



## ZNAČAJ BIOTINA U MEDICINSKO-LABORATORIJSKOJ DIJAGNOSTICI

Nihada Šehagić, Nihad Bliznović

### SAŽETAK

U posljednjih pet godina, institucije koje se bave ispitivanjem hrane i lijekova su izdale upozorenje javnosti, laboratorijama, zdravstvenim djelatnicima i osobama koje dizajniraju dijagnostičke testove, o potencijalnim interferencijama uzrokovanim biotinom. U ovom radu ćemo ukratko pojasniti strukturu biotina, njegovu biološku funkciju, prednosti i posljedice njegove upotrebe, odnosno, nedostatka u organizmu čovjeka, primjenu u različitim praksama sa akcentom na uticaj u imunohemiji u smislu rezultata ispitivanja i posljedično pogrešnih dijagnoza.

*Ključne riječi: biotin, koncentracija biotina, biotinska interferencija*

**Autor za korespondenciju**  
**Nihada Šehagić MA dipl. ing. MLD**  
**Kantonalna bolnica Zenica**  
**e:mail: n.gazic.l@gmail.com**

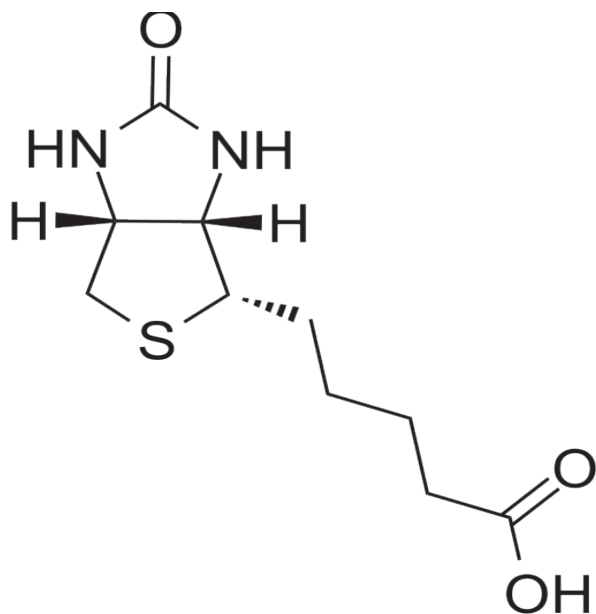


### UVOD

Biotin, poznat kao i vitamin B7 ili vitamin H, je vitamin topljiv u vodi koji pomaže organizmu u metabolizmu masti, karbohidrata i proteina (1). Ljudski organizam mora zadovoljavati potrebe za dnevnim unosom biotina, odnosno vitamina B7. Biotin ima široku praktičnu primjenu, od farmaceutske industrije, preko terapijskih sredstava u nekim patološkim stanjima do upotrebe u multivitaminским dodacima u kozmetici.

### STRUKTURA I FUNKCIJA BIOTINA

Biotin sadržava tri asimetrična ugljikova atoma. Samo se D (+) pojavljuje u prirodi i biološki je aktivan, odnosno ima vitaminsku aktivnost. Kao i svi u vodi topljivi vitamini i biotin nije skladišten u tijelu te je potreban dnevni unos u organizam. Ne mogu ga sintetizovati ljudske ćelije ali ga proizvode bakterije u organizmu te se nalazi u raznoj hrani.



Slika 1: molekularna struktura biotina (<https://www.medchemexpress.com/biotin.html>)

Biološka je funkcija biotina da djeluje kao koenzim niza karboksilaza u metabolizmu masnih kiselina, aminokiselina i ugljikohidrata. U ljudskim tkivima biotin je koenzim za enzimsku karboksilaciju četiri supstrata: piruvata, CoA, propionil-CoA i p-metilkrotonil-CoA. Vezanje CO<sub>2</sub> obavlja se dvostepenom reakcijom: prva uključuje vezanje CO<sub>2</sub> na biotinsko središte holoenzima, a druga prijenos CO<sub>2</sub> vezanog za biotin do odgovarajućeg akceptora.(2)

### Prisutnost biotina

U namirnicama biljnoga i životinjskog porijekla samo je mali dio biotina u slobodnom obliku. Većina biotina kovalentno je vezana na enzime ovisne o biotinu preko amidne veze karboksilne skupine pokrajnjeg lanca biotina i aminoskupine lizinskog ostatka. Biotin se apsorbira u enterocite aktivnim prijenosom ovisnim o natriju. Oralno uziman biotin gotovo se u potpunosti apsorbira, dok biološka dostupnost biotina dobivenog hranom varira.

