mide 10.000 pg/ml de cobinamida como menos de 75 pg/ml cuando se les frente a una curva patrón construida a partir de patrones de cobalamina. Además se inhibe más del 95% de la fijación de vitamina B<sub>12</sub> por el anticuerpo bloqueante anti-F específico.

En estudios adicionales se ha demostrado que, cuando se utiliza el Kit SimuTRAC-SNB de MP Biomedicals, la cobinamida (un análogo de la vitamina B<sub>12</sub>) tiene una reactividad cruzada inferior al 0,01%.

**Sensibilidad:**

La sensibilidad, definida como la concentración al 90% de fijación del trazador es 75 pg/ml para B<sub>12</sub> y 0,6 ng/ml para el folato. Bibliografía: Ver "References" en el texto en inglés.

**TABLE 1**

**SimuTRAC-SNB VITAMIN B<sub>12</sub> [<sup>57</sup>Co]/FOLATE [<sup>125</sup>I] RADIOASSAY KIT  
TABULATED DATA**

Vitamin B <sub>12</sub> [ <sup>57</sup> Co] Data																																													
Tube No.	cpm	Corrected cpm	Average cpm	% Bound	% of Trace Binding	B <sub>12</sub> pg/mL	B <sub>12</sub> pmol/L																																						
1	23319	22580	22778	46.7																																									
2	23716	22977																																											
3	750	---	739					46.7																																					
4	728	---																																											
5	11488	10749	10632									46.7																																	
6	11254	10515																																											
7	9914	9175														10632	46.7																												
8	10197	9458																																											
9	8935	8196																			10632	46.7																							
10	9016	8271																																											
11	7637	6898																								10632	46.7																		
12	7451	6712																																											
13	5330	4591																													10632	46.7													
14	5153	4414																																											
15	3914	3175																																		10632	46.7								
16	3812	3073																																											
Sample																																									10632	46.7			
17	7324	6585																																											
18	7294	6555																																											

*[Handwritten signatures and stamps]*

*[Circular stamp: INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS]*

*[Handwritten text: Laboratorio de Diagnóstico]*

*[Handwritten text: Caracas]*

*[Handwritten text: 1985]*

Folate [ <sup>125</sup> I] Data								
Tube No.	cpm	Corrected cpm	Average cpm	% Bound	% of Trace Binding	Folate ng/mL	Folate nmol/L	
1	35748	34427	34477	51.1			Blank	
2	35910	34589						
3	1384	---						
4	1259	---	1321			Blank	Blank	
5	18772	17451	17647			Trace	Trace	
6	19165	17844				Trace	Trace	
7	16184	14863		84.2	1.0	2.3		
8	16332	15011		85.0	1.0	2.3		
9	14438	13117		74.3	2.0	4.5		
10	14590	13269		75.1	2.0	4.5		
11	11983	10662		60.4	4.0	9.1		
12	11870	10549		59.7	4.0	9.1		
13	7969	6648		37.6	10.0	23		
14	7825	6504		36.8	10.0	23		
15	5444	4123		23.3	20.0	45		
16	5444	4123		23.3	20.0	45		
Sample								
17	11218	9897			56.0	4.62	10.5	
18	11592	10271			58.0	4.23	9.6	

Figure 1 - SimuTRAC-SNB  
Typical Standard Curve with Logit-Log Transformation

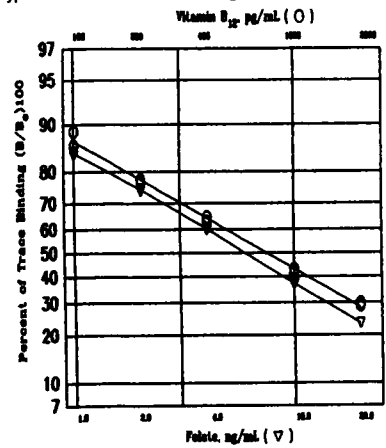
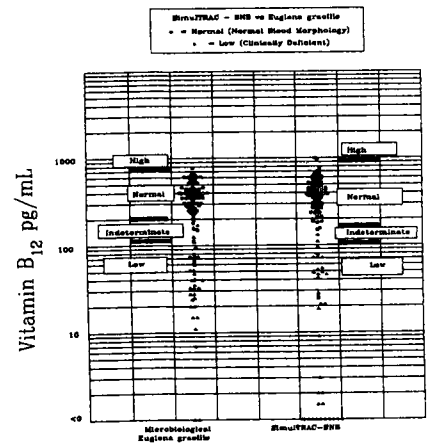


