Biotin kao mogući izvor interferencije u imunokemijskim reakcijama

Miškić, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:085552

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET
I
KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET

Marija Miškić

BIOTIN KAO MOGUĆI IZVOR INTERFERENCIJE U IMUNOKEMIJSKIM REAKCIJAMA

Diplomski rad

Akademska godina: 2019/2020.

Mentor: Doc. dr. sc. Leida Tandara, spec. med. biokem.

Split, veljača 2020.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET
I
KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET

Marija Miškić

BIOTIN KAO MOGUĆI IZVOR INTERFERENCIJE U IMUNOKEMIJSKIM REAKCIJAMA

Diplomski rad

Akademska godina: 2019/2020.

Mentor: Doc. dr. sc. Leida Tandara, spec. med. biokem.

Split, veljača 2020.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Biotin 2
1.2. Uloga biotina u imunokemijskim reakcijama 4
1.3. Interferencija biotina u dijagnostičkim testovima 9
1.4. Troponin 12
1.5. Uloga TSH, T_3, T_4 hormona štitnjače 14
1.6. Bolesti štitnjače i laboratorijska testiranja 17
2. CILJ ISTRAŽIVANJA 19
2.1. Glavni cilj istraživanja 20
2.2. Hipoteza 21
3. MATERIJALI I METODE 22
3.1. Ispitanici 23
3.2. Uzorci 23
3.3. Metode 24
3.3.1. Metoda neutralizacije biotina 24
3.3.2. Imunokemijske metode 24
4. REZULTATI 26
5. RASPRAVA 33
6. ZAKLJUČAK 40
7. POPIS CITIRANE LITERATURE 42
8. SAŽETAK 48
9. SUMMARY 50
10. ŽIVOTOPIS 52

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti
Znanstveno polje: Farmacija
Nastavni predmet: Medicinska laboratorijska dijagnostika
Tema rada je prihvaćena na 60. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na 19. sjednici fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i 14. sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta
Mentor: doc. dr. sc. Leida Tandara
Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Leida Tandara

BIOTIN KAO MOGUĆI IZVOR INTERFERENCIJE U IMUNOKEMIJSKIM REAKCIJAMA

Marija Miškić, broj indeksa 143

Sažetak: Ciljevi ovog istraživanja bili su utvrditi uzrokuje li uzimanje biotina interferenciju u mjeri koja može utjecati na kliničku odluku, te utvrditi utjecaj na rezultate u periodu od tri sata nakon ingestije biotina te nakon kontinuiranog uzimanja biotina tijekom 7 dana. 7 zdravih ispitanika, od toga 6 žena i 1 muškarac u dobi od 20 do 25 godina primjenjivali su oralno, svaki dan u isto vrijeme, jednu tabletu od 10 mg biotina. Jedna epruveta krvi uzorkovala se od svakog ispitanika, prvi i sedmi dan istraživanja, u nultom satu, prije uzimanja biotina, te nakon 1 h i 3 h od uzimanja biotina. Koncentracija hormona TSH, T_3, T_4, fT_3, fT_4, hsTnT određivala se u nativnom uzorku i nakon obrade uzorka s mikročesticama obloženim streptavidinom. Obrađeni uzorci testirani su na Roche Cobas 8000/e801 imunokemijskom analizatoru. Svi rezultati TSH, fT_3 i fT_4 prije i nakon neutralizacijskog protokola, unutar su referentnih intervala za dob i spol ispitanika. Svi ispitani testovi imaju različitu deklariranu toleranciju na biotin od strane proizvođača, a najveću toleranciju na prisutnost biotina imaju TSH i troponin. Najmanja deklarirana tolerancija na prisutnost biotina u uzorku je za hormon T_3 i upravo tu smo izmjerili više vrijednosti T_3 jedan sat nakon uzimanja biotina: 28 % više prvi dan i 38 % sedmi dan. U većini uzoraka, kako prije tako i nakon provedenog protokola neutralizacije, u svim točkama mjerenja koncentracija troponina bila je niža od donje točke mjernog raspona, stoga se apsolutna i relativna razlika nisu mogle izračunati. Uzimanje biotina u dozama do 10 mg/dan, dostupnim u bezreceptnim preparatima, ne interferira u ispitanim metodama za određivanje TSH, T_4, fT_3, fT_4 i hsTnT, kako kod jednokratnog, tako ni kod kontinuiranog uzimanja biotina. Interferencija je moguća u testovima koji imaju nisku toleranciju na prisustvo biotina, kao T_3, iako u ovom slučaju interferencija ne bi utjecala na kliničku odluku. Metoda neutralizacije korištenjem streptavidinskih čestica jednostavan je način za dokazivanje interferencije biotina koji ne zahtijeva posebnu opremu ni reagense te je lako provediv u svakom laboratoriju.

Ključne riječi: *biotin, streptavidin, imunokemijske reakcije, troponin, hormoni štitnjače*
Rad sadrži: 54 stranica, 10 slika, 10 tablica, 63 literaturnu referencu
Jezik izvornika: hrvatski
Sastav Povjerenstva za obranu:

1. dr.sc. Vedrana Čikeš Čulić, izv. prof., predsjednik
2. doc. dr. sc. Daniela Šupe-Domić, član
3. doc. dr. sc. Leida Tandara, član – mentor

Datum obrane: 24.02.2020.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u knjižnici Medicinskog fakulteta u Splitu, Šoltanska 2**.**

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

School of Medicine and Faculty of Chemistry and Technology
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy
University of Split, Croatia

Scientific area:	Biomedical sciences
Scientific field:	Pharmacy
Course title:	Medical laboratory diagnostics
Thesis subject:	was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. 60 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, sesssion no. 19 and Faculty Council of School of Medicine, session no. 14
Mentor:	doc. dr. sc. Leida Tandara
Technical assistence:	doc. dr. sc. Leida Tandara

BIOTIN AS POSSIBLE SOURCE OF INTERFERENCE IN IMMUNOCHEMICAL METHODS.

Marija Miškić, index number 143

Summary: The aim of this research was to determine whether biotin uptake causes interference to the extent that it may influence clinical decision making and to determine the effect of biotin on the results over a period of three hours after biotin ingestion and after continuous biotin uptake for 7 days. 7 healthy subjects, of which 6 women and 1 man, aged 20 to 25 years, orally administered one tablet of 10 mg biotin daily, at the same time. One tube of blood was sampled from each subject, on the first and seventh day of the study, at zero hour, before biotin uptake, and after 1 h and 3 h after uptake of biotin. The concentrations of the hormones TSH, T_3, T_4, fT_3, fT_4, hsTnT were determined in the native sample and after the treatment of the sample with streptavidin-coated microparticles. The treated samples were tested on a Roche Cobas 8000/e801 immunochemical analyzer. All TSH, fT_3, and fT_4 results before and after the neutralization protocol were within the reference intervals for subjects' age and gender. All tests have a different declared tolerance to biotin by the manufacturer, and TSH and troponin have the highest tolerance for the presence of biotin. The lowest declared tolerance for the presence of biotin in the sample is for hormone T_3, and this is where we measured more T_3 values one hour after taking biotin: 28 % more on the first day and 38 % on the seventh day. In most samples, both before and after the neutralization protocol was performed, at all measuring points the troponin concentrations were lower than the lower limit of the measuring range. Therefore the absolute and relative differences could not be calculated. The uptake of biotin in a dosage of up to 10 mg/day, which is available in over-the-counter preparations, does not interfere with the tested methods for the determination of TSH, T_4, fT_3, fT_4 and hsTnT, both for single and continuous biotin uptake. Interference is possible in assays that have a low tolerance for the presence of biotin, such as T_3, although in this case the interference would not have affect the clinical decision. The neutralization method using streptavidin particles is an easy way to prove biotin interference as it requires no special equipment or reagents and is easily implemented in any laboratory

Keywords: *biotin, streptavidin, immunochemical reactions, troponin, thyroid hormones*
Thesis contains: 54 pages, 10 figures, 10 tables, 63 references
Original in: Croatian
Defence committee:

1. Vedrana Čikeš Čulić, PhD, assoc. prof, chair person
2. Daniela Šupe-Domić, PhD, assistant professor, member
3. Leida Tandara, PhD, assistant professor, member – supervisor

Defence date: February 24th, 2020.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

Zahvala…

Najprije hvala mojoj dragoj mentorici, doc.dr.sc. Leidi Tandari, na srdačnosti, bezuvjetnoj pomoći i riječima ohrabrenja tijekom pisanja ovog diplomskog rada, kao i svim kolegama, dobrovoljnim ispitanicima koji su sudjelovali u našoj studiji.

Zahvaljujem svim svojim bližnjima, prijateljima i kolegama koji su bili uz mene tijekom studija i učinili to razdoblje za mene posebnim.

Najviše hvala mojim roditeljima, bratu i sestrama koji su mi uzor i bezuvjetna podrška na mom životnom putu.

Hvala dragom Bogu, zbog Njega sam to što jesam!

POPIS KRATICA

A

ABC – avidin-biotin kompleks (*eng. avidin-biotin complex)*

ACC (*eng. American College of Cardiology)*

AIM – akutni infarkt miokarda *(eng. acute myocardial infarction)*

Anti-TPO – antitijela na tiroidnu peroksidazu (*eng. Thyroid Peroxidase antibodies*)

ATP – adenozin trifosfat

C

CA125 – karcinom antigen, tumorski marker

cTn – srčani troponin *(eng. cardiac Troponin*)

TnT – troponin T

TnI – troponin I

hsTnT – osjetljivi troponin T

D

DAB – 3,3'-diaminobenzidin

DIT – dijodtirozin

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (*eng. Deoxyribonucleic acid*)

E

EDTA – etilendiaminotetraoctena kiselina

EKG – elektrokardiogram

ELISA – enzimski imunokemijski test *(eng. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)*

ESC – Europsko kardiološko društvo (*eng. European Society of Cardiology)*

F

FDA – Američka Agencija za hranu i lijekove (*eng. Food and Drug Administration*)

FSH – folikul stimulirajući hormon

fT_3 – slobodni trijodtironin *(eng. free triiodothyronine)*

fT_4 – slobodni tiroksin (*eng. free thyroxine*)

H

HIV – virus humane imunodeficijencije (*eng. Human Immunodeficiency Virus)*

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti *(eng. High performance liquid chromatography)*

HRP – peroksidaza iz hrena *(eng. horseradish peroxidase)*

K

KBC – Klinički bolnički centar

L

LH – luteinizacijski hormon

LSAB – označeni streptavidin-biotin kompleks (*eng. Labeled Streptavidin-Biotin Complex)*

M

MIT – monojodtirozin

N

NSTEMI –Infarkt miokarda bez ST elevacije (*eng. Non-ST-Segment Elevation Myocardial Infarction)*

NT-proBNP – N-terminalni dio natriuretskog peptida proBNP, srčani marker (*eng. N-terminal proBrain Natriuremic Peptide)*

O

OTC – „preko pulta“, bezreceptni preparati (*eng. over the counter*)

P

PSA – prostata specifični antigen

PTH – paratireoidni hormon

S

STEMI – Infarkt miokarda s elevacijom ST-segmenta (*eng. ST-Segment Elevation Myocardial Infarction)*

T

TBG – globulin koji veže tiroksin *(engl. thyroxine–binding globulin)*

TPO – tiroidna peroksidaza

TRH – hormon koji oslobađa tireotropin (*eng. Thyrotropin Releasing Hormone*)

TSH – tiroidni stimulirajući hormon, tireotropin

TTR – transtiretin

1. UVOD

1.1. Biotin

Biotin, poznat kao vitamin H, koenzim R ili vitamin B7, pripada skupini B vitamina topljivih u vodi (1). Prvi je puta izoliran 1935. godine iz faktora rasta Bios IIA, a zatim godinu dana kasnije iz osušenog žumanjka. Avidin, izoliran iz bjelanjka, s biotinom tvori molekulski spoj u omjeru 4:1 koji sadrži jednu od najstabilnijih poznatih veza (2). Avidin je glikoprotein otporan na bakterijske proteaze i gušteračine proteaze te sprječava crijevnu apsorpciju biotina. Kuhanje denaturira avidin te tako omogućava crijevnu apsorpciju biotina iz hrane (1). Čovjek iskoristi samo oko 50 % hranom unesenog biotina, dok se ostatak izlučuje fecesom (2).

Uloga biotina u ljudskom organizmu važna je u procesima karboksilacije i dekarboksilacije (3). Biotin služi kao kofaktor za pet enzima karboksilaza te tako igra važnu ulogu u transportu ugljikovog dioksida, sintezi masnih kiselina i proizvodnji energije (1).

Sisavci ne mogu sintetizirati biotin i ovise o sintezi mikroorganizama i biljaka. Hrana bogata biotinom je: žumanjak, pivski kvasac, soja, gljive, pileća jetra, brokula, kuhani slatki krumpir, teleća jetra, mlijeko, sir (1). Tablica 1 prikazuje sadržaj biotina u određenim namirnicama (4).

U industrijski razvijenim zemljama, unos biotina iznad je preporučenog dnevnog unosa, te je stoga nedostatak biotina kod ljudi vrlo rijedak. Nedostatak biotina pojavljuje se kod ljudi koji konzumiraju sirova jaja u pretjeranim količinama zbog avidina iz bjelanjka koji sprječava intestinalnu apsorpciju biotina. Također se pojavljuje i kod ljudi na dugotrajnoj parenteralnoj prehrani, dugotrajnoj antikonvulzivnoj terapiji te terapiji sulfonamidima. Sekundarni manjak biotina posljedica je urođenog nedostatka biotinidaze. Riječ je o enzimu koji katalizira hidrolizu biocitina u biotin i lizin u crijevima, čineći biotin bioraspoloživim. Urođeni nedostatak biotinidaze liječi se dnevnim dodatkom 50 do 150 mg slobodnog biotina. Manifestacije nedostatka biotina kod sisavaca uključuju alopeciju, pruritus, psorijazu, seboroični dermatitis, središnje živčane poremećaje, stvaranje ragada i parestezije ekstremiteta (3).

Preporučena dnevna doza biotina iznosi 30-70 μg/dan te uz normalnu prehranu nije potrebna dodatna suplementacija biotinom. Medicinski dokazano, megadoze biotina smanjuju simptome i poboljšavaju kvalitetu života pacijenata s progresivnom multiplom sklerozom u dozi od 300 mg/dan. Kod nedostatka enzima biotinidaze i propionske acidemije, klinički dokazan učinak ima doza 5-10 mg/dan. Kod bazalne bolesti ganglija koriste se doze 100-300 mg/dan (5).

Tablica 1. Sadržaj biotina u određenim namirnicama određen HPLC/avidin metodom (6).

Namirnica	**ng biotina/g hrane**
goveđa jetra	416
pileća jetra	1872
cijelo jaje, kuhano	214
žumanjak jajeta	272
brokula	9,43
kuhani slatki krumpir	14,5
konzervirane gljive	21,6
avokado	9,61
bademi, pečeni, posoljeni	44,07
kikiriki, pečeni, posoljeni	175

Izvor: Staggs CG, Sealey WM, McCabe BJ, Teague AM, Mock DM. Determination of the biotin content of select foods using accurate and sensitive HPLC/avidin binding. J Food Compost Anal. 2004 Dec; 17(6):767–776. doi: 10.1016/j.jfca.2003.09.015 [pristupljeno 10.09.2019.]

Biotin ima linearnu farmakokinetiku koju je izrazito važno razumjeti zbog neracionalnog korištenja 100-500 puta većih dnevnih doza od preporučenih (RDI). Brzo se apsorbira iz gastrointestinalnog trakta, a maksimalne koncentracije u serumu postiže za 1 sat (6). Biotin se može metabolizirati u različite konjugate koji se izlučuju mokraćom i također mogu reagirati s avidinom/streptavidinom. Studije farmakokinetike biotina sugeriraju kako kod zdravih pojedinaca srednji poluživot ($t_{1/2}$) iznosi oko 15 sati. Kada pacijent ima oštećenje bubrega, smatra se da se poluživot i vršna koncentracija biotina povećavaju u usporedbi s vremenom poluživota i maksimalnom koncentracijom (t_{max}) biotina koja se primjećuje kod zdravih osoba koje uzimaju isto doziranje biotina (7, 8).

U posljednjih nekoliko godina raste popularnost biotina kao dodatka prehrani i kozmetičkog proizvoda koji pridonosi ljepoti. Budući da su registrirani kao kozmetički proizvodi koji se prodaju bez recepta, ovi preparati ne podliježu provjeri kakvoće i kvalitete. Sve veći broj proizvoda sadrži megadoze biotina, 10 000 puta veće od preporučene dnevne doze, koje se reklamiraju kao proizvodi za zdravlje i ljepotu kose, kože i noktiju te ne postoje adekvatne provjere stvarnih doza u multivitaminskim proizvodima. Iako se biotin smatra

netoksičnim te ni u velikim dozama neće izazvati nuspojave, nameće se potencijalni medicinski problem interferencije visoke koncentracije biotina u uzorku pacijenta sa širokim rasponom dijagnostičkih testova (9).