Tabela 1: Sadržaj biotina u određenim namirnicama

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

Reapsorbira se u bubrezima aktivnim prijenosom ovisnim o natriju, a kod viših koncentracija izlučuje se urinom. Sve stanice sadržavaju biotin, a veće se koncentracije mogu pronaći u jetri, bubrezima, mišićima i mozgu.

### Posljedice nedostatka biotina u organizmu

Nedostatak biotina vrlo je rijedak, no može se javiti kod dugotrajne neadekvatne prehrane, hroničnog alkoholizma, hemodijalize i dugotrajne konzumacije sirovih jaja (biotin stvara neaktivni kompleks s proteinom avidinom sadržanim u bjelanjku jaja, čime je onemogućena njegova apsorpcija; kuhanjem jaja avidin se denaturira, što omogućava otpuštanje, odnosno uspješnu apsorpciju biotina).



Simptomi pomanjkanja biotina jesu gubitak kose, gubitak apetita, konjunktivitis, letargija, osjećaj trnjenja i pečenja u rukama i nogama, hipotonija i bolovi u mišićima.

Tabela 2: dnevne potrebe za unosom biotina

Životna dob čovjeka	Dnevne potrebe za unos biotina
Prvih 6 mjeseci života	5 $\mu\text{g}$
7 – 12 mjeseci	6 $\mu\text{g}$
1 – 3 godine	8 $\mu\text{g}$
4 – 8 godine	12 $\mu\text{g}$
9 – 13 godine	20 $\mu\text{g}$
14 – 18 godine	25 $\mu\text{g}$
19 + godine	30 $\mu\text{g}$

Biotin nije toksičan uziman oralno ili intraveniski u miligramskim (mg) količinama kroz dulje razdoblje. Dnevna potreba za biotinom iznosi 30  $\mu\text{g}$ . Kod odraslih zdravih osoba koncentracija biotina u seumu je od 133 – 329 pmol/L i od 18 do 127 nmol u dnevnom urinu.(3) Pored činjenice da je nedostatak biotina u organizmu jako rijedak on je i dalje stalna komponenta vitaminskih suplemenata.

### Praktična primjena biotina

Farmaceutska primjena biotina nalazi se kod sekundarne progresivne multiple skleroze, metaboličkih bolesti (defekti karboksilaze i biotini-daze) i propionske acidemije.

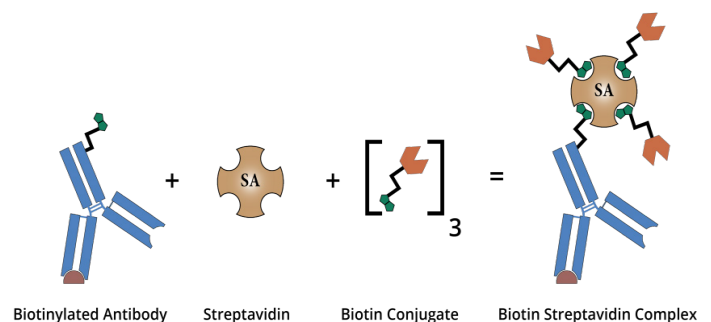
Biotin se u velikim dozama (5-10 mg/dan) koristi kao terapijsko sredstvo kod nekih patoloških stanja kao što su urođene greške u metabolizmu. Još veće doze biotina (300 mg/dan) koriste se u tretmanu sekundane progresivne multiplskleroze.(5)

Biotin se koristi u multivitaminским dodacima i u preparatima za kosu, kožu i nokte. Zadnjih nekoliko godina porasla je popularnost biotina kao dodatka prehrani i kozmetičkog proizvoda koji pridonosi ljepoti. Pošto su ti preparati uglavnom registrirani kao kozmetički proizvodi ne podliježu provjeri kontrole i kvaliteta tako da se dolazi u situaciju da se na tržištu nalaze proizvodi koji sadrže i megadoze biotina i do 10 000 puta veće od preporučene dnevne doze. Ti se biotinski preparati uglavnom reklamiraju kao proizvodi za zdravlje, ljepotu kose, kože i noktiju.

