

Interferencija biotina u imunokemijskim analizama

Salopek, Bruno

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:563387>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Bruno Salopek

**Interferencija biotina u imunokemijskim
analizama**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019. godina.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Specijalna područja kliničke biokemije Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Odjelu za elektroforetsku i imunokemijsku dijagnostiku Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Dunje Rogić.

Od srca se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Dunji Rogić na strpljenju i stručnim savjetima te osoblju Odjela za elektroforetsku i imunokemijsku dijagnostiku Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb i svima koji su doprinijeli izradi ovoga diplomskog rada.

Velika hvala mojim roditeljima Ivanu i Ivanki koji su me tokom studija podržavali i hrabрили.

Zahvaljujem se svim svojim kolegama na fakultetu i svim profesorima koji su mi predavali.

Popis kratica

ACMIA- eng. antibody conjugated magnecit immunoassay

PETINIA- eng. particle enhanced turbidimetric inhibition immunoassay

CLIA- eng. chemiluminescence immunoassay

ELFA- eng. enzyme linked fluorescent assay

ELISA- eng. enzyme linked immunosorbent assay

ECLIA- eng. electrochemiluminiscence immunoassay

TPA-tripropilamin

Ru-rutenij

AFP-alfa-1-fetoprotein

CEA-karcinoembrijski antigen

CA-19-9-karbohidratni antigen

PVDF-poliviniliden-fluorid

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Biotin.....	1
1.2. Imunokemijske metode	2
1.3. Podjela imunokemijskih metoda	2
1.4. Imunokemijske metode u kliničkoj primjeni.....	4
1.5. Interferencije biotina u imunokemijskim analizama	7
1.6. Mehanizam interferencija biotina.....	8
1.6.1. Mehanizam interferencija biotina u kompetitivnome imunokemijskom testu	9
1.6.2. Mehanizam interferencija biotina u sendvič-imunokemijskom testu	10
1.7. Interferencije biotina u kliničkoj praksi.....	12
2. OBRAZLOŽENJE TEME	13
3. MATERIJALI I METODE.....	14
3.1. Uzorci.....	14
3.2. Metode.....	14
3.2.1. Određivanje koncentracije vitamina B12	15
3.2.2. Određivanje koncentracije vitamina D.....	16
3.2.3. Određivanje koncentracije karcinoembrijskog antigena (CEA).....	17
3.2.4. Određivanje koncentracije alfa-fetoproteina (AFP)	18
3.2.5. Određivanje koncentracije karbohidratnog antigena 19-9 (CA 19-9)	18
3.3. Obrada rezultata.....	19
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	21
4.1. Rezultati za vitamin B12.....	21
4.2. Rezultati za vitamin D.....	21
4.3. Rezultati za CEA.....	22
4.4. Rezultati za AFP.....	22
4.5. Rezultati za CA 19-9	23
4.6. Rasprava	23
5. ZAKLJUČCI	27
6. SAŽETAK / SUMMARY	28
6.1. SAŽETAK.....	28
6.2. SUMMARY	29
7. LITERATURA:.....	30

1. UVOD

1.1. Biotin

Biotin (vitamin B7), prethodno poznat kao vitamin H, topljiv je u vodi. Sadrži tri asimetrična ugljikova atoma. Samo se D –(+) pojavljuje u prirodi i biološki je aktivan, odnosno ima vitaminsku aktivnost. U namirnicama biljnoga i životinjskog podrijetla samo je mali dio biotina u slobodnom obliku. Većina biotina kovalentno je vezana na enzime ovisne o biotinu preko amidne veze karboksilne skupine pokrajnjeg lanca biotina i aminoskupine lizinskog ostatka. Biotin se apsorbira u enterocite aktivnim prijenosom ovisnim o natriju. Oralno uziman biotin gotovo se u potpunosti apsorbira, dok biološka dostupnost biotina dobivenog hranom varira. Reapsorbira se u bubrezima aktivnim prijenosom ovisnim o natriju, a kod viših koncentracija izlučuje se urinom. Sve stanice sadržavaju biotin, a veće se koncentracije mogu pronaći u jetri, bubrezima, mišićima i mozgu. Biotin je koenzim karboksilaza koje kataliziraju dvostupanjsku reakciju ugradnje bikarbonata, u obliku karboksilne skupine (-COOH), na supstrat. Karboksilaze imaju ulogu u metabolizmu ugljikohidrata, lipida i aminokiselina i u biosintezi masnih kiselina. Osim što je koenzim karboksilaze, biotin ima ulogu i u regulaciji gena i staničnoj signalizaciji. Veže se na histone (uloga u proliferaciji stanica, utišavanju i ekspresiji gena te popravku DNA). Biotin je prisutan u mnogim namirnicama, uključujući povrće i voće (primjerice banane), losos, piletinu, jaja, žitarice, mliječne proizvode i orašaste plodove. Preporučena dnevna doza biotina iznosi 30 mikrograma dnevno ($\mu\text{g}/\text{dan}$). Nedostatak biotina vrlo je rijedak, no može se javiti kod dugotrajne neadekvatne prehrane, kroničnog alkoholizma, hemodijalize i dugotrajne konzumacije sirovih jaja (biotin stvara neaktivni kompleks s proteinom avidinom sadržanim u bjelanjku jaja, čime je onemogućena njegova apsorpcija; kuhanjem jaja avidin se denaturira, što omogućava otpuštanje, odnosno uspješnu apsorpciju biotina). Simptomi pomanjkanja biotina jesu gubitak kose, gubitak teka, konjuktivitis, letargija, osjećaj trnjenja i pečenja u rukama i nogama, hipotonija i bolovi u mišićima. Biotin nije toksičan uziman oralno ili intravenski u miligramskim (mg) količinama kroz dulje razdoblje. Biotin se koristi u multivitaminским dodatcima i u preparatima za kosu, kožu i nokte. Farmaceutska primjena biotina nalazi se kod sekundarne progresivne multiple skleroze, metaboličkih bolesti (defekti karboksilaze i biotinidaze) i propionske acidemije (Berg i sur, 2013; Minkovsky i sur, 2016).

1.2. Imunokemijske metode

Imunokemijske metode temelje se na interakciji antigena (Ag) i protutijela (At) i koriste se za otkrivanje, razlikovanje i mjerenje koncentracije različitih antigena i protutijela. Zbog iznimne specifičnosti reakcije između antigena i protutijela imunokemijske metode karakterizira osjetljivost, reproducibilnost i jednostavnost. Interakcija između antigena i protutijela posljedica je slabih veza (vodikove veze, Coulumbove veze, hidrofobne veze i Van der Waalsove veze). Fab područje protutijela odgovorno je za interakciju antigena i protutijela. Jakost je tih veza mala i postaje veća tek nakon vezanja antigena i protutijela. Jakost ili energija vezanja antigena i protutijela određena je dvama pojmovima. To su afinitet i avidnost. Afinitet označava jakost vezanja jednoga spojnog mjesta protutijela i jednog epitopa odnosno determinante antigena, dok avidnost označava jakost vezanja protutijela i cijele molekule antigena, odnosno zbroj afiniteta svih spojnih mjesta na protutijelu. Afinitet je svojstvo antigena, a avidnost je svojstvo protutijela. Brzina reakcije vezanja antigena i protutijela ovisi o vrsti antigena i protutijela, afinitetu protutijela, koncentraciji elektrolita, pH i temperaturi (Dodig, 2014). Reakcija antigena i protutijela najbolje se može opisati Heidelberger-Kendallovom krivuljom. Krivulja opisuje rezultate mjerenja količine precipitata nastalog dodatkom različite koncentracije antigena stalnoj koncentraciji protutijela. Odnos između antigena i protutijela različit je u svakoj fazi krivulje. U fazi viška protutijela odnos između antigena i protutijela manji je od jedan. Budući da je broj veznih mjesta protutijela velik, gotovo sva mjesta za vezanje na antigenu zasićena su prije nego što može doći do križnog povezivanja između antigena. Stoga nastaju mali topljivi kompleksi sastava $AgAt_2$. Daljnjim dodatkom antigena vjerojatnost križnog povezivanja antigena s protutijelom veća je, pa nastaje veliki topljivi kompleksi. Veličina kompleksa raste do zone ekvivalencije u kojoj je sav antigen vezan s protutijelom. Tada je odnos između antigena i protutijela jednak jedan. U fazi viška antigena odnos između antigena i protutijela raste pri čemu se veličine kompleksa smanjuju. Kad je suvišak antigena velik, nastaju mali topljivi kompleksi sastava Ag_2At (www.neupsykey.com).

1.3. Podjela imunokemijskih metoda

Prema osnovi prirode reakcije imunokemijske metode dijele se na: homogene i heterogene metode. **Homogene** metode ne zahtijevaju dodatni korak zbog odjeljivanja vezanoga i slobodnog obilježenog antigena ili protutijela jer je aktivnost obilježivača, npr. enzima, ovisna

o vezanju protutijela. Analizirani i obilježeni antigen inkubiraju se i natječu se za vezna mjesta na protutijelu. Enzimski obilježen antigen aktivan je samo ako nije vezan za protutijelo. Nakon dodavanja enzimskog supstrata pretvorba supstrata u produkt razmjerna je koncentraciji analiziranog antigena u uzorku. **Heterogene** metode zahtijevaju dodatni korak zbog odjeljivanja nevezanog antigena ili protutijela. Mogu biti kompetitivne i nekompetitivne ili sendvič-metode. **Kompetitivne** su metode kod kojih se koristi jedno protutijelo. Reakcija se odvija uvijek uz višak antigena (ispitivana tvar). Obilježeni antigen (najčešće enzimom) miješa se s uzorkom koji sadržava nepoznatu količinu antigena. Obilježeni antigen i antigen iz uzorka (neobilježeni) natječu se za vezna mjesta na poznatoj količini protutijela koja se nalazi vezana na nosaču. Obilježeni antigen i neobilježeni antigen vežu se za protutijelo u omjeru u kojem su u otopini (što je više neobilježenog antigena, manje će se obilježenog antigena vezati za protutijelo i obratno). U indikatorskoj reakciji dodatkom supstrata kojim je antigen obilježen nastaje obojeni spoj kojem se mjeri intenzivnost boje. Intenzivnost boje obrnuto je proporcionalna koncentraciji ispitivanoga (neobilježenog) antigena u uzorku. **Nekompetitivne ili sendvič**-metode jesu metode u kojima se koriste dva protutijela i mjere količinu antigena između dvaju slojeva protutijela. Antigen koji se određuje mora sadržavati najmanje dva antigenska mjesta sposobna za vezanje na protutijela. Primarno je protutijelo vezano za nosač i specifično je za antigen koji se određuje. Dodatkom uzorka, antigen koji se određuje veže se za primarno protutijelo. Postoji višak primarnog protutijela u odnosu na antigen. Zatim se dodaje sekundarno protutijelo koje je obilježeno (npr. enzimom) i nastaje sendvič primarno protutijelo – antigenom obilježeno sekundarno protutijelo. U indikatorskoj reakciji dodatkom supstrata kojim je sekundarno protutijelo obilježeno razvija se boja, a jačina boje razmjerna je koncentraciji antigena u uzorku. S obzirom na način otkrivanja reakcije između antigena i protutijela, imunokemijske metode dijele se u dvije skupine: neobilježene ili izravne i obilježene. **Neobilježene** metode jesu metode kod kojih se mjerenja izvode u zoni ekvivalencije reaktanata, kada dolazi do stvaranja netopivih imunoprecipitata. Neobilježene metode mogu se podijeliti na kvantitativne i kvalitativne. Kvantitativne metode jesu imunonefelometrija, imunoturbidimetrija i radijalna imunodifuzija, a kvalitativne metode imunoelektroforeza, imunofiksacija i imunoselekcija. **Obilježene** metode jesu metode kod kojih se reakcija između antigena i protutijela mjeri s pomoću obilježenih reaktanata. Pripadaju među najvažnije analitičke tehnike u kliničkoj kemiji i njihovo je otkrivanje znatno unaprijedilo neke grane medicine, a posebno endokrinologiju. Ovim je metodama moguće mjeriti tvari koje se u organizmu nalaze u vrlo malim količinama (10^{-14} mol/L). Obilježene metode dijele se na kvalitativne i kvantitativne. U kvalitativne metode spada