1.2. Uloga biotina u imunokemijskim reakcijama

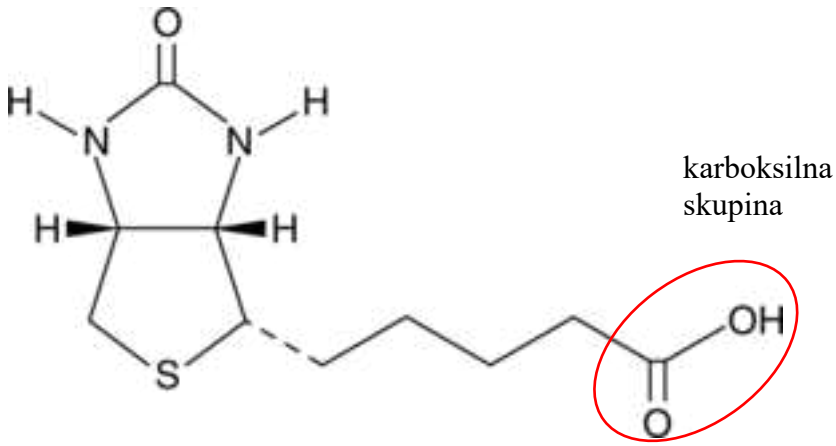
Otkrivanje, lokalizacija i kvantificiranje antigena i antitijela imunokemijskim tehnikama zahtijeva upotrebu enzim-protein konjugata. Većina takvih konjugata nastaje spajanjem enzimatskog markera i antitijela kovalentnom ili nekovalentnom vezom. U posljednje vrijeme sve se više koristi izuzetno jaka nekovalentna interakcija avidin-biotin u raznim sustavima kao što su inaktivacija bakteriofaga, gensko i stanično mapiranje, selektivna apsorpcija stanica i imobilizacija makromolekula (10).

Avidin, protein izoliran iz bjelanjka, i njemu sličan protein streptavidin, izoliran iz *Streptomyces avidinii,* imaju sposobnost vezanja biotina visokim afinitetom. Smatra se kako ova interakcija predstavlja prirodni obrambeni mehanizam jer vezanje biotiniliranih enzima, koji sudjeluju u transportu ugljikova dioksida, s avidinom ili streptavidinom inaktivira te enzime i tako inhibira rast bakterija koje ovise o biotiniliranim enzimima (11).

Karakteristike interakcije biotin-streptavidin:

a) Jedna od najjačih poznatih nekovalentnih veza osigurava čvrsto formiran kompleks koji neće biti poremećen promjenama pH, višestrukim pranjem i imobilizacijom.
b) Vezivanje avidina ili streptavidina na biotin dovoljno je specifično da bi osiguralo ciljano vezanje.
c) Streptavidin i avidin imaju 4 vezna mjesta na molekuli koja omogućavaju korištenje biotiniliranih polimera. Ovo svojstvo pridonosi povećanoj osjetljivosti detekcijskog reagensa u odgovarajućim reakcijama.
d) Biotin je mala molekula kojom se konjugiraju biološki aktivne makromolekule ili se biotiniliraju male molekule koje djeluju kao enzimski supstrati ili mogu vezati specifična antitijela. Proces biotinilacije ne mijenja svojstva molekula niti biološku aktivnost.
e) U pravilu su streptavidin i avidin stabilne molekule čije vezivanje s biotinom može preživjeti različite reakcijske uvjete i konjugacije s organskim reagensima ili čvrstim tvarima (11).

Ireverzibilni kompleks biotina i avidina/streptavidina koristi se za različite komercijalne imunokemijske analize klinički važnih analita i biomarkera, kao i za pripremu biotiniliranih antigena i antitijela te magnetskih kuglica obloženih streptavidinom. Biotin je mala molekula koja se sastoji od imidazolskog prstena i tiofena te valerične kiseline (Slika 1). Proces biotinilacije obuhvaća konjugiranje karboksilne skupine biotina s amino skupinom proteina. Kovalentna veza biotina s proteinima, polipeptidima i antigenima niske molekularne mase ima minimalan učinak na biološku i antigenu aktivnosti takvih biomolekula. Ova značajka omogućuje upotrebu konjugata biotina kao liganda u različitim oblicima imunokemijskih ispitivanja (12).



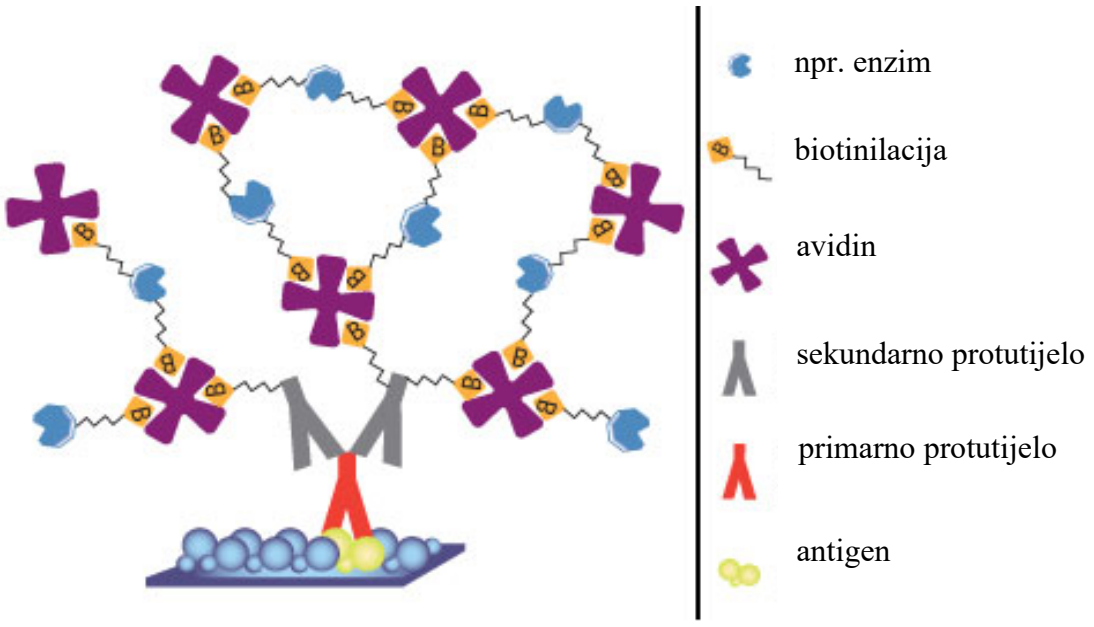
Slika 1. Prikaz strukture biotina i funkcionalnih skupina važnih u procesu biotinilacije
Preuzeto s: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975019300436 [pristupljeno 13.09.2019.]

Interakcija avidin-biotin može se koristiti za detekciju raznolikog broja ciljnih molekula s tri različite konfiguracije:

1) Avidin/streptavidin označeni su molekulama koje se mogu detektirati, npr. enzimom, metalom ili fluorescirajućom tvari. Biotin je prisutan u drugom reagensu, npr. antitijelo, lektin, nukleotid. On povezuje ciljnu molekulu, imobiliziranu na čvrstu fazu, sa sustavom označavanja koji omogućuje detekciju. Ova vrsta detekcije učestalo se koristi za protočnu citometriju, imunotestiranje, testove DNA hibridizacije i imunohistokemiju.
2) Streptavidin se koristi neobilježen i služi za povezivanje biotiniliranog vezivnog sredstva s biotiniliranom detekcijskom molekulom. Prednost varijacije ove metode veći je broj slobodnih mjesta na molekuli streptavidina za vezivanje biotina. Ova metoda također se široko koristi u tehnikama imunoanalize i DNA hibridizacije.

3) Treća metoda učinkovito kombinira prva dva principa kako bi se dobio znatno osjetljiviji sustav. Osnovna ideja je miješanje, u kontroliranim uvjetima, neobilježenog streptavidina i biotiniliranog reagensa za detekciju npr. enzima. Na taj način formira se polimer koji omogućava višestruki broj slobodnih mjesta na streptavidinu za vezanje biotina. Takav reagens pruža vrhunsku osjetljivost.

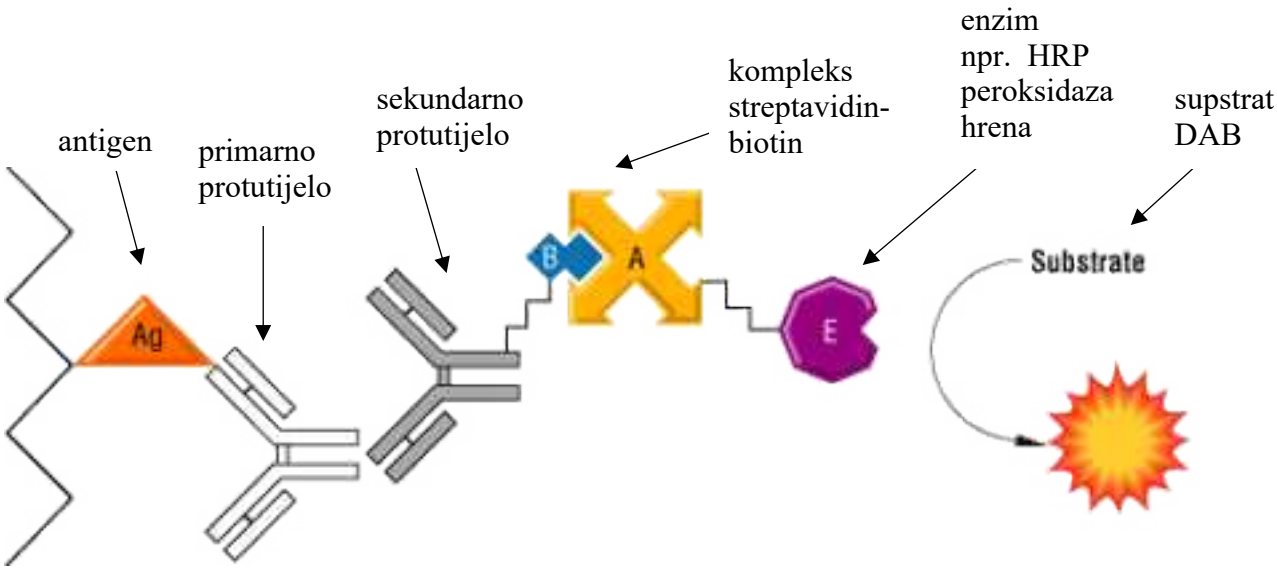
ABC (avidin-biotin complex) setovi komercijalno su dostupni i nude streptavidin biotinilirani enzim u odgovarajućim koncentracijama, tako da se kompleks može formirati jednostavnim miješanjem reagensa (11). Slika 2 prikazuje princip ABC metode koja uključuje tri sloja: prvi sloj obuhvaća neoznačeno primarno antitijelo, drugi sloj obuhvaća sekundarno antitijelo koje je biotinilirano. Treći sloj obuhvaća kompleks avidin-biotin peroksidaze. Kako bi dobili kromogeno obojenje, peroksidaza hrena (HRP) detektira se pomoću nekog supstrata, npr. 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Enzim HRP pretvara DAB u smeđi precipitat te se na taj način vizualizira mjesto vezanja specifičnog antitijela i ciljanog antigena. Sekundarna antitijela mogu biti označena enzimom, npr. alkalnom fosfatazom ili peroksidazom hrena, te je tada riječ o indirektnoj imunoenzimskoj metodi. Kada su označena fluorokromom, riječ je o indirektnoj fluorescentnoj metodi (13).



Slika 2. Shematski prikaz ABC metode

Preuzeto i modificirano s: https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/avidin-biotin-complex-method-ihc-detection.html [pristupljeno 14.09.2019.]

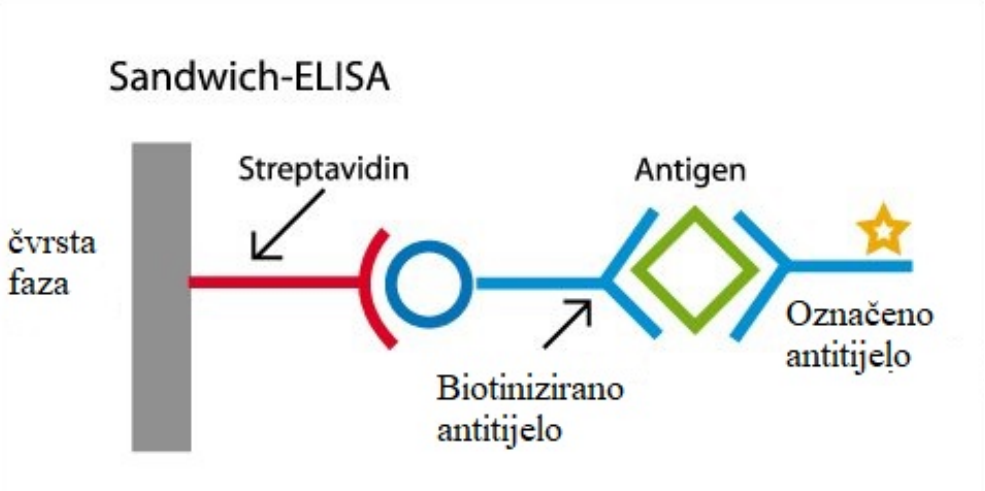
Slika 3 shematski prikazuje LSAB metodu koja je pet do deset puta osjetljivija od ABC metode. Tehnički je vrlo slična standardnoj ABC metodi, ali umjesto avidina koristi streptavidin konjugiran s enzimom ili fluorokromom (13).



Slika 3. Shematski prikaz LSAB metode

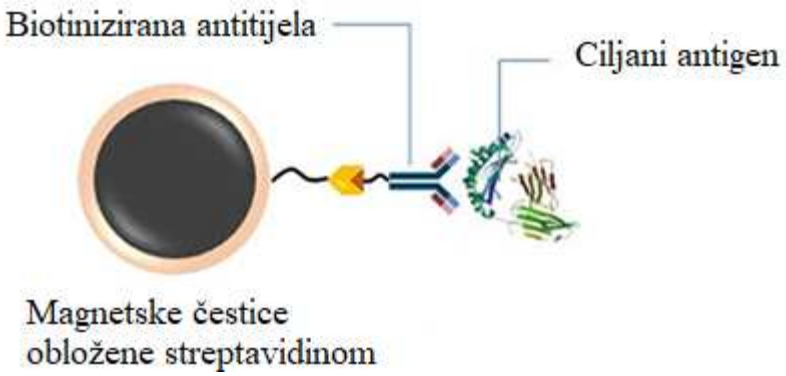
Preuzeto i modificirano s: https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/avidin-biotin-complex-method-ihc-detection.html [pristupljeno 14.09.2019.]

U modificiranim ispitivanjima koristi se čvrsta faza na koju je imobiliziran streptavidin. Protein prisutan u stanici reagira sa biotiniliranim antitijelom koje se veže za streptavidin na čvrstoj podlozi i na taj način nastaje kompleks koji se može detektirati, a protein odvojiti. Riječ je o sustavu koji omogućava otkrivanje analita u niskim koncentracijama jer interakcija streptavidin-biotin umnožava signal i povećava osjetljivost (Slika 4). Umjesto čvrste podloge, mogu se koristiti i magnetske kuglice visokog kapaciteta s imobiliziranim streptavidinom koje omogućavaju brzo i učinkovito pročišćivanje biomolekula iz složenih uzoraka (Slika 5). Čvrste faze obložene streptavidinom učinkovito se koriste kao sredstva za odvajanje u heterogenim imunoanalizama i u testovima DNA-hibridizacije (11, 14).



Slika 4. Prikaz sendvič metode, vezanje biotiniliranog antitijela za streptavidin na čvrstom nosaču

Preuzeto s: https://www.researchgate.net/publication/240106184_Principles_of_Immunochemical_Techniques_Used_in_Clinical_Laboratories/figures [pristupljeno 15.09.2019.]



Slika 5. Prikaz magnetske kuglice imobilizirane streptavidinom

Preuzeto s: https://www.cd-bioparticles.com/product/streptavidin-list-149.html [pristupljeno 16.09.2019.]

Nove tehnike biotinilacije, uključujući kemijske i enzimske tehnike, razvijene su za poboljšanje selektivnog obilježavanja proteina za biološku primjenu. Streptavidin-biotin sustav je jednostavan, robustan i prilagodljiv te, iako je davno otkriven, stalno pronalazi novu upotrebu u modernim disciplinama (15).