### Primjena biotina u imunohemiji

Otkrivanje i kvantifikacija antitijela i antigena pomoću imunohemijskih tehnika zahtijeva upotrebu enzim – protein konjugata. Većina takvih konjugata nastaje spajanjem enzimatskog markera i antitijela kovalentnom ili nekovalentnom vezom. U zadnje vrijeme se najčešće koristi izuzetno jaka nekovalentna veza streptavidin – biotin.

Streptavidin je 66 kDa protein koji se dobija iz bakterije *Streptomyces avidinii*. Streptavidin – biotin stvaraju jedan od najčešćih kompleksa u prirodi i ima široku primjenu u osjetljivim biohemijskim ispitivanjima. (6)



Slika 2: ilustracija biotin – streptavidin interakcije

Glavna prednost korištenja biotin – streptavidin kompleksa je mogućnost za unaprijeđen-

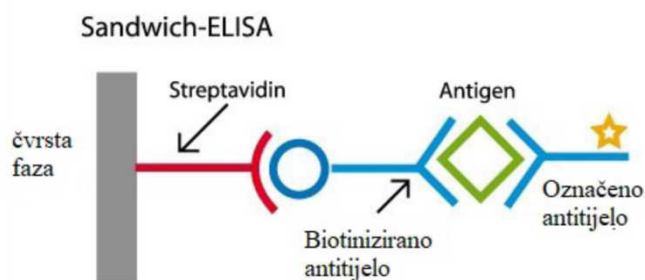


je osjetljivosti detekcije. To je u velikoj mjeri zbog tetramerne strukture streptavidina. Jedan streptavidin protein ima mogućnost vezivanja četiri molekule biotina sa velikim afinitetom i selektivnošću. Mogućnost većeg vezivanja omogućava pojačanje slabog signala i unapređuje osjetljivost detekcije (7). Ostale karakteristike interakcije između biotina i streptavidina su:

- *Kompleks je otporan na promijene pH, ispiranja, promiejnju temperature*
- *Vezivanje streptavidina za biotin je dovoljno specifično da bi osiguralo ciljano vezanje*
- *Biotin je mala molekula kojom se konjugiraju biološki aktivne makromolekule ili se biotiniziraju male molekule koje djeluju kao enzimski supstrati ili mogu vezati specifična antitijela (8)*

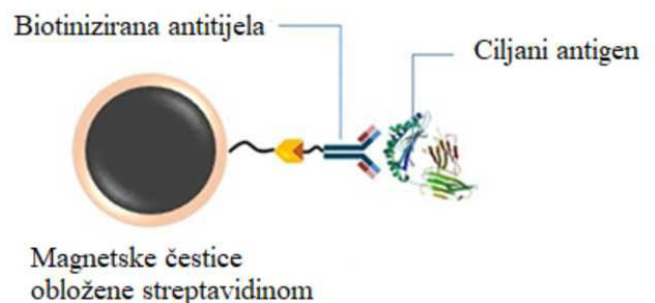
Streptavidin se može u imunohemijskim analizama koristiti na nekoliko načina. Pojedini analizatori koriste čvrstu fazu na koju je imobiliziran streptavidin (Ortho Diagnostics). Na taj način protein prisutan u stanici reagira sa biotiniziranim antitijelom koje se veže za streptavidin na čvrstoj podlozi i na taj način nastaje kompleks koji se može detektirati, a protein odvojiti.

Riječ je o sistemu koji omogućava otkrivanje analita u niskim koncentracijama jer interakcija streptavidin-biotin umnožava signal i povećava osjetljivost (slika br.3).



Slika 3: Prikaz sendvič metode, vezanje biotiniziranog antitijela za streptavidin na čvrstom

Umjesto čvrste podloge, mogu se koristiti i magnetske kuglice visokog kapaciteta s imobiliziranim streptavidinom (Roche Diagnostics) koje omogućavaju brzo i učinkovito pročišćivanje biomolekula iz složenih uzoraka. Čvrste faze obložene streptavidinom učinkovito se koriste kao sredstva za odvajanje u heterogenim imunoanalizama i u testovima DNA-hybridizacije (slika br.4)



Slika 4: Prikaz magnetske kuglice imobilizirane streptavidinom

Mnoge imunohemijske platforme danas koriste biotin u svom radu. Između ostalih tu spadaju: Roche Diagnostics (Cobas), Siemens Healthineers Laboratory Diagnostics (Advia Centaur, Dimension Vista, Immulite), Ortho Clinical Diagnostics (Vitros), Beckman Coulter (Access, DXI i DXC Platforms) i drugi (9).