imunohibridizacija (engl. *immunoblot*). To je metoda kod koje se proteini prvo razdvoje elektroforezom u agaroznom gelu, a zatim se prenese na čvrsti nosač. Potom se dodaju protutijela na nosač i nastane reakcija imunoprecipitacije. Kvantitativne metode jesu metode kod kojih se antigeni ili protutijela obilježavaju. Mogu se obilježiti radioizotopom (radioimunološka metoda-RIA), enzimom, ili kofaktorom, inhibitorom i supstratom enzima (enzimimunokemijska metoda – ELISA), luminiscentnim spojem (luminoimunokemijska metoda – LIA) i fluorescentnim spojem (fluoroimunokemijska metoda – FIA) (Dodig, 2014).

1.4. Imunokemijske metode u kliničkoj primjeni

Najučestalije imunokemijske metode u kliničkoj primjeni jesu imunoturbidimetrija, elektrokemiluminiscencija (ECLIA), imunonefelometrija, imunofiksacija, imunokemijska metoda s protutijelom vezanim za magnetske čestice (ACMIA), kemiluminiscentni imunokemijski test (CLIA), enzimimunokemijska metoda s fluorescentnom detekcijom (ELFA), lateks-imunoturbidimetrijska metoda, indirektna imunofluorescencija, imunohibridizacija, imunološki test s povećanom turbidimetrijskom inhibicijom čestica (PETINIA) i enzimimunokemijski test (ELISA). **Imunohibridizacija** je brza i osjetljiva metoda za detekciju i karakterizaciju proteina, glikoproteina i lipopolisaharida i temelji se na specifičnom vezanju antigena i protutijela. Imunohibridizacija se sastoji od nekoliko koraka. To su solubilizacija i elektroforetsko razdvajanje proteina, glikoproteina i lipopolisaharida elektroforezom na gelu. Zatim slijedi kvantitativni prijenos i nepovratno vezanje za nitrocelulozu, PVDF (poliviniliden-fluorid) ili najlon. Na antigen (proteini, glikoproteini i lipopolisaharidi) veže se obilježeno poliklonsko ili monoklonsko protutijelo i antigeni se vizualiziraju s pomoću kromogenih ili kemiluminescentnih supstrata (Dodig, 2014.). **Imunofiksacija** omogućuje detekciju i tipizaciju monoklonskih antitijela ili imunoglobulina u serumu ili urinu. To je od velike važnosti za dijagnosticiranje i praćenje određenih krvnih bolesti kao što je multipli mijelom. Elektroforeza na agaroznom gelu prvo razdvaja proteine u uzorku seruma. Antiserum (protutijelo) protiv željenog proteina širi se izravno na gel. Protein od interesa taloži se u matrici gela. Nakon koraka ispiranja kako bi se uklonili drugi proteini, precipitirani je protein obojen (Šegulja, 2015). **Indirektna imunofluorescencija** rabi dva protutijela; neobilježeno prvo (primarno) antitijelo specifično veže ciljnu molekulu, a sekundarno antitijelo, koje nosi fluorofor, prepoznaje primarno antitijelo i veže se na njega. Detekcija antigena provodi se reakcijom u kojoj nastaje fluorescentni spoj. **Imunokemijska metoda s protutijelom vezanim za magnetske čestice (ACMIA)** koristi se za određivanje koncentracija lijekova u serumu (ciklosporin i digoksin). Na početku se lijek veže s

protutijelom protiv lijeka obilježenim s enzimom (P-galaktozidazom). Magnetske kuglice obložene lijekom koriste se za uklanjanje nevezanog protutijela, a koncentracija lijeka u uzorku mjeri se spektrofotometrijski nakon hidrolize kromogenog supstrata s pomoću P-galaktozidaze. Promjena apsorpcije pri 577 nm proporcionalna je koncentraciji lijeka u uzorku (www.sciencedirect.com). **Imunoturbidimetrija i imunonefelometrija** jesu imunokemijske metode koje se izvode u tekućem mediju. Dodatkom otopine protutijela u otopinu koja sadržava antigen nastaje замуćenje zbog nastalih kompleksa antigen-protutijelo. Mjerenje reakcije između antigena i protutijela u zoni ekvivalencije kad je postignuta najviša koncentracija kompleksa antigen-protutijelo naziva se metoda krajnje točke (engl. *end-point method*). Nakon inkubacije mjeri se kod imunoturbidimetrije apsorpcija svjetla ili kod imunonefelometrije rasap svjetla. Standardna krivulja apsorpcije ili rasapa svjetlosti dobije se mjerenjem poznatih koncentracija antigena (Kuntić i Stojić-Vukanić, 2009). **Lateks- imunoturbidimetrijska metoda** jest preinaka imunoturbidimetrijske metode. Koriste se čestice lateksa obložene protutijelom. To metodu čine osjetljivijom i stabilizira protutijelo. **Imunološki test s povećanom turbidimetrijskom inhibicijom čestica (PETINIA)** homogena je kompetitivna metoda. Koristi se za određivanje koncentracije lijeka u serumu (valproična kiselina). Ulomci protutijela i čestice lijek – lateks vezat će se i stvoriti agregate koji povećavaju mutnoću otopine. Slobodni lijek iz uzorka natječe se za ulomke protutijela, čime se smanjuje brzina agregacije čestica. Brzina agregacije obrnuto je proporcionalna koncentraciji lijeka u uzorku (www.accessdata.fda.gov). **Kemiluminiscentni imunokemijski test (CLIA)** jest sendvič-metoda s kemiluminiscencijskom detekcijskom metodom. Mikrotitarska pločica prethodno je prevučena s protutijelom specifičnim za analit. Zatim se uzorak dodaje u mikrotitarsku pločicu i analit se veže na specifično protutijelo. Nakon toga se dodaje protutijelo konjugirano biotinom i veže se na analit apsorbiran na ploči. Kompleks dvaju protutijela i analita djeluje kao „sendvič“-struktura. Nakon ispiranja nevezanog biotin- konjugiranog protutijela dodaje se avidin-konjugirana peroksidaza iz hrena. Na kraju se dodaje luminol i skeniraju se relativne vrijednosti svjetlosti (RLU) s pomoću brojača fotona. Relativne vrijednosti svjetlosti proporcionalne su koncentraciji analita u uzorku (Cinquanta i sur, 2017). **Enzimimunokemijska metoda s fluorescentnom detekcijom (ELFA)** jest sendvič-metoda koja se koristi dvama protutijelima. Monoklonsko je protutijelo vezano za čvrsti nosač i na njega se veže antigen iz uzorka. U drugom se koraku veže drugo monoklonsko protutijelo koje je obilježeno enzimom (alkalna fosfataza). Detekcija se izvodi tako da se dodaje supstrat enzima kojim je obilježeno monoklonsko protutijelo. Enzim katalizira hidrolizu supstrata i nastaje fluorescentni spoj čija se fluorescencija mjeri na 450 nm.

Jačina fluorescencije razmjerna je koncentraciji antigena u uzorku (www.bioscience.scientific-journal.com). **Enzimimunokemijski test (ELISA)** temelji se na vezanju protutijela i antigena iz uzorka te spektrofotometrijskom mjerenju nastale reakcije do koje dolazi zbog promjene boje. Postoji više vrsta tehnika imunokemijskog određivanja s pomoću testa ELISA: indirektna, sendvič, kompetitivna i nova višestruka i prijenosna metoda s pomoću mikrotitarskih ploča. Sama metodologija metode ELISA uključuje imobilizaciju jedne ili dviju komponenti, tj. antigena ili protutijela na čvrstu podlogu. To uklanja probleme separacije s obzirom na to da nakon reakcije između vezane i nevezane komponente jedna komponenta ostaje pričvršćena na čvrstu podlogu, a ostatak se jednostavno uklanja, pri čemu ostavlja vezani reaktant u obliku u kojem ga je moguće lako izmjeriti. Mjerenje kod metode ELISA riješeno je na način da se protutijelo obilježi enzimom. Nakon dodatka supstrata za enzim, reakcija rezultira mjerljivim promjenama jačine obojenja. Sendvič-ELISA mjeri količinu antigena između dvaju slojeva protutijela. Antigen koji se određuje mora sadržavati najmanje dva antigenska mjesta sposobna za vezanje na protutijela jer najmanje dva protutijela djeluju u "sendviču". Izmjerena apsorbancija razmjerna je koncentraciji analita. Kompetitivna metoda ELISA uključuje imobiliziranje antigena i njihovo vezanje na krutu fazu. Ako uzorak ne sadržava antigen, protutijelo obilježeno enzimom pokazuje maksimalno vezanje na krutu fazu, što rezultira visokim izmjerenim vrijednostima apsorbancije obojenog produkta. Povećanjem udjela antigena u uzorku dolazi do inhibicije vezanja protutijela obilježenih enzimima na podlogu te posljedično i nižih izmjerenih vrijednosti apsorbancije. Izmjerena apsorbancija obrnuto je proporcionalna koncentraciji analita u uzorku (www.bosterbio.com). Elektrokemiluminiscencija (ECLIA) će biti detaljnije opisana u poglavlju 3. (materijali i metode).

