



Osaamista  
ja oivallusta  
tulevaisuuden  
tekemiseen

Riina Vainionpää

# Biotiinihäiriön poistaminen streptavidiini- biotiini-tekniikkaan perustuvista immu- nologisista määrittämismenetelmistä

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikka (AMK)

Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Opinnäytetyö

16.4.2019

Tekijä(t) Otsikko	Riina Vainionpää Biotiinihäiriön poistaminen streptavidini-biotiini-tekniikkaan perustuvista immunologisista määritysmenetelmistä
Sivumäärä Aika	21 sivua 16.4.2019
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaaja(t)	Lehtori Merja Ojala Sairaalakemisti Henrik Alfthan
<p>Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää potilaan verinäytteessä olevan biotiinin mahdollisesti aiheuttamaa häiriötä biotiini-streptavidini-tekniikkaan perustuvissa menetelmissä. Lisäksi opinnäytetyössä testattiin erilaisia tekniikoita, joiden avulla biotiinin aiheuttama häiriö voitaisiin poistaa näytteistä. Opinnäytetyö tehtiin yhteistyössä HUSLABin erikoiskemian laboratorion kanssa.</p> <p>Opinnäytetyössä seerumipoolista ja biotiiniliuksesta tehtiin laimennussarjoja. Sarjoista analysoitiin Anti-Müllerian hormoni- sekä progesteronimääritykset. Näiden määritysten avulla saatiin selville, aiheuttaako biotiini häiriötä biotiini-streptavidini-tekniikkaan perustuvissa määritysmenetelmissä. Lisäksi häiriön poistamiseksi kokeiltiin kolmea eri menetelmää; streptavidiinilla päällystettyjä mikrotiitterilevyjä, kaupallisia streptavidiinilla päällystettyjä magneettipartikkeleita sekä Anti-Müllerian-hormonin sekä progesteronin määritykseen käytettävästä reagenssista ylijääviä streptavidiinilla päällystettyjä magneettipartikkeleita. Käsitellyistä näytteistä määritettiin Anti-Müllerian hormoni- tai progesteronipitoisuudet.</p> <p>Määrityksistä saadut tulokset olivat selkeitä. Näytteen biotiinimäärän kasvaessa kasvoi myös mitattu progesteronipitoisuus. Mitattu Anti-Müllerian hormonipitoisuus taas laski biotiinimäärän kasvaessa. Streptavidiinilla päällystetty mikrotiitterilevy vähensi biotiinin aiheuttamaa tulosten vääristymää hieman. Molemmilla magneettipartikkeliliuoksilla analysaattorin määrittämä AMH-pitoisuus saatiin samalle tasolle kuin se oli ennen biotiinin lisäämistä näytteisiin.</p> <p>Tuloksien perusteella voidaan päätellä, että biotiini aiheuttaa häiriötä biotiini-streptavidini-tekniikkaan perustuvissa menetelmissä varsinkin silloin, kun sitä on paljon veressä. Häiriön poistaminen on kuitenkin testatuilla menetelmillä mahdollista. Parhaimmaksi menetelmäksi osoittautui kaupallisen magneettipartikkeliliuoksen käyttäminen. Reagenssista ylijäävään liuokseen verrattuna kaupallista liuosta ei tarvita niin paljoa, joten näyte on helpompi käsitellä. Lisäksi täytyy miettiä, tuleeko laboratoriossa tarpeeksi ylijäämäreagenssia, että tarvittavat näytteet saadaan käsiteltyä. Mikrotiitterilevyn käyttäminen biotiinin poistamiseen oli hankalaa ja aikaavievää.</p>	
Avainsanat	biotini, biotiini-streptavidini-tekniikka, kliininen kemia

Author(s) Title	Riina Vainionpää Removing the biotin interference in immunological assays based on streptavidin biotin method
Number of Pages Date	21 pages 16 April 2019
Degree	Biomedical Laboratory Scientist (Bachelor of Health Care)
Degree Programme	Degree Programme in Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructor(s)	Merja Ojala, Lecturer Henrik Alfthan, Clinical Chemist
<p>The purpose of this study was to solve whether the biotin in patients' blood samples causes interference on assays based on streptavidin biotin method. Furthermore, many different techniques were implemented in the study with which the interference caused by the biotin could be eliminated from the samples. This study was made in collaboration with HUSLAB clinical chemistry laboratory.</p> <p>In the study dilution series were made from serum pool and biotin. Anti-Müllerian hormone and progesterone levels were assayed from these series. With the help of these assays it was possible to determine if the biotin causes interference in assays based on biotin streptavidin method. Also three different techniques were tested to see if it is possible to remove the biotin interference. Those techniques were streptavidin coated plates, commercial streptavidin coated magnetic particles and similar streptavidin coated magnetic particles gathered from excess reagent.</p> <p>Results from the assays were clear. When the amount of biotin increases also the measured amount of progesterone increases. Measured Anti-Müllerian hormone amount decreases as the biotin amount increases. Processing samples with streptavidin coated plates it was possible to reduce the interference caused by biotin. Both magnetic particle solutions were able to reduce the biotin interference and achieve the original Anti-Müllerian hormone level of the serum pool.</p> <p>Based on the results biotin in blood samples causes an interference on assays based on streptavidin biotin method. After all it is possible to eliminate the interference with the techniques tested on this study. Turns out the best one out of three techniques is to use the commercial streptavidin coated magnetic particles. Compared to the other ones the commercial solution is easier and faster to use. Also it should be taken into consideration whether there will be enough magnetic particle solution to be gathered from excess reagent so the necessary samples will be processed. Using the streptavidin coated plates for eliminating biotin is both inconvenient and time-consuming.</p>	
Keywords	biotin, biotin streptavidin technique, clinical chemistry