1.3. Interferencija biotina u dijagnostičkim testovima

Tijekom posljednjeg desetljeća pojavio se problem široke upotrebe visokih doza biotina kao kozmetičkog preparata. Budući da je riječ o bezreceptnom dodatku prehrani, smatra se kako je siguran i netoksičan te je zbog toga neracionalno korišten. Ovaj rastući zdravstveni trend donio je poseban problem liječnicima i laboratorijima jer većina kliničkih imunokemijskih ispitivanja koja mjere analite u malim koncentracijama, poput hormona, u metodama koriste visoko specifičnu biotin-streptavidin vezu. U posljednjih nekoliko godina pokazano je kako visoke koncentracije biotina u krvi mogu interferirati u tim imunokemijskim ispitivanjima uzrokujući pogrešne rezultate. Posljedice toga mogu biti postavljanje pogrešne dijagnoze, neprimjereno liječenje, pa čak i smrti zbog pogrešne dijagnoze. Premda su laboratoriji postali svjesni važnosti ove interferencije, propusti se događaju u komunikaciji pacijenata i liječnika, budući da pacijenti često ne navode da primjenjuju dodatke prehrani (7).

U studenom 2017., FDA (Food and Drug Administration) je izdala upozorenje javnosti, laboratorijima, zdravstvenim djelatnicima i osobama koje dizajniraju dijagnostičke testove o potencijalnim interferencijama uzrokovanim biotinom. FDA je zaključila kako visoke koncentracije biotina u bolesničkim uzorcima mogu rezultirati lažno pozitivnim ili negativnim rezultatima ispitivanja i posljedično pogrešnim dijagnozama. Sukladno tome, izdane su brojne preporuke kako bi se potaknula svijest o uzimanju biotina kao dodatka prehrani i mogućoj interferenciji s dijagnostičkim testovima (16).

Klinički nesukladne i ekstremne laboratorijske vrijednosti testova mogu se lako prepoznati kao smetnje, ali umjerene promjene u rezultatima teško se prepoznaju u laboratoriju. Čak i male promjene rezultata mogu uzrokovati ozbiljne posljedice za testove u kojima se može dogoditi pogrešna dijagnoza ozbiljnih zaraznih bolesti poput HIV-a ili virusa hepatitisa C ili neprepoznavanje recidiva tumora. Pacijenti sa simptomima infarkta miokarda mogu biti u opasnosti ako biotin ometa analizu srčanih markera. Pacijenti koji uzimaju terapiju zbog hipotireoze ili hipertireoze, mogu biti nepravilno liječeni zbog netočnih laboratorijskih rezultata (9).

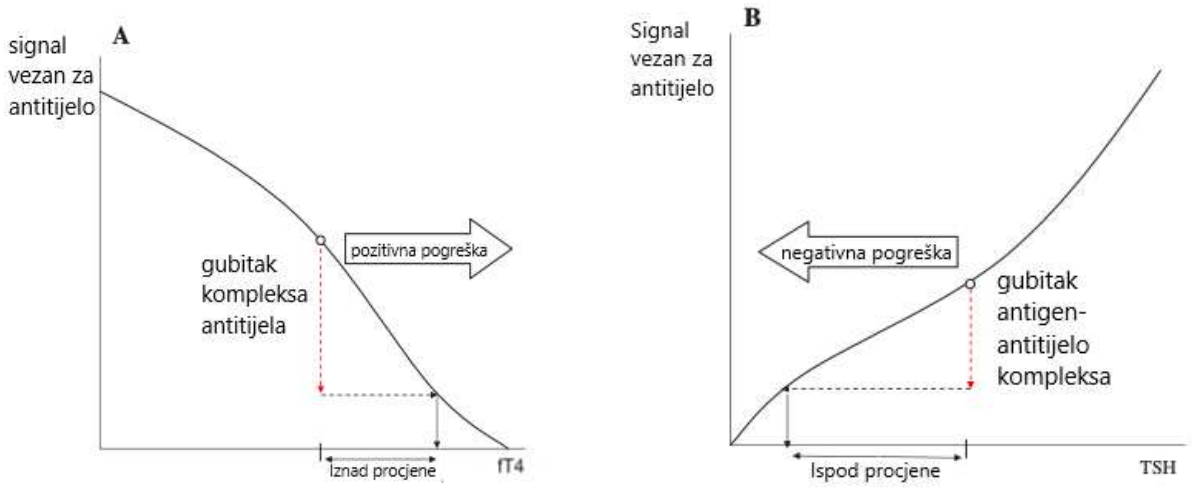
Konzumiranje uravnotežene prehrane, uzimanje multivitamina (koje sadrže otprilike 30 μg biotina) ili uzimanje biotinskog dodatka u malim dozama ne utječu na imunokemijske testove koji koriste biotin-streptavidin tehnologiju. Međutim, uzimanje dodatka 5 mg biotina dnevno može utjecati na neke testove koji se temelje na biotinu, dok uzimanje farmaceutskih doza (100-300 mg/dan) za liječenje simptoma multiple skleroze ili drugih bolesti može utjecati na gotovo sve imunokemijske analize temeljene na biotinu (17).

Tablica 2. Popis nekih imunokemijskih testova, analiziranih na Roche Cobas-analizatorima, koji su potencijalno osjetljivi na interferenciju visokim dozama biotina

Analit	**Dizajn metode**	**Očekivani smjer interferencije: lažno povećan rezultat ↑ ili lažno snižen rezultat ↓**
kortizol	kompetitivna metoda	↑ – lažno pozitivan test
FSH	sendvič metoda	↓ – lažno negativan test
fT_3	kompetitivna metoda	↑ – lažno pozitivan test
fT_4	kompetitivna metoda	↑ – lažno pozitivan test
LH	sendvič metoda	↓ – lažno negativan test
NT-proBNP	sendvič metoda	↓ – lažno negativan test
testosteron	kompetitivna metoda	↑ – lažno pozitivan test
ukupni PSA	sendvič metoda	↓ – lažno negativan test
Troponin T	sendvič metoda	↓ – lažno negativan test
TSH	sendvič metoda	↓ – lažno negativan test
Anti-TPO	kompetitivna metoda	↑ – lažno pozitivan test
CA125	sendvič metoda	↓ – lažno negativan test

Preuzeto i modificirano s: https://mft.nhs.uk/app/uploads/2018/09/potential-for-biotin-interference-in-immunoassays.pdf [pristupljeno 17.09.2019.]

U kompetitivnim imunokemijskim ispitivanjima, koristeći biotinilirano antitijelo, signal ispitivanja je obrnuto proporcionalan koncentraciji analita, dok je u „sendvič“ testu signal ispitivanja izravno proporcionalan koncentraciji analita. Ta razlika objašnjava zašto biotin izaziva pozitivne smetnje u kompetitivnom formatu, a negativne smetnje u „sendvič“ formatu (17). Kompetitivni format u imunokemijskim testovima koristi se za male molekule s molekularnom masom manjom od 1000 Da, kao što su steroidni (testosteron, kortizol) i tiroidni hormoni (fT_3, fT_4). U „sendvič“ formatu imunokemijskog testa koriste se veće proteinske molekule, kao što su hormoni TSH, LH, FSH, neki tumorski markeri (CA125, PSA) i srčani biljezi NT-proBNP te troponin T (9, 17).



Slika 6. Mehanizmi interferencije. Inhibicija razdvajanja imuno-kompleksa dovodi do gubitka kompleksa antigen-antitijelo, inducira povećanje koncentracije analita u kompetitivnom testu (A) i sniženje koncentracija analita u „sendvič“ testu (B) (18).

U ovim imunokemijskim testovima riječ je o dvostrukom prepoznavanju epitopa. Tako da se TSH u „sendvič“ testu nalazi između dva antitijela. Jedno antitijelo označeno je signalom koji se mjeri (enzim ili fluorescentni spoj), a drugo je antitijelo za hvatanje koje omogućava odvajanje imunokemijskog kompleksa na čvrstu fazu. Što je veća koncentracija TSH, veći je signal vezan za čvrstu fazu. Dakle, riječ je o rastućoj krivulji (Slika 6B) zbog signala vezanog za čvrstu fazu koji je direktno proporcionalan koncentraciji TSH u uzorku. Ovaj format testa ima dobru osjetljivost, specifičnost i robusnost.

Razvijen je i kompetitivni format imunokemijskog testa koji detektira male molekule, primjerice fT_4. Najprije se uzorak inkubira antitijelom protiv fT_4 i fT_4 označenim mjerljivim signalom (enzim, fluorescentni ili luminiscentni spoj, izotop), pri čemu dolazi do natjecanja između fT_4 hormona u uzorku i signalom obilježenog fT_4 za mjesta na antitijelu vezanom na čvrstu fazu. Te molekule fT_4 vezane na antitijelo, vezane su na čvrstu fazu. Za razliku od „sendvič“ ispitivanja, što je veća koncentracija fT_4 u uzorku, manje je signalom označenog fT_4 vezano na čvrstu fazu. Stoga je kalibracijska krivulja padajuća (Slika 6A), jer je signal vezan za čvrstu fazu obrnuto proporcionalan koncentraciji fT_4 u uzorku. Na kraju inkubacije, u oba formata ispitivanja, hormon vezan za reagens antitijela odvojen je od reakcijske smjese te se mjeri veličina signala. Biotin-streptavidin veza predstavlja učinkovitu metodu za razdvajanje. Za svaki test kalibracijska krivulja je konstruirana korištenjem kalibratora s poznatim koncentracijama analita (18).

Ova kombinacija pozitivnih i negativnih smetnji biotina može paradoksalno sličiti patološkom stanju s potencijalno štetnim učincima. U slučaju ispitivanja funkcije štitnjače, nizak TSH („sendvič“ metoda) u kombinaciji s visokom T_3 i T_4 (kompetitivni test) može dovesti do savršene biokemijske dijagnoze hipertireoze, koja može biti čak Gravesova bolest ako su antitijela TSH također lažno otkrivena kompetitivnom metodom (19).

1.4. Troponin

Troponin je građen od tri strukturno funkcionalne podjedinice: troponin T, troponin I i troponin C. Troponinski kompleks sudjeluje u regulaciji kontrakcije staničnih miofibrila. Troponin T veže miofibrile, troponin C veže ione kalcija, a troponin I inhibira ATP-aze. Vezanjem kalcija za proteinski kompleks, mijenja se struktura troponina, što uzrokuje interakciju između aktinskih i miozinskih vlakana i posljedično dovodi do kontrakcije srčanog mišića (20). Postoje višestruke izoforme svake podjedinice troponina, koje su kodirane različitim genima, od kojih se neke selektivno izražavaju u srčanom mišiću. U kliničkoj praksi uobičajeno se koriste kardiospecifični TnT i TnI čiji se nizovi aminokiselina razlikuju od njihovih verzija u mišićima (21).

Utvrđivanje razlika u sljedovima aminokiselina između srčanog i skeletnog troponina omogućilo je stvaranje protutijela na specifične epitope srčanih troponina. U prošlom desetljeću srčani troponin (cTn) postao je zlatni standard za otkrivanje akutne nekroze miokarda koja je patološki znak akutnog infarkta miokarda. Povišena vrijednost troponina bez akutnog infarkta miokarda često odražava ozljedu miokarda nepoznatog porijekla, što je dokaz da je cTn test specifičan za organ, a ne za bolest (21).

Infarkt miokarda nastaje kada je u koronarnim žilama, koje srčani mišić opskrbljuju kisikom, blokiran protok krvi. To dovodi do nedovoljne opskrbe miocita kisikom, te posljedično nekroze i stanične smrti. Tijekom tog procesa dolazi do rupture stanične membrane i izlijevanja unutarstaničnog sadržaja u izvanstanični prostor. Troponin nakon rupture membrane dostiže visoku razinu u cirkulirajućoj krvi (22).

2000. godine zajednički odbor Europskog kardiološkog društva i Američkog kardiološkog koledža (ESC / ACC) priznao je biomarker troponin kao temelj za dijagnozu akutnog infarkta miokarda, jer simptomi mogu biti atipični, a promjene elektrokardiograma mogu izostati (23). Povećanje ili pad srčanog troponina I (TnI) ili srčanog troponina T (TnT) koristi se za razlikovanje AMI od nestabilne angine pektoris, dok se ST-segment EKG-a koristi za razlikovanje STEMI i NSTEMI (21). Infarkt miokarda sa ST-elevacijom (STEMI)

podrazumijeva povišenje troponina kao i promjenu EKG-a. Infarkt miokarda bez ST-elevacije (NSTEMI) definiran je kao manja ozljeda srčanog mišića koja rezultira povišenim troponinom, ali bez promjena na EKG-u. Pacijent s bolovima u prsima može imati negativan troponin, izostanak promjena na EKG-u, ali svejedno može imati NSTEMI jer razina troponina ne raste odmah nakon oštećenja miokarda. Zbog toga je dijagnosticiranje NSTEMI poseban izazov liječnicima na hitnom prijemu (22).

Koncentracija troponina u cirkulaciji kod zdravih pojedinaca vrlo je niska, a vrijeme poluživota iznosi oko 2 sata. Razvoj testova hsTn, pored povećanja analitičke osjetljivosti, pokazao je kako muškarci imaju značajno veće koncentracije hsTnT i hsTnI nego žene (24). Citoplazmatski TnI oslobađa se unutar sat vremena od oštećenja i slijedi monofaznu krivulju. Maksimalna koncentracija postiže se nakon 24 sata, a vrijednosti ostaju povećane 5-7 dana. Porast vrijednosti TnT-a u cirkulaciji slijedi bifaznu krivulju. U prvoj fazi, zbog oštećenja stanične membrane, dolazi do oslobađanja slobodnog TnT-a u cirkulaciju unutar sat vremena od oštećenja, dok u drugoj fazi koja traje 1-2 tjedna dolazi do oslobađanja TnT-a iz oštećenih miofilamenata (20, 25).

Nakon početka ishemije miokarda, može doći do smrti srčanog miocita u roku od 15 minuta, s histološkim dokazima nekroze unutar 4 – 6 h. cTn se oslobađa iz miokarda nekoliko sati nakon razdoblja ishemije i može se otkriti u venskoj cirkulaciji kada srčana limfa očisti intersticijsku tekućinu iz infarktne zone. Nakon miokardijalne ishemije, zbog nastale nekroze srčanih miocita mogu se otkriti različiti oblici cTn u serumu. TnI/T ne oslobađaju se samo u slobodnom obliku, već i kao nekovalentni ternarni i binarni kompleksi. Nakon AIM slobodni oblici TnI i TnT iz citosola prvi se otkriju u serumu, prije detekcije složenih oblika (18). Test cTn visoke osjetljivosti (hsTn) ubrzava procjenu pacijenata s mogućim akutnim koronarnim sindromima (ACS) na odjelu hitne pomoći. Predloženi su brzi protokoli probira s hsTn za pacijente kod kojih se sumnja na akutni infarkt miokarda (AMI). Nove analitičke metode mogu odrediti znatno nižu koncentraciju analita od konvencionalnih metoda. Za kliničku upotrebu tih testova potrebno je definirati 99. percentilu zdrave populacije, pri čemu analitička nepreciznost u tom području ima koeficijent varijacije ≤ 10 %. Test bi trebao detektirati koncentraciju cTn ispod 99. percentile u 50 % zdravih pojedinaca (26).

Pojedinačan nalaz troponina nije dovoljan za određivanje dijagnoze. Za diferencijalnu dijagnostiku akutnog od kroničnog oštećenja srca, preporučeno je višekratno određivanje troponina. Kod visokoosjetljivih metoda preporuka je određivanje koncentracije troponina po prijemu bolesnika i opetovano nakon jednog do tri sata (20). Upravo zbog toga metoda na 99. percentili mora imati koeficijent varijacije < 10 %.

Poseban problem kliničarima predstavljaju povišene razine troponina zbog neishemijskih uzroka kao što su: sepsa, plućna embolija, bubrežno zatajenje, srčano zatajenje, perikarditis, cerebrovaskularne bolesti, Takotsubo kardiomiopatija, tahikardija, kemoterapija. Kod infekcije prsnog koša, Takotsubo kardiomiopatije, plućne embolije i perikarditisa također mogu biti prisutni bol u prsima i nedostatak daha, što komplicira dijagnostiku. Kod plućne embolije, perikarditisa i srčanog zatajenja može doći do nespecifičnih promjena ST segmenta. Sve to otežava razlikovanje akutnog infarkta miokarda od ostalih mogućih stanja u kojima je razina troponina u krvi povišena (27). Važno je napomenuti da je dokazano da tijekom oboljenja skeletnih mišića može doći do ponovne ekspresije fetalnog TnT, koji se detektira TnT testovima, što dovodi do lažno pozitivnih rezultata (21). Reverzija TnI se ne događa. Sukladno svemu navedenom, veliku važnost ima pravilna interpretacija laboratorijskih rezultata, kao i neizostavna klinička procjena te svijest o mogućim interferencijama (20).