Figure 2



*[Handwritten signatures and notes]*

*[Circular stamp]*

*[Handwritten text: "Dr. Brewer", "10/20/80", "D.L. 80A"]*

**BIBLIOGRAPHY**

1. Herbert, V., Introduction to the "Nutritional Anemias". Sem. Hemat., 7, 2-5, 1970.
2. Herbert, V., Folic Acid and Vitamin B<sub>12</sub>. "Modern Nutrition in Health and Disease", 5th ed., edited by R.S. Goodhart and M.E. Shils, Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 221-224, 1973.
3. Chanarin, I., The assay and concentration of folate in blood and other tissues. "The Megaloblastic Anemias", Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 306-336, 1969.
4. Herbert, V., Drugs effective in megaloblastic anemias. "The Pharmacological Basis of Therapeutics", 4th ed., edited by L.S. Goodman and A. Gilman, MacMillan Co., New York, pp. 1414-1444, 1970.
5. Tishman, G. and Herbert, V., B<sub>12</sub> dependence of cell uptake of serum folate: an explanation for high serum folate and cell folate depletion in B<sub>12</sub> deficiency. Blood, 41, 465-469, 1973.
6. Herbert, V., B<sub>12</sub> and folate deficiency. "Nuclear Medicine", edited by B. Rothfield, Lippincott, Philadelphia, pp. 69-84, 1974.
7. Chanarin, I., The assay and concentration of Vitamin B<sub>12</sub> in serum, liver and cerebrospinal fluid. "The Megaloblastic Anaemias", Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 192-229, 1969.
8. Sullivan, L.W., The megaloblastic anemias. "Hematology: Principles and Practice", edited by E.C. Mengel, E. Frei III and R. Nachman, Yearbook Medical Publishers, Chicago, pp. 95-131, 1972.
9. Kohouse, J.F., Kondo, H., Allen, N.C., Podell, E. and Allen, R.H., Cobalamin analogues are present in human plasma and can mask cobalamin deficiency because current radioisotope dilution assays are not specific for true cobalamin. New Eng. J. Med., 299, 785-792, 1978.
10. Cooper, B.A. and Whitehead, V.M., Evidence that some patients with pernicious anemia are not recognized by radiodilution assay for cobalamin in serum. New Eng. J. Med., 299, 816-818, 1978.
11. Zucker, R.M., Podell, E.R., and Allen R.H., Multiple Problems with Current No Boil assays for Serum Cobalamin, Ligand Quarterly, 4, 54-58, 1981.
12. Higgins, T., and Wu, A., Differences in Vitamin B<sub>12</sub> Results as Measured with Boil and No Boil Kits, Clin. Chem., 29, 587-588, 1983.
13. Herbert, V., Diagnostic and prognostic values of measurement of serum Vitamin B<sub>12</sub>-binding proteins. Blood, 32, 305-312, 1968.
14. Gilbert, H.S., Krauss, S., Pasternack, B., Herbert, V. and Wasserman, L.R., Serum Vitamin B<sub>12</sub> and unsaturated Vitamin B<sub>12</sub>-binding capacity in myeloproliferative disease: value in differential diagnosis and as indicators of disease activity. Ann. Intern. Med., 71, 719-729, 1969.
15. Anderson, B., Investigations into the Euglena method for the assay of Vitamin B<sub>12</sub> in serum. J. Clin. Pathol., 17, 14-26, 1964.
16. Guidelines for Evaluating a B<sub>12</sub> (Cobalamin) Assay. National Committee for Clinical Laboratory Standards, March 1980.

