

# DASA

## Regional Minas Gerais

### Revista Inovar

Edição 17 – Set/Dez 2017

*A suplementação de biotina e a interferência em exames analisados por imunoenensaio*



## São Marcos

SAÚDE E MEDICINA DIAGNÓSTICA

Dra. Yolanda Schrank, Dra. Paula Bruna, Dra. Eliana Labes,  
Dra. Margarete Tonetti e Dr. Mario Augusto Junior\*

## A suplementação de biotina e a interferência em exames analisados por imunensaio

O que vc deve saber sobre os resultados laboratoriais se seu paciente está em suplementação de biotina



## A BIOTINA É UMA VITAMINA HIDROSSOLÚVEL, TAMBÉM CONHECIDA COMO VITAMINA H.

Participa como cofator de uma série de reações de carboxilação. Na dieta apresenta-se principalmente ligada a proteínas. A enzima biotinidase intestinal quebra a ligação proteica, permitindo sua absorção. Algumas vezes, forma ligações não covalentes com a avidina, proteína da clara do ovo; portanto, a ingestão de ovo cru inibe sua absorção. No intestino é absorvida ligada à lisina como peptídeo biocitina. A enzima biocitinase plasmática catalisa a hidrólise da biocitina, produzindo biotina livre.

A necessidade de biotina para adultos é de 35-100 mcg/dia, quantidade normalmente obtida por meio de dieta, pois está contida em boas quantidades no leite, nos ovos, no fermento, no fígado, nos rins e no pâncreas. Fontes mais pobres incluem cereais, frutas, legumes e carne. A microflora intestinal também contribui com a produção de biotina. Portanto, a deficiência de biotina é incomum, produzindo sintomas como anorexia, náuseas, vômitos, glossite, palidez, depressão e dermatite escamosa. O uso exógeno está indicado no tratamento de certas patologias, em doses elevadas, como na esclerose múltipla (300 mg/dia), bem como em outras doenças metabólicas hereditárias, como a doença dos gânglios da base responsiva à tiamina/biotina e a deficiência de biotinidase. A deficiência de biotinidase leva a distúrbios neurológicos severos. A utilização da biotina tem se popularizado por meio de produtos para os cabelos, as unhas e polivitamínicos.

Nos últimos anos, tem se observado interferência em certos exames laboratoriais que utilizam biotina nos ensaios. Em 2016, a Endocrinology Society alertou para o problema. Entre eles há diversas dosagens hormonais, especialmente dos hormônios tireoideanos, alterações que já estão bem documentadas por meio de trabalhos. Mas o tratamento com biotina interfere potencialmente em imunoenaios que utilizam a ligação biotina-estreptavidina, tais como marcadores tumorais,

Apesar da interferência da biotina nos ensaios que usam a reação biotina-streptavidina ser conhecida de longa data, os trabalhos alertando para a interferência da biotina em dosagens hormonais começaram a aparecer em 2012, com um "boom" em 2016, (...) que coincide com a prescrição cada vez mais rotineira de megassuplementação de biotina, em doses de até 100 - 1.000 vezes a IDR



vitaminas, marcadores cardíacos, marcadores inflamatórios, exames toxicológicos, farmacológicos e testes sorológicos, embora haja poucos estudos a respeito (Figura 1). Embora os fabricantes tenham conhecimento desse problema em potencial, essa informação não tem sido usualmente reportada pelos laboratórios. Portanto, a discordância dos resultados laboratoriais com a clínica do paciente deve ser avaliada com cautela, averiguando se ele faz uso de biotina exógena. A interferência pode ocorrer gerando falsas elevações ou falsas reduções nas dosagens, bem como falsos-positivos ou falsos-negativos na sorologia. Isto depende do tipo de imunoenensaio utilizado, com falsa elevação nos ensaios competitivos e falsa redução em ensaios imunométricos tipo sanduíche.

Importante ressaltar que existem outros ensaios que não utilizam a streptavidina-biotina para dosar estes analitos quando houver suspeita da interferência.

O termo Elisa vem do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, que em português equivale a ensaio imunoenzimático. É um dos métodos imunológicos mais utilizados para quantificar a concentração de antígenos e anticorpos, por apresentar grande sensibilidade e especificidade.