### Biotinska interferencija

Iako se smatra da i velike doze biotina nisu toksične te nemaju neželjene efekte postoji velika mogućnost da će velike količine biotina u ispitivanom uzorku dovesti do interakcije u velikom broju dijagnostičkih testova. To se posebno odnosi na one testove koji koriste streptavidin-biotin vezivanje (5).

U kliničkim laboratorijama, mnogi biomarkeri, uključujući hormone, tumor markere, vitamine i lijekove određuju se pomoću imunohemijskih platformi koje koriste biotin-streptavidin tehnologiju (11).



Savremene laboratorije su jako dobro upućene u prepoznavanje potencijalnih interferencija kako u hemijskim tako i u imunohemijskim reakcijama. Biotinska interferencija je relativno novo otkriće ali mnoge metode koje se koriste za otkrivanje ove interferencije preklapaju se sa metodama koje su već ranije usvojene (4).

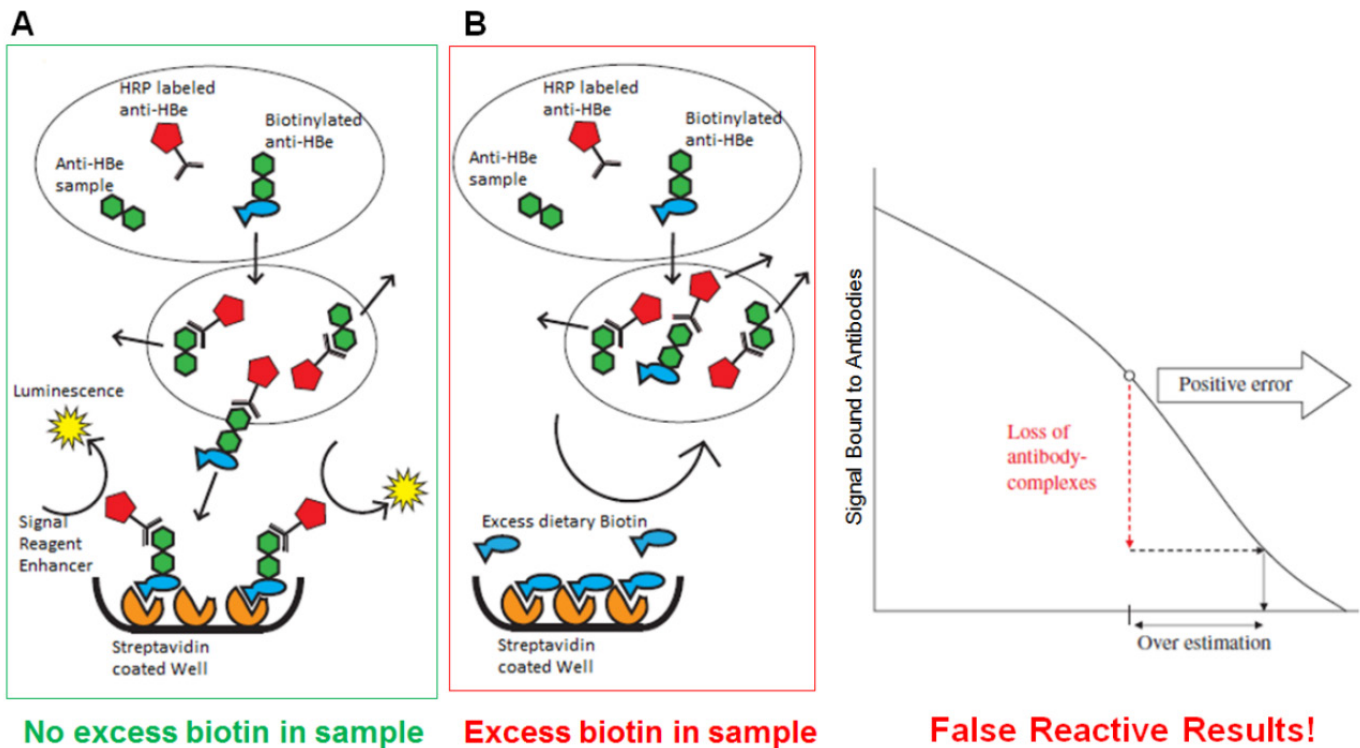
Normalan nivo biotina, koji se u organizam unese ishranom te dobije metabolizmom, prenizak je da bi doveo do interferencije u analizama koje koriste biotin. Također nisu prijavljeni slučajevi interferencije niti prilikom uzimanja multivitaminskih suplemenata koji sadrže do 1 mg biotina. Međutim, unošenje većih doza biotinskih suplemenata ( $\geq 5$  mg) dovodi značajnih povećanja koncentracije biotina u krvi koje mogu interferirati u reakcijama koje koriste biotin (10).

