

Zpráva o biotinu a jeho interferencích u imunoanalytických metod

Friedecký B.^{1,2}, Kratochvíla J.²

¹ÚKBD FN Hradec Králové

²SEKK Pardubice

SOUHRN

Zvýšené koncentrace exogenního biotinu jsou potenciálním zdrojem interferencí imunoanalytických stanovení, založených na využití reakce streptavidin-biotin. Interference jsou negativní u nekompetitivních (sendvičových) metod a pozitivní u metod kompetitivních. Zvýšení koncentrací biotinu v séru vlivem terapie některých nemocí a vlivem používání řady doplňků stravy a kosmetických přípravků může být extrémně vysoké (300 až 10000násobně). Interference biotinu jsou silně závislé nejen na dávce a sérové koncentraci biotinu, ale i na typu použité metody a měřicí platformy. Potenciální interference biotinu se mohou týkat více než 50 analytů včetně steroidních hormonů, kardiálních markerů, léčiv a tumorových markerů. Závažnost problému interference biotinu vedla ke vzniku několika důležitých dokumentů edukačního charakteru a zásadního informačního významu, které jsou v práci zmíněny a komentovány.

Klíčová slova: Biotin, streptavidin, interference, imunoanalýza, dávka.

SUMMARY

Friedecký B., Kratochvíla J.: Report on biotin and its interferences in immunoanalytical methods

Elevated concentrations of exogenous biotin in serum makes interferences in immunoanalytical measurements based on using streptavidin-biotin linkage. Interferences are negative in cases of noncompetitive methods and positive in competitive methods. Elevation of serum biotin causes its use in therapy and very often in cases using as food supplements. Elevation of biotin may be 300-10000 times higher than concentration without addition of exogenous biotin. Interferences of biotin are extremely dependent on method and analytes. Potential interferences are possible in more than 50 analytes measured by immunoanalytical methods, namely of steroid hormones, cardiac markers, tumour markers, some therapeutic drugs and others. Necessity of biotin interference problem lead to creating some important guidance's, warnings and requirements introduced in this work.

Keywords: Biotin, streptavidin, interference, immunoanalytical methods, dose of biotin.

Doporučení a varování

Problémy s interferencí biotinu u imunoanalytických metod byly čas od času pozorovány už asi od roku 1996. Zejména u thyroïdních hormonů jsou natolik závažné, že jejich problematika vyústila v letech 2017 až 2019 do řady doporučení a pokynů. Z těch uvádíme dokumenty Food and Drug Administration FDA [1], Americké asociace klinické chemie AACC [2, 3], Evropské instituce pro farmakologickou vigilanci, otištěné česky v materiálu SÚKL ČR [4]. Na výročním sjezdu AACC v srpnu 2019 byl problému této interference věnován speciální blok [5]. Uvedené dokumenty shrnují podstatné otázky interference biotinu, jejího rozsahu, četnosti, omezení, vlivu metod a přístrojových platform a poskytují množství nezbytných informací, edukačních poznatků a potřebné dokumentace k minimalizaci rizika péče o pacienty. Za běžných podmínek by koncentrace biotinu v séru zdravého jedince neměly přesahovat hodnotu 30 µg/L. Nicméně při použití biotinu jako terapeutika u některých typů vrozených metabolických vad a u některých fází multiplex sclerosis se dosahuje denních dávek o několik řádů vyšších v rozmezí 10 až 300 mg. Zvýšené koncentrace biotinu v séru mohou však být v mnoha případech způsobeny používáním (často dlouhodobým) některých druhů doplňků stravy (multivitaminové

a jiné přípravky) a mnoha kosmetickými přípravky pro dosažení zvýšené kvality vlasů, kůže a nehtů. V těchto případech je velmi obtížné získat o koncentraci biotinu dostatečné množství informací a dat.

Interference, dávky, koncentrace v séru, četnost

Interference zvýšených koncentrací biotinu v séru se týkají měřicích systémů, používajících vazbu biotin-streptavidin (Beckman, Siemens, Roche, Ortho), což se týká s ohledem na laboratorní spektra vyšetření zhruba 30 až 60 % všech imunoanalytických měření v rutinních klinických laboratořích.

Biotin působí potenciálně pozitivní chyby měření u kompetitivních metod (používaných pro nízkomolekulární analyty) a negativní chyby měření u nekompetitivních (sendvičových) metod (používaných často pro vysokomolekulární proteiny).

Interference jsou extrémně závislé na metodě a analytu a týkají se více než 50 analytů. U thyroïdních hormonů může být situace zvláště komplikovaná, protože se často paralelně vyhodnocují analyty s pozitivní interferencí (FT4 – free thyroxine) a negativní interferencí (TSH – thyroid stimulating hormone), a to s použitím stejné měřicí platformy. Zatím lze nalézt asi 20 prací

pojednávajících o 27 závažných diagnostických omylech při diagnóze thyroideálních nemocí, zejména pak chybné diagnózy Gravesovy choroby [2]. K srpnu 2019 bylo podle údajů FDA hlášeno 92 případů pozorovaných interferencí biotinu.