Os métodos Elisa podem assumir uma forma competitiva ou não competitiva. Num Elisa competitivo, o analito aparece em concentrações variáveis na mistura da reação em contato com o anticorpo específico, e compete com uma quantidade constante de analito previamente imobilizado na fase sólida. A concentração do anticorpo deve ser limitada, a fim de assegurar a eficácia da competição. No ensaio não competitivo, o anticorpo reage proporcionalmente com a quantidade de analito da amostra. Em ambos os métodos, a quantidade de anticorpo, que no final se mostra ligado à fase sólida, é direta ou inversamente proporcional à quantidade de analito na amostra original.

Tabela 1. Analitos cujos ensaios sofrem interferência das concentrações de biotina

| Hematologia                               | Hormônios       | Tireoide                                | Oncologia      | Infectologia  | Farmacologia/ Toxicologia | Inflamação                   |                 |
|-------------------------------------------|-----------------|-----------------------------------------|----------------|---------------|---------------------------|------------------------------|-----------------|
| Eritropoetina                             | ACTH            | ATG                                     | CEA            | Hepatite B    | Carbamazepina             | 6-acetilmorfina              | C1-inibidor     |
| Ferritina                                 | AMH(Mulleriano) | TPO                                     | AFP            | Hepatite A    | Ciclosporina              | Acetoaminofeno               | C3 / C4         |
| Folato                                    | Androstenediona | TRAb                                    | CA 125         | Hepatite C    | Digitoxina                | Anfetamina                   | PCR             |
| Vitamina B12                              | Cortisol        | Calcitonina                             | CA 15.3        | HIV           | Digoxina                  | Barbitúrico                  | Ig A / IgE      |
|                                           | Peptidio C      | T3 / T3L                                | CA 19.9        | C. difficile  | Gentamicina               | Benzodiazepínicos            | Ig G / IgM      |
| <b>Cardiologia</b>                        | DEA-S           | T4 / T4L                                | CA 72.4        | CMV           | Lidocaína                 | Cafeína                      | Interleucina-6  |
| BNP                                       | Estradiol       | Tireoglobulina                          | HE4            | H. Pyloti IgG | Lítio                     | THC                          | Interleucina-8  |
| CKMB                                      | FSH             | TSH                                     | Oncoproteínas  | Herpes I e II | Micofenolato              | Cocaína                      | Interleucina-10 |
| D-Dímero                                  | LH              |                                         | Gastrina       | Rubéola       | Fenobarbital              | Ecstasy                      | Pré-albumina    |
| Mioglobina                                | HbA1C           | <b>Metab. Ósseo</b>                     | Enolase        | Sífilis       | Fenitoína                 | Metadona                     | Procalcitonina  |
| Pró-BNP                                   | HCG             | Anti-CCP                                | FAP            | Toxoplasmose  | Procainamida              | Metaqualona                  | Tranferrina     |
| Troponina I                               | IGF-1           | Osteocalcina                            | Pró-gastrina   | Toxo-avidez   | Sirolimus                 | Methotrexato                 | TNF-alfa        |
| Troponina T                               | IGFBP-3         | PTH                                     | Proteína S-100 |               | Valproato                 | Opiáceo                      |                 |
|                                           | Inibina-A       | Vitamina D                              | sFlt-1<br>PSA  |               | Tacrolimus                | Fenciclidina                 |                 |
| <b>Gastroenterologia/<br/>Hepatologia</b> | Insulina        | Amino-Terminal<br>Propeptideo<br>tipo I |                |               | Teofilina                 | Propoxifeno                  |                 |
| Ác. Hialurônico                           | Progesterona    |                                         |                |               | Tobramicina               | Salicilato                   |                 |
| Propetideo Procolágeno<br>Tipo III        | Prolactina      |                                         |                |               | Vancomicina               | Antidepressivo<br>trícíclico |                 |
|                                           | SHBG            |                                         |                |               |                           |                              |                 |
|                                           | Testosterona    |                                         |                |               |                           |                              |                 |