### Mehanizam biotinske interferencije

Biomolekule, kako male tako i velike, klinički bitne u onkologiji, kardiologiji, metabolizmu kostiju, anemiji, infektivnim bolestima, sepsi, dijabetesu, reproduktivnoj endokrinologiji itd. određuju se pomoću imunohemijskih analiza.

Dvije su metode imunohemijskih analiza: kompetitivne i nekompetitivne ili sendvič analize. Kompetitivna metoda se koristi uglavnom kod određivanja manjih molekula kao što su: T3, T4, kortizol, vitaminom D i dr. Kompetitivne su metode kod kojih se koristi jedno antitijelo. Reakcija se odvija uvijek uz višak antigena (ispitivana tvar).

Mehanizam biotinske interferencije kod kompetitivne imunohemijske metode prikazan je na slici br.5. Uzorak seruma se inkubira s an-



Slika 5: Mehanizam biotinske interferencije kod kompetitivnih metoda na primjeru određivanja Hepatitis e antitigena na VITROS platformi. Slučaj A kada nema viška biotina u uzorku, slučaj B kada se stvara višak biotina i pojava lažno reaktivnih rezultata (ref. 3)

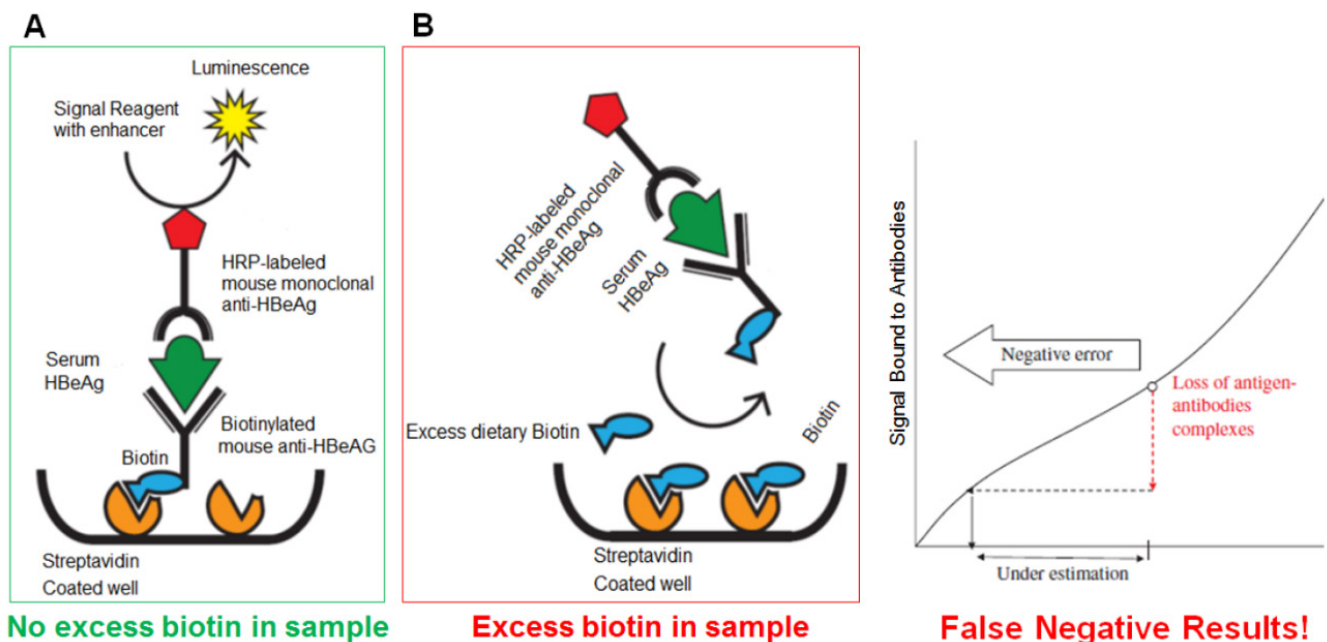


ti-HBe-specifičnim antitijelom, vezanim za HRP. Nakon toga, smjesi se dodaje biotinizirano anti-HBe-specifično antitijelo. Biotinizirani kompleks anti-HBe-protutijela zatim se veže za streptavidinom obloženu jažicu na čvrstoj fazi. Nakon uklanjanja tekuće faze, emitirana kemiluminiscencija obrnuto je proporcionalna anti-HBe u uzorku seruma (Slika 5A). Opisan je način na koji vrlo visoka doza biotina u serumu zasićuje mjesta vezanja streptavidina, što rezultira malim ili nikakvim vezanjem obilježenog kompleksa anti-HBe-antitijela na čvrstu fazu, a time i lažno pozitivnim anti-HBe (Slika 5B). U ovom primjeru, imunotestovi VITROS HBeAg i anti-HBe osjetljivi su na interferenciju biotina, što dovodi do klinički značajne promjene u kvalitativnim interpretacijama rezultata izvorno graničnog HbeAg (reaktivnog do negativnog rezultata) te izvorno anti-Hbe (negativnog do reaktivnog rezultata).

Nekompetitivne ili sendvič-metode se koriste uglavnom za određivanje većih molekula, iz-

među ostalih tu spadaju: TSH, PTH, C-peptid, feritin, prolaktin i dr (12). Koriste se dva protutijela i mjeri se količina antigena između dvaju slojeva antitijela. Antigen koji se određuje mora sadržavati najmanje dva antigenska mjesta sposobna za vezanje na antitijela. Primarno je antitijelo vezano za nosač i specifično je za antigen koji se određuje. Dodatkom uzorka, antigen koji se određuje veže se za primarno antitijelo. Postoji višak primarnog antitijela u odnosu na antigen. Zatim se dodaje sekundarno antitijelo koje je obilježeno (npr. sa HRP) i nastaje sendvič primarno antitijelo - antigenom obilježeno sekundarno antitijelo. U indikatorskoj reakciji dodatkom supstrata kojim je sekundarno antitijelo obilježeno razvija se boja, a jačina boje razmjerna je koncentraciji antigena u uzorku.