**Manufactured by:**  
**Hergestellt von:**  
**Fabriqué par:**  
**Prodotto da:**  
**Fabricado por:**

**MP Biomedicals, LLC**  
**Diagnostics Division**  
**29525 Fountain Parkway**  
**Solon, Ohio 44139**  
**USA**

**Customer Service:**  
**FAX:**  
**Technical Service:**

**(800) 854-0530**  
**(440) 337-1180**  
**(800) 854-0530**  
[www.mpbio.com](http://www.mpbio.com)

**European**  
**Authorized**  
**Representative:**

**MP Biomedicals Germany GmbH**  
**Thüringer Straße 15**  
**37269 Eschwege**  
**Tel: +49 5651 9210**  
**Fax: +49 5651 921 181**



CE

06B58581-R16  
 Q15-042, A15-005  
 Q16-009, A16-001  
 04/16

*[Handwritten signatures and stamps]*

*[Circular stamp: "MP BIOMEDICALS" with illegible text]*

*[Handwritten text: "Jankowski", "ocke", "A. J. M."]*

**ДЕКЛАРАЦИЯ**

за съгласие с клаузите на приложения проект на договор

Долуподписаният: Даниела , ва

(трите имена)

в качеството си на Управител

(длъжност)

на „Данс Фарма“ ЕООД -

(наименование на участника)

участник в процедура за възлагане на обществена поръчка с предмет: „Доставка на радиоактивни лекарствени продукти, радиофармацевтици, радионуклидни генератори, китове и радионуклидни прекурсори за 2018 г.“ по прекратени обособени позиции

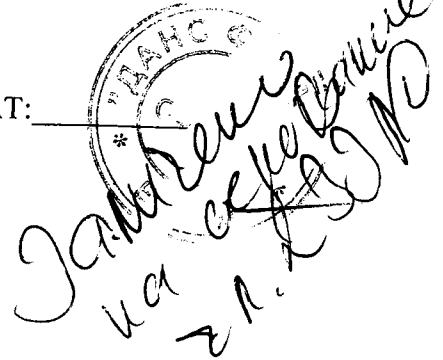
Предложението е по обособена позиция № 8 с предмет 125 Vit B 12 + фолиева киселина

**ДЕКЛАРИРАМ, ЧЕ:**

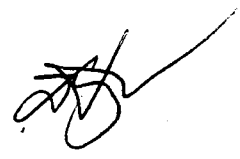
Запознат съм със съдържанието на проекта на договора и приемам условията в него

ДАТА: 02.08.2018 г.

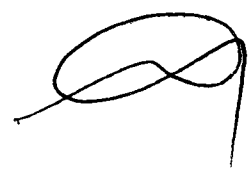
ПОДПИС и ПЕЧАТ:



Handwritten signature and circular stamp of "DANS" EOOD. The stamp contains the text "ДАНС" and "ЕООД". The signature is written over the stamp.



Handwritten signature.



Handwritten signature.



Handwritten signature.



Handwritten signature.

**ДЕКЛАРАЦИЯ**  
за срока на валидност на офертата

Долуподписаният: Даниела  
(трите имена)

в качеството си на Управител  
(длъжност)

на „Данс Фарма“ ЕООД -  
(наименование на участника)

участник в процедура за възлагане на обществена поръчка с предмет: „Доставка на радиоактивни лекарствени продукти, радиофармацевтици, радионуклидни генератори, китове и радионуклидни прекурсори за 2018 г.“ по прекратени обособени позиции


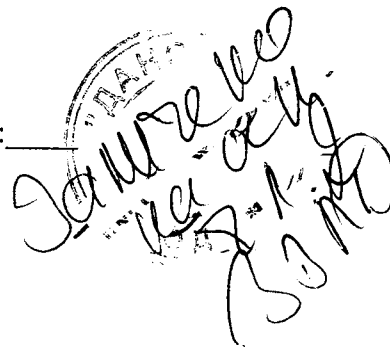
Предложението е по обособена позиция № 8 с предмет 125 Vit B 12 + фолиева киселина

**ДЕКЛАРИРАМ, ЧЕ:**

Срокът на валидност на настоящата оферта е 3 (три) месеца, считано от датата, която е посочена като крайна дата на получаване на офертите в обявлението за поръчка и представлява времето, през което сме обвързани с условията на представеното от нас предложение

ДАТА: 02.08.2018 г.