## CASO CLÍNICO:

PACIENTE MBS, 44 ANOS, SEXO FEMININO, TELEFONA PARA O NÚCLEO DE ACESSORIA MÉDICA DO LABORATÓRIO, A PEDIDO DO MÉDICO SOLICITANTE, PARA QUESTIONAR OS SEGUINTE EXAMES LABORATORIAIS:

|      | 5/3/2017 | Valor de referência |
|------|----------|---------------------|
| T4L  | 6,0      | 0,7 a 1,9 ng/dL     |
| TSH  | 0,02     | 0,3 a 4,2 mcUI/mL   |
| T3L  | 810      | 200 a 420 pg/dL     |
| Trab | 50       | < 1,75 UI/L         |
| Tg   | 2,3      | 1,6 a 50,0 ng/mL    |

Relata que em função desses exames, realizou ultrassonografia (US) de tireoide com Doppler colorido e cintilografia e captação com I<sup>(123)</sup>, exames estes normais.

Ao ser questionada sobre uso de medicamentos, a paciente relata uso de Losartana 50 mg e “vitamina para o cabelo”. Nega uso de hormônio tireoideano.

Nega sintomas sugestivos de hipertireoidismo. Queixava-se apenas de cansaço e queda de cabelo.

## DISCUSSÃO:

Analisando os achados laboratoriais acima, destacamos TSH pouco suprimido e tireoglobulina inapropriadamente baixa para o nível das dosagens de T4L e Trab. Tal achado, no contexto de US e cintilografia de tireoide normais, falam contra o hipertireoidismo endógeno. A presença de hipertireoidismo exógeno pelo uso indevido de levotiroxina poderia ser cogitada, mas o Trab aumentado e cintilografia de tireoide normais descartam tal condição.

Na ausência de quadro clínico compatível com o achado laboratorial acima descrito, foi aventada a possibilidade de interferência no ensaio. Após discussão do caso com o médico assistente, a paciente foi orientada a retornar ao laboratório para a repetição dos exames após 72 horas sem fazer uso de qualquer fórmula ou vitamina. Foi mantido apenas o uso do anti-hipertensivo.

|      | 22/4/2017 | 5/3/2017 | Valor de referência |
|------|-----------|----------|---------------------|
| T4L  | 1,2       | 6,0      | 0,7 a 1,9 ng/dL     |
| TSH  | 1,8       | 0,02     | 0,3 a 4,2 mcUI/mL   |
| T3L  | 290       | 810      | 200 a 420 pg/dL     |
| TRAB | < 1,75    | 50       | < 1,75 UI/L         |
| Tg   | 29        | 2,3      | 1,6 a 50,0 ng/mL    |

Diante de uma rotina laboratorial totalmente normal, após suspensão das vitaminas, foi confirmada a interferência medicamentosa no ensaio. Como a vitamina para o cabelo continha biotina em altas concentrações [10 mg, mais de cem vezes a ingestão diária recomendada (IDR)], e diante de recentes estudos comprovando a interferência desta vitamina nos ensaios a base de biotina-streptavidina, confirmamos ser a biotina a causa das alterações laboratoriais encontradas na avaliação do dia 5/3/2017.

