Riv Ital Med Lab (2017) 13:1–9
DOI 10.1007/s13631-017-0144-z

EDITORIALE

Biotina e interferenze nei metodi immunologici; problemi e opportunità

Biotin and interferences in immunoassays; problems and opportunities

Romolo M. Dorizzi[1]

Ricevuto: 29 gennaio 2017 / Accettato: 10 febbraio 2017
© Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio 2017

Riassunto La biotina è una vitamina idrosolubile del gruppo B nota anche con altri nomi: coenzima R, vitamina H (o più raramente vitamina I) nella nomenclatura tedesca, vitamina B_7 in quella anglosassone e vitamina B_8 in quella francese. La molecola della biotina comprende due anelli: uno tiofenico, a cui è legata una catena laterale di acido valerico, e uno imidazolidinonico. La biotina è un cofattore che interviene nel trasferimento di una molecola di CO_2 in numerose carbossilasi coinvolte nella sintesi degli acidi grassi, dell'isoleucina, della valina e nella gluconeogenesi. Non è definito in modo unanime il fabbisogno di biotina, anche se diverse fonti lo collocano intorno a 30–100 µg/die. Un deficit sublinico causa sintomi lievi come fragilità e perdita di capelli e sono stati attribuiti a carenza di biotina nell'adulto sintomi neurologici (depressione, letargo, allucinazioni). Deficit ereditari delle carbossilasi biotina-dipendenti impediscono alle cellule di utilizzare in modo efficiente la biotina con conseguenze che possono essere molto gravi e arrivare alla morte. Alla fine del secolo scorso ha cominciato a diffondersi nei Laboratori e nell'industria dei diagnostici l'impiego di sistemi che sfruttano la capacità della biotina di legarsi con grande affinità alla streptavidina, che si trova in *Streptomyces avidinii*. Mentre le supplementazioni tradizionali di biotina non hanno mai comportato interferenze sui metodi immunometrici che si basano sul sistema streptavidina-biotina, negli ultimi anni è stato segnalato che l'assunzione di biotina a concentrazioni superiori centinaia e migliaia di volte a quelle fisiologiche può produrre interferenze rilevanti. La streptavidina lega, secondo l'architettura del metodo, l'anticorpo o l'antigene biotinilato. Quando la concentrazione di biotina nel siero del paziente è molto aumentata, le molecole di biotina interferiscono con il legame degli anticorpi o degli antigeni biotinilati alla fase solida rivestita di streptavidina. I risultati di laboratorio sono falsamente diminuiti nel caso di metodiche sandwich o falsamente aumentati nel caso di metodiche competitive. L'editoriale commenta brevemente quanto pubblicato fino al gennaio 2017 e contiene una proposta operativa oggettiva, equilibrata e basata sulle "prove" a disposizione. Il Laboratorio non deve perdere l'occasione di svolgere un ruolo di consulente per il medico prescrittore, il paziente e il cittadino nell'interpretazione di un risultato di un esame. La possibilità di interferenze della biotina sugli immunodosaggi deve essere conosciuta, ma in Italia sembra comunque un fenomeno molto limitato. Occorre, pertanto, intercettare le richieste al momento dell'accettazione con la collaborazione dei medici prescrittori e dei sistemi informativi aziendali e regionali.

Parole chiave Biotina · Interferenze · Metodi immunologici · Metodo sandwich · Metodo competitivo · Tiroide

Summary *Biotin is a water-soluble B vitamin that is also known by other names: coenzyme A, vitamin H (or more rarely vitamin I) in German nomenclature, vitamin* B_7 *in the Anglo-Saxon and vitamin* B_8 *in the French one. The molecule of biotin comprises two rings: a thiophene ring, which is linked to a side chain of valeric acid, and an imidazole ring. Biotin is a cofactor responsible for the transfer of a molecule of* CO_2 *in several carboxylase enzymes involved in the synthesis of fatty acids, isoleucine, valine, and in gluconeogenesis. It is not unanimously defined the biotin requirements even though different sources place it around 30–100 µg/day. A subclinical deficit causes mild symptoms such as weakness and loss of hair and neurological symptoms (depression, lethargy, hallucinations) have*

✉ R.M. Dorizzi
romolo.dorizzi@auslromagna.it

[1] UOC Patologia Clinica, Laboratorio Unico della Romagna, Pievesestina di Cesena (FC), Italia

been attributed to lack of biotin. In adult hereditary biotin-dependent carboxylase deficit the cells do not efficiently use the biotin with consequences that can be very serious and lead to death. Diagnostic systems that exploit the ability of biotin to bind with great affinity to streptavidin, which is found in Streptomyces avidinii entered in the Laboratories and in the industry at the end of the last century. While traditional biotin supplementation has never caused interferences in immunoassays that are based on the system biotin-streptavidin, in recent years it has been reported that the intake of biotin at concentrations greater than the physiological ones of hundreds and thousands of times can produce significant interferences. Streptavidin binds, depending on the architecture of the method the biotinylated antibody or antigen. When the concentration of biotin in the patient serum is very increased, the biotin molecules interfere with the binding of biotinylated antibodies or antigens to the solid phase coated with streptavidin. The Laboratory results are falsely decreased in the case of sandwich methods or falsely increased when competitive methods. The editorial gives an overview of what has been published up to January 2017 and includes an objective, balanced and evidence-based working plan. The Laboratory should not miss the occasion to fulfill the role of consultant for the requesting clinician, the patient and the citizen to interpret a test result. The possibility of biotin interferences on immunoassays must be known, but in Italy it seems a very limited phenomenon. It is, therefore, necessary to intercept the requests at the time of the order entry with the support of the prescribing physicians and institution and regional information systems.