ПОДПИС и ПЕЧАТ:



## ЦЕНОВО ПРЕДЛОЖЕНИЕ

До: Министерство на здравеопазването  
с адрес: гр София- 1000, пл. „Света Неделя“ № 5  
(наименование и адрес на възложителя)

От: „Данс Фарма“ ЕООД  
(наименование на участника)  
с адрес: гр. София, 1202 ул. „Индуриална“ № 11, Василев Бизнес Сити, ет.7  
тел.: 02/ 936 70 79; 936 77 92, факс: 02/ 936 70 79; 936 77 92, e-mail: info@danspharma.com  
Булстат/ЕИК: BG130868975

*Забележка: На основание чл. 47, ал. 9 от ППЗОП, когато участник подава оферта за повече от една обособена позиция, за всяка обособена позиция се представят отделни непрозрачни пликкове с надпис "Предлагани ценови параметри", с посочване на позицията, за която се отнасят.*

## УВАЖАЕМИ ДАМИ И ГОСПОДА,

С настоящото, Ви представяме нашето ценово предложение за изпълнение на обявената от Вас процедура за възлагане на обществена поръчка с предмет: „Доставка на радиоактивни лекарствени продукти, радиофармацевтици, радионуклидни генератори, китове и радионуклидни прекурсори за 2018 г.“ по прекратени обособени позиции

Предложението е по обособена позиция № 8 с предмет 125 Vit B 12 + фолиева киселина

№ на обособена позиция	Наименование, активност, единична	Ед. цена за опаковка без ДДС	Ед. цена за опаковка с ДДС	Обща стойност без ДДС	Обща стойност с ДДС
8	125 Vit B 12 + фолиева киселина	496,00	595,20	5952,00	7142,40

Така предложената цена включва всички разходи за изпълнение предмета на поръчката. Посочената обща цена не подлежи на промяна през целия срок на действие на договора за изпълнение на поръчката, освен в случаите на чл. 116 от ЗОП.

Предложените цени са определени при пълно съответствие с условията от документацията по процедурата.

При несъответствие между предложените единична цена и обща стойност, валидна ще бъде единичната цена на офертата.

Всички оферирани цени, следва да бъдат закръглени до втория знак, след десетичната запетая.

Заменил  
на осигуряване  
РАДЖИ



Задължаваме се, ако нашата оферта бъде приета, да изпълним и предадем договорените работи, съгласно сроковете и условията, залегнали в договора.

При условие, че бъдем избрани за изпълнител на обществената поръчка, ние сме съгласни да представим гаранция за изпълнение на задълженията по договора в размер на 3 % от стойността му, без ДДС.

За лекарствените продукти обособени позиции от № 1 до №3, вкл.:

В случай, че през времето на действие на договора стойността, която следва да се заплаща с публични средства на лекарствени продукти от Позитивния лекарствен списък стане по-ниска от договорената, възложителят безусловно заплаща лекарствените продукти на по-ниската цена, считано от датата на обявяването на влезлите в сила решения по реда на чл. 18 от Наредбата за условията, правилата и реда за регулиране и регистриране на цените на лекарствените продукти. В случаите по предходното изречение, стойността се определя към момента на доставката (подписване на приемо-предавателен протокол)

Сметката, по която ще бъдат извършвани разплащанията по договора, ако бъдем определени за изпълнител на поръчката:

Банка: Уникредит Булбанк IBAN BG 14UNCR 76301066259102 BIC UNCRBGSF

Титуляр на сметката „Данс Фарма“ ЕООД

Забележка: Участниците, регистрирани по ДДС, отбелязват наличието на такава регистрация.

ДАТА: 02.08.2018 г.