## Sisällys

1	Johdanto	1
2	Biotiinihäiriöt immunologisissa määritysmenetelmissä	1
2.1	Biotiini-streptavidini-tekniikka	2
2.2	Anti-Müllerian hormoni ja progesteroni	2
2.3	Anti-Müllerian hormoni- ja progesteronitutkimusten mittausperiaatteet	3
2.3.1	Anti-Müllerian hormonitutkimus	3
2.3.2	Progesteronitutkimus	4
3	Tarkoitus, tavoitteet ja tutkimuskysymykset	5
4	Opinnäytetyön toteuttaminen	6
4.1	Näytteiden valmistaminen	6
4.2	Biotiinin poistaminen	7
4.2.1	Kaupallinen magneettipartikkeli	7
4.2.2	Reagenssin ylijäämäpartikkeli	8
4.2.3	Mikrotiitterilevy	9
4.3	Analysointi	9
5	Tulokset	10
5.1	Biotiinin vaikutus progesteronimääritykseen	10
5.2	Biotiinin vaikutus Anti-Müllerian hormonimääritykseen	11
5.3	Biotiinin poistaminen reagenssin ylijäämäpartikkeleilla	13
5.4	Biotiinin poistaminen kaupallisilla magneettipartikkeleilla	14
5.5	Biotiinin poistaminen mikrotiitterilevyn avulla	16
6	Pohdinta	17
6.1	Tulosten tarkastelu ja johtopäätökset	17
6.2	Luotettavuus ja eettisyys	18
6.3	Kehittämisehdotukset	19
6.4	Ammatillinen kasvu	19
	Lähteet	21

## 1 Johdanto

Immunologiset määrittymenetelmät ovat käytössä yleisesti laboratorioissa. Menetelmien etuna on esimerkiksi tarkkuus ja herkkyys. Vaikka menetelmät ovat yleisesti luotettavia, niissä on tiettyjä heikkouksia. Immunologiset määrittymenetelmät ovat alttiita endogeenisille häiriöille, eli näytteen sisäisille muuttujille, jotka voivat aiheuttaa virheellisiä tuloksia. (Piketty – Polak – Flechtner – Gonzales-Briceno – Souberbielle 2016.)

Suuria määriä biotiinia sisältävien vitamiinivalmisteiden ja lääkkeiden suosio on viime aikoina lisääntynyt. Se on tuonut esille uuden ongelman biotiini-streptavidini-tekniikkaan perustuvissa määrittymenetelmissä. Verinäytteessä oleva ylimääräinen biotiini voi aiheuttaa virheellisen korkeita tai matalia tuloksia biotiini-streptavidini-tekniikkaan perustuvissa laboratoriotutkimuksissa. Reagenssi- ja laitevalmistajat eivät ole osanneet varautua näin suuriin biotiinipitoisuuksiin veressä, jolloin sitä ei ole osattu huomioida menetelmien kehittämisessä.

Ongelmaa on tärkeä tutkia, sillä korkea biotiinipitoisuus voi aiheuttaa virhelähteitä näytteen diagnosoinnissa, ja virheellisellä laboratoriotuloksella voi olla suuri merkitys potilaan hoidossa. Opinnäytetyö tehtiin yhteistyössä Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin laboratorio-organisaation, HUSLABin, erikoiskemian laboratorion kanssa. Opinnäytetyön tarkoitus on selvittää, minkälaiset biotiinimäärät häiritsevät eräitä biotiini-streptavidini-tekniikkaa hyödyntäviä määrittymenetelmiä. Lisäksi kokeillaan myös muutamia erilaisia tapoja poistaa analysointia häiritsevää biotiinia näytteestä.

## 2 Biotiinihäiriöt immunologisissa määrittymenetelmissä

Immunologiset määrittymenetelmät perustuvat vasta-aineen ja antigeenin väliseen vuorovaikutukseen. Näissä menetelmissä antigeeni tai vasta-aine on leimattu merkkiaineella. Merkkiaineita on useita erilaisia. Määrittymenetelmät perustuvat merkkiaineiden pitoisuuden mittaamiseen, jolloin pystytään selvittämään tutkittavan aineen pitoisuus. Esimerkiksi ELISA-testeissä leimattu merkkiaine on entsyymi. Leimattu merkkiaine voi testistä riippuen olla sidottuna esimerkiksi magneettisiin mikropartikkeleihin. (Savolainen – Parviainen 2010.)

## 2.1 Biotiini-streptavidiini-tekniikka

Biotiinina tunnettu B7-vitamiini on vesiliukoinen koentsyymi. Biotiinia löytyy jokaisesta elävästä solusta, varsinkin sitoutuneena proteiineihin ja polypeptideihin. Ravinnosta sitä saadaan pieninä määrinä esimerkiksi liha- ja maitotuotteista. Biotiinivalmisteita markkinoidaan erityisesti hiusten ja kynsien hyvinvoinnin edistämiseen. (PubChem 2004.) Suuria määriä biotiinia sisältäviä lääkkeitä käytetään myös esimerkiksi MS-taudin hoidossa (Trambas – Lu – Yen – Sikaris 2017).

Biotiinin farmakokinetiikka tunnetaan hyvin. Se poistuu elimistöstä suhteellisen nopeasti, riippuen kuitenkin otetun biotiinin määrästä. Esimerkiksi 10 milligramman annoksen ei pitäisi aiheuttaa häiriötä laboratoriotutkimuksissa, jos biotiinivalmisteen ottamisen ja verinäytteenoton välissä on kulunut kahdeksan tuntia. (Grimsey ym. 2017.) Arvioidaan, että 100 milligramman biotiiniannos voi nostaa veren biotiinipitoisuuden noin 400 ng/ml tasolle. Kuitenkaan 300 milligramman annos ei kolminkertaista tuota pitoisuutta, vaan silloin arvioitu veren biotiinipitoisuus on 800 ng/ml. (Trambas ym. 2017.)