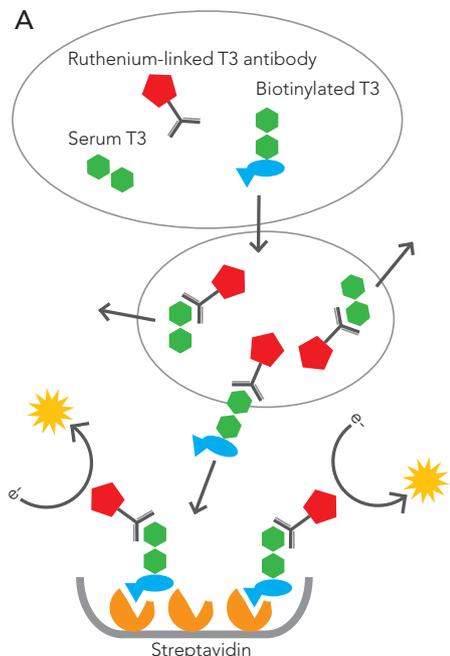
Apesar da interferência da biotina nos ensaios que usam a reação biotina-streptavidina ser conhecida de longa data, sendo inclusive descrita na bula do fabricante, os trabalhos alertando para a interferência da biotina em dosagens hormonais começaram a aparecer em 2012<sup>(3,4,5)</sup> com um “boom” em 2016, quando vários trabalhos sobre o assunto foram publicados. Este “boom” coincide com a prescrição cada vez mais rotineira de megassuplementação de biotina, em doses de até 100 - 1.000 vezes a IDR, para condições tais como *Diabetes mellitus* tipo 2<sup>(6)</sup>, problemas de pele e queda de cabelo. A partir de 2015, surgem vários trabalhos mostrando os benefícios da reposição de altas doses de biotina (até 10 mil vezes a IDR) na melhoria da qualidade de vida em pacientes com esclerose múltipla (EM)<sup>(7,8)</sup>, contribuindo ainda mais para o aumento no número de trabalhos publicados sobre a interferência da biotina nos mais diversos ensaios hormonais e não hormonais.

Doses baixas de biotina, como as encontradas em muitas vitaminas e suplementos, não produzem níveis séricos altos o suficiente para interferir nos ensaios laboratoriais, entretanto, alguns fabricantes como a Roche Diagnostics Inc. mencionam, na bula do ensaio, a possibilidade de interferência quando a suplementação de biotina é superior a 5 mg ao dia<sup>(9,10 e 11)</sup>.

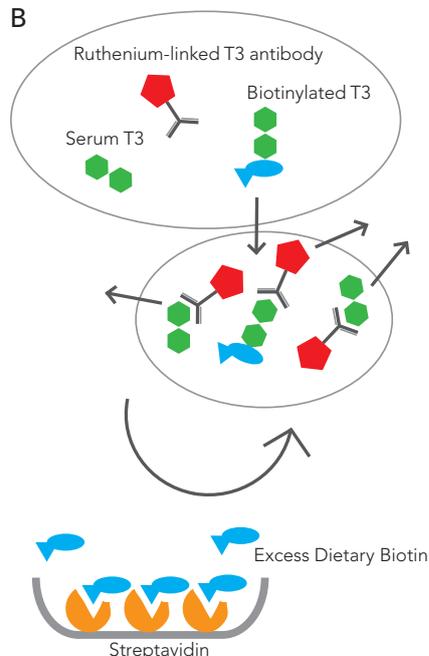
Muitos imunoenaios utilizam a biotina-streptavidina como sistema de imobilização de imunocomplexos. A streptavidina se liga à biotina com alta afinidade<sup>(12)</sup> e, como é uma molécula muito pequena, é facilmente incorporada a hormônios e anticorpos contra estes hormônios, tornando a sua aplicação bastante popular em ensaios laboratoriais de precisão. Dependendo do tipo de ensaio, competitivo ou imunométrico (sanduíche), altos níveis de biotina séricos podem resultar, respectivamente, em resultado falsamente elevado ou falsamente baixo, como ilustrado esquematicamente abaixo<sup>(13)</sup>:

Figura 1. Ensaio imunométrico (sanduíche).