1.5. Uloga TSH, T_3 , T_4 hormona štitnjače

Štitnjača ili štitna žlijezda jedna je od najvećih žlijezda endokrinog sustava koja se sastoji od dva režnja, desnog i lijevog, međusobno spojenih istmusom (28). Riječ je o neparnoj žlijezdi smještenoj u donjem dijelu vrata, ispred dušnika, mase 15-20 g (29). Svojim oblikom podsjeća na slovo H (30). Štitnjača je prva endokrina žlijezda koja se pojavljuje u embrionalnom razvoju, te se hormoni štitnjače mogu otkriti u krvi između 11. i 13. tjedna trudnoće (31). Strukturalno, štitnu žlijezdu formiraju manji režnjevi građeni od folikula – strukturalnih jedinica žlijezde različitih veličina, obavijenih gustom mrežom limfnih žila, kapilara i simpatičkih živčanih ogranaka. Folikuli su iznutra obavijeni folikularnim i parafolikularnim stanicama (C-stanicama) koje izlučuju kalcitonin. Folikularne stanice formiraju koloid koji ispunjava folikule i sadrži jodirani tireoglobulin, prekursor tiroidnih hormona (29, 32). Tireoglobulin je veliki glikoprotein u kojem se stvaraju i pohranjuju hormoni štitnjače. Štitnjača je jedina endokrina žlijezda koja proizvodi i skladišti svoje početne forme hormona te ih na podražaj pretvara u aktivne forme i ispušta u krvotok (33).

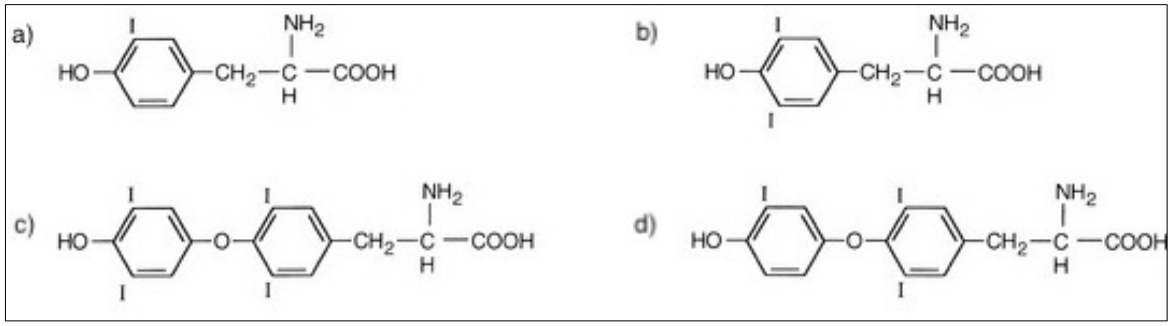
Biosinteza i sekrecija hormona štitnjače održava se strogim regulatornim mehanizmima koji su izrazito osjetljivi i na male promjene u koncentraciji cirkulirajućih hormona (32, 34). Oni potiču funkciju svih organa u tijelu. Bez njih ne bi bilo normalnog rada ni razvoja središnjeg živčanog sustava (35). Opći učinak hormona štitnjače poticanje je transkripcije gena u jezgri, što dovodi do stvaranja velikog broja enzima te građevnih i

prijenosnih proteina. Djeluju s latencijom i dugotrajno. Njihov manjak može usporiti metabolizam do 40 %, a višak može ubrzati metabolizam za čak 60 do 100 % (36). Utjecaj hormona štitnjače na metabolizam očituje se povećanjem bazalnog metabolizma. Jedna od posljedica toga je povećanje potrošnje kisika i ATP hidroliza, povećan broj i aktivnost mitohondrija, što rezultira povećanom proizvodnjom topline. Osim toga, hormoni štitnjače pospješuju metabolizam ugljikohidrata aktivacijom glikolize, glukoneogeneze te lučenjem inzulina. Hormoni štitnjače stimuliraju i metabolizam masti. Povećane koncentracije hormona stimuliraju otpuštanje masnih kiselina povećavajući njihovu koncentraciju u plazmi. Koncentracija kolesterola i triglicerida u plazmi obrnuto je proporcionalna razini hormona štitnjače (37, 38). Važan je učinak hormona štitnjače na rast i razvoj mozga za vrijeme fetalnog života i u prvih nekoliko godina nakon rođenja. Njihov učinak očituje se i na rast djece (39, 40). Osim navedenog, hormoni štitnjače utječu i na kardiovaskularni sustav povećavajući broj srčanih otkucaja, srčanu kontraktilnost, potiču vazodilataciju i povećanu prokrvljenost brojnih organa. Djeluju i na mentalni status, na način da premalo hormona dovodi do usporavanja mentalnih funkcija, dok previše hormona uzrokuje anksioznost i nervozu. Za normalne spolne funkcije potrebno je normalno lučenje hormona štitnjače. Mogu utjecati na libido, plodnost i menstrualni ciklus. Uz sve to, hormoni štitnjače imaju učinak na pokretljivost probavnog sustava, mišića te na spavanje. Ukoliko postoji disbalans hormona odrazit će se kao skup simptoma zbog poremećaja fizioloških funkcija koji će se kao takvi dijagnosticirati i potvrditi laboratorijskim testiranjima (36).

Postoje dva biološki aktivna oblika hormona štitnjače. To su tiroksin (T_4) i 3,5,3'-trijodtironin (T_3). Razlikuju se u građi na način da T_4 ima dva atoma joda na vanjskom prstenu, dok T_3 ima samo jedan (41). Tiroidni hormoni su jodirane aminokiseline dobivene iz L-tirozina (slika 7). Jod je potreban za sintezu i pohranu hormona štitnjače na tireoglobulinu. Štitnjača je jedini organ u sisavaca koji ima sposobnost ugradnje joda u organske spojeve. Za prelazak jodida iz krvne plazme u stanice štitnjače odgovorna je jodidna crpka čiju aktivnost najviše potiče tireotropin (TSH). Oksidaciju joda omogućuje enzim tiroperoksidaza (TPO) koja koristi vodikov peroksid kao oksidans. TSH povećava gensku ekspresiju enzima tiroperoksidaze koja regulira jodiranje tirozina te spajanje jodtirozina. Vodikov peroksid je esencijalan i ograničavajući faktor pri oksidaciji jodida, aromatskom jodiranju i reakciji spajanja prekursora (35). Tirozin se prvo jodira u položaju 3, a zatim u položaju 5, pri čemu nastaje monojodtirozin, zatim dijodtirozin. Udruživanjem jedne molekule monojodtirozina s jednom molekulom dijodtirozina nastaje trijodtironin, a dvije molekule dijodtirozina daju tiroksin (36). Trijodtironin može nastati i dejodiranjem tiroksina (42). Na tiroksin otpada 93 % ukupno otpuštenih hormona iz štitnjače (36). Hormoni cirkuliraju krvotokom vezani za

transportne proteine TBG (thyroid binding globulin), TTR (transtiretin) i albumin. Vezani tiroksin nije fiziološki aktivan. T_4 ima dulje biološko vrijeme poluživota nego T_3 koji ima manji afinitet vezanja na proteine plazme, pa ima brže djelovanje (42). Dominantan hormon u krvnoj plazmi je T_4 koji se nalazi u većoj koncentraciji, dok T_3 ima 3 do 4 puta jače djelovanje i jače se veže za nuklearne receptore (35). Trijodtironin je aktivna forma na staničnoj razini dok tiroksin predstavlja uglavnom prijenosni oblik (42).

Radom štitnjače u fiziološkim okolnostima upravljaju hipotalamus i hipofiza mehanizmom povratne sprege. Supraoptičke i supraventrikularne jezgre u hipotalamusu izlučuju hormon koji oslobađa tireotropin – TRH (*eng. Thyrotropin Releasing Hormone*), koji portalnim krvotokom dolazi do tireotropnih stanica adenohipofize, gdje se veže na receptore za TRH i izaziva lučenje i stvaranje TSH (43). U kontroli lučenja hormona štitnjače najvažnija je adenohipofiza koja izlučuje TSH te time potiče rast štitnjače i lučenje hormona T_3 i T_4 (44). Tireotropin povećava proteolizu tireoglobulina pohranjenog u folikulima, što dovodi do otpuštanja hormona štitnjače u krvotok, povećava rad jodidne crpke i transport jodida, povećava jodiranje tirozina i stvaranje hormona štitnjače, povećava se volumen i sekrecijska djelatnost stanica štitnjače te se povećava broj samih stanica štitnjače (32). Pri povećanju koncentracije hormona štitnjače u tjelesnim tekućinama, negativnom se povratnom spregom smanjuje lučenje TSH iz adenohipofize i time prekida daljnja stimulacija lučenja hormona iz štitne žlijezde (36).



Slika 7. Aminokiseline i hormoni s jodom:
a) monojodtirozin (MIT); b) dijodtirozin (DIT); c) tiroksin (T_4); d) trijodtironin (T_3)

Preuzeto i modificirano s: https://entokey.com/thyroid-physiology-and-thyroid-function-testing/ [pristupljeno 23.01.2020.]

1.6. Bolesti štitnjače i laboratorijska testiranja

Bolesti štitnjače karakterizirane su kvalitativnim i kvantitativnim promjenama lučenja hormona i/ili povećanjem štitnjače (guša). Maligni ili benigni tumori najčešće uzrokuju lokalizirano povećanje štitnjače. Dva su osnovna poremećaja funkcije štitnjače: prekomjerno lučenje hormona štitnjače rezultira hipertireozom i ubrzanim metabolizmom, dok nedostatno lučenje rezultira hipotireozom i usporenošću cjelokupnoga organizma (45). Među najučestalije bolesti štitnjače ubrajaju se autoimuni poremećaji poput Hashimotovog tireoiditisa, papilarni karcinom, benigne neoplazije i strume (46).

Struma ili guša je povećanje štitne žlijezde koje se javlja kod gotovo svih poremećaja štitnjače kao posljedica hipertrofije i hiperplazije folikularnog epitela štitnjače. Može biti izazvana nekim od poremećaja koji koče proizvodnju hormona štitnjače: kemikalijama, nedostatnim unosom joda (endemska gušavost) ili je pak nepoznate etiologije (idiopatski tip). Toksična struma može proizvoditi višak hormona te se javljaju simptomi hipertireoze, dok se kod netoksične strume javljaju simptomi hipotireoze (47).

Hipertireoza označava hiperaktivnost štitne žlijezde, a tireotoksikoza svaki suvišak hormona štitnjače (48). Patofiziološka podloga hipertireoze može biti bolest same štitnjače, pojačano i neregulirano lučenje TSH ili TRH ili izvanhipofizno lučenje tireoidnog stimulatora. U krvi bolesnika s hipertireozom nalaze se povišene koncentracije hormona T_3 i T_4. Povišenje koncentracije T_3 veće je od povišenja T_4 zbog pojačanog stvaranja tog hormona u štitnjači i povećane pretvorbe T_4 u T_3 na periferiji. Glavne posljedice tireotoksikoze su povećana potrošnja energije, pojačan tonus simpatikusa, neuromuskularni simptomi, poremećaji kardiovaskularnog sustava (47). U većine oboljelih štitnjača se poveća 2 do 3 puta. Najčešći oblik hipertireoze je Gravesova (Basedowljeva) bolest. Riječ je o autoimunoj bolesti koju karakteriziraju difuzna guša, egzoftalmus i dermopatija. U krvi bolesnika nalazi se niz protutijela protiv receptora TSH na stanicama štitnjače koja se nazivaju imunoglobulinima koji potiču štitnjaču (TSI) (36, 45).

Hipotireoza označava smanjeno stvaranje, izlučivanje i djelovanje hormona štitnjače. Može biti posljedica bolesti same štitnjače (primarna hipotireoza), nedovoljnog stvaranja TSH u hipofizi (sekundarna hipotireoza) ili TRH u hipotalamusu (tercijarna hipotireoza). U bolesnika s gotovo potpunim zatajenjem funkcije štitnjače javljaju se miksedem, pretibijalni miksedem i miksedemska koma (48). Fiziološki učinci hipotireoze su malaksalost, umor, pospanost, zimogroznost, usporena srčana frekvencija, smanjen minutni volumen srca, smanjen volumen krvi, opstipacija, povećanje tjelesne mase, manjak koncentracije, hrapav glas, edematozni izgled i mišićna slabost (36). Hashimotov tireoiditis, najčešći oblik

hipotireoze, predstavlja kroničnu upalu štitne žlijezde. Karakterizira ga postepeno narušavanje funkcije štitnjače zbog autoimune reakcije na tkivo štitnjače. Klinički se očituje kao difuzno uvećanje tkiva (48). Dijagnoza se temelji na dokazu povećane koncentracije antitireoglobulinskih protutijela (Tg-At) i koncentracije antitireoperoksidaze (TPO-At), te je potrebno doživotno liječenje nadomjesnim tiroidnim hormonima (levotiroksin) (35).

Dijagnostički postupak bolesti štitnjače započinje razgovorom s pacijentom, uzimanjem osobne anamneze i kliničkim pregledom. Nakon toga slijedi laboratorijska dijagnostika koja podrazumijeva određivanje niza parametara u svrhu procjene funkcije štitnjače (49). Većina kliničkih centara primjenjuje strategiju određivanja TSH kao prvog nalaza u procjeni funkcije štitnjače. Nalaz tireotropina unutar normalnog raspona označava urednu funkciju štitnjače te najčešće ostale pretrage nisu potrebne. TSH ukazuje jedino na poremećaj u funkciji osi hipotalamus-hipofiza, ali ne razlikuje klinički manifestnu od supkliničke disfunkcije štitnjače (48). S obzirom na izrazitu osjetljivost i specifičnost metoda određivanja TSH, otkrivanje poremećaja funkcije štitnjače putem TSH ima veću osjetljivost u odnosu na određivanje fT_4. Povišena vrijednost tireotropina upućuje na hipotireozu. Za dijagnostiku klinički manifestne ili supkliničke hipotireoze, potrebno je odrediti ukupni tiroksin (T_4) i slobodni tiroksin (fT_4). Određivanje trijodtironina rutinski se ne primjenjuje zbog povećane pretvorbe fT_4 u fT_3. Zbog toga kod bolesnika s hipotireozom T_3 i fT_3 ostaju dulji period u granicama normale, osim u dugotrajnoj i teškoj hipotireozi kada su sniženi (50). Određivanje protutijela za tireoidnu peroksidazu (TPO-At) može potvrditi autoimunu etiologiju bolesti štitnjače, ali i ukazati na prognozu poremećaja štitnjače. Nalaz protutijela za TPO može pomoći pri odluci o liječenju graničnih slučajeva. Određivanje tireoglobulina kao specifičnog biljega štitnjače koristi se u praćenju pacijenata s diferenciranim karcinomom štitnjače.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

2.1. Glavni cilj istraživanja

Utvrditi uzrokuje li uzimanje biotina interferenciju u mjeri koja može utjecati na kliničku odluku.

Specifični ciljevi ovog istraživanja su:

Utvrditi utjecaj na rezultate u periodu od tri sata nakon ingestije biotina te nakon kontinuiranog uzimanja biotina tijekom 7 dana.

2.2. Hipoteza

Uzimanje biotina u visokim dozama u pripravcima dostupnim u slobodnoj prodaji može biti izvor interferencije u imunokemijskim testovima.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

Ova je studija odobrena od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Splitu i Etičkog povjerenstva KBC-a Split (Klasa: 003-08/19-03/0003, Ur.br. 2181-198-03-04-19-0075). Studija se provodila u Zavodu za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Split i u njoj je sudjelovalo 7 zdravih ispitanika. U skupini ispitanika bilo je 6 studentica i 1 student Sveučilišta u Splitu u starosti od 20 do 25 godina. Svi ispitanici potpisali su suglasnost za provođenje istraživanja. U informiranom pristanku upoznati su sa svim aspektima studije, potencijalnim rizicima i načinom uzorkovanja. Uvjet za sudjelovanje u studiji jest da su ispitanici zdravi i da ne piju nikakve lijekove ili dodatke prehrani za vrijeme trajanja istraživanja. Nisu uzimani osobni podaci ispitanika, a uzorci su označeni inicijalima.

3.2. Uzorci

Uzorkovanje krvi izvršeno je u Zavodu za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Split. Svi ispitanici poštivali su standardni protokol pripreme koji se primjenjuje prije uzorkovanja. Ispitanici su tijekom uzorkovanja bili natašte i nije bila dozvoljena konzumacija jela i pića, osim vode, sve do posljednjeg uzorkovanja krvi toga dana. Prvi dan istraživanja, prije početka uzimanja biotina, uzorkovala se po jedna epruveta krvi od svakoga ispitanika. Potom su svi ispitanici u nultom satu, nakon prvog uzorkovanja krvi, popili jednu tabletu biotina u dozi od 10 mg. Uzorkovanje se ponovilo nakon jednog sata i nakon tri sata. Svi ispitanici su uzimali pripravak od 10 mg biotina, jednom dnevno, u isto vrijeme, tijekom 7 dana. Sedmi dan se ponovilo uzorkovanje krvi u tri točke: neposredno prije uzimanja biotina, nakon sat vremena i nakon tri sata. Pripravak biotina koji se primjenjivao u istraživanju, smatra se dodatkom prehrani i može se kupiti u slobodnoj prodaji. Uzorci su uzimani u standardne vakuum spremnike bez antikoagulansa, centrifugirani 10 minuta na 3500 okretaja/min, nakon čega je serum odvojen od stanica. Do analize, alikvoti su bili pohranjeni na temperaturi od -70 ^{o}C.