Doposud málo prostudovaná je problematika interferencí u kardiálních troponinů a natriuretických peptidů, přestože je zjevné, že falešné snížení výsledků kardiálních troponinů zcela jistě ovlivní klíčovou klinickou hodnotu 99. percentilu [6]. Velmi zajímavá data o interferencích biotinu u hs kardiálních troponinů (hs-cTn) a natriuretických peptidů přináší aktuální práce skupiny IFCC pro kardiální biomarkery [7]. Negativní interference biotinu u cTnT Roche je potvrzena srovnáním se stanovením hs cTnI Abbott [8]. K významné interferenci, která by mohla způsobit chybnou diagnostickou klasifikaci, stačí koncentrace biotinu ve vzorku 20 až 30 µg/L (Tabulka 1).

Table 1. Cardiac markers and critical concentration for possible biotin interferences

Analytical system	biotin [µg/L]
Roche hs cTnT	21
Siemens Dimension hs cTnI	300
Roche NTpro-BNP	35
Siemens Advia/Attelica NTpro-BNP	75

Pozorovatelnou změnu 99. percentilu stanovení troponinu cTnT asi již od 25 µg/L biotinu, a jistě od 50 µg/L v séru, způsobenou jejich negativními interferencemi neodstraní doporučené předředování vzorků. To působí naopak posuv 99. percentilů opačným směrem. Často propagované použití algoritmu po sobě jdoucích odběrů k zjištění delta hodnot, kratších než tři hod., je při interferenci biotinu velmi pochybné [9].

Interference mohou být pozorovány u některých analytů již od koncentrací asi 15 µg/L biotinu v séru (cTnT, TSH, protilátky proti thyroideálním hormonům), zatímco u jiných analytů se projevují až u koncentrací o řád vyšších, ale od 500 µg/L lze interference biotinu pokládat za velmi pravděpodobné, až jisté [10, 11]. Zatím se obecně považuje denní dávka biotinu 5 mg/den za kritickou pro manifestaci interferencí, někteří endokrinologové však považují za interference schopnou již dávku nad 1 mg/den.

Vliv in vivo podané dávky 100 mg na stanovení thyroideálních hormonů u platformy Roche je velmi silný. U FT4 bylo pozorováno po 1 hodině skoro čtyřnásobné zvýšení FT4 eliminované až po 5 hodinách od podání. Rozdíly mezi soupravami 2. generace a 3. generace (která má mít údajně 5x zvýšenou odolnost vůči biotinové interferenci) nebyly autory pozorovány. U stejných pacientů došlo po 1 hodině od dávky prakticky k vynulování koncentrace TSH a ani po 5 hodinách nebyl vliv biotinu výrazně eliminován [12]. Autoři provedli paralelně u stejné dávky a stejných pacientů měření na přístrojové platformě Fujirebio, nepoužívající streptavidin-biotinovou vazbu bez jakéhokoliv vlivu na výsledky měření při srovnávání s výsledky Roche. Biotin v dávkách 100 mg a vyšších tedy snadno může vést při použití některých přístrojových platform a souprav

k chybným diagnostickým klasifikacím a první pokusy o zvýšení odolnosti k biotinovým interferencím (Roche 3. generace) zatím nebyly přesvědčivé.

Složitost celé situace je dána i enormně velikou závislostí interference na analytech a metodě / přístrojové platformě. To lze demonstrovat na sedmi analytech a u tří koncentrací biotinu v séru [13]. Data jsou uvedena v Tabulce 3. Koncentrace biotinu v séru zde modelují případ bez předpokládané interference (30 µg/L). Případ mezní koncentrace z hlediska možnosti interferencí (60 µg/L) a situaci po podání dávky 300 mg s odpovídající koncentrací 500 µg/L. Ale problém s potravinovými a jinými doplňky ani taková opatření neřeší, protože je zřejmé, že u řady jedinců nelze koncentraci biotinu v séru vlivem používání potravinových doplňků vůbec kvalifikovaně odhadnout!

Nejčastěji uváděné související hodnoty mezi dávkami biotinu, jejich koncentrací v séru a ochranou před interferencí jsou v Tabulce 3 a pocházejí z řady prací [14 - 18], z dokumentace výrobců a z doporučení AACC [2].