**SEM A INTERFERÊNCIA DE BIOTINA**



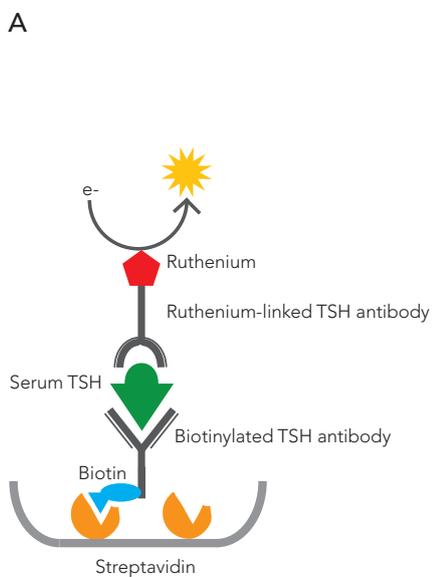
**COM A INTERFERÊNCIA DE BIOTINA**



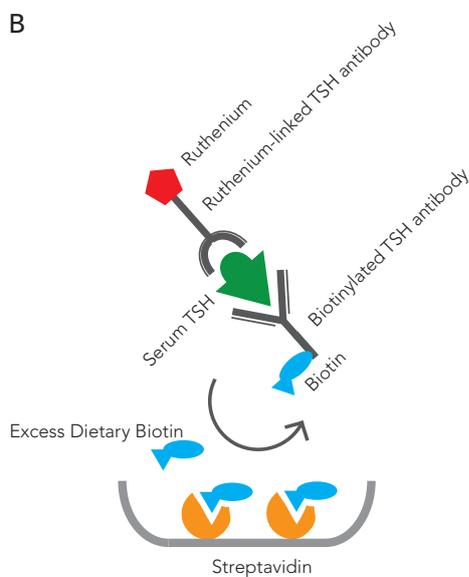
Adaptado de: Baesino G 2016. Misdiagnosis of Graves' Disease with Apparent Severe Hyperthyroidism in a Patient Taking Biotin Megadoses. Thyroid 26(6):860-863.

Figura 2. Imunoensaio competitivo.

**SEM A INTERFERÊNCIA DE BIOTINA**



**COM A INTERFERÊNCIA DE BIOTINA**



Adaptado de: Baesino G 2016. Misdiagnosis of Graves' Disease with Apparent Severe Hyperthyroidism in a Patient Taking Biotin Megadoses. Thyroid 26(6):860-863.

## FIGURA 1: ENSAIO IMUNOMÉTRICO (SANDUÍCHE)

A figura 1A ilustra um ensaio utilizado na quantificação sérica do TSH: o soro do paciente é incubado com uma mistura de anticorpos monoclonais anti-TSH biotinilado (ligado a biotina) e anti-TSH ligado ao rutênio (anticorpo revelador). Os imunocomplexos formados entre estes dois anticorpos e o TSH sérico são ancorados à fase sólida pela ligação de biotina a streptavidina. A quimioluminescência produzida pelo rutênio é diretamente proporcional a quantidade de TSH no ensaio.

A figura 1B ilustra como uma grande quantidade de biotina interfere na ancoragem dos imunocomplexos na fase sólida gerando, conseqüentemente, um falso resultado diminuído de TSH.

## FIGURA 2: IMUNOENSAIO COMPETITIVO

A figura 2A ilustra um ensaio utilizado na quantificação sérica do T3: o soro do paciente, contendo uma concentração desconhecida de T3, é incubado com anticorpo anti-T3 ligado ao rutênio (anticorpo revelador) em concentração conhecida. Dessa forma, as moléculas de T3 do soro do paciente se ligarão ao anticorpo anti-T3. Em seguida, é adicionada a essa mistura uma solução contendo T3 biotinilado (ligado à biotina), também em concentração conhecida, o qual irá ocupar os sítios de ligação ainda livres dos anticorpos anti-T3 ligados ao rutênio. Os complexos formados pelo anticorpo revelador e o T3 biotinilado são ancorados à fase sólida por meio da ligação da biotina à streptavidina, enquanto os complexos entre o T3 do soro do paciente e o anticorpo anti-T3 ligado ao rutênio ficam livres na fase líquida. Após remoção da fase líquida, a quimioluminescência emitida corresponderá aos complexos ligados à fase sólida e, portanto, será inversamente proporcional aos níveis de T3 na amostra de soro do paciente.

A figura 2B ilustra como uma grande quantidade de biotina interfere na ancoragem dos imunocomplexos na fase sólida gerando, conseqüentemente, um falso resultado elevado de T3.

Percebemos, portanto, que para ensaios que usam o sistema biotina-streptavidina na avaliação da função tireoideana, a presença de biotina em excesso resulta em achado laboratorial de hipertireoidismo indistinguível bioquimicamente do hipertireoidismo verdadeiro.

Alguns ensaios, nos quais a interação entre os antígenos ou anticorpos biotinilados e a streptavidina é estabelecida antes da incubação com o soro

do paciente, são mais resistentes à interferência da biotina em excesso<sup>(13)</sup>.