Mehanizam interferencije biotina u sendvič-formatu prikazan je na slici 6. Slučajem A na slici 6A je predstavljen normalan tok reakcije. Uzorak pacijenta, antitijela za detekciju i biotinizirana



Slika 6: Mehanizam biotinske interferencije kod nekompetitivnih metoda na primjeru određivanja Hepatitis e antitigena na VITROS platformi. Slučaj A kada nema viška biotina u uzorku, slučaj B kada se stvara višak biotina i pojava lažno negativnih rezultata (ref. 3)



antitijela dodaju se u reakcijsku posudu u kojoj se nalazi streptavidin vezan na čvrstu fazu. Biotinilirano antitijelo veže se na streptavidin. Analit od interesa bit će u sendviču između biotiniliranoga i detektirajućeg antitijela. Nevezane se tvari ispiru. Preostali signal bit će proporcionalan koncentraciji analita u uzorku.

Na slici 6B predstavljena je situacija kada imamo višak biotina u uzorku. Biotin će se vezati za mjesta streptavidina blokirajući biotinilirano antitijelo te stoga i analit od interesa. Biotinilirano antitijelo vezat će se za analit od interesa, ali, bez vezanja za čvrstu fazu, bit će isprano.

### **Neki praktični primjeri lažnih rezultata**

Na interferencije treba posumnjati kada rezultat testa nije u skladu sa širom kliničkom slikom (npr. pacijent bez simptoma disfunkcije štitnjače, ali ima abnormalne rezultate testa funkcije štitnjače). Identificiranje smetnji može biti veći izazov kod pacijenata s utvrđenom dijagnozom, kao što je karcinom, gdje se biomarkeri koriste za procjenu napredovanja bolesti ili usmjeravanje liječenja. Na primjer, tireoglobulin i kalcitonin koriste se kao rani pokazatelji recidiva bolesti kod bolesnika s diferenciranim i medularnim karcinomom štitnjače. Slično tome, kod raka prostate i testisa, rana identifikacija recidiva bolesti temelji se na antigenu specifičnom za prostatu i ljudskom korionskom gonadotropinu. Nesigurnost uzrokovana potencijalno lažnim rezultatom testa može biti posebno izazovna za te pacijente, stoga je važno da kliničari budu svjesni mogućih smetnji i da ispravno protumače anomalne rezultate. Prije nastavka s invazivnim postupcima/terapijama potrebno je provesti dodatne komplementarne testove i razmotriti smetnje.