Streptavidiini on bakteerista eristetty proteiini. Streptavidiinin ja biotiinin välillä on voimakas affiniteetti eli kemiallinen vetovoima. Streptavidiini pystyy sitoutumaan neljään biotiinimolekyyliin. Tämän ominaisuuden vuoksi eräissä immunologisissa määritysmenetelmissä käytetään hyväksi biotiinin ja streptavidiinin välistä reaktiota. (Thermo Fisher Scientific.)

Biotiini-streptavidiini-tekniikkaa käytetään monissa laboratoriotutkimuksissa. Se on yleinen esimerkiksi hormonimäärityksissä. Anti-Müllerian hormonin ja progesteronin määritykset perustuvat tähän tekniikkaan. Lisäksi biotiini-streptavidiini-tekniikkaa voidaan käyttää esimerkiksi sydäninfarktidiagnostiikassa käytetyn herkän Troponiini T:n (Troponin T hs) määrittämisessä. (Trambas ym. 2017.)

## 2.2 Anti-Müllerian hormoni ja progesteroni

Anti-Müllerian hormoni (AMH) on glykoproteiini. Veren AMH-pitoisuus kertoo tarkasti munasarjojen fysiologisesta tilasta. Tällä hormonilla on vaikutusta myös kuukautishäiriöissä ja hedelmällisyydessä. AMH-tason mittaaminen auttaa myös granuloosasolukasvaimien diagnosoinnissa ja seurannassa. (Rzeszowska ym. 2016.)

Progesteroni on hormoni, jota tuotetaan pääasiassa keltarauhasessa ja raskauden aikana istukassa. Veren progesteronitaso muuttuu keltarauhasen kehittyessä ja palautuessa. Hormonin pitoisuus nousee hieman ennen ovulaatiota ja pysyy koholla kuukautiskierron luteaalivaiheen ajan. Hormonitason vaihtelun vuoksi progesteronimäärän mittausta käytetään ovulaation havaitsemiseksi ja kierron luteaalivaiheen määrittämiseksi. (Roche Diagnostics 2016b.)

### 2.3 Anti-Müllerian hormoni- ja progesteronitutkimusten mittausperiaatteet

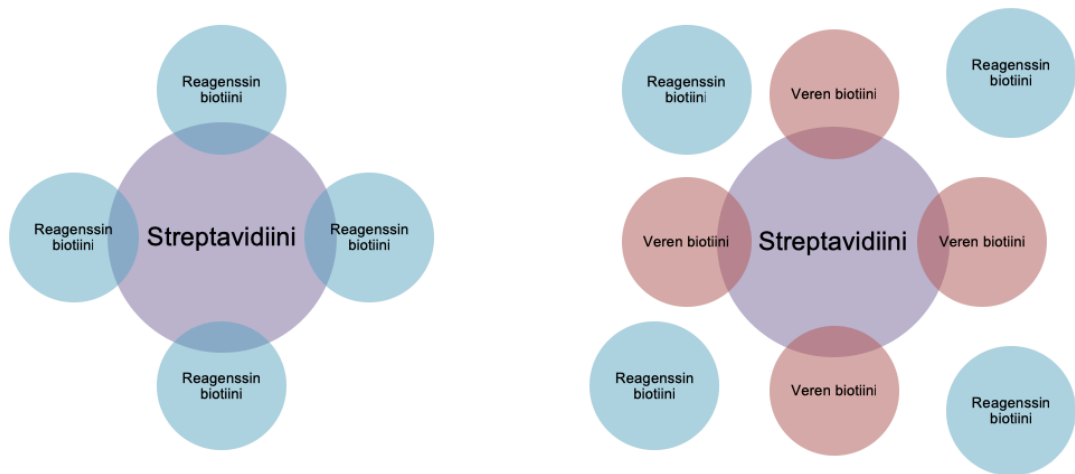
Anti-Müllerian hormonin ja progesteronin määritysten keskeinen osuus on biotiinin ja streptavidiinin välinen voimakas affiniteetti. Jos verinäytteessä on paljon ylimääräistä biotiinia valmiiksi, voi laboratoriotutkimuksen tulos olla virheellinen (Trambas ym. 2017).

#### 2.3.1 Anti-Müllerian hormonitutkimus

Anti-Müllerian hormonin määritysmenetelmä perustuu elektrokemiluminesenssitekniikkaan. Menetelmässä aluksi inkuboidaan näytettä, johon on lisätty AMH:lle spesifistä monoklonaalista vasta-ainetta, johon on liitetty biotiini. Lisäksi seokseen lisätään myös monoklonaalista AMH-spesifistä vasta-ainetta, joka on merkitty ruteniumilla. Rutenium toimii menetelmässä merkkiaineena. Nämä aineet sitoutuvat muodostaen niin sanotun sandwich-rakenteen. Sen jälkeen lisätään reagenssia, jossa on streptavidiinilla päällystettyjä magneettisia mikropartikkeleita. Biotiinin ja streptavidiinin vuorovaikutuksen ansiosta aineet muodostavat kompleksin, joka sitoutuu kiinteään faasiin. Reaktioseos siirretään mittauskennoon, jossa mikropartikkelit kiinnitetään magneetin avulla elektrodin pinnalle. Sitoutumattomat partikkelit poistetaan seoksesta puskuriliuoksen avulla. Elektrodiin ohjattavan jännitteen avulla saadaan aikaan kemiluminesenssireaktio, joka mitataan valonvahvistimen avulla. (Roche Diagnostics 2016a.) Mittaustulos on suoraan verrannollinen näytteen sisältämään AMH-pitoisuuteen (HUSLAB 2017).