Tablica 1. Imunokemijske metode u kliničkoj praksi i primjeri pretraga

METODA	PRIMJERI PRETRAGA
IMUNONEFELOMETRIJA	ceruloplazmin, homocistein, albumin, imunoglobulin G (IgG)
IMUNOTURBIDIMETRIJA	transferin, haptoglobin, feritin, alfa-1-antitripsin, beta-2-mikroglobulin
IMUNOFIKSACIJA	monoklonski protein – imunotipizacija u serumu

LATEKS-IMUNOTRUBIDIMETRIJA	von Willebrandov faktor – aktivnost (VWF – aktivnost), von Willebrandov faktor - antigen (VWF:Ag)
ACMIA	ciklosporin, digoksin
ELFA	D-dimeri, protein c-antigen
CLIA	specifični imunoglobulin E na alergene peluda (bazge, breze, trave mačji repak), specifični imunoglobulin E na alergen grinje iz kućne prašine
PETINIA	valproična kiselina
IMUNOHIBRIDIZACIJA	antimitohondrijska antitijela, anti-neuronska autoantitijela (Hu, Yo, Ri)
ECLIA	troponin T-visokoosjetljivi, alfa-1-fetoprotein (AFP), karcinoembrijski antigen (CEA), karbohidratni antigen 19-9 (CA 19-9), vitamin B ₁₂ , folna kiselina, vitamin D (25-hidroksi)
ELISA	adalimumab, borrelia burgdorferi (IgG), varicella/zoster (IgG), morbilli (IgG), antitijela na infliksimab, ukupna aktivnost klasičnog puta aktivacije komplementa (CH50), antitijela na dvostruku uzvojnici DNA (dsDNA)

1.5. Interferencije biotina u imunokemijskim analizama

Biotin se sve više koristi kao dodatak prehrani (multivitaminski dodatci), kao preparat za kožu, kosu i nokte te u farmakološke svrhe (progresivna multipla skleroza, nedostaci karboksilaze i biotinidaze i propionska acidemija). U obliku multivitaminskih dodataka koristi se u dozi od 30 mikrograma. Kao preparat za kožu, kosu i nokte koristi se u dozi od 50 mikrograma pa sve do 20 miligrama, najčešće u dozi od 1 do 10 miligrama. U Republici Hrvatskoj u ljekarnama se mogu nabaviti preparati u dozi do najviše dva miligrama biotina. U farmakološke svrhe koristi se u dozi od 100 do 300 miligrama. Biotin iz preparata ili iz farmakoloških pripravaka može interferirati u imunokemijskim metodama koje rabe biotinilirana protutijela i interakciju biotin – streptavidin u svojim sustavima. Interferencije biotina uočavaju se kod preparata na bazi biotina u dozi od 5 – 10 miligrama biotina i različite su ovisno o analitičkim sustavima koji se koriste (Dasgupta, 2019.). Biotin interferira u imunokemijskim analizama na način da u kompetitivnim imunotestovima prouzrokuje pozitivnu interferenciju (lažno pozitivni rezultati), a u sendvič-imunotestovima negativnu

interferenciju (lažno negativni rezultati) (Samarsinghe i sur., 2017). Najčešće opisane interferencije biotina u kliničkoj praksi jesu interferencije u testovima funkcije štitne žlijezde i troponina I. Kod tih se testova interferencije biotina javljaju kod najnižih koncentracija biotina. Biotin pokazuje pozitivnu interferenciju (lažno pozitivni rezultati) s testovima tiroksina (T4), slobodnog tiroksina (FT4), trijodtironina (T3) i slobodnog T3 (FT3) jer su to relativno male molekule i imunokemijski testovi korišteni za njihovu analizu kompetitivni su imunotestovi. Nasuprot tome, tiroidni stimulirajući hormon (TSH) velika je molekula (molekularna težina: 28 kDa) koja zahtijeva sendvič-immunokemijski test za analizu, tj. biotin lažno snižava vrijednost TSH. Takvi laboratorijski nalazi pogrešno upućuju na dijagnozu Gravesove bolesti (Piketty i sur., 2017). Interferencija biotina kod analize troponina I još je opasnija. Interferencija biotina lažno snižava troponin I koji je biljeg akutnog infarkta miokarda. Stoga lažno negativan troponin I u kontekstu atipične boli u prsima i nespecifičnih promjena EKG-a može imati ozbiljne kliničke posljedice jer može dovesti do neprepoznavanja akutnog infarkta miokarda (Willeman i sur., 2017).

Tablica 2. Analitički sustavi i tvrtke koje se koriste biotinom u svom formatu

ANALITIČKI SUSTAV	TVRTKA
Automated Analyzer	Diagnostic Company
Elecsys, Cobas and Modular Platform	Roche Diagnostics
Vitros Platforms	Ortho Clinical Diagnostics
Dimension ExL, Dimension Vista, Immulite, Centaur Platforms	Siemens Healthineers Laboratory Diagnostics
Access, DXI and DXC Platforms	Beckman Coulter
Isys Platforms	Immunodiagnostic System

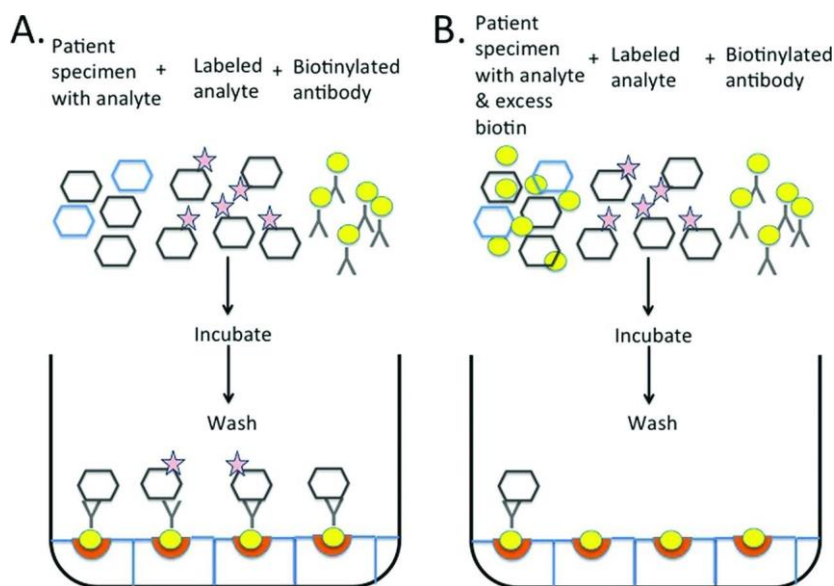
1.6. Mehanizam interferencija biotina

Biotin interferira u imunoanalizama koje se koriste biotiniziranim protutijelom i interakcijom biotin – streptavidin. Biotin prisutan u biotiniziranom protutijelu ima jak afinitet za streptavidin. Streptavidin je protein koji se izdvaja iz bakterije *Streptomyces avidinii*. Molekula streptavidina sastoji se od četiri identične podjedinice, svaka s aktivnim veznim mjestom za vitamin biotin, tj. može vezati četiri mola biotina po molu streptavidina i lako se može imobilizirati na čvrstu površinu (mikročestičnu ili kromatografsku), bez ugrožavanja sposobnosti vezanja biotina. U imunotestovima na bazi biotina protutijela su obično biotinizirana, dok je hvatanje kompleksa antigen – biotinizirano protutijelo postignuto

primjenom mikročestica obloženih streptavidinom. Biotinilacija protutijela jednostavan je proces koja se može postići upotrebom sukcinimidil-estera biotina. Ovaj reagens, koji je topljiv u vodi, reagira s primarnim aminima lizinskih ostataka i stvara amidnu vezu. Biotinilacija protutijela ne mijenja sposobnost vezanja protutijela i antigena. Iako je vezanje biotina na streptavidin u prirodi nekovalentno, zbog jakog afiniteta streptavidina za biotin nastali je kompleks vrlo stabilan i otporan na raspad čak i u okolini promjenjivog pH i temperature ili u prisutnosti deterdženata. Stoga kemijska reakcija ili stanje koje generira analizirani signal nema utjecaja na interakciju biotin-streptavidin. Interferencije biotina prouzrokuju lažno povišene vrijednosti analita koristeći kompetitivni format imunokemijskog testa i lažno snižene vrijednosti koristeći sendvič-format imunokemijskog testa (Mao, 2010.).

1.6.1. Mehanizam interferencija biotina u kompetitivnome imunokemijskom testu

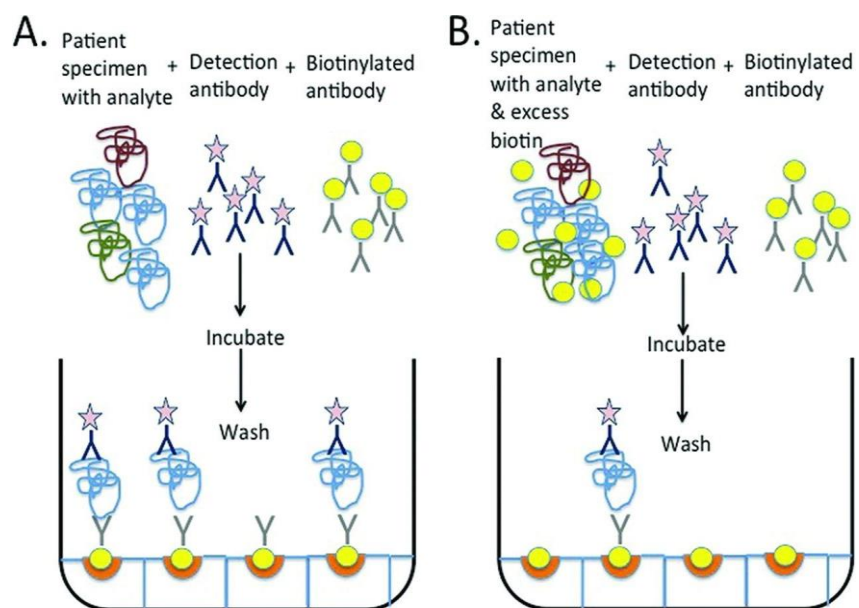
Mehanizam interferencije biotina u kompetitivnom formatu imunotestova prikazan je na slici 1. Uzorak pacijenta, obilježeni analit i biotinirana protutijela dodaju se u reakcijsku posudu u kojoj se nalazi streptavidin vezan na čvrstu fazu (mikročestice obložene streptavidinom). Biotinilirano se protutijelo veže na streptavidin. Analit od interesa natjecat će se s obilježenim analitom za vezanje na biotinilirana protutijela. Ako ima više analita u uzorku, više će se vezati na biotinilirana protutijela (što je više neobilježenoga antigena, manje će se obilježenog antigena vezati za protutijelo i obratno). Nevezane se tvari ispiru. Preostali će signal biti obrnuto proporcionalan koncentraciji analita (A). Međutim, ako je u uzorku višak biotina, biotin će se vezati za mjesta streptavidina blokirajući biotinilirano protutijelo te stoga i analit od interesa. Biotinilirano protutijelo vezat će se za analit od interesa, ali, bez vezanja za čvrstu fazu, bit će ispirano. To će rezultirati signalom koji je lažno smanjen, a s obzirom na to da je u kompetitivnom testu signal obrnuto proporcionalan koncentraciji analitita, doći će do lažno povišenog rezultata (B) (www.jalm.aaccjnls.org)



Slika 1. Mehanizam interferencija biotina u kompetitivnom formatu testa (preuzeto sa www.jalm.aaccjnls.org)

1.6.2. Mehanizam interferencija biotina u sendvič-imunokemijskom testu

Mehanizam interferencije biotina u sendvič-formatu prikazan je na slici 2. Uzorak pacijenta, protutijela za detekciju i biotinilirana protutijela dodaju se u reakcijsku posudu u kojoj se nalazi streptavidin vezan na čvrstu fazu (mikročestice obložene streptavidinom). Biotinilirano protutijelo veže se na streptavidin. Analit od interesa bit će u sendviču između biotiniliranoga i detektirajućeg protutijela. Nevezane se tvari ispiru. Preostali signal bit će proporcionalan koncentraciji analita u uzorku (A). Međutim, ako je u uzorku višak biotina, biotin će se vezati za mjesta streptavidina blokirajući biotinilirano protutijelo te stoga i analit od interesa. Biotinilirano protutijelo vezat će se za analit od interesa, ali, bez vezanja za čvrstu fazu, bit će isprano. To će rezultirati signalom koji je lažno smanjen, a budući da je u sendvič-testu signal proporcionalan koncentraciji analita u uzorku, doći će do lažno smanjenog rezultata (B). (www.jalm.aaccjnls.org)



Slika 2. Mehanizam interferencija biotina u sendvič-formatu testa (preuzeto sa www.jalm.aaccjnls.org)

1.7. Interferencije biotina u kliničkoj praksi

Tablica 3. Interferencije biotina u imunokemijskim analizama koje rabe biotin u svom formatu.