Keywords *Biotin · Interferences · Immunoassays · Sandwich method · Competitive method · Thyroid*

Il principio

La biotina è una vitamina idrosolubile del gruppo B nota anche con altri nomi: coenzima R, vitamina H (o più raramente vitamina I) nella nomenclatura tedesca, vitamina B_7 in quella anglosassone e vitamina B_8 in quella francese. Un primo indizio dell'interesse rivolto verso questa vitamina è dato dal numero di hit che si ottengono su Google: 16 milioni per *biotine*, quasi 7 milioni per *coenzyme R*, quasi 4 milioni per *vitamin* B_7 e più di un milione e mezzo per *vitamin* B_8.

La molecola della biotina comprende due anelli: uno tiofenico, a cui è legata una catena laterale di acido valerianico, e uno imidazolinico (Fig. 1). La biotina è un cofattore responsabile per il trasferimento di una molecola di CO_2 in numerose carbossilasi coinvolte nella sintesi degli acidi grassi, dell'isoleucina, della valina e nella gluconeogenesi. Nell'uomo viene utilizzata da piruvato carbossilasi

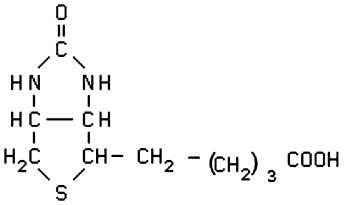

Fig. 1 Molecola della biotina

(per la trasformazione di piruvato in ossalacetato), propionil CoA carbossilasi (per la trasformazione di propionil-CoA in metilmalonil-CoA), metilcrotonil carbossilasi e acetil-CoA carbossilasi (per trasformare acetil-CoA in malonil-CoA) [1, 2].

La biotina, solubile in acqua, è assunta dagli alimenti in forma libera o legata alle proteine e assorbita a livello dell'ileo e del digiuno (una biotinasi secreta nel succo pancreatico interviene nella scissione della biotina dalle proteine cui è legata). La vitamina, che è prodotta in elevate quantità dai batteri intestinali, è contenuta in numerosi alimenti come latte (umano e di mucca), latticini, tuorlo, fegato, frutti di mare, arachidi, bietola e altre verdure a foglia larga (anche se nei vegetali è legata in maniera forte alle proteine e quindi meno biodisponibile) [3, 4]. Non sono definiti in modo unanime Fabbisogno Medio Stimato (*Estimated Average Requirements*) e Quantità Giornaliera Quotidiana (*Recommended Dietary Allowances*) per la biotina, anche se fonti diverse collocano il Fabbisogno Medio Stimato intorno a 30–100 µg/die [5, 6]. Fino a 12 mesi di età si considera adeguato assumere 5 µg; il fabbisogno aumenta negli anni successivi, arrivando a 30 µg/die nell'adulto (35 in gravidanza), mentre non è stato definito un limite massimo tollerabile. Non si conoscono fenomeni di tossicità da biotina fino a livelli di 10 mg/die [5, 6]. Il deficit di biotina può essere causato da inadeguato introito dietetico o da disordini genetici che interessano il metabolismo della biotina. Gli stati carenziali di biotina sono rari e si possono verificare in individui che assumono elevate quantità di uova crude (le uova cotte, invece, non hanno tale effetto in quanto la cottura denatura l'avidina). Sono stati anche descritti casi di carenza in individui nutriti solo per via parenterale o dopo somministrazione di alte dosi di sulfamidici (attribuita all'alterazione della flora batterica). Un deficit subclinico causa sintomi lievi come fragilità e perdita di capelli e dermatite (in particolare al volto), ma sono stati attribuiti a carenza di biotina nell'adulto sintomi neurologici (depressione, letargo, allucinazioni). Si tratta di segnalazioni scarsamente supportate da "prove", ma che sono alla base della rutilante congerie dei trenta milioni di hit che affollano la rete contenenti offerte commerciali relative a prodotti dietetici o cosmetici che "rinforzano" unghie e capelli.

I disordini metabolici ereditari caratterizzati da deficit delle carbossilasi biotina dipendenti sono denominati deficit multipli delle carbossilasi e comprendono il deficit degli

enzimi olocarbossilasi sintetasi o biotinidasi. La biotinidasi libera la vitamina biotina dalla sua forma legata e la rende disponibile; se l'enzima manca la vitamina è perduta [7, 8]. Questo deficit impedisce alle cellule di utilizzare in modo efficiente la biotina con conseguenze di diversa gravità (acidosi chetolattica, aciduria organica, iperammoniemia, rash cutanei, ipotonia, convulsioni, ritardo nella crescita, alopecia), ma si può arrivare al coma e alla morte. La ricerca del deficit di biotinidasi (1 ogni 60.000 nascite) è compresa nello screening metabolico allargato neonatale [9].

Alla fine del secolo scorso ha cominciato a diffondersi nei Laboratori e nell'industria dei diagnostici l'impiego di sistemi che sfruttano la capacità della biotina di legarsi con grande affinità alla streptavidina, che si trova in *Streptomyces avidinii*. La biotina è legata all'anticorpo analitico e la separazione della quota legata avviene quando la biotina (e il complesso a essa associata) si unisce all'avidina immobilizzata sulla fase solida, indipendentemente dal tipo di ligando a cui la biotina è legata [10]; l'impiego di tale sistema ha contribuito all'esplosiva diffusione dei metodi immunometrici nei Laboratori di ricerca e clinici [11, 12]. Le principali caratteristiche del sistema steptavidina-biotina nelle metodiche messe a punto o impiegate in Laboratorio sono state le seguenti:

- l'interazione non covalente della streptavidina con la biotina è caratterizzata da una costante di affinità di molti ordini di grandezza (10^3–10^6) maggiore di quella dell'interazione dei ligandi con i loro anticorpi specifici. Il complesso, una volta formato, non è influenzato da alterazioni del pH e da manipolazioni come lavaggi ripetuti;
- streptavidina e biotina posseggono quattro siti di legame per molecola facilitando il numero di complessi che molecole biotinilate possono formare con la streptavidina;
- la biotina è una molecola piccola (244 Da) e, una volta introdotta in macromolecole biologicamente attive non influenza la loro attività biologica (es. l'attività catalitica di un enzima o il legame a un anticorpo);
- la streptavidina può essere derivatizzata a supporti solidi senza perdere la capacità di legare la biotina.