Jotta AMH-määritysmenetelmä toimisi oikein, pitäisi reagenssin streptavidiini-magneettipartikkeliin tarttua biotiinilla leimattu AMH:lle spesifinen vasta-aine. Kuitenkin, jos näytteessä on ylimääräistä biotiinia, se vie biotiinilla leimatun vasta-aineen paikan streptavidiinin pinnalta, jolloin AMH ja siihen tarttunut biotiinilla leimattu vasta-aine huuhtoutuvat pois pesussa. Tällöin analysaattorin mittaama tulos jää todellisuutta matalammaksi, koska mitattava Anti-Müllerian hormoni on pesty pois ennen mittausta. Kuviossa 1 on

kuvattu tilanteet normaalista analysointitilanteesta ja tilanteesta, jossa verinäytteessä oleva ylimääräinen biotiini häiritsee määrittystä. (HUSLAB 2017.)



Kuvio 1. Kuviossa on kuvattu tilanne, jossa reagenssin biotiinit ja streptavidini sitoutuvat toisiinsa, sekä tilanne, jossa näytteessä ylimääräisenä oleva biotiini sitoutuu reagenssin streptavidiniin, jolloin reagenssin biotiinit jäävät sitoutumatta.

### 2.3.2 Progesteronitutkimus

Progesteronin määrittäminen perustuu elektrokemiluminesenssitekniikkaan. Menetelmässä näytettä inkuboidaan progesteroni-spesifisen vasta-aineen kanssa. Vasta-aineeseen on liitetty biotiini-molekyyli. Näistä muodostuu immunokomplekseja, joiden määrä riippuu analysoidun aineen määrästä näytteessä. Tämän jälkeen seokseen lisätään streptavidiinilla päällystettyjä magneettisia mikropartikkeleita sekä ruteniumilla merkittyä progesteronijohdannaisia. Tässä vaiheessa vapaat biotiinia sisältävät vasta-aineet sitoutuvat muodostaen vasta-aine-hapteeni-komplekseja. Koko kompleksi sitoutuu kiinteään faasiin biotiinin ja streptavidiinien välisen vuorovaikutuksen ansiosta. Reaktio siirretään mittauskammioon, jossa magneetin avulla mikropartikkelit kiinnitetään elektrodin pinnalle. Sitoutumattomat aineet poistetaan seoksesta puskuripesun avulla. Kuten AMH-määrittämisessä, myös tässä menetelmässä elektrodiin ohjattava jännite saa aikaan kemiluminesenssireaktion, joka voidaan mitata valonvahvistimen avulla. (Roche Diagnostics 2015.) Mittaustulos on kääntäen verrannollinen näytteen sisältämään progesteronipitoisuuteen (HUSLAB 2018).



Jotta progesteronin määrittäminen toimisi suunnitellulla tavalla, tulee biotiinilla leimatun progesteroni-spesifisen vasta-aineen tarttua näytteen progesteroniin. Kun näytteen kaikki progesteroni on tarttunut biotiinilla leimattuun vasta-aineeseen, lisätään joukkoon merkkiaineella leimattuja progesteronijohdannaisia. Leimattu progesteroni yhdistyy vapaisiin biotiinilla leimattuihin vasta-aineisiin. Mittaustilanteessa tämä reagenssin leimattu progesteroni on mitattava kohde. Mitä enemmän potilasnäytteessä on progesteronia, sitä vähemmän merkkiaineella leimattua progesteronia päätyy mittaustilanteeseen ja mitattu määrä jää pienemmäksi. Koska menetelmä on kääntäen verrannollinen, laite kääntää mitatun tuloksen: mitä enemmän komplekseja mitattiin, sitä vähemmän potilasnäytteessä on progesteronia. Jos näytteessä on ylimääräistä biotiinia, se vie tilaa streptavidini-magneettipartikkelien pinnalta. Silloin vähemmän merkkiaineella leimattua progesteronia päätyy mittaustilanteeseen ja analysaattori ei mittaa komplekseja, jolloin se olettaa näytteessä olevan todellisuutta enemmän progesteronia ja lopullinen tulos on todellista tilannetta korkeampi. (HUSLAB 2018.)

### **3 Tarkoitus, tavoitteet ja tutkimuskysymykset**

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia, millaisilla menetelmillä biotiini-streptavidini-tekniikkaan perustuvia menetelmiä häiritsevä ylimääräinen biotiini voidaan poistaa, jotta tulokset eivät olisi virheellisiä. Tilanteita varten, jolloin näytteessä on analyysiä häiritsevä määrä biotiinia, opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää rutiinimenettely, jonka avulla voidaan poistaa ylimääräinen biotiini näytteestä.

Tutkimuksessa testattiin biotiinin poistamiseksi Roche cobas e 411 –analysaattorin reagenssina toimivaa liuosta, jossa on streptavidiinilla päällystettyjä magneettipartikkeleita, samankaltaista kaupallista magneettipartikkeliliuosta sekä streptavidiinilla päällystettyä mikrotiiterilevyä. Niiden ominaisuuksia voidaan vertailla tutkimuskysymysten avulla. Tutkimuskysymykset ovat:

1. Minkälainen määrä biotiinia näytteessä häiritsee biotiini-streptavidini-tekniikkaan perustuvien AMH- ja progesteronipitoisuuksien määrittäystä?
2. Mikä menetelmästä on tehokkain biotiinihäiriön poistamiseen?
3. Mikä biotiinihäiriön poistamismenetelmästä on kustannuksiltaan edullisin?