3.3. Metode

3.3.1. Metoda neutralizacije biotina

Uzorci venske krvi dobivene venepunkcijom korišteni su za određivanje koncentracije TSH, T_3, T_4, fT_3, fT_4 i troponina prije i nakon uzimanja biotina. Protokol koji se koristio u istraživanju objavili su Leo Lam i Campbell V. Kyle (51).

U Zavodu za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku sakupljali su se ostaci reagensa namijenjeni za otpad. Reagensi za imunokemijske analize proizvođača Roche sadrže mikročestice obložene streptavidinom. Najprije je 3 mL suspenzije mikročestica obloženih streptavidinom centrifugirano 5 minuta na 1000 okretaja/min. Zatim je odvojen supernatant, dodano je 500 µL seruma, vorteksirano i inkubirano 1 h na sobnoj temperaturi. Nakon sat vremena, smjesa je centrifugirana 5 minuta na 3000 okretaja/min. Iz epruvete se oprezno izdvojilo 450 µL supernatanta i alikvotiralo u novu epruvetu pazeći da se ne dodiruje talog mikročestica. Nativni i obrađeni uzorci testirani su na Roche Cobas 8000/e801 imunokemijskom analizatoru (51).

3.3.2. Imunokemijske metode

Primjer „sendvič“ formata imunokemijskog testa (Cobas Roche)

„Sendvič“ format imunokemijskog testa koristi se za detektiranje većih proteinskih molekula TSH i troponina. U prvoj inkubaciji dodano je 30 µL uzorka, biotinilirano monoklonsko antitijelo specifično za TSH i monoklonsko antitijelo specifično za TSH, označeno rutenijskim kompleksom koji reagiraju tako da s TSH formiraju kompleks sendviča. U drugoj inkubaciji, nakon dodavanja mikročestica obloženih streptavidinom, kompleks se veže na čvrstu fazu interakcijom biotina i streptavidina. Reakcijska smjesa usisava se u mjernu ćeliju gdje se mikročestice magnetski zarobljavaju na površini elektrode. Nevezane tvari zatim se uklanjaju pomoću ProCell II M. Primjena napona na elektrodi tada inducira kemiluminescentnu emisiju koja se mjeri fotomultiplikatorom.

Primjer kompetitivnog formata imunokemijskog testa (Cobas Roche)

Kompetitivni imunokemijski testovi koriste se za detektiranje malih molekula T_3, T_4, fT_3, fT_4. U prvoj inkubaciji dodano je 18 μL uzorka i antitijelo specifično za T_3 označeno s rutenijskim kompleksom; vezani T_3 oslobađa ANS (8-anilino-1-naphthalene sulfonsku kiselinu) iz vezivnih proteina u uzorku. U drugoj inkubaciji, nakon dodavanja mikročestica obloženih streptavidinom i biotiniliranog T_3, slobodna mjesta vezanja obilježenog protutijela postaju okupirana, stvarajući kompleks antitijelo-hapten. Cijeli kompleks veže se za čvrstu fazu interakcijom biotina i streptavidina.

Iako su imunokemijski testovi koji koriste sendvič, odnosno kompetitivni format, slični, njihova osjetljivost na interferenciju biotina deklarirana od proizvođača značajno se razlikuje (Tablica 3).

Tablica 3. Deklarirane vrijednosti tolerancije na biotin prema proizvođaču

Analit	**TSH**	**T_3**	**T_4**	**fT_3**	**fT_4**	**troponin T**
Ispitivana koncentracija biotina	≤ 4912 nmol/L ili ≤ 1200 ng/mL	≤ 123 nmol/L ili ≤ 30 ng/mL	≤ 409 nmol/L ili ≤ 100 ng/mL	≤ 286 nmol/L ili ≤ 70 ng/mL	≤ 409 nmol/L ili ≤ 100 ng/mL	≤ 4.92 μmol/L ili ≤ 1200 ng/mL

4. REZULTATI

Koncentracija analita od interesa (TSH, T_3, T_4, fT_3, fT_4, hsTnT) u krvi ispitanika, mjerena je prije i poslije obrade uzoraka s mikročesticama obloženim streptavidinom. Nakon obrade uzoraka uklonjen je biotin kao potencijalna interferencija. Izračunata je apsolutna i relativna razlika između koncentracije analita prije i poslije obrade, to jest uklanjanja interferencije. Zelenom bojom u tablicama označene su koncentracije analita unutar referentnih vrijednosti, a crvenom bojom one izvan referentnih vrijednosti. Deklarirane referentne vrijednosti za hormone štitnjače prikazane su u Tablici 4.

Tablica 4. Deklarirane referentne vrijednosti hormona štitnjače za muškarce i žene u dobi od 20 do 40 godina

	TSH (mIU/L)	**T_3** (nmol/L)	**T_4** (nmol/L)	**fT_3** (pmol/L)	**fT_4** (pmol/L)
Muškarci	0.81 – 4.3	1.3 – 3.1	66 – 181	4.50 – 6.96	12.9 – 21.4
Žene	0.5 – 5.1	1.3 – 3.1	66 – 181	3.96 – 7.07	11.2 – 19.9

Tablica 5. Rezultati određivanja koncentracije TSH u krvi ispitanika u nativnim uzorcima i uzorcima nakon primjene neutralizacijskog protokola (izraženi u mIU/L)

	prije uzimanja biotina (0h)				1 sat nakon uzimanja biotina (1h)				3 sata nakon uzimanja biotina (3h)			
	prije	poslije	apsolutna razlika	relativna razlika	prije	poslije	apsolutna razlika	relativna razlika	prije	poslije	apsolutna razlika	relativna razlika
1. DAN	1.71	1.80	-0,09	-5%	1.78	1.79	-0,01	-1%	1.50	1.61	-0,11	-7%
	1.26	1.49	-0,23	-15%	1.06	1.25	-0,19	-15%	0.914	0.995	-0,08	-8%
	2.59	2.71	-0,12	-4%	2.66	2.83	-0,17	-6%	2.58	2.77	-0,19	-7%
	2.35	2.51	-0,16	-6%	2.07	2.17	-0,10	-5%	1.97	2.10	-0,13	-6%
	1.86	1.99	-0,13	-7%	1.45	1.58	-0,13	-8%	1.21	1.38	-0,17	-12%
	1.60	1.74	-0,14	-8%	1.08	1.36	-0,28	-21%	0.899	1.01	-0,11	-11%
	1.90	2.18	-0,28	-13%	1.60	1.84	-0,24	-13%	1.44	1.52	-0,08	-5%
			-0,16	-8%			-0,16	-10%			-0,12	-8%

	prije uzimanja biotina (0h)				1 sat nakon uzimanja biotina (1h)				3 sata nakon uzimanja biotina (3h)			
	prije	poslije	apsolutna razlika	relativna razlika	prije	poslije	apsolutna razlika	relativna razlika	prije	poslije	apsolutna razlika	relativna razlika
7. DAN	2.57	2.59	-0,02	-1%	1.95	1.96	-0,01	-1%	1.50	1.55	-0,05	-3%
	1.47	1.49	-0,02	-1%	0.961	1.01	-0,05	-5%	0.722	0.802	-0,08	-10%
	3.12	3.27	-0,15	-5%	2.73	2.86	-0,13	-5%	2.46	2.59	-0,13	-5%
	2.04	2.11	-0,07	-3%	1.87	2.12	-0,25	-12%	1.54	1.77	-0,23	-13%
	3.78	4.09	-0,31	-8%	2.76	3.21	-0,45	-14%	1.87	2.11	-0,24	-11%
	2.27	2.24	0,03	1%	1.65	1.76	-0,11	-6%	1.21	1.31	-0,10	-8%
	3.14	3.10	0,04	1%	2.41	2.67	-0,26	-10%	2.00	2.23	-0,23	-10%
			-0,07	-2%			-0,18	-7%			-0,15	-9%

Neutralizacijski protokol primijenjen je na svim uzorcima. Razina hormona prije obrade je očekivano niža nego nakon uklanjanja biotina s mikročesticama obloženim streptavidinom. Izračun apsolutne i relativne razlike pokazao je vrlo male promjene u razini TSH prije i nakon obrade uzorka. Razlika se kretala od 0.07 do 0.18 mIU/L odnosno 2 do 10 %. Svi dobiveni rezultati, prije i nakon primjene protokola neutralizacije, unutar su referentnih vrijednosti (Tablica 5).

Tablica 6. Rezultati određivanja koncentracije T_3 u krvi ispitanika u nativnim uzorcima i uzorcima nakon primjene neutralizacijskog protokola (izraženi u nmol/L)

	prije uzimanja biotina (0h)				1 sat nakon uzimanja biotina (1h)				3 sata nakon uzimanja biotina (3h)			
1. DAN	prije	poslije	apsolutna razlika	relativna razlika	prije	poslije	apsolutna razlika	relativna razlika	prije	poslije	apsolutna razlika	relativna razlika
	1.44	1.36	0,08	6%	1.83	1.47	0,36	24%	1.46	1.40	0,06	4%
	1.38	1.29	0,09	7%	2.47	1.35	1,12	83%	1.25	1.27	-0,02	-2%
	1.40	1.46	-0,06	-4%	1.83	1.43	0,40	28%	1.40	1.35	0,05	4%
	1.40	1.30	0,10	8%	1.63	1.37	0,26	19%	1.33	1.34	-0,01	-1%
	1.58	1.58	0,00	0%	1.55	1.48	0,07	5%	1.51	1.44	0,07	5%
	1.27	1.22	0,05	4%	1.32	1.34	-0,02	-1%	1.27	1.24	0,03	2%
	1.81	1.73	0,08	5%	1.78	1.67	0,11	7%	1.55	1.56	-0,01	-1%
	srednja vrijednost=		0,05	4%	srednja vrijednost=		0,33	23%	srednja vrijednost=		0,02	2%

	prije uzimanja biotina (0h)				1 sat nakon uzimanja biotina (1h)				3 sata nakon uzimanja biotina (3h)			
7. DAN	prije	poslije	apsolutna razlika	relativna razlika	prije	poslije	apsolutna razlika	relativna razlika	prije	poslije	apsolutna razlika	relativna razlika
	1.63	1.57	0,06	4%	2.46	1.62	0,84	52%	1.41	1.41	0,00	0%
	1.18	1.29	-0,11	-9%	1.85	1.31	0,54	41%	1.23	1.24	-0,01	-1%
	1.66	1.63	0,03	2%	2.03	1.70	0,33	19%	1.52	1.47	0,05	3%
	1.41	1.46	-0,05	-3%	1.68	1.47	0,21	14%	1.40	1.46	-0,06	-4%
	1.43	1.44	-0,01	-1%	2.49	1.65	0,84	51%	1.48	1.49	-0,01	-1%
	1.25	1.28	-0,03	-2%	1.48	1.27	0,21	17%	1.21	1.22	-0,01	-1%
	1.86	1.93	-0,07	-4%	3.31	1.93	1,38	72%	1.72	1.73	-0,01	-1%
	srednja vrijednost=		-0,03	-2%	srednja vrijednost=		0,62	38%	srednja vrijednost=		-0,01	-1%

Neutralizacijski protokol primijenjen je na svim uzorcima. Razina hormona prije obrade u većini uzoraka bila je očekivano viša nego nakon uklanjanja biotina s mikročesticama obloženim streptavidinom. Izračun apsolutne i relativne razlike pokazao je vrlo male promjene u razini T_3, prije i nakon obrade, u uzorcima neposredno prije uzimanja biotina te 3 sata nakon uzimanja biotina, 1. dan i nakon 7 dana kontinuiranog uzimanja. Značajno više vrijednosti izmjerene su u nativnim uzorcima 1. i 7. dan, 1 h nakon uzimanja biotina. Prosječna razlika bila je 0.33 pmol/L (23 %) 1. dan i 0,62 pmol/L (38 %) 7. dan. Najviša pojedinačna ustanovljena razlika bila je 83 %. Bez obzira na pozitivnu interferenciju, 1 sat nakon uzimanja biotina svi rezultati prije i poslije neutralizacijskog protokola za sve

ispitanike 1. dan bili su unutar referentnog raspona. Sedmi je dan kod jednog ispitanika u nativnom uzorku vrijednost prije obrade bila unutar referentnih vrijednosti prije obrade, dok je nakon uklanjanja biotina vrijednost bila niža od referentnog raspona, što odgovara rezultatima dobivenim u ostalim točkama mjerenja za istog ispitanika. Pozitivna interferencija, s lažno povišenim vrijednostima izvan referentnog raspona, u uzorku prije uklanjanja biotina, ustanovljena je 7. dan 1 h nakon uzimanja biotina kod jednog ispitanika koji je u svim ostalim točkama imao vrijednosti unutar referentnog intervala.

Tablica 7. Rezultati određivanja koncentracije T_4 u krvi ispitanika u nativnim uzorcima i uzorcima nakon primjene neutralizacijskog protokola (izraženi u nmol/L)

	prije uzimanja biotina (0h)				1 sat nakon uzimanja biotina (1h)				3 sata nakon uzimanja biotina (3h)			
	prije	poslije	apsolutna razlika	relativna razlika	prije	poslije	apsolutna razlika	relativna razlika	prije	poslije	apsolutna razlika	relativna razlika
1. DAN	69.9	66.2	3,7	6%	71.3	68.5	2,80	4%	69.8	66.8	3,00	4%
	63.4	61.7	1,7	3%	64.8	64.0	0,80	1%	63.4	63.2	0,20	0%
	68.0	66.6	1,4	2%	71.6	67.4	4,20	6%	68.9	66.9	2,00	3%
	81.0	78.5	2,5	3%	80.9	77.5	3,40	4%	83.5	81.0	2,50	3%
	77.0	77.7	-0,7	-1%	76.5	74.1	2,40	3%	75.7	74.8	0,90	1%
	63.4	61.9	1,5	2%	66.3	59.4	6,90	12%	64.7	61.9	2,80	5%
	79.6	76.7	2,9	4%	77.3	77.5	-0,20	0%	76.8	74.5	2,30	3%
			1,86	3%			2,90	4%			1,96	3%

	prije uzimanja biotina (0h)				1 sat nakon uzimanja biotina (1h)				3 sata nakon uzimanja biotina (3h)			
	prije	poslije	apsolutna razlika	relativna razlika	prije	poslije	apsolutna razlika	relativna razlika	prije	poslije	apsolutna razlika	relativna razlika
7. DAN	77.5	73.4	4,1	6%	77.0	68.8	8,20	12%	69.3	66.3	3,00	5%
	59.0	54.2	4,8	9%	62.6	57.9	4,70	8%	62.0	60.1	1,90	3%
	71.6	71.2	0,4	1%	70.8	67.1	3,70	6%	70.0	65.9	4,10	6%
	88.1	81.7	6,4	8%	91.1	86.9	4,20	5%	88.6	83.0	5,60	7%
	75.1	74.7	0,4	1%	79.2	81.8	-2,60	-3%	79.3	75.1	4,20	6%
	65.8	60.1	5,7	9%	67.2	62.2	5,00	8%	65.7	63.3	2,40	4%
	89.2	83.8	5,4	6%	88.2	86.2	2,00	2%	86.4	85.0	1,40	2%
			3,89	6%			3,60	5%			3,23	5%

Nakon određivanja koncentracije T_4 hormona, prije i poslije obrade s mikročesticama obloženim streptavidinom, dobiveni su zeleno označeni rezultati unutar referentnog intervala, a crveno označeni izvan referentnog intervala. Izračun apsolutne i relativne razlike pokazao je vrlo male promjene u razini T_4 hormona prije i nakon obrade uzorka. Razina hormona, u većini slučajeva, prije obrade je očekivano viša nego nakon uklanjanja biotina s mikročesticama obloženim streptavidinom (Tablica 7). Vrijednosti T_4 u nativnim uzorcima bile su više za 1.96 do 3.89 nmol/L, odnosno 3 do 6 %.