ПОДПИС и ПЕЧАТ:

*Данс Фарма*  
*на пт.*

**ГЛАВА II: ТЕХНИЧЕСКИ СПЕЦИФИКАЦИИ**  
**1. МИНИМАЛНИ ТЕХНИЧЕСКИ ИЗИСКВАНИЯ И КОЛИЧЕСТВА**

Лекарствени продукти			
№	Наименование, единична активност	Мярка	Количество ДО
	<b>Радиофармацевтици за диагностика in vivo</b>		
1	Sodium Iodide [ <sup>131</sup> I] 740 MBq solution for injection	оп. x 1 бр.	106
	<b>Радиофармацевтици за терапия</b>		
2	Sodium Iodide [ <sup>131</sup> I] 3,7 GBq solution for injection	оп. x 1 бр.	25
3	Strontium (89 Sr) chloride	оп. x 1 бр.	145
Медицински изделия			
№	Наименование, единична активност	Мярка	Количество ДО
	<b>Радиофармацевтици за диагностика in vitro</b>		
4	<sup>125</sup> I FT3 KIT	оп. x 1 бр.	27
5	<sup>125</sup> I FT4 KIT	оп. x 1 бр.	71
6	<sup>125</sup> I TSH ( 96-100 проби) KIT IRMA	оп. x 1 бр.	111
7	<sup>125</sup> I beta 2 microglobulin	оп. x 1 бр.	100
8	<sup>125</sup> I Vit B 12 + фолиева киселина	оп. x 1 бр.	12
9	<sup>125</sup> I anti TG antibody	оп. x 1 бр.	33
10	<sup>125</sup> I Ferritin KIT	оп. x 1 бр.	10

**2. ИЗИСКВАНИЯ КЪМ ПРЕДЛАГАНИТЕ ЛЕКАРСТВЕНИ ПРОДУКТИ**  
**ОБОСОБЕНИ ПОЗИЦИИ ОТ № 1 ДО № 3, ВКЛ.**

2.1. Лекарствените продукти трябва да отговарят на изискванията на Закона за лекарствените продукти в хуманната медицина (ЗЛПХМ) – трябва да притежават валидно разрешение за употреба в страната, издадено по реда на ЗЛПХМ или Регламент (ЕО) № 726/ 2004 г. на Европейския парламент и Съвета /чл. 23, ал.1 на ЗЛПХМ/. В случай на изтичане на срока на разрешението за употреба на лекарствен продукт през 2018 г., участникът декларира в съответствие с чл. 55, ал. 6 от ЗЛПХМ, че количествата за лекарствения продукт са налични.

Това обстоятелство се доказва с представянето на заверено копие на валидно разрешение за употреба в страната, издадено по реда на ЗЛПХМ или Регламент (ЕО) № 726/ 2004 г. на Европейския парламент и Съвета /чл. 23, ал.1 на ЗЛПХМ/. В случай на изтичане на срока на разрешението за употреба на лекарствен продукт през 2018 г., участникът декларира в съответствие с чл. 55, ал. 6 от ЗЛПХМ, че количествата за лекарствения продукт са налични.

2.2. Цената по договора е фиксирана и не подлежи на промяна за срока на действие на договора, освен в случаите на чл. 116 от ЗОП.

2.3. В случай, че през времето на действие на договора стойността, която следва да се заплаща с публични средства на лекарствени продукти от Позитивния лекарствен списък стане по-ниска от договорената, възложителят безусловно заплаща лекарствените продукти на по-ниската цена, считано от датата на обявяването на влезлите в сила решения по реда на чл. 18 от Наредбата за условията, правилата и реда за регулиране и регистриране на цените на лекарствените продукти. В случаите по предходното изречение, стойността се определя към момента на доставката (подписване на приемо-предавателен протокол).

2.4. Лекарствените продукти следва да бъдат включени в Приложение 3 на Позитивния лекарствен списък, актуално към датата на подаване на предложението.

### 3. ИЗИСКВАНИЯ КЪМ МЕДИЦИНСКИТЕ ИЗДЕЛИЯ, ОБОСОБЕНИ ПОЗИЦИИ ОТ № 4 ДО № 10, ВКЛ.:

3.1. Да са включени в списъка по чл. 1, т. 1, буква "б" от Наредбата за условията и реда за съставяне на списък на медицинските изделия по чл. 30а от Закона за медицинските изделия /ЗМИ/ и за определяне на стойността, до която те се заплащат.