## 4 Opinnäytetyön toteuttaminen

Opinnäytetyö toteutettiin syksyn 2018 ja kevään 2019 aikana. Syys- ja lokakuussa 2018 kirjoitettiin opinnäytetyön suunnitelma. Suunnitelma esiteltiin suunnitelmaseminaarissa 10.10.2018. Kun opinnäytetyösuunnitelma oli hyväksytty, haettiin opinnäytetyölle Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiriltä tutkimuslupa ja solmittiin osapuolten välinen sopimus projektista.

Opinnäytetyön toiminnallinen osuus toteutettiin viikoilla 49-50 HUSLABin erikoiskemian laboratoriossa. Toiminnallisen osuuden valmistuttua saadut tulokset koottiin yhteen. Tämän jälkeen tammikuussa 2019 aloitettiin kirjoittamaan opinnäytetyön raporttia. Tässä vaiheessa analysoitiin aiemmin saatuja tutkimustuloksia. Opinnäytetyön raportti palautettiin 3.4.2019 opponentin ja ohjaavan opettajan tarkasteltavaksi. Opinnäytetyön raportointivaiheen seminaari järjestetään 9.-10.4.2019. Lopullinen opinnäytetyön raportti palautettiin 16.4.2019.

Laboratoriotyöskentely toteutettiin HUSLABin erikoiskemian laboratoriossa. Siellä tutkittiin, minkälainen määrä biotiinia näytteessä häiritsee biotiini-streptavidini-tekniikkaan perustuvien AMH- ja progesteronitasojen määrittystä. Tutkimustilanne luotiin siten, että näytteisiin lisättiin eri määriä biotiinia. Näin saatiin luotua koetilanne, joka mukaillee tilannetta, jossa potilas on ottanut suuren määrän biotiinia. Ainetta lisättiin niin, että näytteissä oli biotiinia 1,0 – 10 000 ng/ml. Näyttemateriaalina käytettiin potilasnäytteitä koottua seerumipoolia sekä proteiinipuskuria.

### 4.1 Näytteiden valmistaminen

Näytteinä käytettiin potilasnäytteistä valmistettua seerumipoolia. AMH-seerumipooliin otettiin jo analysoiduista näytteistä ylijäänyttä materiaalia. Pooliin valittujen näytteiden S-AMH-pitoisuus oli 3 – 10 µg/l, ja koko seerumipoolin S-AMH-pitoisuus oli 4,9 µg/l. Progesteronitutkimuksissa pohjana käytettiin proteiinipuskuria (Diluent II) ja sen S-PROG-pitoisuus on 0 nmol/l.

Biotiini oli Sigma-Aldrich:n valmistama. Sen biotiinipitoisuus on  $\geq 99\%$ . Biotiinivalmiste oli jauheena ja se liuotettiin 10 millilitraan proteiinipuskuria (Diluent II). Biotiinin pitoisuus liuotettuna oli 10 mg/ml. Seerumiin ja proteiinipuskuriin lisättiin biotiinireagenssia niin, että näytteissä oli 1,0; 2,0; 3,9; 7,8; 15,6; 31,3; 62,5; 125; 250; 500; 1000 ja 10 000 ng/ml

biotiniä. Näytteet analysoitiin Roche cobas e 411 –analysaattorilla. Seeruminäytteistä mitattiin S-AMH-pitoisuus ja proteiinipuskurinäytteistä mitattiin S-PROG-pitoisuus.

## 4.2 Biotiinin poistaminen

Seuraavaksi tutkittiin, voidaanko biotiinin aiheuttama häiriö poistaa. Kaikki kolme menetelmää hyödyntävät streptavidiinin kykyä sitoa monta biotiinimolekyyliä itseensä. Ensimmäisessä poistomenetelmässä käytettiin Roche Streptavidin Magnetic Particles –liuosta. Se on kaupallinen valmiste, joka sisältää streptavidiinilla päällystettyjä magneettipartikkeleita 10 mg/ml. Toisena menetelmänä käytettiin Rochen cobas e 411 –analysaattorista ylijäävää reagenssia, joka sisältää streptavidiinilla päällystettyjä magneettipartikkeleita 0,72 mg/ml. Kolmas menetelmä on DELFIA / AutoDELFIA Streptavidin Microtitration Strips, eli mikrotiiterilevy, jonka seinämät on päällystetty streptavidiinilla. Kun näyte oli käsitelty poistomenetelmällä, se analysoitiin Rochen cobas e 411 –analysaattorilla.

### 4.2.1 Kaupallinen magneettipartikkeli

Kaupallisena magneettipartikkelina käytettiin Roche Streptavidin Magnetic Particles –liuosta. Reagenssi oli kuivajauheena, joka liuotettiin ohjeiden mukaan. Magneettipartikkeliliuoksen pitoisuus oli 10 mg/ml. Aiemmin tehdyn tutkimuksen ja sen tulosten perusteella valittiin magneettipartikkeliliuoksesta käytetyt tilavuudet: 10 µl, 25 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl, 300 µl, 400 µl, 500 µl ja 1000 µl. Poistomenetelmässä käytetyn näytteen biotiinipitoisuus oli 1000 ng/ml, koska sen arvioitiin olevan luotettava määrä menetelmän testaukseen. (Trambas ym. 2017.)