SKUPINA TESTOVA	KOMPETITIVNI IMUNOTEST (LAŽNO POVIŠEN REZULTAT)	SENDVIČ-IMUNOTEST (LAŽNO SNIŽEN REZULTAT)
Funkcija tiroidne žlijezde	ukupni T4, slobodni T4, ukupni T3, slobodni T3, anti-TPO (anti-tiroidna peroksidaza), anti-TSHR (protutijelo na receptor tiroidnoga stimulirajućeg hormona)	tiroidni stimulirajući hormon (TSH), tiroglobulin
Hormoni	testosteron, estradiol, kortizol, dehidroepiandrosteron-sulfat,	paratiroidni hormon (PTH), luteinizirajući hormon (LH), folikul-stimulirajući hormon (FSH), faktor rasta, prolaktin, inzulin, c-peptid, adrenokortikotropni hormon (ACTH)
Srčani biljezi		troponin I, troponin T, kreatinin-kinaza – srčani izoenzim (CK-MB)
Serološka testiranja		HIV antigen, HIV protutijela, hepatitis C protutijela, hepatitis B površinski antigen, hepatitis B površinska protutijela, hepatitis B IgM protutijela, hepatitis A IgM protutijela
Tumorski biljezi		Alfa-1-fetoprotein (AFP), prostata-specifični antigen (PSA), karcinoembrijski antigen (CEA), karbohidratni antigen 19-9 (CA19-9), tumorski antigen 125 (CA125)
Ostali analiti	vitamin D, vitamin B ₁₂ , folna kiselina	feritin, mioglobin, globulin koji veže spolne hormone
Lijekovi	digoksin, digitoksin	

2. OBRAZLOŽENJE TEME

S obzirom na sve veću uporabu OTC (od engleskog izraza „over the counter“, tj. uzima se bez liječničkog recepta) preparata biotina koji se koriste za kožu, kosu i nokte te lijekova na bazi biotina djelatnici medicinskobiokemijskih laboratorija i liječnici moraju biti svjesni utjecaja biotina na rezultate imunokemijskih analiza. Interferencije biotina mogu dovesti do pogrešnog laboratorijskog nalaza, a onda i do pogrešne liječničke dijagnoze i do pogrešnog načina liječenja, što može biti vrlo štetno za pacijenta. Interferencije biotina u imunokemijskim analizama relativno su kasno otkrivene i još nema dovoljno znanstvenih radova o njima te nisu dovoljno istražene. Cilj ovoga diplomskog rada jest istražiti interferencije biotina u dozi od pet miligrama (mg) na pet analita koristeći se imunokemijskom metodom. To su: vitamin D, vitamin B₁₂, karcinoembrijski antigen (CEA), karbohidratni antigen 19-9 (CA 19-9), i alfa-1-fetoprotein (AFP). Diplomski rad proveden je u Kliničkome bolničkom centru Zagreb. U istraživanju sudjeluje 12 ispitanika. Uzorci krvi uzimaju im se dva puta i određuju navedeni analiti. Poslije prvog uzorkovanja ispitanici uzimaju oralno 5 mg biotina i ponovno se uzimaju uzorci nakon tri sata. Imunokemijska metoda kojom se određuju analiti jest elektrokemiluminiscencijska imunokemijska metoda (ECLIA). Rezultati mjerenja određuju se na način da se za svaki analit iz dva mjerenja izračuna postotak odstupanja prvoga mjerenja od drugog i na temelju veličine RCV (referentna promjena vrijednosti) zaključi je li prisutna interferencija biotina na taj analit ili je nema.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci

U istraživanju sudjeluje 12 zdravih ispitanika (22 – 61 godina), šest muških i šest ženskih. Ispitanici su dobrovoljno pristali sudjelovati u istraživanju i upoznati su sa svrhom istraživanja. U Republici Hrvatskoj mogu se nabaviti OTC pripravci biotina u dozi do najviše 2 mg. Ispitanici u istraživanju uzimaju 5 mg biotina jer je to puno više od preparata koji se mogu nabaviti u Republici Hrvatskoj. Ako se utvrdi da nema interferencija biotina u dozi od 5 mg, onda ih sigurno nema niti u dozi od 2 mg.

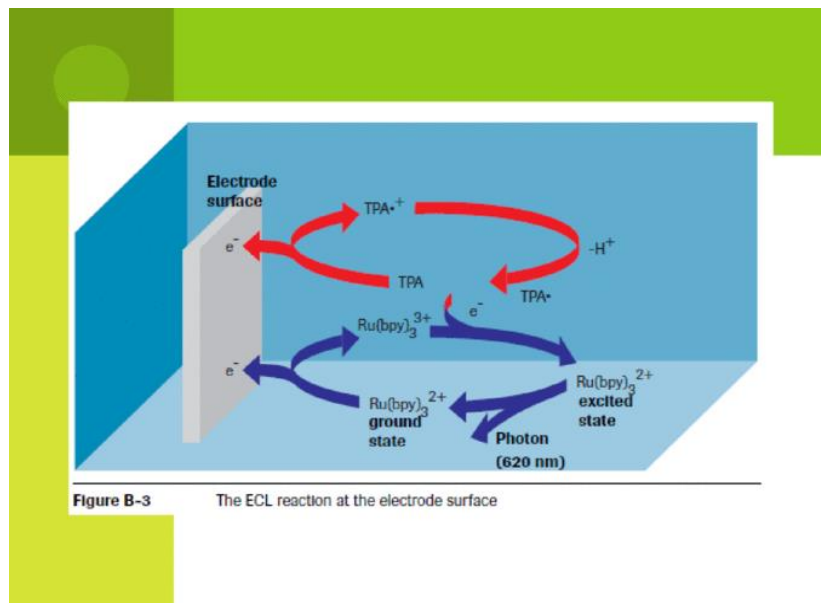
Prvo uzorkovanje - za analizu se koristi serum (krv se vadi u standardne epruvete bez antikoagulansa ili u epruvete koje sadržavaju gel-separator (odvaja serum od stanica, stanice su ispod gela, a serum je iznad gela). Uzorci se potom stavljaju na uređaj za predanalitičku obradu (centrifuga) i centrifugiraju 10 minuta na 3500 okretaja u minuti.

Drugo uzorkovanje - nakon prvog uzorkovanja ispitanicima se oralno daje 5 mg biotina Natrol (tvrtka Chastworth, SAD) i uzimaju se uzorci ponovno nakon tri sata. Daljnji je postupak analogan kao kod prvog uzorkovanja.

3.2. Metode

Diplomski je rad proveden u Kliničkome bolničkom centru Zagreb (Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Odjel za elektroforetsku i imunokemijsku dijagnostiku). Sve su analize provedene na automatskome imunokemijskom analizatoru Cobas e601 tvrtke Roche Diagnostics. Korištena je imunokemijska metoda elektrokemiluminiscencije – ECLIA (*Electrochemiluminescence Immunoassay*). ECLIA se temelji na reakciji između TPA (tripropilamin) i Ru (rutenij)-kompleksa. Poslije primjene napona na elektrodu, nastaje kemiluminiscentna reakcija između TPA i Ru-kompleksa. Ta reakcija dovodi do emisije svjetla koja se mjeri fotomultiplikatorom. TPA na elektrodi oksidira i nastaje radikal $\text{TPA}\bullet^+$, a Ru-kompleks oksidira (Ru je u kompleksu u Ru^{2+}) do Ru^{3+} . Ru-kation i TPA reagiraju i dolazi do redukcije Ru-kompleksa i prelaska u pobuđeno stanje. To je pobuđeno stanje nestabilno pa dolazi do emisije fotona na 620 nm i kompleks se vraća u osnovno stanje. TPA se troši, pa se treba nalaziti u višku. Ru-kompleks stalno se obnavlja te može proći kroz niz ciklusa u kojima se stvara svjetlosni signal. Postoje dva tipa metode ECLIA. To su kompetitivna i sendvič ECLIA. Kod kompetitivne metode ECLIA nastala je količina svjetla

obrnuto proporcionalna koncentraciji analita u uzorku, a kod sendvič-metode ECLIA količina nastalog svjetla proporcionalna je koncentracija analita u uzorku (www.hnlab.ir).



Slika 3. Reakcija između TPA i Ru-kompleksa (preuzeto sa www.cobas.be)

3.2.1. Određivanje koncentracije vitamina B12

Metoda: kompetitivna ECLIA

Ukupno trajanje analize: 27 minuta.