Tablica 8. Rezultati određivanja koncentracije fT_3 u krvi ispitanika u nativnim uzorcima i uzorcima nakon primjene neutralizacijskog protokola (izraženi u pmol/L)

	prije uzimanja biotina (0h)				1 sat nakon uzimanja biotina (1h)				3 sata nakon uzimanja biotina (3h)			
	prije	poslije	apsolutna razlika	relativna razlika	prije	poslije	apsolutna razlika	relativna razlika	prije	poslije	apsolutna razlika	relativna razlika
1. DAN	4.48	4.51	-0,03	-1%	4.77	4.61	0,16	3%	4.50	4.44	0,06	1%
	4.55	4.55	0	0%	4.86	4.66	0,20	4%	4.34	4.45	-0,11	-2%
	4.33	4.22	0,11	3%	4.75	4.28	0,47	11%	4.45	4.19	0,26	6%
	4.54	4.76	-0,22	-5%	4.88	4.78	0,10	2%	4.57	4.79	-0,22	-5%
	4.57	4.41	0,16	4%	4.60	4.39	0,21	5%	4.58	4.32	0,26	6%
	4.36	4.35	0,01	0%	4.45	4.43	0,02	0%	4.20	4.04	0,16	4%
	4.53	4.74	-0,21	-4%	4.91	4.80	0,11	2%	4.52	4.52	0,00	0%
			-0,03	0%			0,18	4%			0,06	1%

	prije uzimanja biotina (0h)				1 sat nakon uzimanja biotina (1h)				3 sata nakon uzimanja biotina (3h)			
	prije	poslije	apsolutna razlika	relativna razlika	prije	poslije	apsolutna razlika	relativna razlika	prije	poslije	apsolutna razlika	relativna razlika
7. DAN	4.93	4.96	-0,03	-1%	4.97	4.86	0,11	2%	4.45	4.45	0,00	0%
	4.17	4.36	-0,19	-4%	4.60	4.57	0,03	1%	4.32	4.41	-0,09	-2%
	4.88	4.90	-0,02	0%	5.05	4.82	0,23	5%	4.50	4.62	-0,12	-3%
	4.80	5.10	-0,3	-6%	5.29	5.23	0,06	1%	4.85	4.93	-0,08	-2%
	4.16	4.27	-0,11	-3%	4.82	4.42	0,40	9%	4.36	4.21	0,15	4%
	4.27	4.21	0,06	1%	4.41	4.27	0,14	3%	4.20	4.25	-0,05	-1%
	4.99	5.05	-0,06	-1%	5.26	4.95	0,31	6%	4.61	4.54	0,07	2%
			-0,09	-2%			0,18	4%			-0,02	0%

Izračun apsolutne i relativne razlike pokazao je vrlo male promjene u razini fT_3 hormona prije i nakon obrade uzorka. Najveća razlika izmjerena u uzorcima 1 h nakon uzimanja biotina 1. dan bila je 0,47 pmol/L, odnosno 11 %. Svi dobiveni rezultati fT_3 hormona, prije i poslije obrade s mikročesticama obloženim streptavidinom, unutar su referentnih vrijednosti (Tablica 8).

Tablica 9. Rezultati određivanja koncentracije fT_4 u krvi ispitanika u nativnim uzorcima i uzorcima nakon primjene neutralizacijskog protokola (izraženi u pmol/L)

	prije uzimanja biotina (0h)				1 sat nakon uzimanja biotina (1h)				3 sata nakon uzimanja biotina (3h)			
	prije	poslije	apsolutna razlika	relativna razlika	prije	poslije	apsolutna razlika	relativna razlika	prije	poslije	apsolutna razlika	relativna razlika
1. DAN	13.5	13.0	0,5	4%	14.1	12.4	1,70	14%	13.2	12.1	1,10	9%
	14.5	14.0	0,5	4%	14.4	13.7	0,70	5%	14.2	13.2	1,00	8%
	12.0	12.6	-0,6	-5%	12.2	11.6	0,60	5%	12.9	11.4	1,50	13%
	16.8	16.6	0,2	1%	16.7	15.0	1,70	11%	17.5	15.4	2,10	14%
	13.6	13.4	0,2	1%	12.9	11.9	1,00	8%	13.2	11.8	1,40	12%
	15.6	15.0	0,6	4%	16.7	13.7	3,00	22%	15.0	13.5	1,50	11%
	13.4	13.1	0,3	2%	12.9	12.2	0,70	6%	13.6	12.0	1,60	13%
			0,24	2%			1,34	10%			1,46	11%

	prije uzimanja biotina (0h)				1 sat nakon uzimanja biotina (1h)				3 sata nakon uzimanja biotina (3h)			
	prije	poslije	apsolutna razlika	relativna razlika	prije	poslije	apsolutna razlika	relativna razlika	prije	poslije	apsolutna razlika	relativna razlika
7. DAN	13.1	12.2	0,9	7%	13.2	12.3	0,90	7%	12.9	11.7	1,20	10%
	14.1	12.2	1,9	16%	14.2	12.6	1,60	13%	13.9	12.3	1,60	13%
	12.2	12.0	0,2	2%	12.8	12.2	0,60	5%	12.6	11.1	1,50	14%
	18.0	16.2	1,8	11%	17.4	16.5	0,90	5%	17.7	16.6	1,10	7%
	12.3	11.3	1	9%	12.6	12.0	0,60	5%	12.4	11.9	0,50	4%
	14.5	13.6	0,9	7%	14.8	13.3	1,50	11%	14.8	13.7	1,10	8%
	12.9	12.6	0,3	2%	13.1	13.1	0,00	0%	12.9	11.8	1,10	9%
			1,00	8%			0,87	7%			1,16	9%

Izračun apsolutne i relativne razlike pokazao je vrlo male promjene u razini fT_4 hormona prije i nakon obrade uzorka. Prije obrade dobivene su očekivano više koncentracije hormona nego nakon uklanjanja biotina s mikročesticama obloženim streptavidinom. Prosječna razlika kretala se od 0.87 do 1.46 pmol/L, odnosno 7 do 11 % (Tablica 9). Svi dobiveni rezultati fT_4 hormona, prije i poslije obrade s mikročesticama obloženim streptavidinom, unutar su referentnih vrijednosti.

Tablica 10. Rezultati određivanja koncentracije troponina T u krvi ispitanika u nativnim uzorcima i uzorcima nakon primjene neutralizacijskog protokola (izraženi u ng/L)

	TnT prije uzimanja biotina (0h)				TnT 1 sat nakon uzimanja biotina (1h)				TnT 3 sata nakon uzimanja biotina (3h)			
	nativni uzorak	nakon obrade	apsolutna razlika (ng/l)	relativna razlika (%)	nativni uzorak	nakon obrade	apsolutna razlika (ng/l)	relativna razlika (ng/l)	nativni uzorak	nakon obrade	apsolutna razlika (ng/l)	relativna razlika (%)
1. DAN	< 3	< 3	/	/	< 3	< 3	/	/	< 3	< 3	/	/
	3	< 3	/	/	< 3	< 3	/	/	< 3	< 3	/	/
	< 3	< 3	/	/	< 3	< 3	/	/	< 3	< 3	/	/
	4	4	0	0	< 3	4	/	/	4	4	0	0
	4	4	0	0	< 3	< 3	/	/	< 3	< 3	/	/
	< 3	< 3	/	/	< 3	< 3	/	/	< 3	< 3	/	/
	3	< 3	/	/	< 3	< 3	/	/	< 3	3	/	/

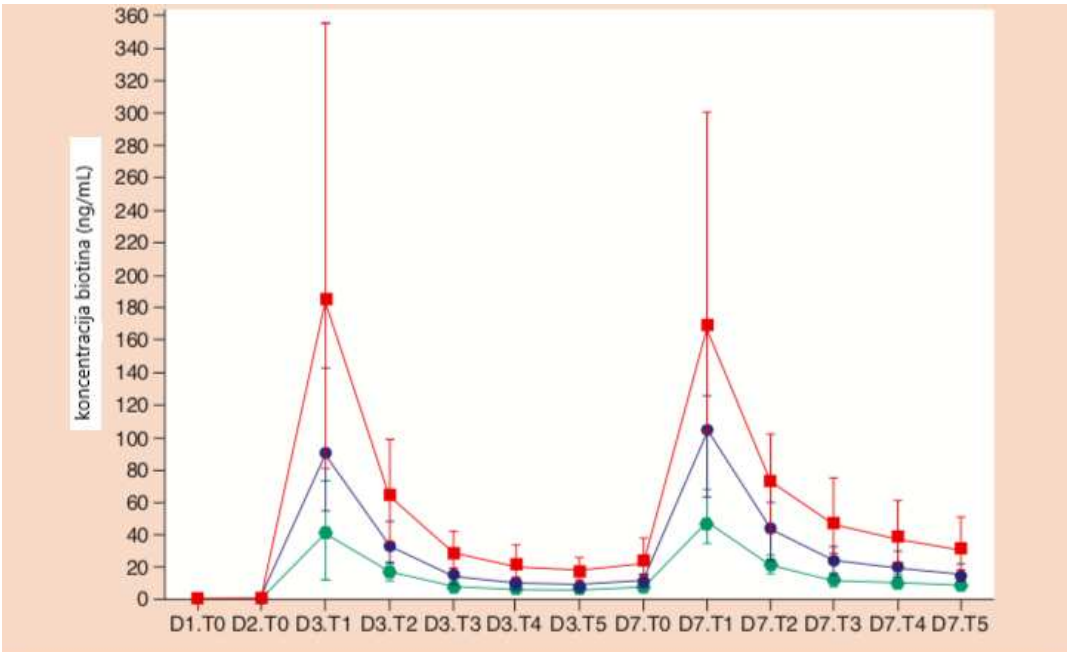
	TnT prije uzimanja biotina (0h)				TnT 1 sat nakon uzimanja biotina (1h)				TnT 3 sata nakon uzimanja biotina (3h)			
	nativni uzorak	nakon obrade	apsolutna razlika (ng/l)	relativna razlika (%)	nativni uzorak	nakon obrade	apsolutna razlika (ng/l)	relativna razlika (%)	nativni uzorak	nakon obrade	apsolutna razlika (ng/l)	relativna razlika (%)
7. DAN	3	< 3	/	/	< 3	< 3	/	/	< 3	< 3	/	/
	< 3	< 3	/	/	< 3	< 3	/	/	< 3	< 3	/	/
	< 3	< 3	/	/	< 3	< 3	/	/	< 3	< 3	/	/
	7	6	1	17%	4	4	0	0%	5	5	0	0
	4	4	0	0%	< 3	< 3	/	/	< 3	< 3	/	/
	< 3	< 3	/	/	< 3	< 3	/	/	< 3	< 3	/	/
	< 3	< 3	/	/	< 3	< 3	/	/	< 3	3	/	/

Crvenom bojom u Tablici 10 prikazane su koncentracije troponina unutar mjernog raspona metode (3 do 10 000 ng/mL) u nativnom uzorku i uzorku nakon neutralizacije. Zelenom bojom prikazane su koncentracije troponina izvan mjernog raspona metode (3 do 10 000 ng/mL) u nativnom uzorku i uzorku nakon neutralizacije.

U većini uzoraka, kako prije tako i nakon provedenog protokola neutralizacije, u svim točkama mjerenja koncentracija troponina bila je niža od donje točke mjernog raspona, stoga se apsolutna i relativna razlika nisu mogle izračunati. U jednom uzorku koncentracija troponina bila je manja od granične vrijednosti, ali mjerljiva u svim točkama osim 1. dan nakon uzimanja biotina. Najveća razlika dobivena nakon provedenog neutralizacijskog protokola u tom uzorku bila je 1 ng/L (Tablica 10).

5. RASPRAVA

Naše istraživanje pokazalo je da uzimanje biotina u dozi od 10 mg/dan ne interferira u imunokemijskim testovima za određivanje koncentracije TSH, fT_3, fT_4 i T_4, dok su odstupanja uočena u rezultatima T_3 hormona. Svi ispitani testovi imaju različitu deklariranu toleranciju na biotin od strane proizvođača, a najveću toleranciju na prisutnost biotina imaju TSH i troponin (Tablica 3). Najmanja deklarirana tolerancija na prisutnost biotina u uzorku je za hormon T_3 (30 ng/mL), i upravo tu izmjerili smo više vrijednosti T_3 jedan sat nakon uzimanja biotina: 28 % prvi dan i 38 % sedmi dan. Prema farmakokinetičkim istraživanjima, očekivana koncentracija biotina u krvi, jedan sat nakon uzimanja iznosi oko 90.6 ng/mL (Slika 8). Iako deklarirana osjetljivost testa za određivanje koncentracije T_4 iznosi 100 ng/mL, što je blizu deklarirane vrijednosti biotina ispitane od proizvođača, naše istraživanje je pokazalo odstupanja rezultata unutar 10 %. Budući da su svi rezultati TSH, fT_3 i fT_4 prije i nakon neutralizacijskog protokola unutar referentnih intervala za dob i spol ispitanika, možemo zaključiti kako odstupanja koja smo uočili nisu klinički značajna.



grupa 1 (5 mg na dan)	0.1	0.1	40.5	16.2	6.6	4.9	3.6	4.9	46.4	19.2	11.2	9.1	7.0
grupa 2 (10 mg na dan)	0.1	0.1	90.6	32.7	14.1	10.3	7.9	10.2	103.2	41.9	24.3	18.7	14.9
grupa 3 (20 mg na dan)	0.1	0.1	183.8	63.7	27.7	20.9	16.7	21.6	168.4	71.4	45.9	37.0	29.5

Slika 8. Medijan (minimum – maksimum) koncentracije biotina u serumu (ng/mL) za svaku skupinu (5,10 i 20 mg) (6).

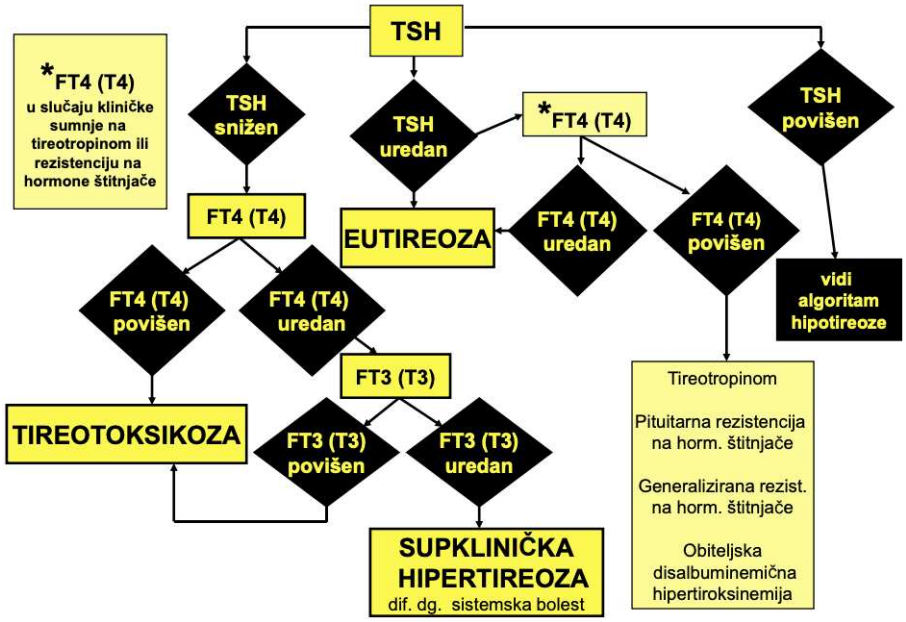
D: dan; T0: prije uzimanja biotina; T1: 1 h nakon doze; T2: 3 h nakon doze; T3: 6 h nakon doze; T4: 8 h nakon doze; T5: 12 h nakon doze

Interferencije lijekova i dodataka prehrani u laboratorijskim testiranjima dobro je poznat fenomen, no interferencija koju uzrokuje biotin, za razliku od ostalih, može u isto vrijeme interferirati u nizu imunokemijskih reakcija, pri čemu konstelacija rezultata za parametre koji se koriste za procjenu funkcije štitnjače može imati sliku hipertireoze. Lam i sur. u svom su istraživanju dokazali interferenciju biotina u imunokemijskim testovima za određivanje hormona štitnjače, koristeći 10 puta veće doze biotina u odnosu na naše istraživanje, no pri tome nije poznato koji je prag tolerancije na biotin u testovima korištenim u studiji (51). Kummer i sur. prikazali su slučaj šestero djece koja su primjenjivala visoke doze biotina s lažno povišenim vrijednostima T_4 i T_3 hormona te lažno sniženim vrijednostima TSH (52). Ardabilygazir i sur. prikazali su slučaj pacijenta s multiplom sklerozom koji uzima visoke doze biotina. Zbog povišenih hormona T_3 i T_4 te sniženog TSH, došlo je do savršenog preklapanja rezultata laboratorijskih nalaza i pogrešne dijagnoze Gravesove bolesti bez znakova i simptoma hipertireoze. U opisanom slučaju, laboratorijska mjerenja koja sugeriraju tireotoksikozu pripisana su interferenciji, uslijed liječenja visokim dozama biotinom, s imunokemijskim ispitivanjima. Pacijent je prestao uzimati biotin i nakon tjedan dana došlo je do normalizacije rezultata za TSH, T_3 i T_4 (53).