*Това обстоятелство се доказва с декларация от участника, с приложено извлечение от Списъка по чл. 1, т. 1, буква „б“ от Наредбата за условията и реда за съставяне на списък на медицинските изделия по чл. 30а от ЗМИ и за определяне на стойността, до която те се заплащат (Наредбата), от което извлечение да е видна продажната цена по смисъла на § 1, т. 29а от ЗМИ, във връзка с § 1, т. 4 от допълнителните разпоредби на Наредбата, представена за всяка позиция, за която той кандидатства.*

3.2. Да няма регистрирани данни в ИАЛ и/или EUDAMED за инциденти/потенциални инциденти през последните две години, както и за блокирани или изтеглени партии през последните две години съгласно предоставена от ИАЛ информация.

*Това обстоятелство се доказва с официален документ, издаден от Изпълнителната агенция по лекарствата, от който да е видно, че няма регистрирани данни в ИАЛ и/или EUDAMED за инциденти/потенциални инциденти през последните две години, както и за блокирани или изтеглени партии през последните две години.*

3.3. Да се заплащат от обществен фонд в поне една от страните, членки на Европейския съюз. *Това обстоятелство се доказва с декларация от участника, в която се посочва конкретният обществен фонд на съответната държава.*

3.5. Да отговарят на изискванията на Закона за медицинските изделия и да са изпълнени приложимите процедури за оценяване на съответствието.

*Това обстоятелство се доказва с представяне на: копие на декларация за съответствие с Директива 98/79/ЕС, издадена от производителя или упълномощен негов представител (придружено с превод на български език и заверено от участника)*

3.6. При производството на предлаганите медицински изделия да са спазени изискванията за управление на качеството по стандарт БДС EN ISO 13485 или еквивалентна система за управление на качеството.

*Това обстоятелство се доказва с представяне на: копие на валиден сертификат по стандарт БДС EN ISO 13485 или еквивалентна система за управление на качеството, с обхват производство на медицински изделия, издаден на името на производителя. Сертификатът трябва да е издаден от независими лица, които са акредитирани по съответната серия европейски стандарти от Изпълнителна агенция „Българска служба за акредитация“ или от друг национален орган по акредитация, който е страна по Многостранното споразумение за взаимно признаване на Европейската организация за акредитация, за съответната област или да отговарят на изискванията за признаване съгласно чл. 5а, ал. 2 от Закона за националната акредитация на органи за оценяване на съответствието. Възложителят приема еквивалентни*

сертификати, издадени от органи, установени в други държави членки. Възложителят приема и други доказателства за еквивалентни мерки за осигуряване на качеството, когато участник не е имал достъп до такива сертификати или е нямал възможност да ги получи в съответните срокове по независещи от него причини. В случаите по предходното изречение, участникът трябва да е в състояние да докаже, че предлаганите мерки са еквивалентни на изискваните.

#### **4. СРОК НА ГОДНОСТ НА ЛЕКАРСТВЕНИТЕ ПРОДУКТИ**

##### **4.1. Минимален срок на годност**

Радиофармацевтиците за диагностика *in vivo* и радиофармацевтиците за терапия по обособени позиции от № 1 до № 3 вкл. от спецификацията следва да имат минимален срок на годност не по-кратък от 60 % от обявения от производителя, към датата на всяка доставка, предоставена на крайните получатели /съответните лечебни заведения/.

Това обстоятелство се доказва с деклариране на обстоятелствата в предложението за изпълнение.

Радиофармацевтици за диагностика *in vitro* по обособени позиции от № 4 до № 10 вкл. от спецификацията следва да имат минимален срок на годност не по-кратък от 80 % от обявения от производителя, към датата на всяка доставка, предоставена на крайните получатели /съответните лечебни заведения/.

Това обстоятелство се доказва с деклариране на обстоятелствата в предложението за изпълнение.