Il passato

Le ultime due decadi del secolo scorso hanno rappresentato l'età dell'oro dell'immunometria, e attraverso successive innovazioni hanno reso disponibili metodiche automatiche per misurare un numero sempre maggiore di molecole con sensibilità, rapidità e precisione elevate. A fronte di questi progressi si sono palesati dei limiti per quanto riguarda l'accuratezza e la specificità, legati non solo alla difficoltà di mettere a punto anticorpi in grado di rilevare la porzione biologicamente attiva della molecola (che non sempre corrispondeva a quella immunologicamente attiva), ma anche alla dimostrazione di un numero crescente di interferenze. Esiste ormai una ricca letteratura sulle interferenze (in sostanza ogni effetto di una sostanza presente nel campione che altera il corretto valore del risultato) [10, 13–15].

Nel corso degli anni è stato segnalato più volte anche dalla stampa "laica" il pericolo costituito dall'assunzione di sostanze diverse come farmaci e integratori alimentari che possono interferire nei risultati degli esami misurati con metodi immunometrici. Uno degli ambiti per i quali vi sono più segnalazioni è la diagnostica tiroidea, anche per la preponderanza del numero degli esami di funzionalità tiroidea sul totale degli esami immunometrici eseguiti. In questi casi l'unico modo per interpretare correttamente i risultati è conoscere le sostanze assunte nelle ore e nei giorni precedenti l'esecuzione della raccolta del campione sul quale sono stati eseguiti gli esami del sangue e, in particolare, gli esami immunometrici che hanno dato risultati non coerenti con la clinica [16].

Tornando alla letteratura scientifica, la prima segnalazione di interferenze che interessano i metodi basati su streptavidina-biotina risale alla fine del secolo scorso. Nel 1994, Dale et al [17] hanno segnalato che il 10% dei soggetti studiati presentava anticorpi contro le proteine biotinilate e una percentuale minore contro l'avidina. Gli autori concludevano che, anche se era improbabile che questi anticorpi avessero conseguenze *in vivo*, potevano interferire positivamente o negativamente sui metodi basati sul sistema streptavidina-biotina. Negli anni successivi si sono aggiunte altre segnalazioni [18–21].

Nel 1996, Henry et al hanno aperto un altro filone quando hanno segnalato per la prima volta un caso clinico di interferenza della somministrazione subito dopo la nascita di un cocktail vitaminico che conteneva 10 mg di biotina. Nel corso dello screening neonatale erano state rilevate un'interferenza negativa sulla determinazione del TSH e un'interferenza positiva su quella dell'fT4 eseguendo la determinazione con l'analizzatore ES 300, che non era stata confermata, eseguendo la determinazione con Amerlite [22].

Una recente rassegna di Piketty et al [23] riporta una stima del numero di partecipanti all'esercizio del Programma francese di Verifica Esterna di Qualità Probioqual del giugno 2016 che impiegano metodi a rischio di interferenze legate alla biotina. Anche solo considerando cinque produttori, nel 2016 più della metà dei Laboratori (500 su 953 per il TSH, 509/810 per l'fT4; 442/709 per l'fT3; 242 su 513 per il PTH; 221 su 535 per la 25 OH vitamina D) utilizzava metodiche interessate da tale interferenza. In generale le aziende mettono a disposizione nei singoli inserti e sulla rete le informazioni relative alle concentrazioni che possono interferire sui singoli metodi, le quali sono ben al di sopra di quelle assunte nella dieta o contenute nei comuni preparati polivitaminici presenti sul mercato e, in qualche caso, raccomandano che i pazienti che assumono più di 5 mg/die

ANEMIA	PAPP-A	HIV Ag p24	PTH	LBP
Eritopoietina	PlGF	HIV Ag Conferma	P1NP	Prealbumina
Ferritina	Progesterone	HIV Combo	Pyrilinks-D	Procalcitonina
Folato	Prolattina	HSV-1/2 IgG	Vitamina D	TNF-α
Vitamina B12	SHBG	Rosolia IgG, IgM		Transferrina
	Testosterone	Sifilide	**ONCOLOGIA**	
CARDIOLOGIA		Toxo Avidity	ACE	**FIBROSI EPATICA**
BNP	**TIROIDE**	Toxo IgG, IgM	AFP	Acido ialuronico
CK-MB	Anti Tg		β-microglobulina	PIIINP
D-Dimero	Anti TPO	**FARMACI**	BR 27.29	TIMP-1
Mioglobina	Anti-TRAb	Carbamazepina	CA 125	
NT-proBNP	Calcitonina	Ciclosporina	CA 15-3	**TOSSICOLOGIA**
Troponina I	T3, FT3	Digitossina	CA 19.9	6-Acetilmorfina (6-AM)
Troponina T	T4, FT4	Digossina	CA 72-4	Acetaminofene
	TBG	Gentamicina	Cyfra 21-1	Amfetamine
ORMONI	Tireoglobulina	Lidocaina	HE4	Barbiturati
ACTH	TSH	Litio	HER-2/neu	Benzodiazepina
AMH	T-Uptake	Micofenolato	Gastrina	Caffeina
Androstenedione		Fenobarbital	NSE	Cannabinoidi (THC)
Cortisolo	**MAL.INFETTIVE**	Fenitoina	PAP	Cocaina Metaboliti
Peptide P	Ag HBe	Procainamide	ProGRP	Ecstasy
DEA-solfato	Ag HBs	Sirolimus	PSA	Metadone
Estradiolo	Anti-HAV	Valproato	S100	Metadone Metaboliti, EDPP
Estriolo, libero	Anti-HBc	Tacrolimus	sFlt-1	Metaqualone
FSH, LH	Anti-HBc IgM	Teofillina	TPS	Methotrexate
HbA1c	Anti-Hbe	Tobramicina		Oppiacei
HCG	Anti-HBs	Vancomicina	**INFIAMMAZIONE**	Fenciclidina
hGH	Anti-HCV 2		C1 inibitore	Propossifene
IGF-1	Anti-HIV 1/2	**METAB. OSSEO**	C3, C4	Salicilato
IGFBP-3	C. difficile Tossina	Anti-CCP	CRP	Antidepressivi triciclici
Inibina A	CMV IgG, IgM	Beta cross Laps	IgA, IgE, IgG, IgM	
Insulina	H. pylori IgG	Osteocalcina	IL-6, IL-8, IL-10	
	Herpes I & II IgG			