Liuotettua magneettipartikkeliliuosta pipetoitiin Eppendorf Safe Lock 2,0 ml -putkiin. Putkiin pipetoitiin magneettipartikkeliliuosta 10 µl, 25 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl, 300 µl, 400 µl, 500 µl ja 1000 µl. Putket asetettiin magneettitelineeseen, jolloin magneettipartikkelit asetuivat tiukasti putken reunalle ja ylimääräinen liuos pipetoitiin pois. Sen jälkeen putkiin lisättiin 250 µl seerumipoolia, joka sisälsi 1000 ng/ml biotiinia. Putket sekoitettiin kunnolla ja niiden annettiin seisoa vähintään 15 minuuttia, jotta streptavidiini ja biotiini sitoutuvat varmasti toisiinsa. Tämän jälkeen putket asetettiin takaisin magneettitelineeseen ja magneettipartikkelit olivat taas tiukasti putken seinämällä. Jos menetelmä toimi toivotulla tavalla, näytteen biotiinimolekyylit olivat sitoutuneet magneettipartikkelien streptavidiiniiin ja näin ollen putkesta talteen pipetoitu näyte oli biotiinipitoisuudeltaan pienempi. Puhdistetut seeruminäytteet otettiin talteen ja niistä analysoitiin seerumin Anti-Müllerian hormonipitoisuus Roche cobas e 411 -analysaattorilla.

Progesteronimääritystä varten tehtiin toinen sarja niin, että magneettipartikkeliliuosta pipetoitiin Eppendorf-putkiin 10 µl, 25 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl sekä 500 µl. Sarja toteutettiin edelliseen suppeampana, koska haluttiin vain varmistua menetelmän toimivuudesta toisessa määritysmenetelmässä. Ylimääräinen liuos poistettiin, jonka jälkeen putkiin lisättiin 250 µl proteiinipuskuria (Diluent II), johon oli lisätty biotiinia niin, että sen biotiinipitoisuus oli 1000 ng/ml. Putket sekoitettiin perusteellisesti ja niiden annettiin seisoa vähintään 15 minuuttia. Sen jälkeen putkista otettiin magneettitelineen avulla talteen puhdistetut näytteet. Näytteistä analysoitiin progesteronipitoisuus Roche cobas e 411 -analysaattorilla.

#### 4.2.2 Reagenssin ylijäämäpartikkeli

Analysaattorin käyttämästä reagenssista jää yli muutamia millilitroja magneettipartikkeliliuosta, jonka pitoisuus on 0,72 mg/ml. Ylijääväosuus on hukkatilavuutta, jota laite ei pysty pipetoimaan reagenssipullosta. Tätä ylijäävää osuutta reagenssista voidaan hyödyntää tutkimuksessa. Aiemmin tehdyn tutkimuksen perusteella valittiin käytettävän magneettipartikkeliliuoksen tilavuudet: 250 µl, 500 µl, 1000 µl, 1500 µl, 2000 µl, 3000 µl sekä 5000 µl. Poistamismenetelmissä käytetyn näytteen biotiinipitoisuus on 1000 ng/ml, koska sen arvioitiin olevan luotettava määrä menetelmän testaukseen. (Trambas ym. 2017.)

Yhdestä reagenssipullosta jää noin 3 millilitraa magneettipartikkeliliuosta. Useammasta pullosta kerättiin ylijääneet osuudet Falcon-putkeen, jolloin liuosta saatiin noin 45 millilitraa. Liuosta käsitellessä oli erittäin tärkeää sekoittaa sitä kunnolla, jotta kaikki magneettipartikkelit saatiin talteen.

Magneettipartikkeliliuosta pipetoitiin Eppendorf-putkiin. Pipetoidut tilavuudet olivat 250 µl, 500 µl, 1000 µl, 1500 µl, 2000 µl, 3000 µl sekä 5000 µl. Reagenssin magneettipartikkeliliuosta jouduttiin käyttämään suurempia määriä, koska sen magneettipartikkelipitoisuus on pienempi kuin kaupallisessa liuoksessa. Osa liuosmääristä oli niin suuria, että ne jouduttiin lisäämään putkeen pienemmissä osissa, välillä poistaen ylimääräistä liuosta. Kun ylimääräinen liuos oli poistettu putkista, voitiin sinne lisätä seeruminäyte. Sitä lisättiin 250 µl ja sen biotiinipitoisuus oli 1000 ng/ml. Putket sekoitettiin kunnolla ja niiden annettiin seistä vähintään 15 minuuttia. Seisotuksen jälkeen magneettitelineen avulla putkista kerättiin puhdistettu seeruminäyte ja niiden S-AMH-pitoisuus analysoitiin Roche cobas e 411 -analysaattorilla.

#### 4.2.3 Mikrotiitterilevy

Näytteen analysointia häiritsevän biotiinin poistamiseen kokeiltiin myös streptavidiniä sisältävää mikrotiitterilevyä. Koska levyn kapasiteetti biotiinin sitomisen suhteen oli vähemmän kuin magneettipartikkeliliuokset, käytettiin näytteenä seerumia, jonka biotiinipitoisuus oli 100 µg/l ja AMH-pitoisuus noin 5 µg/l.

Mikrotiitterilevyn kahdeksaan kuoppaan pipetoitiin 250 µl näytettä. Niitä inkuboitiin ravistelijalla viisi minuuttia, jonka jälkeen yksi näytteistä otettiin talteen (näyte 1) ja loput seitsemän näytettä siirrettiin seuraaviin kuoppiin ja inkuboitiin ravistelijalla viisi minuuttia. Tämän jälkeen taas otettiin yksi näyte talteen (näyte 2) ja loput kuusi näytettä siirrettiin seuraaviin kuoppiin, niitä inkuboitiin viisi minuuttia ravistelijalla jne. Näin ollen viimeistä näytettä oli inkuboitu 40 minuuttia (näyte 8). Talteen otetuista kahdeksasta näytteestä analysoitiin S-AMH-pitoisuus Roche cobas e 411 -analysointilaitteella.