Společnost ATA (American Thyroid Association) navrhuje k vyloučení rizika biotinových interferencí 48hodinové přerušení léčebné dávky [15]. Stanovení TSH metodou Ortho ukázalo rovněž potřebu 48hodinového intervalu mezi dávkou biotinu a vlastní analýzou. Za nejvíce ohrožené analyty interferencí biotinem v praxi jsou považována stanovení cTnT, TSH a FSH. Tabulka 4 ukazuje extrémní závislost četnosti a velikosti interferencí na analytu a platformě a její data jsou převzata z aktuální práce [13]. In vivo provedený farmakokinetický experiment potvrdil, že od dávky 5 mg/den hrozí interference biotinu, že je zapotřebí asi 7 hodin k eliminaci dávky, ale po asi 7 dnech opakování dávek 5, 10 a 20 mg lze již pozorovat počátek kumulace biotinu v séru [19].

Omezení interferencí [14]

Jednoduchým způsobem redukce potenciálních interferencí biotinu je respektování potřebné doby mezi podáním dávky a dobou analýzy. Data jsou uvedena v Tabulkách 2 a 3. Problémem až enigmatického charakteru je však neznalost dávky v případech používání různých kosmetických přípravků a doplňků stravy. Předředění vzorků před analýzou nevedlo u kardiálních troponinů k cíli [9]. Principiálně nezpochybnitelné by bylo často zmiňované použití alternativní metody, nepoužívající streptavidin-biotinové vazby [2, 5, 13], ale z praktické stránky nejde o zrovna ideální způsob.

Přebytek exogenního biotinu v séru (nad 30 µg/den) lze efektivně odstranit jeho sorpcí na suspenzi agarózy se streptavidinem, případně se streptavidinem navázaným na povrch absorbentu, ale o jednoduchosti postupu zejména pro rutinní laboratoře zde nelze mluvit. Nicméně tento pro rutinu komplikovaný přístup byl několikrát úspěšně validován, například už v roce 2017 [20].

Edukace, informace, dokumentace [1 - 5], přístupné všem zainteresovaným, jsou nezbytné a jejich aplikace je zapotřebí ihned.

Table 2. Dose of biotin and time of its elimination

Dose [mg]	Serum concentration [$\mu\text{g/L}$]	Time of elimination [hour]
< 5	< 30 (?)	0
5 – 10	50 - 150	8
300	500 - 1100	8 - 18

Table 3. Dose of biotin and time for interferences mitigation

Biotin [mg/day]	Analysis timing
>1	interference is possible
<5	tolerance of interference possibility
5	up to 3.5 hour
10	8 hour
≥ 100	48 hour

Table 4. Dependency of biotin interference on seven analytes (FT4, FT3, TSH, vitamin D, CA 19-9, folate, testosterone and three measurement platforms (Siemens, Beckman, Roche).

Biotin [$\mu\text{g/L}$]	Description of situation
30	Beckman with b > 20 % for FT3 and FT4; others b < 10 %
60	b > 10 % for Roche Vitamin D, TSH; Beckman FT4 and FT3
500	without influence by interference: - 27 % Roche - 86 % Beckman - 91 % Siemens

Na závěr

Problém interferencí biotinu je do značné míry problémem potravinových a jiných doplňků. Jsou k dispozici stovky různých přípravků od desítek dodavatelů a jsou předmětem intenzivní a nekritické reklamy. Denní dávky nad 30 μg jsou u nich zcela běžné a občas dosahují až 5 mg! Obsahy lahviček jsou běžně nad 100 tablet, obvykle jsou doporučovány dávky 1 tablety denně a povědomí o skutečně dosahovaných koncentracích biotinu v séru je mizivé.

Vysoká variabilita interferencí podle analytů a metod situaci dále komplikuje.

Edukace pacientů, lékařů, laboratorních profesionálů a existence dokumentace o prevenci, detekci a zacházení je za této situace zásadní. Situace kolem interferencí biotinu ve spojení se situací na trhu různých doplňků stravy a jiných přípravků představuje další možnou obtíž pro snížení již tak nedostatečné úrovně harmonizace. Propojení imunoanalytických metod se selektivnějšími metodami měření prostřednictvím zlepšení validačních procesů a obecně přístupných protokolů u výrobců by bylo velmi žádoucí. Snad paradoxně právě problém interferencí biotinu k tomu zlepšení validace a dokumentace přispěje.

Krátký, velmi tendenční článek, založený v podstatě na ignorování všech faktů, se objevil v časopise Labor Aktuell [21]. Tvzení týkající se diagnostik Roche jsou zde dokonce v rozporu s údaji pocházejícími od téže firmy [22].