Fig. 2 Determinazioni potenzialmente interferite se misurate con metodi basati sul sistema streptavidina-biotina

eseguano il prelievo per gli esami interferiti dopo almeno 8 ore l'assunzione [24] e provvedono a tenere aggiornate le informazioni direttamente [25, 26] (Fig. 2) o attraverso le informazioni messe a disposizione tramite Enti governativi di sorveglianza [27, 28].

La differenza di molti ordini di grandezza tra la posologia con cui era assunta la biotina e quella che poteva interferire le decine di metodiche di laboratorio basate sul sistema streptavidina-biotina ha segregato inizialmente il problema nell'ambito della segnalazione aneddotica. La situazione ha cominciato a cambiare con la diffusione (anche nel nostro Paese) di prodotti proposti per rinforzare e proteggere unghie e capelli che contengono decine di milligrammmi di biotina e non le decine di microgrammi dei polivitaminici tradizionali [29] anche se una compressa rivestita di Supradyn® contiene 1,8 mg di biotina e una effervescente 2,3 mg. In ambito pediatrico e neurologico (es. per la terapia della sclerosi multipla) è aumentato il ricorso alla somministrazione di biotina a posologie ben al di sopra del fabbisogno quotidiano (da decine a centinaia di milligrammi/die).

Le segnalazioni si sono successivamente infittite:

- Meany et al [30] hanno segnalato un caso di un paziente che assumeva 10 mg/die di biotina in cui le basse concentrazioni di PTH misurate con Roche Elecsys 2010 (Monza, Italia) contrastavano con la clinica; rianalizzando il campione con Immulite 2000 (Siemens, Milano, Italia) è stato ottenuto il risultato marcatamente elevato atteso dal quadro clinico (dimostrando, al contempo, che nei pazienti con insufficienza renale l'interferenza dalla biotina può durare fino a 2 settimane);
- Waghray A et al [31] hanno confermato la segnalazione qualche anno dopo sulla rivista ufficiale dell'*American Association of Clinical Endocrinologists*;
- Kwok et al [32] hanno studiato nel 2012 il caso di un bambino di 3 anni trattato con 10 mg/die di biotina in cui erano state ripetutamente misurati con Roche Modular E170 basse concentrazioni di TSH e concentrazioni nei limiti di fT4. La ripetizione dei due esami utilizzando Beckman Coulter Access (Cassina de' Pecchi, MI, Italia) aveva presentato un TSH nei limiti e un fT4 aumentato. Roche

impiegava il sistema biotina-streptavidna sia nella metodica per TSH sia per fT4, mentre Beckman solo per fT4 e gli autori hanno attribuito alla biotina l'interferenza.

Questa segnalazione ha portato al commento di Wijeratne et al [33], che hanno segnalato il caso di un bambino trattato alla posologia di 30 mg/die per insufficienza epatica da acidosi lattica, in cui fT4 e fT3, misurati con Dxi (Beckman Coulter), erano risultati marcatamente elevati e TSH nei limiti. I campioni rianalizzati, utilizzando Architect (Abbott, Roma, Italia) e Centaur (Siemens) erano risultati nei limiti. Il gruppo neo-zelandese ha arricchito la segnalazione con due informazioni: (1) la biotina interferisce anche con altre determinazioni sia di Roche sia di Beckman Coulter (es. testosterone e DEA solfato); (2) numerosi supplementi vitaminici da banco contengono quantità di biotina comparabili a quelle impiegate nel deficit di biotinidasi.

Il presente

Il presente di questa storia si può far partire da un *case report* pubblicato sul fascicolo di giugno 2016 di *Thyroid* [34] e da una lettera pubblicata sul fascicolo del 18 agosto 2016 del *New England Journal of Medicine* [35], la rivista con il più alto *Impact Factor* tra le riviste di medicina non specialistica (59,55 per il 2015). L'autorevolezza e la diffusione delle due riviste hanno amplificato rapidamente la risonanza della questione dell'interferenza della biotina sugli esami immunometrici.

Barbesino [34] riporta il caso di una paziente con sclerosi multipla (che non presentava segni o sintomi di ipertiroidismo) che aveva iniziato da poco l'assunzione di 300 mg/die di biotina in cui erano state misurate concentrazioni di fT4, fT3, TSH e TRAb coerentemente compatibili con malattia di Graves. Due settimane dopo l'interruzione dell'assunzione, gli esami erano rientrati nell'intervallo di riferimento. I medici del *Massachusetts General Hospital* hanno ripreso la somministrazione con biotina e hanno concluso che in questi casi va consigliato di sospenderne l'assunzione per 48 ore prima di eseguire gli esami di funzionalità tiroidea. Non tutti gli ormoni (es. la *Sex Hormone Binding Globulin*) risultavano interferiti anche se Barbesino ipotizzava che l'interferenza della biotina poteva interessare altri ormoni e tutti gli esami che erano eseguiti con metodiche che impiegano il sistema streptavidina-biotina.