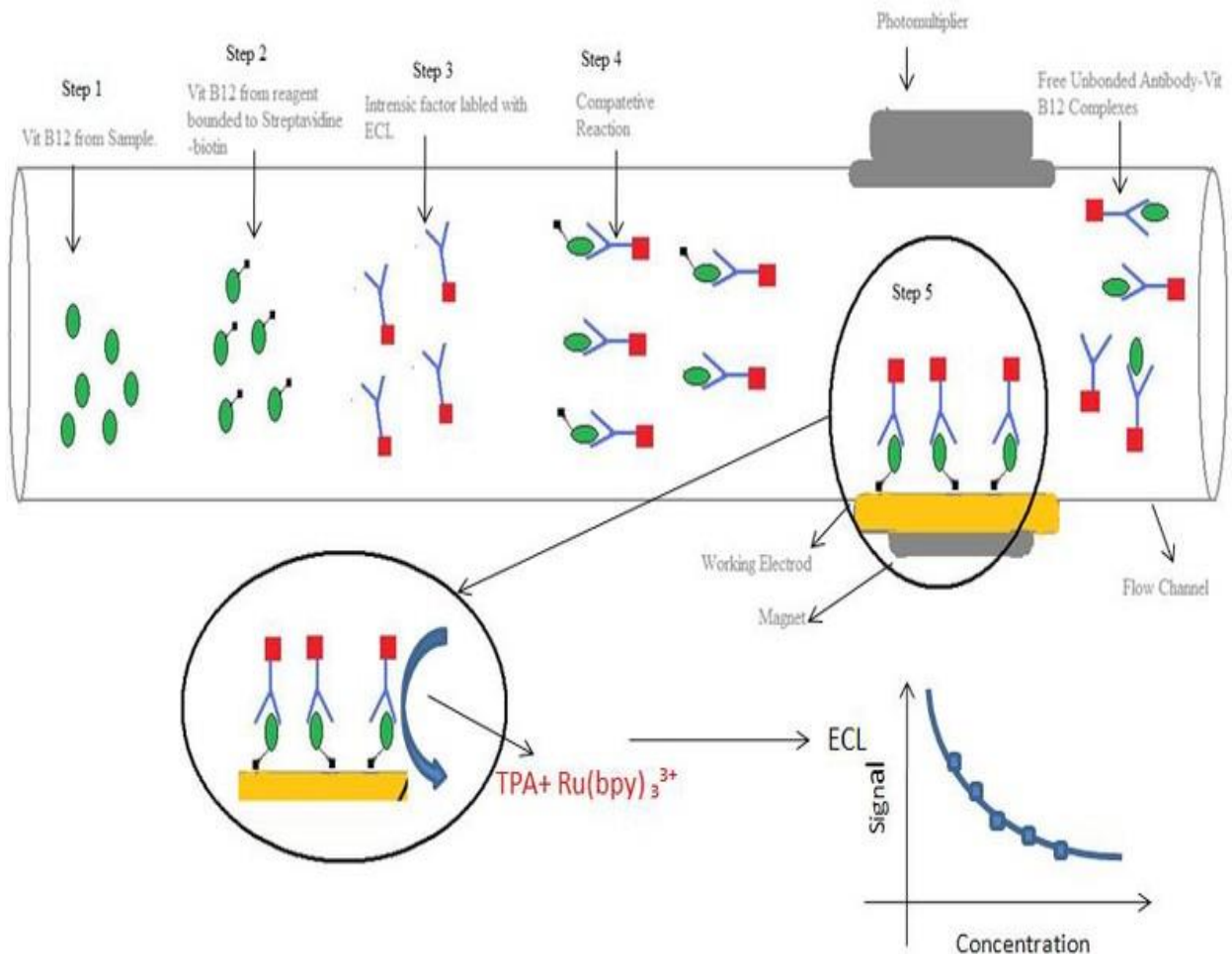
PRVA INKUBACIJA – uzorak (15 μ L) koji sadržava vitamin B₁₂ inkubira se ditiotretiolom (DTT), natrijevim hidroksidom i natrijevim cijanidom da se vitamin B₁₂ oslobodi od unutarnjeg faktora (denaturira se) na koji je vezan.

DRUGA INKUBACIJA – inkubiranje prethodno tretiranog uzorka s unutarnjim faktorom obilježenim rutenijevim kompleksom. Stvara se kompleks vitamina B₁₂ i rutenijem obilježenoga unutarnjeg faktora. Količina kompleksa ovisi o koncentraciji vitamina B₁₂ u uzorku.

TREĆA INKUBACIJA – nakon dodavanja mikročestica obloženih streptavidinom i vitamina B₁₂ obilježenog biotinom popunjavaju se sva slobodna mjesta za vezanje na unutarnjem faktoru obilježenom rutenijem i nastaje kompleks rutenijem obilježenog faktora i biotinom obilježenog vitamina B₁₂. Cijeli se kompleks veže na krutu fazu interakcijom biotina i streptavidina.

DETEKCIJA - reakcijska smjesa usisava se u cijev za mjerenje i mikročestice se vežu za magnet, odnosno površinu elektrode. Nevezane tvari uklanjaju se s pomoću otopine

ProCell/ProCell M koja sadržava TPA. Primjenom napona na elektrodu nastane kemiluminiscentna reakcija koja dovodi do emisije svjetla koja se mjeri fotomultiplikatorom. Količina nastalog svjetla obrnuto je proporcionalna koncentraciji vitamina B₁₂ u uzorku (www.roche.de)



Slika 4. Kompetitivna metoda ECLIA (slika preuzeta sa www.iioab.org)

3.2.2. Određivanje koncentracije vitamina D

Metoda: kompetitivna ECLIA

Ukupno trajanje analize: 27 minuta

PRVA INKUBACIJA – uzorak (20 μL) koji sadržava vitamin D inkubira se ditiotretiolom (DTT) i natrijevim hidroksidom da se vitamin D oslobodi od transportnog proteina.

DRUGA INKUBACIJA – inkubiranje prethodno tretiranog uzorka proteinom koji veže vitamin D obilježenim rutenijevim kompleksom. Stvara se kompleks vitamina D i rutenijem obilježenog proteina koji veže vitamin D. Količina kompleksa ovisi o koncentraciji vitamina D u uzorku.

TREĆA INKUBACIJA - nakon dodavanja mikročestica obloženih streptavidinom i vitamina D obilježenog biotinom popunjavaju se sva slobodna mjesta za vezanje na rutenijem obilježenom proteinu koji veže vitamin D i nastaje kompleks rutenijem obilježenog proteina koji veže vitamin D i biotinom obilježenog vitamina D. Cijeli se kompleks veže na krutu fazu interakcijom biotina i streptavidina.

DETEKCIJA – reakcijska smjesa usisava se u cijev za mjerenje i mikročestice se vežu za magnet, odnosno površinu elektrode. Nevezane tvari uklanjaju se s pomoću otopine ProCell/ProCell M koja sadržava TPA. Primjenom napona na elektrodu nastane kemiluminiscentna reakcija koja dovodi do emisije svjetla koja se mjeri fotomultiplikatorom. Količina nastalog svjetla obrnuto je proporcionalna koncentraciji vitamina D u uzorku (www.cobas.be).

3.2.3. Određivanje koncentracije karcinoembrijskog antigena (CEA)

Metoda: sendvič ECLIA

Ukupno trajanje analize: 18 minuta

PRVA INKUBACIJA – uzorak (10 µL) inkubira se biotinom obilježenim specifičnim monoklonskim protutijelom specifičnim za CEA i monoklonskim CEA specifičnim protutijelom obilježenim rutenijevim kompleksom. Ako uzorak sadržava CEA, stvara se sendvič-protutijelo (obilježeno biotinom) – antigen (CEA) – protutijelo (obilježeno kompleksom rutenija).

DRUGA INKUBACIJA – nakon dodatka mikročestica obilježenih streptavidinom kompleks se veže za stacionarnu fazu streptavidinom koji je vezan za biotin kojim je obilježeno protutijelo.

DETEKCIJA – reakcijska smjesa usisava se u cijev za mjerenje i mikročestice se vežu za magnet, odnosno površinu elektrode. Nevezane tvari uklanjaju se s pomoću otopine ProCell/ProCell M koja sadržava TPA. Primjenom napona na elektrodu nastane kemiluminiscentna reakcija koja dovodi do emisije svjetla koja se mjeri fotomultiplikatorom. Količina nastalog svjetla proporcionalna je koncentraciji CEA u uzorku (www.labogids.sintmaria.be)

3.2.4. Određivanje koncentracije alfa-1-fetoproteina (AFP)

Metoda: sendvič ECLIA

Ukupno trajanje analize: 18 minuta

PRVA INKUBACIJA – uzorak (10 µL) inkubira se biotinom obilježenim specifičnim monoklonskim protutijelom specifičnim za AFP i monoklonskim AFP specifičnim protutijelom obilježenim rutenijevim kompleksom. Ako uzorak sadržava AFP, stvara se sendvič-protutijelo (obilježeno biotinom) – antigen (AFP) – protutijelo (obilježeno kompleksom rutenija).

DRUGA INKUBACIJA – nakon dodatka mikročestica obilježenih streptavidinom kompleks se veže za stacionarnu fazu streptavidinom koji je vezan za biotin kojim je obilježeno protutijelo.

DETEKCIJA – reakcijska smjesa usisava se u cijev za mjerenje i mikročestice se vežu za magnet, odnosno površinu elektrode. Nevezane tvari uklanjaju se s pomoću otopine ProCell/ProCell M koja sadržava TPA. Primjenom napona na elektrodu nastane kemiluminiscentna reakcija koja dovodi do emisije svjetla koja se mjeri fotomultiplikatorom. Količina nastalog svjetla proporcionalna je koncentraciji AFP u uzorku (www.labogids.sintmaria.be)

3.2.5. Određivanje koncentracije karbohidratnog antigena 19-9 (CA 19-9)

Metoda: sendvič ECLIA

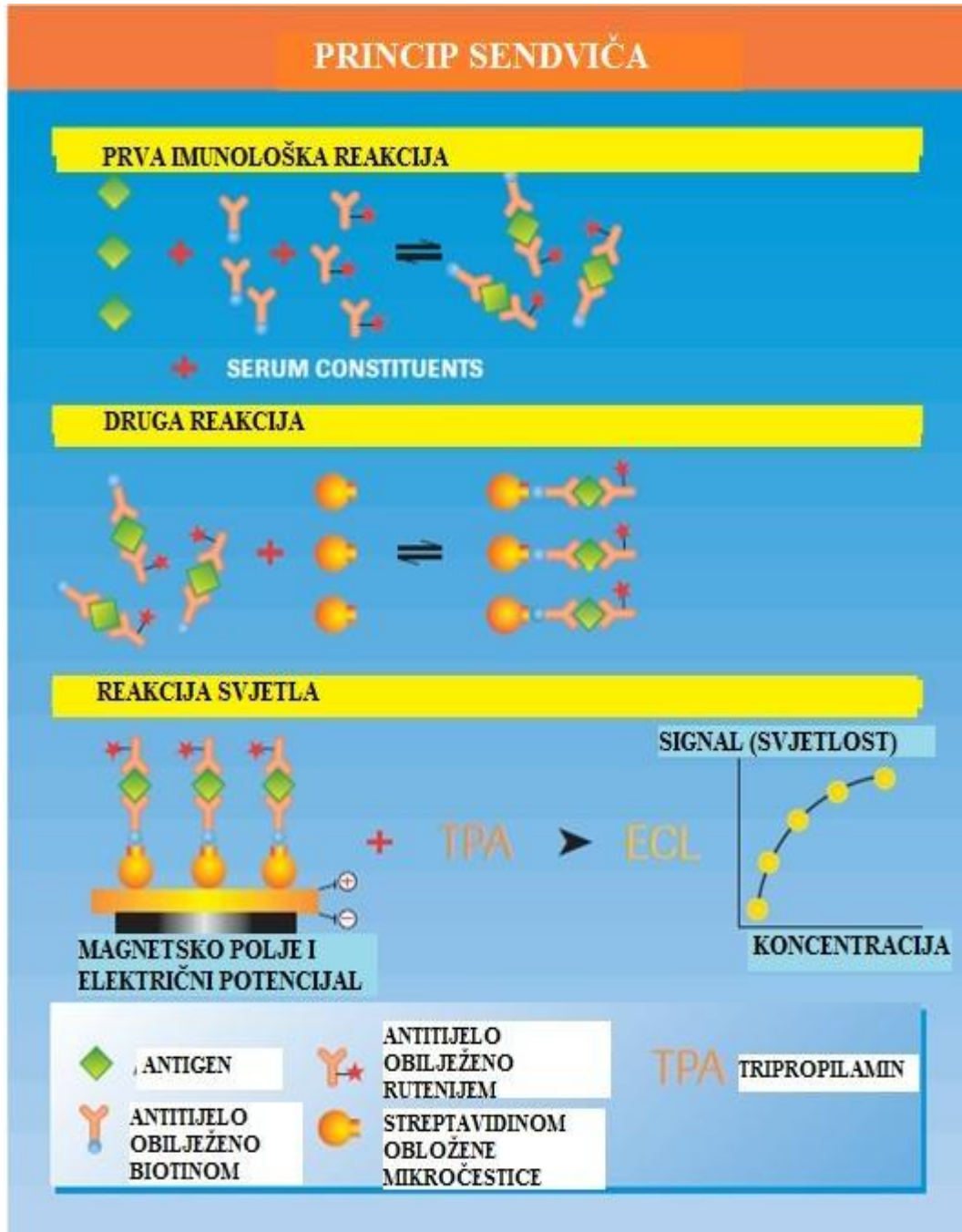
Ukupno trajanje analize: 18 minuta

PRVA INKUBACIJA – uzorak (10 µL) inkubira se biotinom obilježenim specifičnim monoklonskim protutijelom specifičnim za CA 19-9 i monoklonskim CA 19-9 specifičnim protutijelom obilježenim rutenijevim kompleksom. Ako uzorak sadržava CA 19-9, stvara se sendvič-protutijelo (obilježeno biotinom) – antigen (CA 19-9) – protutijelo (obilježeno kompleksom rutenija).