**4.2.** В случай на доставка на лекарствен продукт или медицинско изделие с по-кратък от договорения срок на годност, изпълнителят дължи неустойка, както следва:

**4.2.1.** радиофармацевтици за диагностика *in vivo* и радиофармацевтици за терапия по позиции от № 1 до № 3 вкл. от спецификацията:

- от 59,99 до 50 % - 20% върху стойността на доставката;
- от 49,99 до 40 % - 30% върху стойността на доставката;
- под 40% - 60% върху стойността на доставката.

**4.2.2.** Радиофармацевтици за диагностика *in vitro* по позиции от № 4 до №10 вкл.

- от 79,99% до 70% - 20% върху стойността на доставката;
- от 69,99% до 60% - 30% върху стойността на доставката;
- от 59,99% до 50% - 60% върху стойността на доставката;
- от 49,99% до 40% - 75% върху стойността на доставката;
- под 40% - 90% върху стойността на доставката.

**4.3.** Доставката на лекарствен продукт или медицинско изделие с остатъчен срок на годност по-малък от 40 (четиридесет) на сто от обявения от производителя се извършва само с писмено съгласие на възложителя за конкретно количество, определено от него. Без изрично писмено съгласие на възложителя стоките няма да бъдат заплащани.

Това обстоятелство се доказва с деклариране на съгласие с обстоятелствата в предложението за изпълнение

#### **5. НАЧИН НА ПЛАЩАНЕ**

Заплащането на стоките по договора се извършва отложено в срок до 30 /тридесетия/ ден, след представяне на следните документи:

- 1) Доставка фактура, съставена съгласно изискванията на ЗДДС и ППЗДДС – оригинал и 2 /два/ броя заверени копия;
- 2) Приемателно-предавателни протоколи, по образец на Министерството на здравеопазването съгласно Приложение към договора;
- 3) Обобщен опис на протоколите – 3 /три/ броя;

4) Писмени заявки-разпределения, изготвени от Министерство на здравеопазването и заверени от крайните получатели;

За лекарствените продукти следва да бъдат представени:

Сертификат за освобождаване на всяка партида, издаден от квалифицирано лице по ЗЛПХМ – заверено от изпълнителя копие, в превод на български език от фирма, сключила договор с Министерство на външните работи за извършване на официални преводи.

За медицинските изделия следва да бъдат представени:

-Декларация за съответствие от производителя или неговия упълномощен представител – за обособени позиции от №4 до №10, че са определени като медицински изделия;

-Валиден сертификат за внедрена система за управление на качеството по стандарт БДС EN ISO 13485 или еквивалентен сертификат /заверено копие на оригинал и превод/ издаден на името на производителя – за обособени позиции от №4 до №10;

-Декларация за съответствие от производителя или неговия упълномощен представител със съществените изисквания на Директива 98/79/ЕС за позиции от №4 до №10.

Изброените документи се представят в деловодството на Министерство на здравеопазването, класирани и прикачени в папка. В папката се прилага писмо с опис на съдържащите се в нея документи, като задължително се посочват номерата, датите и броя на приложените документи от всеки вид.

### ГЛАВА III. КРИТЕРИИ ЗА ВЪЗЛАГАНЕ НА ПОРЪЧКАТА

1. Назначената от Възложителя комисия за разглеждане, оценка и класиране на постъпилите оферти извършва оценка на икономически най-изгодната оферта въз основа на определения критерий – „Най – ниска цена“, съгласно чл. 70, ал. 2, т. 1 от ЗОП.

2. В случай, че предлаганите цени на две или повече оферти са равни, комисията провежда публично жребий за определяне на изпълнител между участниците, предложили равните цени, съгласно чл. 58, ал. 3 от ППЗОП.

3. Комисията класира допуснатите до разглеждане оферти по възходящ ред, въз основа на предложената от тях единична цена за опаковка, без начислен ДДС за съответната обособена позиция, като предложената най-ниска цена се класира на първо място. Участникът, предложил най-ниска цена, се определя за изпълнител. След приключване на работата на комисията по разглеждане и оценка на офертите, възложителят обявява с решение за определяне на изпълнител класирането на участниците и участниците, определени за изпълнители на обществената поръчка. Участниците се уведомяват писмено за резултата от проведената процедура, като им се връчва (изпраща) копие от решението.