Nella lettera del *New England Journal of Medicine* Kummer et al [35] hanno segnalato che 6 bambini di età compresa tra 1 mese e 9 anni che assumevano una posologia compresa tra 2 e 16 mg/kg/die di biotina avevano un quadro laboratoristico compatibile con malattia di Graves (concentrazione di TSH compresa tra 0,02 e 0,08 mU/L, concentrazione di fT4 e di anticorpo antirecettore per il TSH (TRAb) molto elevata e in 6 casi su 7 superiore al limite di linearità). Gli autori hanno dimostrato che occorrono più di 8 ore per eliminare l'interferenza della biotina (24–48 ore per TSH e fT4 e 7 giorni per TRAb) e procedono in una precisa, anche se sintetica, spiegazione del fenomeno.

Tutte le determinazioni sono state eseguite con strumentazione Roche che impiega il sistema streptavidina-biotina. La streptavidina lega, secondo l'architettura del metodo, l'anticorpo o l'antigene biotinilato. Quando la concentrazione di biotina nel siero del paziente è molto aumentata, le molecole di biotina interferiscono con il legame degli anticorpi o degli antigeni biotinilati alla fase solida rivestita di streptavidina. I risultati di laboratorio sono falsamente aumentati o diminuiti secondo il principio impiegato dalla specifica metodica.

La metodica del TSH è sandwich e un anticorpo monoclonale specifico per il TSH biotinilato e un anticorpo monoclonale specifico per il TSH marcato con rutenio formano un complesso con il TSH. Dopo aggiunta di microparticelle rivestite di streptavidina, il complesso si lega alla fase solida mediante l'interazione streptavidina-biotina. L'intensità del segnale chemiluminescente della molecola di rutenio è direttamente proporzionale alla concentrazione di TSH. Quando la concentrazione di biotina nel siero del paziente è molto aumentata, compete con il legame del complesso sandwich del TSH alle microparticelle rivestite di streptavidina e causa risultati di TSH falsamente diminuiti.

Le metodiche per fT4 e TRAb sono, invece, competitive. Le molecole di fT4 nel siero del paziente e quelle di T4 biotinilato competono con il legame con un anticorpo specifico per il T4 marcato con rutenio. Dopo l'aggiunta di microparticelle rivestite di streptavidina, il T4 biotinilato e il complesso anticorpo marcato con rutenio-T4 competono per il legame alla fase solida mediante l'interazione biotina e streptavidina. In questo caso l'intensità del segnale chemiluminescente della molecola di rutenio è inversamente proporzionale alla quantità di fT4 nel siero.

Quando la concentrazione di biotina nel siero del paziente è molto aumentata, diminuisce il legame del complesso T4 biotinilato-anticorpo marcato con rutenio alle microparticelle rivestite di streptavidina. Dal momento che queste metodiche hanno un'architettura competitiva, la diminuzione dell'intensità del segnale aumenta falsamente i valori di fT4.

La metodica per il TRAb contiene TRAb suina solubilizzata, immobilizzata su microparticelle rivestite di streptavidina da un anticorpo monoclonale di cattura biotinilato. Il TRAb contenuto nel siero del paziente è rilevato dalla capacità di inibire il legame con l'anticorpo monoclonale anti-TRAb marcato con rutenio. L'intensità del segnale chemiluminescente causato dalla molecola di rutenio è inversamente proporzionale alla quantità di TRAb contenuto nel campione. Quando la concentrazione di biotina nel siero del paziente è molto aumentata, diminuisce la quantità TRAb suina

catturata sulle microparticelle rivestite di streptavidina. Pertanto, il legame del TRAb marcato con rutenio è diminuito e, poiché questa metodica ha un'architettura competitiva, la diminuzione dell'intensità del segnale aumenta falsamente i valori di TRAb.

Trambas et al [36] aggiungono, sempre sul *New England Journal of Medicine*, che un quadro analogo (concentrazioni di fT4, fT3, testosterone, estradiolo, progesterone, DEA solfato e vitamina B_{12} aumentate e concentrazioni di TSH, PSA, PTH, LH e FSH diminuite anche in modo estremo) si verifica nei pazienti con sclerosi multipla sottoposti a terapia con 300 mg di biotina.

La replica di Kummer et al [37] allarga lo scenario segnalando che la biotina è utilizzata, oltre che nei pazienti con sclerosi multipla, anche in quelli con alopecia, onicoressi, dermatite, diabete mellito e depressione e "mega-compresse" come quelle impiegate e facilmente acquistabili da chiunque senza prescrizione, anche su Web, possono interferire non solo con gli esami della funzionalità tiroidea, ma con tutti gli esami che impiegano il sistema streptavidina-biotina (marcatori tumorali, ormoni, itamine, esami di infettivologia e molti altri) confermando le informazioni messe a disposizione dalle aziende di diagnostici. È facile seguire nei mesi successivi l'estensione del dibattito:

- Elston et al [38] hanno segnalato sul fascicolo di settembre 2016 del più autorevole giornale di Endocrinologia clinica (*Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *Impact Factor* = 6.91) il caso di un donna di 63 anni in cui era stata diagnosticata la sclerosi multipla 15 anni prima, che aveva cominciato ad assumere biotina (alla posologia di 300 mg/die). Gli esami di funzionalità tiroidea, eseguiti su due dei più diffusi analizzatori che impiegano il sistema streptavidina-biotina (Modular, Roche e Access, Beckman-Coulter) erano compatibili con ipertiroidismo anche se non coerenti con la clinica; 3 giorni di sospensione dell'assunzione di biotina hanno riportato i risultati di fT4, fT3, TSH e TRAb all'interno dell'intervallo di riferimento;
- Minkovsky et al [39] hanno confermato che la somministrazione di 300 mg/die di biotina, come previsto da studi recenti [40], a 3 pazienti con sclerosi multipla ha portato a un quadro laboratoristico dei risultati di TSH e fT4 ottenuti con una metodica (Roche) che impiega il sistema biotina-streptavidina di ipertiroidismo;
- Piketty et al [23] hanno curato la rassegna più completa sull'argomento e hanno valutato non solo gli ormoni ma anche i principali analizzatori interessati al problema e concludendo con proposte operative per gestire e, quando possibile, rimuovere le interferenze che interessano il sistema biotina-streptavidina;
- Batista et al [41] riportano un caso di quadro laboratoristico di ipertiroidismo e di aumento di estrogeni associato a diminuzione di FSH, in cui le determinazioni erano state eseguite in parte con analizzatore Roche e in parte con analizzatore Ortho. La paziente assumeva 10 mg/die di biotina per un problema di perdita di capelli. Gli autori hanno dimostrato interferenze nella determinazione anche di altri ormoni in 25 soggetti che assumevano biotina per la stessa motivazione. Oggi il Laboratorio di San Paolo in cui è stato condotto lo studio informa, prima della raccolta del prelievo per l'esecuzione degli esami interessati dalle interferenze, della necessità di sospendere l'assunzione di biotina per almeno 2 giorni prima di eseguire il prelievo e inserisce nel referto di questi esami una nota che informa della possibilità di interferenza in caso di assunzione di biotina nelle 48 ore precedenti.