DRUGA INKUBACIJA – nakon dodatka mikročestica obilježenih streptavidinom kompleks se veže za stacionarnu fazu streptavidinom koji je vezan za biotin kojim je obilježeno protutijelo.

DETEKCIJA – reakcijska smjesa usisava se u cijev za mjerenje i mikročestice se vežu za magnet, odnosno površinu elektrode. Nevezane se tvari uklanjaju s pomoću otopine ProCell/ProCell M koja sadržava TPA. Primjenom napona na elektrodu nastane kemiluminiscentna reakcija koja dovodi do emisije svjetla koja

se mjeri fotomultiplikatorom. Količina nastalog svjetla proporcionalna je koncentraciji (CA 19-9) u uzorku (labogids.sintmaria.be).



Slika 5. Sendvič ECLIA (preuzeto sa www.hnlab.ir).

3.3. Obrada rezultata

U istraživanju se dva puta određuju koncentracije analita. Prvi put prije uzimanja biotina, zatim se oralno uzima 5 mg biotina Natrol i nakon tri sata ponovno se određuje koncentracija

analita. Iz koncentracija analita prije uzimanja biotina i tri sata nakon uzimanja biotina izračuna se postotak odstupanja prvoga mjerenja od drugog prema formuli: (konc. analita poslije biotina – koncentracija analita prije biotina) / koncentracija analita prije biotina*100. Druga je bitna veličina referentna promjena vrijednosti – RCV (engl. *reference change value*) i ona se definira kao minimalna bitna razlika između dvaju mjerenja u različitim vremenskim točkama. U osnovi, RCV je razlika koja se mora prekoračiti između dvaju slijednih rezultata

da bi promjena bila klinički važna. Računa se prema formuli $RCV = 2^{1/2} * Z * (CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}$, gdje je Z – standardna devijacija, CV_A – nepreciznost analize nalita, a CV_I – biološka varijacija analita. Za ovo istraživanje RCV za svaki analit nije računano, nego je uzet iz literature. Klinički važna interferencija biotina javlja se onda kada je postotak odstupanja (apsolutna vrijednost) veći od RCV-a, a kad je postotak odstupanja manji od RCV-a nema klinički važne interferencije biotina.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati za vitamin B12

Tablica 4. Rezultati za vitamin B₁₂

Godine	Spol	Koncentracij a prije biotina (pmol/L)	Koncentracij a poslije biotina (pmol/L)	Postotak odstupanja (%)
56	žensko	218,9	211,5	-3,4
50	žensko	169,2	159,9	-5,5
44	žensko	386,3	381,8	-1,2
42	žensko	580,6	545,8	-6,0
29	žensko	251,1	249,1	-0,8
47	žensko	219,1	224,2	2,3
41	muško	350,0	345,1	-1,4
39	muško	257,9	263,0	2,0
26	muško	225,7	214,4	-5,0
22	muško	557,2	563,7	1,2
23	muško	488,9	493,4	0,9
61	muško	197,0	191,8	-2,6

4.2. Rezultati za vitamin D

Tablica 5. Rezultati za vitamin D

Godine	Spol	Koncentracij a prije biotina (nmol/L)	Koncentracij a poslije biotina (nmol/L)	Postotak odstupanja (%)
56	žensko	45,23	51,97	14,9
50	žensko	39,65	45,25	14,1
44	žensko	30,28	38,43	26,9
42	žensko	25,18	16,44	-34,7
29	žensko	20,95	22,92	9,4
47	žensko	38,55	43,35	12,5
41	muško	59,97	56,46	-5,9
39	muško	45,86	53,55	16,9
26	muško	42,66	42,74	0,2
22	muško	67,04	69,93	4,3
23	muško	75,84	54,12	-28,6
61	muško	42,83	51,45	17,4

4.3. Rezultati za CEA

Tablica 6. Rezultati za CEA

Godine	Spol	Koncentracij a prije biotina ($\mu\text{g/L}$)	Koncentracij a poslije biotina ($\mu\text{g/L}$)	Postotak odstupanja (%)
56	žensko	0,88	0,81	-5,8
50	žensko	0,65	0,67	3,8
44	žensko	0,76	0,79	3,0
42	žensko	2,21	2,14	-3,2
29	žensko	0,62	0,60	-3,2
47	žensko	1,60	1,61	0,6
41	muško	1,08	0,99	-7,7
39	muško	3,26	3,35	2,8
26	muško	1,24	1,28	3,2
22	muško	0,50	0,46	-8,3
23	muško	0,55	0,60	8,3
61	muško	5,56	5,28	-5,0

4.4. Rezultati za AFP

Tablica 7. Rezultati za AF

Godine	Spol	Koncentracij a prije biotina (kIU/L)	Koncentracij a poslije biotina (kIU/L)	Postotak odstupanja (%)
56	žensko	12,67	11,50	-9,2
50	žensko	2,88	2,60	-9,7
44	žensko	2,29	2,24	-2,2
42	žensko	5,08	4,83	-4,9
29	žensko	1,01	1,06	5,0
47	žensko	2,42	2,43	0,4
41	muško	2,04	1,90	-6,9
39	muško	5,03	4,87	-3,2
26	muško	1,35	1,34	-0,7
22	muško	2,21	2,12	-4,1
23	muško	1,47	1,67	13,6
61	muško	2,44	2,24	-8,2

4.5. Rezultati za CA 19-9

Tablica 8. Rezultati za CA 19-9

Godine	Spol	Koncentracij a prije biotina (kIU/L)	Koncentracij a poslije biotina (kIU/L)	Postotak odstupanja (%)
56	žensko	10,93	10,58	-3,2
50	žensko	4,69	4,87	3,8
44	žensko	16,55	17,04	3,0
42	žensko	16,24	15,81	-2,6
29	žensko	5,47	5,73	4,8
47	žensko	0,65	0,64	-1,2
41	muško	6,01	5,71	-5,0
39	muško	3,80	3,84	1,1
26	muško	22,48	22,35	-0,6
22	muško	8,83	7,23	-18,1
23	muško	3,36	3,68	9,5
61	muško	25,83	25,21	-2,4

4.6. Rasprava

Iz dobivenih podataka može se zaključiti da biotin u koncentraciji od 5 mg ne interferira niti u jednom ispitaniku kod vitamina B₁₂, CEA, AFP i CA 19-9, a kod vitamina D primijećena je interferencija biotina u 1 od 12 ispitanika. Kao što je već prije objašnjeno u radu, interferencija biotina kod analita javlja se u slučaju kada je postotak odstupanja drugoga mjerenja od prvog veći od RCV-a.

Tablica 9. RCV vrijednosti za analite

ANALIT	RCV (%)
Vitamin D	18,0
CEA	36,8
AFP	35,6
CA 19-9	64,7
Vitamin B ₁₂	20,1

Za određivanje vitamina B₁₂ koristi se kompetitivni format testa, tj. možemo očekivati lažno povišene rezultate ako biotin interferira. RCV za vitamin B₁₂ je 20,1 %, a najveći pozitivni

postotak odstupanja je 2,3 % (tablica 4.). RCV je manji od postotka odstupanja, tj. nema interferencije biotina. Za određivanje CEA koristi se sendvič-format testa, tj. možemo očekivati lažno snižene rezultate ako biotin interferira. RCV za CEA je 36,8 %, a najveći negativni postotak odstupanja iznosi -8,3 % (tablica 6.). RCV je manji od postotka odstupanja, tj. nema interferencije biotina. Za određivanje AFP-a koristi se sendvič-format testa, tj. možemo očekivati lažno snižene rezultate ako biotin interferira. RCV za AFP je 35,6 %, a najveći negativni postotak odstupanja iznosi -9,7 % (tablica 7.) RCV je veći od postotka odstupanja, tj. nema interferencije biotina. Za određivanje CA 19-9 koristi se sendvič-format testa, tj. možemo očekivati lažno snižene rezultate ako biotin interferira. RCV za CA 19-9 je 64,7 %, a najveći negativni postotak odstupanja iznosi -18,1 %. RCV je veći od postotka odstupanja, tj. nema interferencije biotina. Iz ovih se podataka može zaključiti da biotin u dozi od 5 mg ne prouzrokuje interferenciju niti u jednom od 12 ispitanika kod vitamina B₁₂, CEA, CA 19-9 i AFP-a. U ovom se istraživanju nije određivala koncentracija biotina u krvi ispitanika nakon što su uzeli 5 mg biotina, no literaturni podatci navode da je koncentracija biotina u krvi kod osoba koje su uzele 5 mg biotina 10 – 73 ng/mL (jedan sat nakon doze) (Grimsey i sur., 2017). Roche Diagnostics propisuje da se interferencije biotina kod određivanja CEA metodom ECLIA javljaju kada je koncentracija biotina u krvi veća od 120 ng/mL, kod CA 19-9 kad je koncentracija biotina u krvi veća od 100 ng/mL, kod AFP kad je koncentracija biotina u krvi veća od 60 ng/mL, a kod vitamina B₁₂ kad je koncentracija biotina u krvi veća od 50 ng/mL. Iz ovog vidimo da, iako interferencije biotina nisu prisutne niti kod jednog od 12 ispitanika kod sva 4 analita (CEA, AFP, CA 19-9 i vitamin B₁₂), CEA i CA 19-9 manje su osjetljive na interferencije biotina od AFP-a i vitamin B₁₂ jer su potrebne više koncentracija biotina u krvi da bi biotin interferirao. Kod vitamina D uočava se interferencija biotina kod jednog od 12 ispitanika. RCV za vitamin D iznosi 18 %, a postotak odstupanja veći od RCV-a uočava se kod tri ispitanika (tablica 5.). Postotci odstupanja za ta tri ispitanika iznose -28,6 %, -34,7 % i 26,9 %. Naime, iako su za vitamin D kod tri ispitanika postotci odstupanja veći od RCV-a, interferencija biotina javlja se samo kod jednog ispitanika. Budući da je za vitamin D korišten kompetitivni format imunokemijskog testa, biotin interferira na način da prouzrokuje lažno povišene rezultate, tj. kod ispitanika kod kojih su postotci odstupanja negativni ne može se tvrditi da se javila interferencija biotina jer to proturječi teoriji o interferencijama biotina. Stoga se može zaključiti da se interferencija biotina javila kod ispitanika kod kojeg je postotak odstupanja 26,9 %, a za negativan postotak odstupanja veći od RCV-a kod vitamina D (-28,6 % i -34,7 %) nije poznat uzrok interferencije. U smjernicama tvrtke Roche Diagnostics navodi se da se interferencije biotina kod vitamina D