#### 4.3 Analysointi

Näytteet analysoitiin Roche cobas e 411 -laitteella. Se on automatisoitu analysointilaitte, jonka toiminta perustuu ElectroChemiLuminescence-tekniikkaan. Näytteistä analysoitiin laitteella joko AMH- tai progesteronimääritys. Molemmat määritykset perustuvat biotiini-streptavidini-tekniikkaan. Analysointilaitetta käytettäessä tarkistettiin aamuisin, että kaikki tarvittavat reagenssit ja välineet olivat paikoillaan. Analysointilaitteella käytettiin reagenssi-valmistajan Roche Progesterone III CalSet ja Roche AMH Plus CalSet kalibraattoreita. Kalibrointi suoritettiin molemmissa analyyseissä seitsemän vuorokauden välein tai kun reagenssierä vaihtui. Kontrollit analysoitiin laitteella aina ennen näytteiden analysointia. Kontrollina käytettiin BioRad Lyphocheck Immunoassay Plus Control tasoja 1, 2 ja 3 sekä PreciControl AMH Plus PC AMHP1 ja PC AMHP2. Kontrollitulokset olivat raja-arvojen sisällä. Analysointilaitteita huollettiin käytön jälkeen ja tarkistettiin, että reagenssit sekä välineet riittävät seuraavalle päivälle.

## 5 Tulokset

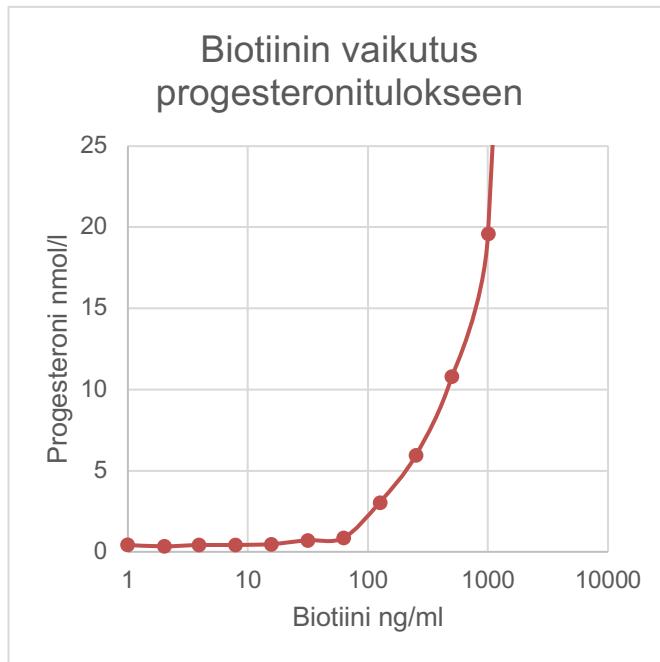
### 5.1 Biotiinin vaikutus progesteronimääritykseen

Proteiinipuskuriin (Diluent II) lisättiin biotiinia ja tehtiin puolilaimennussarja biotiinipitoisuuteen 1,0 ng/ml asti. Valmistetuista näytteistä analysoitiin Roche cobas e411 -laitteella progesteronipitoisuus.

Taulukko 1. Lisätyn biotiinin määrä suhteessa laitteen mittaamaan progesteronipitoisuuteen.

Lisätyn biotiinin määrä (ng/ml)	Mitattu progesteronipitoisuus (nmol/l)
1,0	0,420
2,0	0,339
3,9	0,419
7,8	0,421
15,6	0,476
31,3	0,712
62,5	0,861
125	3,04
250	5,94
500	10,80
1000	19,61
10 000	>190,8

Taulukossa 1 on esitetty analysaattorin mittaamat progesteronipitoisuudet biotiinin määrän kasvaessa näytteessä.



Kuvio 2. Biotiinin vaikutus progesteronimääritykseen.

Kuvio 2 havainnollistaa näytesarjasta saadut tulokset sekä progesteronipitoisuuden kehityksen biotiinin määrän lisääntyessä.

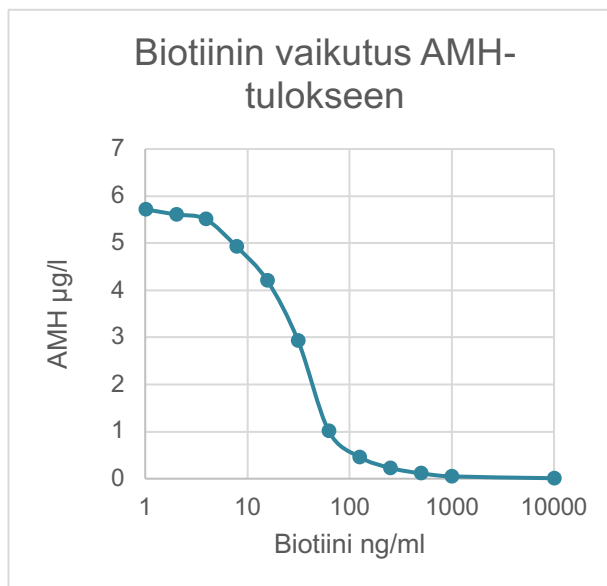
## 5.2 Biotiinin vaikutus Anti-Müllerian hormonimääritykseen

Seerumipoolista ja lisätystä biotiinista valmistettiin puolilaimennussarja biotiinipitoisuuteen 1,0 ng/ml asti. Pelkän seerumipoolin AMH-pitoisuus oli 4,84 µg/l. Valmistetuista näytteistä analysoitiin Roche cobas e 411 -laitteella AMH-pitoisuus.

Taulukko 2. Lisätyn biotiinin määrä suhteessa laitteen mittaamaan AMH-pitoisuuteen.