Anche l'*American Association for Clinical Chemistry* (AACC) si occupa delle interferenze legate al sistema streptavidina-avidina. Il *Journal of Applied Laboratory Medicine* ha discusso diffusamente un caso sospettato di interferenze da biotina a cui ha dedicato un editoriale [42, 43] e sul bollettino dell'associazione Barbesino [44] ha sottolineato l'importanza che il Laboratorio informi i clinici di possibili interferenze e convinca i clinici dell'importanza di chiedere ai loro pazienti se assumono biotina o, meglio ancora, se assumono farmaci, integratori, vitamine, e in quale quantità.

I siti di autorevoli Società scientifiche quali *Endocrine Society* e *College of American Pathologists* segnalano le interferenze della biotina su alcuni metodi di laboratorio per misurare ormoni [45, 46].

Anche i servizi sanitari e i singoli Laboratori hanno cominciato a informare circa le possibili interferenze sugli esami immunometrici di mega-assunzioni di biotina. Per esempio:

- il servizio sanitario dello stato di Alberta in Canada raccomanda di rimandare il prelievo a 48 ore dopo l'assunzione di più di 1 mg/die di biotina [47];
- Laboratori come il Calgary lab services, quello dell'Università della Florida e quello della Mayo Clinic informano i propri utilizzatori (clinici e pazienti) [48–50];
- anche blog [51, 52] e siti di aziende farmaceutiche che producono preparati contenenti quantità di biotina centinaia di volte più elevate del fabbisogno quotidiano cominciano a fornire informazioni dettagliate sui metodi e sui meccanismi con cui la biotina può interferire sui risultati di esami di laboratorio ottenuti con alcuni metodi [53].

Il futuro

Le sintetiche informazioni che abbiamo riportato richiedono una valutazione attenta e meditata. Sono molto pochi i Laboratori che non impiegano metodi basati sul sistema streptavidina-biotina e forse ancora meno quelli che ricevono in modo sistematico informazioni circa i farmaci, gli

integratori e le vitamine assunti, talvolta in concentrazioni straordinariamente elevate, dai pazienti e dai soggetti in cui sono eseguiti esami di laboratorio a rischio di interferenza da biotina. È possibile che l'impiego di sostanze di cui non sono conosciuti spettro ed entità delle possibili interferenze si diffonda anche in Italia. I professionisti che operano nei Laboratori non devono perdere l'occasione di dare il loro contributo alla gestione del paziente. Il contributo deve essere efficace, appropriato ed equilibrato. Questo atteggiamento sembra essere particolarmente raccomandabile se consideriamo alcuni dei commenti degli autori degli articoli che abbiamo citato in precedenza:

- Kummer et al concludono: *"High-dose biotin treatment can fully mimicking the typical laboratory pattern of Graves' disease and sometimes. . . . Although manufacturers are aware of this potential problem, this source of error is usually not referenced to the clinician in laboratory reports. Therefore, we believe that it is crucial to increase the awareness of this problem in the medical community"* [35] e *"Therefore, every clinician should be aware of biotin-interfering assays used in his or her laboratory examinations, and patients should be asked about biotin intake. In turn, clinical laboratories should indicate potential biotin interference whenever possible and keep alternative laboratory methods in mind* [37];
- Wijeratne et al [33] concludono: *However, it is important that clinicians actively inquire about biotin intake with their patients*;
- Barbesino [34] conclude: *Based on in vivo data patients taking biotin should be advised to withhold the supplement for at least two days preceding their blood tests*;
- Batista et al [41] è più perentorio quando conclude: *The simplest way to prevent this problem is to instruct laboratory personnel to specifically ask patients about biotin and recommend them to stop it for 2 days prior to hormone testing. . . . In our laboratory, we have instructed our personnel and introduced in our LIS a recommendation to suspend biotin prior to ormone testing and also included in our reports a warning about biotin interference in our immunoassays*.

I commenti e le proposte della letteratura sono formalmente corretti, ma non trasferibili facilmente nel modo reale quotidiano e si devono considerare anche altri aspetti:

- nel valutare un qualunque problema considerare il numeratore non ha senso senza conoscere il denominatore. Ann Paxton [46] ci ricorda, per esempio, che con i reagenti Roche sono eseguiti 628 milioni di esami tiroidei l'anno e sono state riportate interferenze in 14 casi;
- quotidianamente la popolazione assume per os, per via nasale, endovena le molecole più diverse; qualcuna dannosa o, addirittura mortale, in qualunque quantità è assunta, altre del tutto innocue a meno che siano assunte in una quantità mille o diecimila volte superiore al fabbisogno.