### **Zaključak**

Premda biotin ima široku praktičnu primjenu, zaključak je kako visoke koncentracije biotina u bolesničkim uzorcima mogu rezultirati lažno pozitivnim ili negativnim rezultatima ispitivanja i posljedično pogrešnim dijagnozama. Shodno tome, izdane su brojne preporuke kako bi se potaknula svijest o uzimanju biotina kao dodatka prehrani i mogućoj interferenciji s dijagnostičkim testovima.

Kliničari moraju biti informirani i svjesni mogućih biotinskih interferencija pri interpretaciji rezultata, koje dobiju iz laboratorije.



## Reference

1. Wilson, D.R. (2017, October 18). Why do we need biotin (vitamin B7) preuzeto sa <https://www.medicalnewstoday.com/articles/could-vitamin-d-deficiency-increase-the-risk-of-heart-disease> (pristupljeno 21.08.2022)
2. Štraus B, Karmela B. Protein, u: Čepelak D. i Čvorišćec I. (ur.): Štrausova medicinska biokemija. Medicinska naklada, Zagreb, 2009
3. Jose C. Jara Aguirre, “B” is for Biotin as a Potential Immunoassay Interference, *Pediatric and Maternal-Fetal Division News*; Volume 32, Issue 2, July 2018
4. Biotin: fact sheet for health professionals. National Institute of Health. Dostupno na: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Biotin-HealthProfessional/#h2> (pristupljeno 01.09.2022)
5. Colon, P.J, Greene, D, Biotin Interference in Clinical Immunoassays, May 2018, 02:06, 941-945
6. Chun, K.Y, Biotin Interference in Diagnostic Tests (2017), *Clinical Chemistry*, 63:2, 619
7. Liu, F., Zhang, J. & Mei, Y. The origin of the cooperativity in the streptavidin-biotin system: A computational investigation through molecular dynamics simulations. *Sci Rep* 6, 27190 (2016).
8. Biotin and Streptavidin, preuzeto sa <https://www.aatbio.com/catalog/biotin-and-streptavidin> (pristupljeno 10.08.2022)
9. Bowen R, Benavides R, Colón-Franco J.M, Katzman B, Muthukumar A, Sadrzadeh H, Straseski J, Klause U, Tran N, Best practices in mitigating the risk of biotin interference with laboratory testing, *Clinical Biochemistry*, Volume 74, 2019, pages 1-11,
10. Clerico A, Plebani M, Biotin Interference on immunoassays methods: sporadic cases or hidden epidemic?, *Clin Chem Lab Med* 2017; 55(6): 777-779
11. Li D, Ferguson A, Cervinski MA, Lynch KL, Kyle PB. *AACC guidance document on biotin interference in laboratory tests*. [Epub] *J Appl Lab Med* January 13, 2020,
12. Basok I, Biotin interference in immunoassays, *Int J Med Biochem* 2020;3(1):40-3 /
13. Luong J, Vashist S, Chemistry of Biotin–Streptavidin and the Growing Concern of an Emerging Biotin Interference in Clinical Immunoassays, *ACS Omega* 2020 5 (1), 10-18,





## THE SIGNIFICANCE OF BIOTIN IN MEDICAL-LABORATORY DIAGNOSTICS

Šehagić N., Bliznović N.

### ABSTRACT

In the past five years, the institutions for food and drug testing have issued warnings to the public, laboratories, health care professionals, and people who design diagnostic tests about potential interferences caused by biotin. In this paper, we will briefly explain the structure of biotin, its biological function, the advantages and consequences of his use, his deficiency in the human body, application in various practices with an emphasis on the impact in immunochemistry in terms of test results and, consequently, wrong diagnoses.

**Key words:** *biotin, biotin concentration, biotin interference*

**Corresponding author:**  
**Nihada Šehagić**  
**Cantonal Hospital Zenica**  
**e:mail: n.gazic.l@gmail.com**