javljaju kad je koncentracija biotina u krvi veća od 30 ng/mL. Ta je vrijednost puno niža od vrijednosti biotina u krvi koji prouzrokuje interferenciju nego kod ostalih analita. Ako tome dodamo još i činjenicu da vitamin D ima najniži RCV, logično je da je on najosjetljiviji na interferenciju biotina od svih analita koji se istražuju u ovom radu. Iz ove rasprave vidljivo je da biotin u dozi od 5 mg nema velik utjecaj na istraživane analite. Ako pacijenti uzimaju pravilno pripravke biotina koji se mogu nabaviti u Republici Hrvatskoj (najviše 2 mg biotina dnevno), biotin neće interferirati s ovim analitima jer je prosječna koncentracija biotina u krvi kod pacijenata koji uzimaju 2 mg dnevno biotina puno niža nego najniža koncentracija biotina u krvi kod koje se počinju javljati interferencije biotina. Interferencije se mogu javiti ako pacijenti uzimaju puno veću dozu, npr. ako kupuju pripravke biotina koji su dostupni na internetskim trgovinama, a najčešće sadržavaju 10 mg biotina po dozi (npr. Natrol biotin maximum strength i Gloryfeel biotin). Svi testovi mogu biti osjetljivi na interferenciju biotina ako se uzimaju terapijske doze biotina (100 – 300 mg). Da bi se to izbjeglo, razvijeni su načini za izbjegavanje interferencija biotina u imunokemijskim analizama. To su: primjena platforme za ispitivanje koja se ne koristi biotinom u osmišljavanju ispitivanja, serijsko razrjeđivanje uzorka, čekanje dovoljno vremena da se biotin ukloni iz tijela i predtretman uzorka s mikročesticama obloženim streptavidinom za uklanjanje biotina prisutnog u uzorcima. Abbott Laboratories i DiaSorin Inc rabe platforme koje se ne koriste biotinom u dizajnu i tako su sigurne od interferencija biotina (Holmes i sur., 2017). Međutim, za laboratorije koji se koriste uređajima za analizu koji imaju imunotestove temeljene na biotinu, treba razmotriti alternativni pristup. Glavni je problem što ne postoji lako dostupan test za mjerenje koncentracije biotina u serumu. Stoga se uzorci koji sadržavaju visoke koncentracije biotina ne mogu pregledati kako bi se identificirali. Ako pacijent ne otkrije svoju uporabu mega-doze biotina, ne postoji način da kliničar ili laboratorijsko osoblje znaju da rezultati ispitivanja korištenjem imunoanaliza temeljenih na biotinu mogu biti netočni. Jedan jednostavan pristup za uklanjanje ineterferencija biotina jest serijsko razrjeđivanje uzorka gdje je nelinearnost nakon razrjeđivanja pokazatelj potencijalne prisutnosti ometajuće tvari u uzorku. Na primjer, Meany i suradnici potvrdili su negativnu interferenciju biotina u PTH testu koristeći se analizatorom Roche Elecsys s pomoću studije razrjeđenja. U nerazrijeđenom uzorku vrijednost PTH bila je 48 ng/L, ali nakon razrjeđenja 1 : 20 izračunana vrijednost PTH bila je 567 ng/L. Međutim, važno je napomenuti da se ta nelinearnost tijekom razrjeđivanja ne uočava samo zbog interferencije biotina, već je opća značajka svake interferencije (Kwok i sur., 2012). Drugi pristup za prevladavanje interferencije biotina u testovima temeljenima na biotinu jest čekanje dovoljno vremena da se biotin ukloni iz tijela. Roche Diagnostics

preporučuje čekanje osam sati prije prije uzorkovanja od posljednjeg uzimanja biotina. Općenito, najviša interferencija biotina uočena je dva sata nakon uzimanja biotina, a biotin ima relativno kratak poluživot od 1,8 sati nakon uzimanja male (do 2 mg) doze. Na temelju farmakokinetičkih podataka, čekanje osam sati nakon uzimanja biotina od 10 mg na dan trebalo bi biti dostatno za uklanjanje interferencije biotina (Grimsey i sur., 2017.). Međutim, pacijentima koji uzimaju farmaceutsku dozu biotina (100 – 300 mg) preporučuje se čekanje najmanje tri dana prije provođenja laboratorijskih ispitivanja. Jedan od glavnih problema povezanih s čekanjem dovoljno vremena da se biotin izluči u dovoljnoj količini iz tijela kako ne bi ometao testove jest da takvo razdoblje čekanja kod akutnih bolesnika nije moguće. Na primjer, biotin ometa testove troponin T i troponin I, ali nije moguće odgoditi vađenje krvi kod pacijenta koji je primljen u hitnu službu sa sumnjom na infarkt miokarda. Trenutačno je najbolji pristup za izbjegavanje interferencije biotina u imunitestovima temeljenima na biotinu predtretman uzorka mikročesticama obloženima streptavidinom za uklanjanje biotina prisutnog u uzorcima. Uzorak se prvo inkubira mikročesticama obloženima streptavidinom kako bi se biotin vezao za streptavidin. Nakon inkubacije uzorak se centrifugira i nadtalog (engl. *supernatant*) se koristi za daljnju analizu. Na ovaj se način uklanja biotin iz krvi čak i kod pacijenata s multiplom sklerozom koji uzimaju doze od 300 mg biotina dnevno (koncentracija biotina u krvi jedan sat nakon doze može iznositi do 1200 ng / mL) (Piketny i sur., 2017.).

5. ZAKLJUČCI

- Biotin ne interferira u dozi od 5 mg niti u jednom od 12 ispitanika kod CEA, CA 19-9, AFP i vitamina B₁₂ u ovom istraživanju.
- Biotin interferira u dozi od 5 mg u jednom od 12 ispitanika kod vitamina D u ovom istraživanju.
- Zdravstveni radnici moraju biti svjesni da biotin koji se nalazi u preparatima za kosu, kožu i nokte i u farmaceutskim proizvodima na osnovi biotina može sadržavati dovoljno biotina da prouzrokuje interferencije u imunokemijskim testovima.
- Ako se uzorci skupljaju u laboratoriju, važno je pitati pacijente jesu li uzimali biotin. Iako uzimanje dnevne preporučene količine biotina (30 mikrograma) obično ne utječu na imunotestove na osnovi biotina, neki dodatci biotina mogu sadržavati 20 mg biotina, a razina biotina od 300 mg koristi se za terapiju kod bolesnika s multiplom sklerozom.
- Koncentracija biotina do 1200 ng/mL može biti prisutna u uzorcima prikupljenima od pacijenata koji uzimaju 300 mg biotina dnevno kao dio terapije.
- Uporaba preparata biotina za kosu, kožu i nokte i farmaceutskih doza biotina za liječenje multiple skleroze može se u budućnosti povećati, stoga klinički znanstvenici, patolozi, liječnici i laboratorijski djelatnici moraju biti svjesni takvog učinka na rezultate imunotestova koji koriste biotin u svom formatu.
- Interferencije biotina kod najosjetljivijih analita vidljive su kod uzimanja 5 – 10 mg biotina dnevno, no kod farmaceutskih doza biotina (100 – 300 mg) interferencije se javljaju skoro kod svih analita.
- Ako se rezultati laboratorijskog testa ne podudaraju s kliničkim slikom pacijenta, interferenciju biotina treba smatrati izvorom pogreške u rezultatima laboratorijskih ispitivanja kod osoba koje uzimaju visoke doze biotina.
- Praktično rješenje za izbjegavanje interferencija biotina jest povećanje svijesti pacijenata o interferenciji biotina u laboratorijskim testovima. Tu ulogu imaju laboratorijski djelatnici i liječnici.

6. SAŽETAK / SUMMARY

6.1. SAŽETAK

S obzirom na činjenicu da se biotin sve više koristi u multivitaminskim dodacima, preparatima na osnovi biotina za kožu, kosu i nokte te kao lijek za liječenje progresivne multiple skleroze djelatnici medicinskobiokemijskih laboratorija i liječnici trebaju biti svjesni da biotin može utjecati na rezultate u imunokemijskim analizama koje rabe biotin i interakciju biotin – streptavidin u svojem formatu. Biotin utječe na rezultate u imunokemijskim analizama na dva načina: u kompetitivnom formatu testa prouzrokuje lažno pozitivne rezultate, a u sendvič-formatu testa prouzrokuje lažno snižene rezultate. Cilj je ovoga rada bio istražiti utjecaj biotina na pet analita (vitamin D, CEA, CA 19-9, AFP i vitamin B₁₂) kad se uzima u dozi od 5 mg. Istraživanje je osmišljeno tako da se dva puta mjere koncentracije analita u serumu (prije uzimanja biotina i tri sata nakon uzimanja biotina). U istraživanju je sudjelovalo 12 ispitanika (šest muških i šest ženskih) i koncentracije biotina određivane su na imunokemijskom analizatoru Cobas e601 koristeći se imunokemijskom metodom elektrokemiluminscencije (ECLIA). Istraživanjem je dokazano da biotin u dozi od 5 mg ne interferira niti u jednom od 12 ispitanika kod CEA, CA 19-9, AFP i vitamina B₁₂, a kod vitamina D interferira u jednom od 12 ispitanika. Ako se biotin uzima u puno većim dozama od 5 mg (terapijske doze za multiplu sklerozu iznose od 100 do 300 mg) on će tada interferirati kod svih analita. Da bi se izbjegle interferencije biotina klinički laboratoriji rabe četiri načina. To su korištenje platformom za ispitivanje koja se ne koristi biotinom u osmišljavanju ispitivanja, serijsko razrjeđivanje uzorka, čekanje dovoljno vremena da se biotin ukloni iz tijela i predtretman uzorka mikročesticama obloženima streptavidinom za uklanjanje biotina prisutnog u uzorcima. Djelatnici kliničkih laboratorija trebaju biti oprezni kod interpretacije rezultata i trebaju poučiti pacijente kako se pripremiti za imunokemijske analize ako uzimaju biotin i time pogreške laboratorijskih rezultata svesti na najmanju moguću mjeru.