Già in passato si è rilevato che i clinici si trovano frequentemente a richiedere esami per i quali sono privi delle basi teorico-tecniche e dell'esperienza necessaria a ottimizzarne la sequenza di richiesta e la corretta interpretazione [54]. Ciò contrasta con l'atteggiamento di alcuni clinici, di solito specialisti, di sostituire i laboratoristi nel ruolo di consulenti nell'impiego degli esami di laboratorio. Tuttavia, nel corso degli anni la complessità sempre maggiore delle tecnologie analitiche e informatiche impiegate ha cominciato a limitare addirittura l'*expertise* dei laboratoristi nei dettagli analitici più fini, dal momento che essi dipendevano sempre più dal produttore della strumentazione e dei reagenti.

La letteratura esaminata nel caso della biotina conferma che in tutti i casi solo il Laboratorio disponeva delle conoscenze che gli ha consentito di informare il prescrittore ospedaliero e territoriale e il paziente della necessità di sospendere l'assunzione di biotina per almeno 3 giorni (15 in presenza di insufficienza renale) prima dell'esecuzione del prelievo.

Se la concentrazione di biotina nel sangue è compresa di norma tra 0,12 e 0,36 nmol/L [23] e se le concentrazioni che possono interferire in alcune metodiche sono più alte di centinaia di volte (da 30 nmol/L a 300 nmol/L) il numero di soggetti che deve sospenderne l'assunzione per qualche giorno per evitare qualsivoglia problema è davvero modesto. Nel corso dell'intero 2016 le farmacie dei presidi ospedalieri della Romagna hanno distribuito 600 compresse di biotina da 5 mg per un solo paziente con una malattia rara [F. Pieraccini, W. Giannessi, comunicazione personale]. Con numeri di questo genere non sono convinto che sia utile inserire una nota ai referti di tutti gli esami immunometrici eseguiti dal Laboratorio. Non è più razionale, semplice ed efficace intercettare questi soggetti al momento dell'accettazione? In alcune regioni, come l'Emilia Romagna, praticamente la totalità delle prescrizioni è fatta in forma elettronica. I dirigenti dei Laboratori possono e devono segnalare alle strutture regionali responsabili dell'infrastruttura per la richiesta degli esami diagnostici a livello territoriale e al fornitore del Sistema Informatico di Laboratorio o di Ospedale, responsabili dell'infrastruttura per la richiesta degli esami diagnostici a livello di presidio ospedaliero, la necessità che l'informazione circa l'assunzione di alte dosi di biotina (e di molti altri farmaci e sostanze) sia fornita al momento dell'accettazione dell'esame.

In conclusione, il Laboratorio può/deve trovare il modo di occupare un vero ruolo di consulente per il clinico, il paziente e il cittadino per poter interpretare correttamente il risultato di un esame. Ancora una volta la raccomandazione, anche a costo di essere noioso, è quella di dare l'informazione giusta, nel modo giusto alla persona giusta.

Conflitti di interesse Nessuno.

Studi condotti su esseri umani e animali L'articolo non contiene alcuno studio eseguito su esseri umani e su animali da parte dell'autore.