Voltando ao caso da nossa paciente, observamos que todas as dosagens realizadas utilizam o sistema biotina-streptavidina, sendo que aquelas cujo princípio é o ensaio competitivo resultaram em valores falsamente elevados e aquelas que usaram ensaio tipo sanduíche em resultado falsamente baixos:

|      | 5/3/2017       | Valor de referência | Tipo de ensaio |
|------|----------------|---------------------|----------------|
| T4L  | 10 (falso ↑)   | 0,7 a 1,9 ng/dL     | competitivo    |
| TSH  | 0,02 (falso ↓) | 0,3 a 4,2 mcUI/mL   | sanduíche      |
| T3L  | 810 (falso ↑)  | 200 a 420 pg/dL     | competitivo    |
| Trab | 50 (falso ↑)   | < 1,75 UI/L         | competitivo    |
| Tg   | 2,3 (falso ↓)  | 1,6 a 50,0 ng/mL    | sanduíche      |

Apesar de o caso relatado ilustrar uma paciente que sofreu interferência nas dosagens hormonais tireoideanas, os ensaios que utilizam o sistema biotina-streptavidina em sua preparação vão bem além daqueles que avaliam a tireoide. Na tabela 1, listamos outros exemplos de ensaios atualmente utilizados na DASA que são passíveis de interferência em casos de pacientes que fazem uso de suplementação de biotina em doses acima de 5 mg/dia (lembrando que com alguma frequência a utilização destes ensaios pode sofrer modificação, seja por desabastecimento ou melhorias no processo).

Tabela 2. Analitos dosados por testes que usam anticorpos monoclonais biotinilados

| Método IMUNOMÉTRICO (sanduíche) – Resultados falsamente baixos | Método COMPETITIVO – Resultados falsamente elevados |
|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| TSH                                                            | T3                                                  |
| Tireoglobulina                                                 | T4                                                  |
| FSH                                                            | FT4                                                 |
| LH                                                             | Ft3                                                 |
| PRL                                                            | Anti-TPO                                            |
| Insulina                                                       | Anti-Tireo                                          |
| Anti-HBc IGM                                                   | TRAB                                                |
| HbsAg                                                          | Testosterona                                        |
| CA 125                                                         | Estradiol                                           |
| CA 153                                                         | Progesterona                                        |
| CEA                                                            | Anti-Core (HBC total)                               |
| PRO-BNP                                                        | Anti-HAV G                                          |
| HCG                                                            | Anti-HAV M                                          |
| HIV                                                            | Hepatite C                                          |
|                                                                | SDHEA                                               |

## CONCLUSÃO

Diante da ampla gama de ensaios que utilizam o sistema biotina-streptavidina e da crescente importância da suplementação de biotina em megadoses, sobretudo para pacientes com EM, reforçamos que todo paciente com laboratório incompatível com a clínica deve ser revisto com cuidado, sendo recomendada a interrupção desses suplementos, dependendo da dose, até 48 a 72 horas antes da avaliação laboratorial<sup>(14)</sup>. ■

**\*Dra. Eliana Guimarães Labes**  
Médica patologista clínica.  
Graduada pela UNIFESP.  
Residência em patologia  
clínica pelo IAMSPE.

**\*Dra. Yolanda Schrank**  
Médica endocrinologista do corpo clínico DASA-RJ.  
Médica endocrinologista do corpo clínico do HFB.  
Título de especialista em endocrinologia  
e metabologia pela SBEM/AMB.  
Mestre em endocrinologia pela PUC-RJ.

**\*Dra. Paula Bruna Araujo**  
Médica endocrinologista DASA.  
Mestre em medicina (área de  
concentração em endocrinologia)  
pela Universidade Federal do  
Rio de Janeiro (UFRJ).  
*Clinical Fellowship* em endocrinologia  
oncológica pela University of Toronto.



**\*Dra. Margarete Tonetti**  
Biomédica do NAM/DASA-SP.

**\*Dr. Mario Augusto Paulo Junior**  
Médico patologista clínico.  
Residência médica e título de  
especialista em patologia clínica.