6.2. SUMMARY

Given the fact that biotin is increasingly used in multivitamin supplements, biotin-based skin, hair and nail products, as well as a medication for treatment of progressive multiple sclerosis, medical biochemistry laboratory professionals and physicians should be aware that biotin can affect results in immunochemical analyses that use biotin and the streptavidin-biotin interaction in their platform. Biotin affects the results in immunochemical analysis in two ways: in competitive tests it causes false positive results, and in sandwich tests it causes false low results. The aim of this paper was to examine the impact of biotin on five analytes (vitamin D, CEA, CA 19-9, AFP and vitamin B₁₂) when administered at a dose of 5 mg. The research was designed in such a way to measure the concentrations of analytes in serum two times (before taking biotin and three hours after taking biotin). Twelve subjects participated in the research (six male and six female) and biotin concentrations were determined with the Cobas e601 immunoassay analyser using the electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) method. The investigation showed that 5 mg of biotin did not interfere in any of twelve subjects with CEA, CA 19-9, AFP and B₁₂, and in terms of vitamin D, it interfered with one out of twelve subjects. If biotin is taken at doses much higher than 5 mg (therapeutic doses for multiple sclerosis range from 100 to 300 mg), it will interfere with all analytes. There are four methods that clinical laboratories use in order to avoid biotin interference. These are the use of a test platform that does not use biotin in the design of the assay, serial dilution of the sample, waiting long enough for the biotin to be removed from the body and pre-treatment of samples with streptavidin-coated microparticles for the removal of biotin present in the samples. Clinical laboratory professionals should be careful when interpreting results and should educate patients on how to prepare for immunochemical analysis if they take biotin and thus minimise errors in lab results.

7. LITERATURA:

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biokemija, 1. hrvatsko izdanje. Zagreb, Školska knjiga, 2013, str. 416, 418, 423, 443, 444, 435.

Cinquanta L, Fontana DE, Bizzaro N. Chemiluminescent immunoassay technology what does it change in autoantibody detection. *Autoimmunity Highlights*. 2017 Dec8(1): 9.

Dasgupta A. Biotin and other interferences in immunoassays, 1. Izdanje, Elsevier, str. 1-15; 51-73.

Dodig S. Imunokemija, Zagreb, Medicinska naklada, 2014, str. 9-29; 73-98; 107- 174.

Erden G, Barazzi AO, Tezcan G, Yildirimkaya MM. Biological variation reference change value of CEA, CA 19-9, AFP in serum in healthy individuals, *Scan J Clin Lab Invest*. 2008; 68(3):212-8.

Grimsey P, Frey N, Bending G, Zitzler J et al. Population pharmacokinetics of exogenous biotin and the relationship between biotin serum levels and in vitro immunoassays interference. *Int J Pharmacokinetic* 2017; 2: 247-256.

Holmes EW, Samarasinghe S, Emanuele MA, Meah F. Biotin interference in clinical immunoassays: a cause for concern. *Arch Pathol Lab Med* 2017; 141; 1459-1450.

Kuktić V, Stojić-Vukanić Z. Imunonefelometrija i imunoturbidimetrija: Teorijski principi, instrumenti i primjena. *Arhiv za farmaciju*, 2009, vol. 59, br. 6, str. 536-550.

Kwok JS, Chan IH, Chan MH. Biotin interference on TSH and free thyroid hormone measurement. *Pathology* 2012; 44: 278-280.

Mao SY. Biotinylation of antibodies. *Methods Mol Biol* 2010; 588: 49-52.

Meany DL, Jan de Beur SM, Bill MJ, Sokoll LJ. A case of renal osteodystrophy with unexpected serum intact parathyroid hormone concentrations. *Clin Chem* 2009; 55: 1737-1741.

Minkovsky A, Lee MN, Dowlathshahi M, Angell TE et al. High dose biotin treatment for secondary progressive multiple sclerosis may interfere with thyroid assays. *AACE Clin Case Rep* 2016; 2: e370-e373.

Piketty ML, Polak M, Flechtner I, Gonzales-Briceño L et al. False biochemical diagnosis of hyperthyroidism in streptavidin-biotin-based immunoassays: the problem of biotin intake and related interferences. *Clin Chem Lab Med* 2017; 55: 780-788.

Piketty ML, Prie D, Sedel F, Bernard D et al. High-dose biotin therapy leading to false biochemical endocrine profiles: validation of a simple method to overcome biotin interference. *Clin Chem Lab Med* 2017; 55: 817-825.

Piketty ML, Souberbielle JC. Biotin an emerging analytical interference. *Ann Biol Clin (Paris)* 2017;75: 366-368.

Samarsinghe S, Meah F, Singh V, Basit A et al. Biotin interference with routine clinical immunoassays: understanding the causes and mitigate risk. *Endocr Pract* 2017; 23: 989-998.

Šegulja D. Određivanje razreda i tipa monoklonskog proteina metodom imunoprecipitacije, Specijalistički rad, Zagreb, 2015.

Willeman T, Casez O, Faure P, Gauchez AS. Evaluation of biotin interference on immunoassays: new data for troponin I, digoxin, NT-Pro-BNP, and progesterone. *Clin Chem Lab Med* 2017; 55: e216-e219.

<https://www.iioab.org/Vol2%282%292011/Karmi%20et%20al-IIOABJ-2%20%282%29-2011-23-32p.pdf>, pristupljeno 10. 4. 2019.

https://www.cobas.be/content/dam/internet/dia/cobas/cobas_be/en_BE/cobas/pdf/product1/Elecsys-Vitamin-D-total-assay/Elecsys%20Vitamin%20D%20total%20Factsheet.pdf, pristupljeno 10. 4. 2019.

http://labogids.sintmaria.be/sites/default/files/files/cea_2018-06_v24.pdf CEA, pristupljeno 14. 4. 2019.

http://labogids.sintmaria.be/sites/default/files/files/ca_19-9_2018-07_v23.pdf CA 19.9,
pristupljeno 14. 4. 2019

http://labogids.sintmaria.be/sites/default/files/files/afp_2018-10_v14_0.pdf
AFP, pristupljeno 14. 4. 2019.

<https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/elisa-principle>, pristupljeno 11. 4.
2019.

<http://jalm.aaccjnls.org/content/jalm/2/6/941.full.pdf>, pristupljeno 12.4.2019.

http://www.cobas.be/content/dam/internet/dia/cobas/cobas_be/en_BE/cobas/pdf/product1/Technology%20Elecsys%20ECL/Elecsys%20Technology%20Brochure%20I.pdf,
pristupljeno 10. 4. 2019.

<https://neupsykey.com/principles-of-analytical-methods/>, pristupljeno 12. 4. 2019.

<https://www.kbc-zagreb.hr/wp-content/uploads/2018/07/Popis-akreditiranih-laboratorijskih-postupaka-ispitivanja-2018-07-27.pdf>, pristupljeno 10. 4

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija/Medicinska biokemija
Zavod za (ime Zavoda) ili
Samostalni kolegij (naslov kolegija)
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska
ili druga adresa

Diplomski rad

INTERFERENCIJA BIOTINA U IMUNOKEMIJSKIM ANALIZAMA

Bruno Salopek

SAŽETAK

S obzirom na činjenicu da se biotin sve više koristi u multivitaminskim dodatcima, preparatima na osnovi biotina za kožu, kosu i nokte te kao lijek za liječenje progresivne multiple skleroze djelatnici medicinskobiokemijskih laboratorija i liječnici trebaju biti svjesni da biotin može utjecati na rezultate u imunokemijskim analizama koje rabe biotin i interakciju biotin – streptavidin u svojem formatu. Biotin utječe na rezultate u imunokemijskim analizama na dva načina: u kompetitivnom formatu testa prouzrokuje lažno pozitivne rezultate, a u sendvič-formatu testa prouzrokuje lažno snižene rezultate. Cilj je ovoga rada bio istražiti utjecaj biotina na pet analita (vitamin D, CEA, CA 19-9, AFP i vitamin B12) kad se uzima u dozi od 5 mg. Istraživanje je osmišljeno tako da se dva puta mjere koncentracije analita u serumu (prije uzimanja biotina i tri sata nakon uzimanja biotina). U istraživanju je sudjelovalo 12 ispitanika (šest muških i šest ženskih) i koncentracije biotina određivane su na imunokemijskom analizatoru Cobas e601 koristeći se imunokemijskom metodom elektrokemiluminescencije (ECLIA). Istraživanjem je dokazano da biotin u dozi od 5 mg ne interferira niti u jednom od 12 ispitanika kod CEA, CA 19-9, AFP i vitamina B12, a kod vitamina D interferira u jednom od 12 ispitanika. Ako se biotin uzima u puno većim dozama od 5 mg (terapijske doze za multiplu sklerozu iznose od 100 do 300 mg) on će tada interferirati kod svih analita. Da bi se izbjegle interferencije biotina klinički laboratoriji rabe četiri načina. To su korištenje platformom za ispitivanje koja se ne koristi biotinom u osmišljavanju ispitivanja, serijsko razrjeđivanje uzorka, čekanje dovoljno vremena da se biotin ukloni iz tijela i predtretman uzorka mikročesticama obloženima streptavidinom za uklanjanje biotina prisutnog u uzorcima. Djelatnici kliničkih laboratorija trebaju biti oprezni kod interpretacije rezultata i trebaju poučiti pacijente kako se pripremiti za imunokemijske analize ako uzimaju biotin i time pogreške laboratorijskih rezultata svesti na najmanju moguću mjeru.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 38 stranica, 5 grafičkih prikaza, 9 tablica i 21 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Biotin, interferencija, imunokemijska analiza

Mentor: **Dr. sc. Dunja Rogić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dunja Rogić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Lidija Bach Rojecky, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Saša Kralik Oguić, znanstveni suradnik, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb

Rad prihvaćen: rujan 2019.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
Department of (name of the department) or
Independent course (name of the course)
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia
ili druga adresa

Diploma thesis

BIOTIN INTERFERENCE IN CLINICAL IMMUNOASSAYS

Bruno Salopek

SUMMARY

Given the fact that biotin is increasingly used in multivitamin supplements, biotin-based skin, hair and nail products, as well as a medication for treatment of progressive multiple sclerosis, medical biochemistry laboratory professionals and physicians should be aware that biotin can affect results in immunochemical analyses that use biotin and the streptavidin-biotin interaction in their platform. Biotin affects the results in immunochemical analysis in two ways: in competitive tests it causes false positive results, and in sandwich tests it causes false low results. The aim of this paper was to examine the impact of biotin on five analytes (vitamin D, CEA, CA 19-9, AFP and vitamin B12) when administered at a dose of 5 mg. The research was designed in such a way to measure the concentrations of analytes in serum two times (before taking biotin and three hours after taking biotin). Twelve subjects participated in the research (six male and six female) and biotin concentrations were determined with the Cobas e601 immunoassay analyser using the electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) method. The investigation showed that 5 mg of biotin did not interfere in any of twelve subjects with CEA, CA 19-9, AFP and B12, and in terms of vitamin D, it interfered with one out of twelve subjects. If biotin is taken at doses much higher than 5 mg (therapeutic doses for multiple sclerosis range from 100 to 300 mg), it will interfere with all analytes. There are four methods that clinical laboratories use in order to avoid biotin interference. These are the use of a test platform that does not use biotin in the design of the assay, serial dilution of the sample, waiting long enough for the biotin to be removed from the body and pre-treatment of samples with streptavidin-coated microparticles for the removal of biotin present in the samples. Clinical laboratory professionals should be careful when interpreting results and should educate patients on how to prepare for immunochemical analysis if they take biotin and thus minimise errors in lab results

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 38 pages, 5 figures, 9 tables and 21 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Biotin, interference, immunoassay

Mentor: **Dunja Rogić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Dunja Rogić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Lidija Bach Rojecky, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Saša Kralik Oguić, Ph.D. *Assistant Research Scientist, Department of laboratory diagnostics, University Hospital Centre Zagreb*

The thesis was accepted: September, 2019.