Literatura

1. The FDA Warns that Biotin May Interfere with Lab Test. November 2017. Dostupné na: <https://www.fda.gov/medical-devices/safety/communications>
2. AACC Academy. 1 AACC Guidance Document on Biotin Interferences in Laboratory Tests. Dostupné na: <https://www.aacc.org>
3. Lab Test Online. Biotin Affects some Blood Test Results. March 2019 Dostupné na: <https://Labtestsonline.org>
4. European Medicines Agency. Biotin-Interference with Clinical Laboratory Tests January 2019. Dostupné na: <http://www.sukl.cz/Leciva/doporuceni-prac-k-farmakovigilancnim-signalum-2019?highlightWords=biotin>
5. **Li, P., Ferguson, A., Cervinski, H. A. et al.:** Beautiful Skin but Erroneous Lab Results. 71th AACC Annual Scientific Meeting, Anaheim CA, USA August 7, 2019.
6. **Lackner, K. J.:** Cardiac biomarkers 2019. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2019, 57, p. 565-566.
7. **Saenger, A. K., Jaffe, A. S., Body, R., Body, R., Colinson, P. O. et al.** Cardiac troponin and natriuretic peptide analytical interferences from hemolysis and biotin: educational aids from the IFCC Committee on Cardiac Biomarkers (IFCC C-CB). *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2019, 57/5, p. 633-640.
8. **Frame, I. J., Joshi, P. H., Mwangi, C., Gunsolus, I., De Lemos, J. A. et al.** Susceptibility of cardiac troponin assays to biotin interference. *Am. J Clin. Pathol.* 2019, 1 51/5, p. 486-493.
9. **Bevins, N., Hubbard, J. A., Fitzgerald, R. L., Kelner, M. J.** A dilution method to mitigate biotin interference in cardiac troponin T testing. *J Appl. Lab. Med.*, 2019, 4/3, p. 415-421.

10. **Trambas, C., Lu, Z., Yan, T., Sikaris, K.** Characterization of the scope and magnitude of biotin interference in susceptible Roche Elecsys competitive and sandwich immunoassays. *Ann. Clin. Biochem.*, 2018, 55/2, p. 205-215.
11. **Piketty, M. L., Polak, M., Flechtner, I., Gonzales-Briceño, L., Souberbielle, J. C.** False biochemical diagnosis of hyperthyroidism in streptavidin-biotin-based immunoassays: the problem of biotin intake and related interferences. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2017, 55/6, p. 780-788.
12. **Ruth, I., Mathieu, E., Burniat, A., Fage, D., Cotton, F. et al.** Interferences in free thyroxine concentration using the Roche analytical platform: improvement of the third generation. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2020, 58/2, p. e36-e39.
13. **Haslam, S., Oakey, J., Brown, A., Bradshaw, S., Myers, M.** A comparison of biotin interference in routine immunoassays of the Roche Cobas 8000, Beckman Coulter DXi and Siemens Advia Centaur XPT immunoassay platforms. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2019, 57/11, p. e287-e290.
14. **Bowen, R., Benavides, R., Colón-Franco, J. M., Katzman, B. M., Muthukumar, A. et al.** Best practices in mitigating the risk of biotin interference with laboratory testing. *Clin. Biochem.* 2019, doi:10.1016/j.clinbiochem.2019.08.012.
15. **Gilford, J. L., de Koning, L., Hossein Sadrzadeh, S. M.** Strategies for mitigating risk posed by biotin interference on clinical immunoassays. *Clin. Biochem.*, 2019, 65, p. 61-63.
16. **Charles, S., Agrawal, M., Blum, N.** Erroneous thyroid diagnosis due to over-the-counter biotin. *Nutrition* 2019, 57, p. 257-258.
17. **Li, J., Wagar, A., Meng, Q. H.:** Comprehensive assessment of biotin interference in immunoassays. *Clin. Chim. Acta* 2018, 487, p. 293-298.
18. **Luong, J. H. T., Male, K. B., Glennon, J. D.** Biotin interference in immunoassays based on biotin-streptavidin chemistry. An emerging threat. *Biotechnol. Adv.* 2019, 37/5, p. 634-641.
19. **Grimsey, P., Frey, N., Bendig, G., Zitzler, J., Lorenz, O. et al.** Population pharmacokinetics of exogenous biotin and the relationship between biotin serum levels and in vitro immunoassay interference. *Int. J Pharmacokinetics* 2017, doi:10.4155/ipk-2017-0013.
20. **Piketty, M. L., Prie, D., Sedel, F., Bernard, D., Hercant, C. 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, 55/6, p. 817-825.
21. **Novotná J.:** Biotin: riziko interference? *Labor Aktuell* 2019, 3: 43-45.
22. **Mitigating Biotin Interference in Two Roche Immunoassays by Premixing Biotinylated Capturing Molecules With Streptavidin Coated Beads.** *Clin Chim Acta.*, 2020, 505, p. 130-135.

Do redakce došlo 19. 9. 2019

Adresa pro korespondenci:
RNDr. Bedřich Friedecký Ph.D.
Střelnická 1680
182 00 Praha 8
e-mail: friedecky@sekk.cz