Prema algoritmu za racionalnu dijagnostiku bolesti štitnjače, laboratorijsko testiranje uvijek započinje određivanjem TSH (Slika 9). Kod pacijenata s urednim rezultatima TSH ne preporučuje se daljnje testiranje, a upravo test za određivanje TSH koji smo koristili ima najveću toleranciju na biotin. Daljnje testiranje u slučaju niskih vrijednosti TSH nastavlja se određivanjem fT_4 i fT_3 koji također nisu pokazali osjetljivost na primjenjenu dozu biotina.

U uzorcima ispitanika, osim hormona štitnjače, određivan je i visoko osjetljivi troponin T (hsTnT). U naše istraživanje bili su uključeni zdravi ispitanici u dobi od 20 do 25 godina. Sukladno tome, dobili smo izrazito niske vrijednosti za troponin, koje su kod većine ispitanika, u svim mjerenjima, prije i nakon neutralizacije biotina, bili niži od donje granice mjernog raspona koji deklarira proizvođač (3 do 10 000 ng/mL). Kod jednog ispitanika kontinuirano su tijekom ispitivanja vrijednosti troponina bile mjerljive i pokazalo se kako nema razlike u rezultatima prije i nakon neutralizacije biotina (Tablica 10). Kod istog je ispitanika kod mjerenja koncentracije T_3 hormona, koji je najosjetljiviji na prisutnost biotina, izmjerena razlika od 19 % i prvog i sedmog dana istraživanja (Tablica 6). Ovi su rezultati očekivani s obzirom na to da je deklarirana tolerancija na biotin u testu za mjerenje troponina 1200 ng/mL, a očekivana koncentracija biotina u uzorcima ispitanika 1 h nakon ingestije 10 mg biotina iznosi oko 90 ng/mL, što je 13 puta niže od deklarirane tolerancije. Nedostatak

našeg istraživanja je taj što u uzorcima ispitanika nije mjerena koncentracija biotina, već smo je samo pretpostavili iz farmakokinetičkih istraživanja biotina.



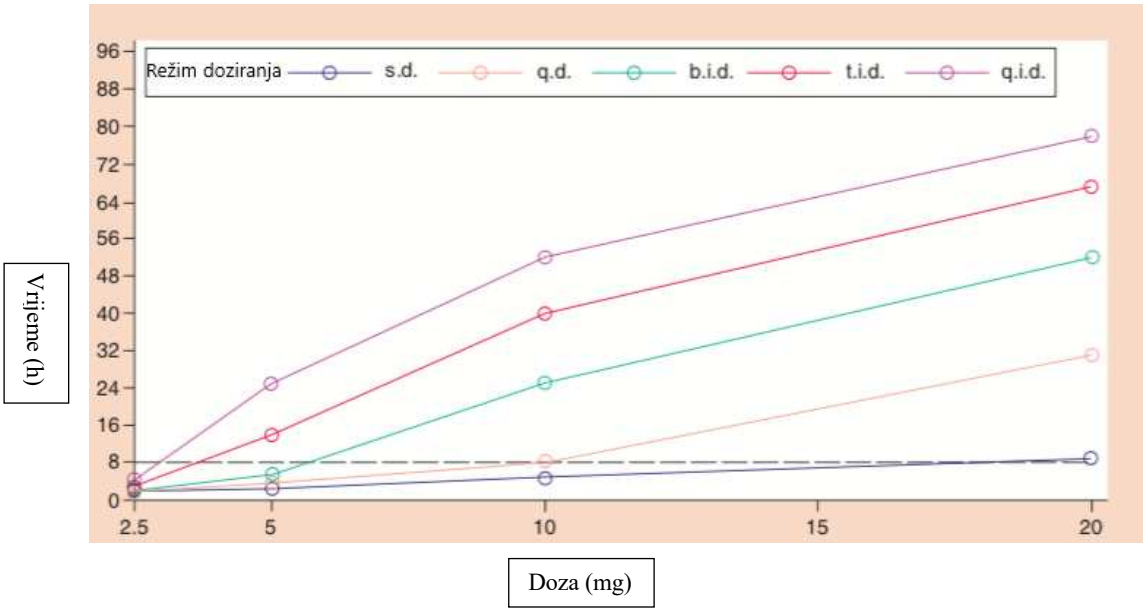
Slika 9. Smjernice za racionalnu dijagnostiku tireotoksikoze

Izvor: Kusić Z, Jukić T, Dabelić N, Rončević S, Lukinac LJ, Labaer i sur. Smjernice Hrvatskog društva za štitnjaču za racionalnu dijagnostiku poremećaja funkcije štitnjače. Liječ Vjesn 2009; 131:328–338.

Frame i suradnici u svojoj su studiji dokazali moguću interferenciju biotina s testom Gen5 koji određuje TnT i ima nisku toleranciju za biotin (54). U našem istraživanju koristili smo test najnovije generacije hsTnT (Roche Diagnostics), čiju su visoku toleranciju na biotin dokazali Zerback i suradnici u svom istraživanju. U svojoj studiji dokazali su kako se test za određivanje hsTnT može koristiti za bolesnike s multiplom sklerozom koji uzimaju biotin do 300 mg dnevno bez ikakvih posebnih mjera opreza (55).

FDA upozorava da je zaprimila prijavu o smrti jedne osobe koja je konzumirala velike doze biotina i umrla od posljedično lažno negativnog nalaza troponina kao biljega infarkta miokarda (16). Suočeni s rizikom po zdravlje pacijenata, proizvođači nastoje unaprjeđivati svoje metode kako bi smanjili osjetljivost metoda na visoke doze biotina poput nove generacije testova za TSH i hsTnT, koje su sigurne za primjenu čak i kod doze od 300 mg/dan što je 10 000 puta veća doza od preporučene dnevne doze. Tako je za novu generaciju testova deklarirana vrijednost tolerancije na biotin 40 puta veća u odnosu na staru generaciju testova za TSH i troponin.

Budući da niti proizvođači niti laboratoriji nisu ponudili univerzalno, konkretno rješenje, i dalje ostaje preporuka za pažljivu komunikaciju s pacijentima, uzimanje anamneze i kontakt s laboratorijem (56). Za prevladavanje interferencije, najbolje bi bilo predložiti mjerenje drugom metodom ako je dostupna ili prekinuti uzimanje biotina i ponoviti uzorkovanje. Slika 10 prikazuje vrijeme potrebno da koncentracija biotina padne ispod 30 ng/mL, što je izrazito važno za izračunavanje razdoblja ispiranja potrebnog prije prikupljanja uzoraka seruma. Rezultati analize farmakokinetike pokazali su kako uzimanjem dnevne doze 1 mg biotina (OTC pripravci), serumska razina biotina pada ispod *in vitro* praga 10 ng/mL za 2 h. Za dozu biotina do 10 mg na dan , *in vitro* serumska koncentracija biotina pada za 8 h ispod 30 ng/mL. Kod dnevnih doza biotina ≥ 20 mg, serumska koncentracija biotina pada ispod 30 ng/mL za više od 31 h. Dakle, u rijetkim slučajevima kada je riječ o izrazito visokim dozama biotina, bit će potrebno produljeno vrijeme ispiranja, osobito za testove koji imaju deklariran vrlo nizak prag tolerancije na biotin (6). Meany i suradnici u svojoj su studiji pokazali kako je kod pacijenata koji imaju smanjenu bubrežnu funkciju, vrijeme eliminacije biotina duže, pa je potrebno produljeno vrijeme apstinencije od uzimanja biotina prije laboratorijskog testiranja kako bi se izbjegla interferencija (57). Može se zaključiti kako potrebno razdoblje ispiranja ovisi o primijenjenoj dozi biotina, funkciji bubrega ali i toleranciji korištenih metoda na biotin.



Slika 10. Simulacija vremena potrebnog da serumska koncentracija biotina padne ispod 30 ng/mL, prateći primjenu biotina od strane 54 ispitanika u studiji farmakokinetike (6)
b.i.d.: dva puta na dan; q.d.: jednom na dan; q.i.d.: četiri puta na dan; s.d.: jedna doza; t.i.d.: tri puta na dan.

Najveći problem interferencije pojavljuje se kod hitnih pacijenata kad su laboratoriji suočeni sa zahtjevom za brzim izdavanjem rezultata, a u isto vrijeme postoji sumnja na interferenciju koja za posljedicu može imati pogrešan rezultat.

U slučaju sumnje na interferenciju biotina, postoji nekoliko mogućnosti za dokazivanje iste. Metoda koju smo koristili u našem istraživanju za neutralizaciju biotina pomoću mikročestica obloženih streptavidinom jednostavna je za primjenu te je korištena i ispitana u nekoliko studija (51). Prema sadašnjim preporukama, ova metoda koristi se za detekciju interferencije, ali se ne preporučuje izdavanje rezultata iz uzorka nakon provedene neutralizacije. Piketty i suradnici validirali su metodu za uklanjanje biotina i potencijalne interferencije. Metoda neutralizacije provedena na uzorcima koji ne sadrže biotin pokazala je kako rezultati ne odstupaju značajno i kako koreliraju s rezultatima dobivenim metodom koja ne koristi vezu streptavidin i biotin, osim za PTH što su autori pripisali inherentnoj nestabilnosti PTH kao molekule, te snižavanjem koncentracije uslijed stajanja uzorka (56). Jednako tako, u našem istraživanju nakon provedenog protokola, razlike u rezultatima bile su unutar 10 %. Piketty i sur. dokazali su kako je neutralizacijski protokol uspješan čak i kad se ne provodi inkubacija od sat vremena. To omogućava izdavanje rezultata unutar jednog sata, što je važno kod sumnje na akutni infarkt miokarda (56). Taj protokol mogao bi se jednostavno primjenjivati u laboratorijima i kod hitnih pacijenata kada bi kliničari bili upoznati s činjenicom da određeni pacijent uzima visoke doze biotina, što često nije slučaj. Budući da se neutralizacijski protokol primjenjuje samo kod uzoraka kod kojih postoji sumnja na interferenciju, nužno je svakog pacijenta prije mjerenja razine troponina upitati o konzumaciji biotina ili nekih dodataka prehrani (58).

Jedna od mogućih metoda za dokazivanje interferencije jest razrjeđivanje uzorka, čime se razrjeđuje i koncentracija interferenta. Bevins i sur. u svojoj su studiji dokazali kako je razrjeđivanje serumom poznate koncentracije TnT od 20 do 30 ng/L brza i učinkovita metoda za ublažavanje analitičkih posljedica biotinske interferencije (59). Predloženi protokoli za uklanjanje smetnji mogu se implementirati u laboratorijskoj praksi, ali u hitnim slučajevima postoji zabrinutost u pogledu vremena, dok alternativne metode koje nisu osjetljive na biotin često nisu dostupne. Zbog toga su u tijeku brojna ispitivanja novih modernih protokola koji bi riješili ovaj problem (60).

Biotin-streptavidin veza česta je komponenta *in vitro* dijagnostičkih testova za detekciju bioloških analita (61). Smatra se kako više od polovice imunokemijskih testova na tržištu koristi ovu interakciju (56). Biotin ne interferira u metodama koje ne koriste biotin-

streptavidin tehnologiju, međutim istraživanje 374 imunokemijska testa otkrilo je kako 59 % ovih testova koristi biotin-streptavidin tehnologiju, a 37 % njih pod visokim je rizikom biotinske interferencije (7). Za sprječavanje interferencije biotina u imunokemijskim reakcijama, od iznimne je važnosti komunikacija između pacijenata i liječnika, te laboratorija. Prije slanja pacijenta na laboratorijsko testiranje, liječnik bi trebao utvrditi uzima li pacijent biotin u dodatcima prehrani. Problem predstavlja to što često pacijenti ne znaju da se biotin nalazi u visokoj dozi u suplementima za kožu, kosu i nokte ili smatraju kako je riječ o vitaminu koji nije potrebno spominjati. Kada se izuzetno visoke doze primjenjuju za liječenje, pacijenta treba upozoriti da prije uzorkovanja krvi 24 sata apstinira od uzimanja biotina, a u slučaju smanjene bubrežne funkcije i dulje.

Nadalje, treba biti svjestan kako je interferencija biotina u imunokemijskim metodama samo jedna od interferencija. U imunokemijskim testovima mogu interferirati antistreptavidinska antitijela, heterofilna antitijela, hemoliza, različiti lijekovi i njihovi metaboliti, te stoga svaki rezultat treba promatrati u svjetlu kliničke slike. Neke od navedenih interferencija učestalije su od interferencije biotina, što su u svom istraživanju dokazali Li i Brattsand, prikazujući negativnu interferenciju hemolize određivanje troponina T (62). Lippi i sur. prikazali su slučaj u kojemu je došlo do lažno pozitivnog rezultata TnI, kod žene u dobi od 76 godina, kao posljedica interferencije heterofilnih antitijela (63).

Potencijalna uloga farmaceuta u rješavanju problema interferencije biotina bila bi u edukaciji pacijenata. Ljekarna je često mjesto izdavanja pripravaka biotina pod raznim tvorničkim nazivima, što je idealna prilika da ljekarnik pacijenta upozna sa sastavom pripravaka i potencijalnom interferencijomu laboratorijskim testiranjima. Na taj način pacijent je educiran o pripravku koji koristi i razumije da je potrebno obavijestiti liječnika o preparatima koje primjenjuje.

6. ZAKLJUČAK

1. Uzimanje biotina u dozama do 10 mg/dan, dostupnim u bezreceptnim preparatima, ne interferira u ispitanim metodama za određivanje TSH, T_4, fT_3, fT_4 i hsTnT, kako kod jednokratnog, tako ni kod kontinuiranog uzimanja.

2. Interferencija je moguća u testovima koji imaju nisku toleranciju na prisustvo biotina (30 ng/mL), kao T_3, iako u ovom slučaju interferencija ne bi utjecala na kliničku odluku.

3. Metoda neutralizacije korištenjem streptavidinskih čestica jednostavan je način za dokazivanje interferencije biotina koji ne zahtijeva posebnu opremu ni reagense te je lako provediv u svakom laboratoriju.

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Mock DM. Biotin: Physiology, Dietary Sources, and Requirements. Encyclopedia of Human Nutrition [Internet]. 2013;182–190. doi:10.1016/b978-0-12-375083-9.00026-x [pristupljeno 09.09.2019.] Dostupno na: https://www.researchgate.net/publication/288176136_Biotin_Physiology_Dietary_Sources_and_Requirements
2. Casutt M, Koppe T, Schwarz M. Vitamins, 9. Biotin. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry [Internet]. 2011;309-320. doi:10.1002/14356007.o27_o12 [pristupljeno 10.09.2019.] Dostupno na: https://www.researchgate.net/publication/278309860_Vitamins_9_Biotin/stats
3. Nohr D, Biesalski HK, Back EI. Vitamins Biotin (Vitamin B7). Encyclopedia of Dairy Sciences [Internet]. 2011;687–689. doi:10.1016/b978-0-12-374407-4.00486-6 [pristupljeno 11.09.2019.] Dostupno na: https://www.researchgate.net/publication/288173994_Vitamins_Biotin_Vitamin_B7
4. Staggs CG, Sealey WM, McCabe BJ, Teague AM, Mock DM. Determination of the biotin content of select foods using accurate and sensitive HPLC/avidin binding. J Food Compost Anal. 2004 Dec;17(6):767–776. doi: 10.1016/j.jfca.2003.09.015.
5. Ardabilygazir A, Afshariyamchlou S, Mir D, Sachmechi I. Effect of High-dose Biotin on Thyroid Function Tests: Case Report and Literature Review. Cureus Jun 2018;10(6):e2845. doi: 10.7759/cureus.2845.
6. Grimsey P, Frey N, Bendig G, Zitzler J, Lorenz O, Kasapic D i sur. Population pharmacokinetics of exogenous biotin and the relationship between biotin serum levels and *in vitro* immunoassay interference. Int.J.Pharmacokinet. 2017;2(4):247–256. doi: 10.4155/ipk-2017-0013
7. Wolf B. High doses of biotin can interfere with immunoassays that use biotin-strept(avidin) technologies: Implications for individuals with biotin-responsive inherited metabolic disorders. Mol Genet Metab. 2019 Aug;127(4):321-324. doi: 10.1016/j.ymgme.2019.07.003
8. Avery G. Biotin interference in immunoassay: a review for the laboratory scientist. Ann Clin Biochem. 2019 Jul;56(4):424-430. doi: 10.1177/0004563219842231
9. Chun K. Biotin Interference in Diagnostic Tests. Clin Chem. 2017 Feb;63(2):619-620. doi: 10.1373/clinchem.2016.267286
10. Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. J Histokemi Cytochem. 1979 Aug;27(8), 1131–1139. doi: 10.1177/27.8.90074

11. Diamandis EP, Christopoulos TK. The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. Clin Chem. 1991 May;37(5):625-36.
12. Luong, JHT, Male KB, Glennon JD. Biotin interference in immunoassays based on biotin-strept(avidin) chemistry: An emerging threat. Biotechnol Adv. 2019 Sep - Oct;37(5):634-641. doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.03.007
13. Vukoja N. i sur. Razvoj metoda imunohistokemijskog bojenja i optimizacija protokola za detekciju transkripcijskog faktora BACH2. J. appl. health sci. 2017; 3(2): 235-245. doi:10.24141/1/3/2/9
14. Koivunen ME , Krogsrud RL. Principles of Immunochemical Techniques Used in Clinical Laboratories. Lab Medicine. 2006 Aug;37(8):490-497. doi: 10.1309/MV9RM1FDLWAUWQ3F
15. Dundas CM, Demonte D, Park S. Streptavidin-biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications. Appl Microbiol Biotechnol. 2013 Nov;97(21):9343-53. doi: 10.1007/s00253-013-5232-z.
16. The FDA Warns that Biotin May Interfere with Lab Tests: FDA Safety Communication. [pristupljeno 16.09.2019.] Dostupno na: https://www.fda.gov/medical-devices/safety-communications/fda-warnsbiotin-may-interfere-lab-tests-fda-safety-communication
17. Desgupta A. Immunoassay Design and Mechanism of Biotin Interference. Biotin and Other Interferences in Immunoassays. 2019; (1):1-15. doi:10.1016/b978-0-12-816429-7.00001-0
18. Piketty ML, Polak M, Flechtner I, Gonzales-Briceno L, Souberbielle JC. 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):780–788.
19. Colon PJ, Greene DN. Biotin Interference in Clinical Immunoassays. JALM. 2018 May;2 (6):941-951. doi: 10.1373/jalm.2017.024257
20. Leniček Krleža J, Zrinski Topić R, Herceg-Čavrak V. Troponin i B-tip natrijuretskog peptida: laboratorijska dijagnostika i klinička upotreba u pedijatriji. Paediatr Croat. [Internet] 2017;61:169-77 [pristupljeno: 23.09.2019.] Dostupno na: https://hrcak.srce.hr/file/296263
21. Park KC, Gaze DC, Collinson PO, Marber MS, Cardiac troponins: from myocardial infarction to chronic disease, Cardiovascular Research. 2017 Dec;113(14):1708-1718. doi:10.1093/cvr/cvx183
22. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507805/ [pristupljeno: 23.09.2019.]