Bibliografia

1. Wikipedia https://en.wikipedia.org/wiki/Biotin (Accesso 22 gennaio 2017)
2. Zempleni J, Wijeratne SS, Hassan YI (2009) Biotin. BioFactors 35:36–46
3. Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline (1998) Biotin in dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B_6, folate, vitamin B_{12}, pantothenic acid, biotin, and choline. National Academies Press, Washington DC, pp 374–389. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114310/ (Accesso 22 gennaio 2017)
4. Scientific Committee on Food Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (2006) Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals, European food safety authority. http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/efsa_rep/blobserver_assets/ndatolerableuil.pdf (Accesso 22 gennaio 2017)
5. Otten JJ, Hellwig JP, Meyers LD (eds) (2006) Dietary reference intakes: the essential guide to nutrient requirements. The National Academies Press, Washington (DC)
6. Zempleni J, Mock DM (1999) Biotin biochemistry and human requirements. J Nutr Biochem 10:128–138
7. Zempleni J, Hassan YI, Wijeratne SS (2008) Biotin and biotinidase deficiency. Expert Rev Endocrinol Metab 3:715–724
8. Wolf B, Grier RE, Secor McVoy JR et al (1985) Biotinidase deficiency: a novel vitamin recycling defect. J Inherit Metab Dis 8(Suppl 1):53–58
9. http://www.neoscreening.ch/it/ildeficitdibiotinidasi.htm (Accesso 22 gennaio 2017)
10. Dotti C, Fortunato A (2015) Le basi immunometriche: basi teoriche e applicazioni cliniche. Piccin, Bologna
11. Laitinen OH, Hytönen VP, Nordlund HR et al (2006) Genetically engineered avidins and streptavidins. Cell Mol Life Sci 63:2992–3017
12. Diamandis EP, Christopoulos TK (1991) The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. Clin Chem 37:625–636
13. Tate J, Ward G (2004) Interferences in immunoassay. Clin Biochem Rev 25:105–120
14. Sturgeon CM, Viljoen A (2011) Analytical error and interference in immunoassay: minimizing risk. Ann Clin Biochem 48:418–432
15. Després N, Grant AM (1998) Antibody interference in thyroid assays: a potential for clinical misinformation. Clin Chem 44:440–454
16. Dorizzi RM (2007) Rischi la tiroide, bellezza… Il sole 24 ore Sanità, 18–24 dicembre, p 29
17. Dale GL, Gaddy P, Pikul FJ (1994) Antibodies against biotinylated proteins are present in normal human serum. J Lab Clin Med 123:365–371
18. Rulander NJ, Cardamone D, Senior M et al (2013) Interference from anti-streptavidin antibody. Arch Pathol Lab Med 137:1141–1146
19. Chen T, Hedman L, Mattila PS et al (2012) Biotin IgM antibodies in human blood: a previously unknown factor eliciting false results in biotinylation-based immunoassays. PLoS ONE 7:e42376
20. Peltier L, Massart C, Moineau MP et al (2016) Anti-streptavidin interferences in Roche thyroid immunoassays: a case report. Clin Chem Lab Med 54:e11–e14
21. Rodriguez-Borja E, Barba-Serrano E, Alfayate-Guerra R et al (2016) The unfinished story of interference in thyroid hormones with Roche immunoassays: when prewashing procedures matter. Clin Chem Lab Med. doi:10.1515/cclm-2016-0886
22. Henry JG, Sobki S, Arafat N (1996) Interference by biotin therapy on measurement of TSH and FT4 by enzyme immunoassay on Boehringer Mannheim ES700 analyser. Ann Clin Biochem 33:162–163
23. Piketty ML, Polak M, Flechtner I et al (2016) False biochemical diagnosis of hyperthyroidism in streptavidin-biotin-based immunoassays: the problem of biotin intake and related interferences. Clin Chem Lab Med. doi:10.1515/cclm-2016-0606
24. Package insert (2014) Elecsys TSH immunoassay. Roche Cobas, Mannheim
25. https://pim-eservices.roche.com/eLD/(S(hsvsujz4zkus55oqcmxwwhcu))/es/it/Documents/GetDocument?documentId=de2eafb8-03f2-e311-98a1-00215a9b0ba8 (Accesso 26 febbraio 2017)
26. http://www.roche-diagnostics.ch/content/dam/corporate/roche-dia_ch/documents/serumindices/Interferences_Immunologie.pdf (Accesso 22 gennaio 2017)
27. https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf15/K152227.pdf (Accesso 22 gennaio 2017)
28. https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfres/res.cfm?id=118059 (Accesso 22 gennaio 2017)
29. http://www.nutritionforest.com/biotin-10000-mcg.html (Accesso 22 gennaio 2017)
30. Meany DL, Jan de Beur SM, Bill MJ et al (2009) A case of renal osteodystrophy with unexpected serum intact parathyroid hormone concentrations. Clin Chem 55:1737–1739
31. Waghray A, Milas M, Nyalakonda K et al (2013) Falsely low parathyroid hormone secondary to biotin interference: a case series. Endocr Pract 19:451–455
32. Kwok JS, Chan IH, Chan MH (2012) Biotin interference on TSH and free thyroid hormone measurement. Pathology 44:278–280
33. Wijeratne NG, Doery JC, Lu ZX (2012) Positive and negative interference in immunoassays following biotin ingestion: a pharmacokinetic study. Pathology 44:674–675
34. Barbesino G (2016) Misdiagnosis of Graves' disease with apparent severe hyperthyroidism in a patient taking biotin megadoses. Thyroid 26:860–863
35. Kummer S, Hermsen D, Distelmaier F (2016) Biotin treatment mimicking Graves' disease. N Engl J Med 375:704–706
36. Trambas CM, Sikaris KA, Lu ZX (2016) More on biotin treatment mimicking Graves' disease. N Engl J Med 375:1698
37. Kummer S, Hermsen D, Distelmaier F (2016) More on biotin treatment mimicking Graves' disease. N Engl J Med 375:1699
38. Elston MS, Sehgal S, Du Toit S et al (2016) Factitious Graves' disease due to biotin immunoassay interference—a case and review of the literature. J Clin Endocrinol Metab 101:3251–3255
39. Minkovsky A, Lee MN, Dowlatshahi M et al (2016) High-dose biotin treatment for secondary progressive multiple sclerosis may interfere with thyroid assays. AACE Clin Case Rep 2:e370–e373
40. Sedel F, Papeix C, Bellanger A et al (2015) High doses of biotin in chronic progressive multiple sclerosis: a pilot study. Mult Scler Relat Disord 4:159–169
41. Batista MC, Ferreira CE, Faulhaber AC et al (2016) Biotin interference in immunoassays mimicking subclinical Graves' disease and hyperestrogenism: a case series. Clin Chem Lab Med. doi:10.1515/cclm-2016-0628
42. Mattman A, DeMarco ML, Wong S et al (2016) Grave clinicopathologic correlation: a case of hyperthyroxemia. JALM 1:310–314
43. Baum JE, Master SR (2016) Defying gravity. JALM 1:247–249
44. Barbesino G (2016) The unintended consequences of biotin supplementation: spurious immunoassay results lead to misdiagnoses.

Bench Matters December. https://www.aacc.org/publications/cln/articles/2016/december/bench-matters-december-2016 (Accesso 22 gennaio 2017)
45. Seaborg E (2016) Thyroid month: beware of biotin. In: Endocrine news. Endocrine Society, Washington DC. http://endocrinenews.endocrine.org/january-2016-thyroid-month-beware-of-biotin/ (Accesso 22 gennaio 2017)
46. Paxton A. Beauty fad's ugly downside: test interference. http://captodayonline.com/beauty-fads-ugly-downsidetest-interference/ (Accesso 22 gennaio 2017)
47. http://www.albertahealthservices.ca/assets/wf/lab/wf-lab-bulletin-biotin-interference-with-laboratory-testing.pdf (Accesso 22 gennaio 2017)
48. http://www.calgarylabservices.com/files/HealthcareProfessionals/Memos/2016-10-21.pdf (Accesso 22 gennaio 2017)
49. http://pathlabs.ufl.edu/tests/carcinoembryonic-antigen-cea (Accesso 22 gennaio 2017)
50. http://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/Specimen/8939 (Accesso 22 gennaio 2017)
51. https://graphpaperdiaries.com/2016/10/05/a-quick-warning-about-biotin-supplements-aka-numbers-still-arent-magic/ (Accesso 22 gennaio 2017)
52. If you are taking sneaky Biotin tell your doctor before they do blood tests. http://multiple-sclerosis-research.blogspot.com/2016/04/if-you-are-taking-sneaky-biotin-tell.html (Accesso 22 gennaio 2017)
53. http://medday-lab.com/ (Accesso 22 gennaio 2017)
54. Dorizzi RM (2006) Consulting: il supporto all'interpretazione. RIMeL/IJLaM 2:68–84