23. Babuin L, Jaffe SA. Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury. CMAJ. 2005 Nov;173(10):1191–1202. doi: 10.1503/cmaj.050141
24. Sex-Specific Cut-Offs for High-Sensitivity Cardiac Troponin: Is Less More? https://www.hindawi.com/journals/cdtp/2019/9546931/ [pristupljeno 18.02.2020.]
25. Maynard SJ, Menown IBA, Adgey AAJ. Troponin T or troponin I as cardiac markers in ischaemic heart disease. Heart. 2000;83:371-373. doi: 10.1136/heart.83.4.371
26. https://www.acc.org/latest-in-cardiology/articles/2018/07/16/09/17/high-sensitivity-cardiac-troponin-in-the-evaluation-of-possible-ami [pristupljeno: 18.02.2020.]
27. Rahman A, Broadley SA. Review article: elevated troponin: diagnostic gold or fool's gold? Emerg Med Australas. 2014 Apr;26(2):125-30. doi: 10.1111/1742-6723.12203
28. Bajek S. Glandula thyroidea, štitasta žlijezda. U: Vinter I, ur. Waldeyerova anatomija čovjeka.17.izd. Zagreb: Golden marketing-tehnička knjiga; 2009. str. 337- 340.
29. Kostović-Knežević Lj, Gajović S. Embrionalni razvoj štitnjače. U: Djelmiš J, Kusić Z, Ivanišević M ,ur. Bolesti štitnjače u trudnoći. Zagreb: Laserplus; 2004. str. 11-21.
30. Keros P, Pećina M, Ivančić-Košuta M, Temelji anatomije čovjeka. Zagreb: Naprijed; 1999. str. 93-95.
31. Stathatos N. Thyroid physiology. Med Clin North Am. 2012;96:165-173. doi: 10.1016/j.mcna.2012.01.007
32. Ross DS. Thyroid hormone synthesis and physiology. https://www.uptodate.com/contents/thyroid-hormone-synthesis-and-physiology [pristupljeno 22.01.2020.]
33. Standring S. Neck and upper neurodigestive tract. U: Standring S, ur. Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2005. str. 560-4.
34. Kusić Z, Jukić T. Fiziologija štitnjače izvan trudnoće. U: Djelmiš J, Kusić Z, Ivanišević M ,ur. Bolesti štitnjače u trudnoći. Zagreb: Laserplus; 2004. str. 21-29.
35. Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B. Interna medicina. Zagreb: Naklada Ljevak; 2008. str. 1196-1202.
36. Guyton AC i Hall JE. Metabolički hormoni štitnjače. U: Medicinska fiziologija. Kukolja Taradi S, Andreis I, ur. Zagreb: Medicinska naklada; 2006. str. 931-943.
37. Smallridge RC, Glinoer D, JG, Brent G. Thyroid function inside and outside of pregnancy: what do we know and what don’t we know? Thyroid. 2005;15:54-9. doi: 10.1089/thy.2005.15.54
38. Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. J Clin Invest. 2012 Sep;122(9):3035-43. doi: 10.1172/JCI60047.

39. Bernal J, Guadaño-Ferraz A, Morte B. Perspectives in the study of thyroid hormone action on brain development and function. Thyroid 2003;13(11):1005-12.
40. Haddow JE, Palomaki GE, Allan WC, et al. Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child. New Eng J Med. 1999;341:549-555.
41. Thyroid Gland and Its Rule in Human Body. https://www.researchgate.net/publication/316364160_Thyroid_Gland_and_Its_Rule_in_Human_Body [pristupljeno 23.01.2020.].
42. Banijamali R. Thyroid Function and Thyroid Drugs. U: Lemke LT, Williams DA, ur. Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 6th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia; 2008, 913-934.
43. Fekete C, Lechan RM. Central Regulation of Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis Under Physiological and Pathophysiological Conditions. Endocr Rev. 2014 Apr;35(2):159-94. doi: 10.1210/er.2013-1087
44. Ortiga-Carvalho TM, Chiamolera MI, Pazos-Moura CC, Wondisford FE. Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis. Compr Physiol. 2016 Jun;6(3):1387-428. doi: 10.1002/cphy.c150027
45. Božikov V. Patofiziologija žlijezda s unutarnjim izlučivanjem. U: Kujundžić M. i sur. Klinička patofiziologija. Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb; 2003. 265-277.
46. Vučemilo L, Znaor T, Kuliš T, Šekerija M, Znaor A. Thyroid Cancer Incidence and Mortality Trends in Croatia 1988-2010. Acta Clin Croat, 2015;54(1):30-36.
47. Gamulin S, Marušić M, Kovač Z. Patofiziologija. 7.izdanje, Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 366-371.
48. Solter M. Bolesti štitnjače - klinička tireoidologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2007. str. 35-75.
49. Marinković J. Dijagnostičke mogućnosti u bolestima štitnjače. Bolesničke novine, 2013, 20 http://www.kbcsm.hr/wp-content/uploads/2017/03/Novine_2013-11.pdf [pristupljeno 28.01.2020.].
50. Kusić Z, Jukić T, Franceschi M, Dabelić N, Rončević S, Lukinac LJ i sur. Smjernice Hrvatskog društva za štitnjaču za racionalnu dijagnostiku poremećaja funkcije štitnjače. Liječ Vjesn. 2009;131:328-338.
51. Lam L, Kyle CV. A simple method to detect biotin interference on immunoassays. Clin Chem Lab Med. 2017 May;55(6):e104-e106. doi: 10.1515/cclm-2017-0059.
52. Kummer S, Hermsen D, Distelmaier F. Biotin Treatment Mimicking Graves' Disease. N Engl J Med. 2016 Aug;375(7):704-6.

53. Ardabilygazir A, Afshariyamchlou S, Mir D, Sachmechi I. Effect of High-dose Biotin on Thyroid Function Tests: Case Report and Literature Review. Cureus. 2018 Jun;10(6):e28-45. doi: 10.7759/cureus.2845
54. Frame IJ, Joshi PH, Mwangi C, Gunsolus I, De Lemos JA, Das SR et al. Susceptibility of Cardiac Troponin Assays to Biotin Interference. Am J Clin Pathol. 2019 Apr;151(5):486-493. doi: 10.1093/ajcp/aqy172
55. Zerback R, Imdahl R, Albert G, Kunzelmann S, Rank C, Von Meyer A. Performance evaluation of a new troponin T-high sensitive assay with increased tolerance to biotin. Clin Chim Acta. 2019;493:197.
56. Piketty M, Prie D, Sedel F et al. High-dose biotin therapy leading to false biochemical endocrine profiles: validation of a simple method to overcome biotin interference. CCLM. 2017;55(6):817-825. doi:10.1515/cclm-2016-1183
57. 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;55:1737-41.
58. https://mft.nhs.uk/app/uploads/2018/09/potential-for-biotin-interference-in-immunoassays.pdf [pristupljeno 18.09.2019.]
59. Bevins NJ, Hubbard JA, Fitzgerald RL, Kelner MJ. A Dilution Method to Mitigate Biotin Interference in Cardiac Troponin T Testing. JALM. 2019 Nov;4(3):415-421. doi:10.1373/jalm.2018.028589
60. Schrapp A, Fraissinet F, Hervouet C, Girot H, Brunel V. Biotin and high-sensitivity cardiac troponin T assay. Biochem Med. 2018 Oct;28(3). doi: 10.11613/BM.2018.030901
61. Bowen R, Benavides R, Colon-Franco JM, Katzman BM, Muthukumar A, Sadrzadeh H i sur. Best practices in mitigating the risk of biotin interference with laboratory testing. Clin Biochem 2019;74:1-11.
62. Li A, Brattsand G. Stability of serum samples and hemolysis interference on the high sensitivity troponin T assay. CCLM, 49(2):335-336.
63. Lippi G, Aloe R, Meschi T, Borghi L, Cervellin G. Interference from heterophilic antibodies in troponin testing. Clin Chim Acta. 2013;426:79-84.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja:

Glavni cilj ovog istraživanja bio je utvrditi uzrokuje li uzimanje biotina interferenciju u mjeri koja može utjecati na kliničku odluku. Specifični cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj na rezultate u periodu od tri sata nakon ingestije biotina te nakon kontinuiranog uzimanja biotina tijekom 7 dana.

Materijali i metode:

Ova studija provodila se na Zavodu za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Split i u njoj je sudjelovalo ukupno 7 zdravih ispitanika, od toga 6 žena i 1 muškarac u dobi od 20 do 25 godina. Svi ispitanici primjenjivali su oralno, svaki dan u isto vrijeme, jednu tabletu od 10 mg biotina. Jedna epruveta krvi uzorkovala se od svakog ispitanika, prvi i sedmi dan istraživanja, u nultom satu, prije uzimanja biotina, te nakon 1 h i 3 h od uzimanja biotina. Koncentracija hormona TSH, T_3, T_4, fT_3, fT_4, hsTnT određivala se u nativnom uzorku i nakon obrade uzorka s mikročesticama obloženim streptavidinom. Obrađeni uzorci testirani su na Roche Cobas 8000/e801 imunokemijskom analizatoru.

Rezultati:

Svi rezultati TSH, fT_3 i fT_4 prije i nakon neutralizacijskog protokola, unutar su referentnih intervala za dob i spol ispitanika. Svi ispitani testovi imaju različitu deklariranu toleranciju na biotin od strane proizvođača, a najveću toleranciju na prisutnost biotina imaju TSH i troponin. Najmanja deklarirana tolerancija na prisutnost biotina u uzorku je za hormon T_3 (30 ng/mL) i upravo tu smo izmjerili više vrijednosti T_3 jedan sat nakon uzimanja biotina: 28 % više prvi dan i 38 % sedmi dan. U većini uzoraka, kako prije tako i nakon provedenog protokola neutralizacije, u svim točkama mjerenja koncentracija troponina bila je niža od donje točke mjernog raspona, stoga se apsolutna i relativna razlika nisu mogle izračunati.

Zaključci:

Uzimanje biotina u dozama do 10 mg/dan, dostupnim u bezreceptnim preparatima, ne interferira u ispitanim metodama za određivanje TSH, T_4, fT_3, fT_4 i hsTnT, kako kod jednokratnog, tako ni kod kontinuiranog uzimanja biotina. Interferencija je moguća u testovima koji imaju nisku toleranciju na prisustvo biotina (30 ng/mL), kao T_3, iako u ovom slučaju interferencija ne bi utjecala na kliničku odluku. Metoda neutralizacije korištenjem streptavidinskih čestica jednostavan je način za dokazivanje interferencije biotina koji ne zahtijeva posebnu opremu ni reagense te je lako provediv u svakom laboratoriju.

9. SUMMARY

Diploma Thesis Title:

Biotin as possible source of interference in immunochemical methods.

The aim of the research:

The main objective of this study was to determine whether biotin uptake causes interference to the extent that it may influence clinical decision making. The specific objective of this study was to determine the effect of biotin on the results over a period of three hours after biotin ingestion and after continuous biotin uptake for 7 days.

Materials and methods:

This study was conducted at the Department of Medical Laboratory Diagnostics at the KBC Split and was attended by a total of 7 healthy subjects, including 6 women and 1 man, aged 20 to 25 years. All subjects administered orally one tablet of 10 mg biotin daily, at the same time. One tube of blood was sampled from each subject, on the first and seventh day of the study, at zero hour, before biotin uptake, and after 1h and 3h after biotin uptake. The concentrations of the hormones TSH, T_3, T_4, fT_3, fT_4, hsTnT were determined in the native sample and after the treatment of the sample with streptavidin-coated microparticles. The treated samples were tested on a Roche Cobas 8000/e801 immunochemical analyzer.

Results:

All TSH, fT_3, and fT_4 results before and after the neutralization protocol were within the reference intervals for subjects' age and gender. All tests have a different declared tolerance to biotin by the manufacturer. TSH and troponin have the highest tolerance for the presence of biotin. The lowest declared tolerance for the presence of biotin in the sample is for the hormone T_3 (30 ng / mL), and this is where we measured multiple T_3 values one hour after taking biotin: 28% higher on the first day and 38% higher on the seventh day. In most samples, both before and after the neutralization protocol was performed, the troponin concentrations were lower than the lower limit of the measuring range at all measuring points. Therefore, the absolute and the relative differences could not be calculated.

Conclusions:

The uptake of biotin in a dosage of up to 10 mg/day, which is available in over-the-counter preparations, does not interfere with the tested methods for the determination of TSH, T_4, fT_3, fT_4 and hsTnT, both for single and continuous biotin administration. Interference is possible in assays that have a low tolerance for the presence of biotin (30 ng/mL), such as T_3, although in this case the interference would not have affected the clinical decision. The neutralization method using streptavidin particles is an easy way to prove biotin interference as it requires no special equipment or reagents and is easily implemented in any laboratory.

10. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

• Ime i prezime: Marija Miškić

• Datum i mjesto rođenja: 28. 05. 1996. Vinkovci, Vukovarsko-srijemska županija, Hrvatska

• Državljanstvo: hrvatsko

• Adresa stanovanja: Otočka 3, 32100 Vinkovci

• E-mail: miskicmarija96@gmail.com

Obrazovanje:

• 2002 – 2010. Osnovna škola „Vladimir Nazor“, Vinkovci

• 2010 – 2014. Srednja škola „Matija Antun Reljković“, opća gimnazija, Vinkovci

• 2014 – 2019. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet, Integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacije

Nagrade/priznanja:

• Rektorova nagrada za izvrsnost Sveučilišta u Splitu 2019. godine dodijeljena za akademsku godinu 2017/2018.

Radno iskustvo:

• 02. 2019. – 08. 2019. Stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna Sućidar

Aktivnosti:

- Član Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije (CPSA) (2014 – 2019)
- Student Exchange Program (SEP), University of Lusofona, Lisabon, Portugal (2017)
- Business English in Pharmacy (Split, 2018)
- Humanijada 2018. i 2019.
- PMKS: Međunarodno natjecanje u znanju studenata farmacije i medicine (Split, 2018)
- Praktična znanja za studente (Split, 2018)
- Natjecanje u izradi magistralnih pripravaka (Split, 2019)

- PMKS: Međunarodno natjecanje u znanju studenata farmacije i medicine (Sarajevo, 2019)
- 11th ISABS Conference on Forensic and Anthropologic Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine (Split, 2019)
- Erasmus + praksa u Hospital Universitari i Politecnic La Fe (Valencia, 2019)
- Ljetna škola kliničke farmacije s Plivom (Split, 2019)

Posebne vještine:

• Rad na računalu: Microsoft Office, Esculap 2000

• Strani jezici: engleski – tečno, španjolski – osnovno