Lisätyn biotiinin määrä (ng/ml)	Mitattu AMH-pitoisuus (µg/l)
1,0	5,72
2,0	5,61
3,9	5,51
7,8	4,93
15,6	4,21
31,3	2,93
62,5	1,01
125	0,460
250	0,229
500	0,113
1000	0,049
10 000	<0,010

Taulukossa 2 on esitetty analysaattorin mitaamat AMH-pitoisuudet biotiinimäärän kasvassa näytteessä.



Kuvio 3. Biotiinin vaikutus AMH-pitoisuuteen.



Kuvio 3 havainnollistaa näytesarjasta saadut tulokset ja AMH-pitoisuudet kehityksen biotiinimäärän kasvaessa.

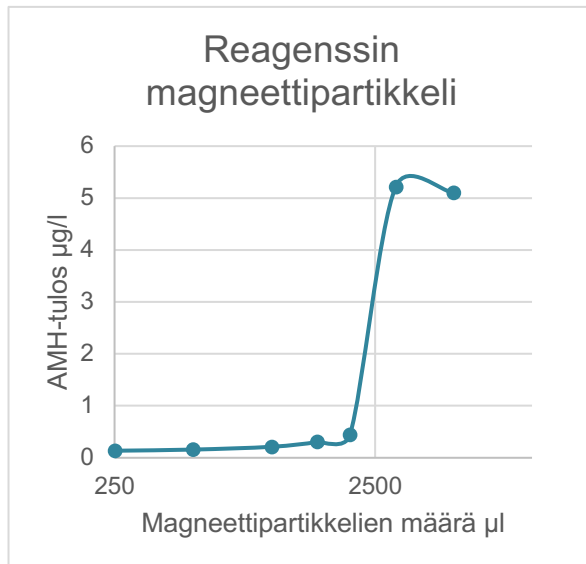
### 5.3 Biotiinin poistaminen reagenssin ylijäämäpartikkeleilla

Roche cobas e 411 -laitteen reagenssin ylijäävää osuutta magneettipartikkeleista kokeiltiin biotiinin aiheuttaman häiriön poistamiseen näytteistä. Seerumipooliin, jonka AMH-pitoisuus oli 4,84 µg/l, lisättiin biotiinia siten, että sen biotiinipitoisuus oli 1000 ng/ml. Magneettipartikkelien poistamisen jälkeen talteen kerätyistä näytteistä analysoitiin AMH-pitoisuus Roche cobas e 411 -laitteella.

Taulukko 3. Biotiinin poistamiseen käytetyn reagenssin magneettipartikkeliliuoksen määrä suhteessa mitattuun AMH-pitoisuuteen.

<b>Magneettipartikkelien määrä (µl)</b>	<b>Mitattu AMH-pitoisuus (µg/l)</b>
250	0,136
500	0,158
1000	0,212
1500	0,304
2000	0,438
3000	5,22
5000	5,1

Taulukossa 3 on esitetty analysaattorilla mitattu AMH-pitoisuus riippuen biotiinihäiriön poistamiseen käytetystä magneettipartikkeliliuoksen määrästä.



Kuvio 4. Reagenssin ylijäämäpartikkeliin käyttö biotiinihäiriön poistamiseen AMH-määrityksessä.

Kuvio 4 havainnollistaa magneettipartikkeliin määrän lisäämisen vaikutuksen mitattuun AMH-tasoon.

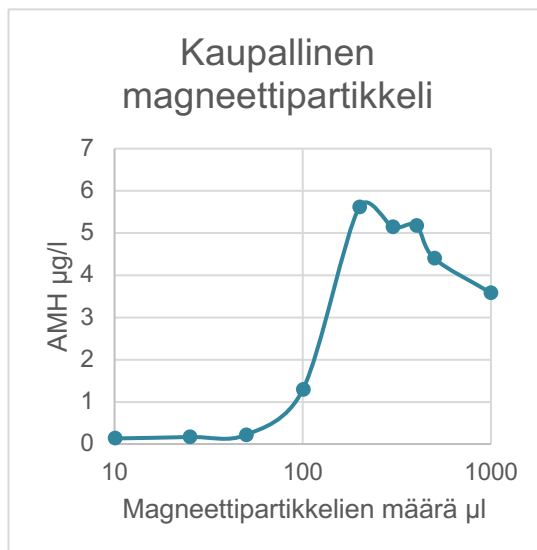
#### 5.4 Biotiinin poistaminen kaupallisilla magneettipartikkeleilla

Reagenssin magneettipartikkeliin tapaisia valmisteita on myös kaupallisia. Kaupallisen liuoksen magneettipartikkeliin pitoisuus on korkeampi kuin reagenssissa, eli pienemmässä määrässä liuosta on enemmän partikkeleita. Seerumipooliin, jonka AMH-pitoisuus oli 4,84 µg/l, lisättiin biotiinia siten, että sen biotiiniin pitoisuus oli 1000 ng/ml. Magneettipartikkeliin poistamisen jälkeen talteen kerätyt näytteistä analysoitiin AMH-pitoisuus Roche cobas e 411 -laitteella.

Taulukko 4. Biotiinin poistamiseen käytetyn kaupallisen magneettipartikkeliliuoksen määrä suhteessa mitattuun AMH-pitoisuuteen.

Magneettipartikkelien määrä ( $\mu\text{l}$ )	Mitattu AMH-pitoisuus ( $\mu\text{g/l}$ )
10	0,132
25	0,166
50	0,218
100	1,286
200	5,62
300	5,14
400	5,18
500	4,4
1000	3,58

Taulukossa 4 on esitetty analysaattorilla mitattu AMH-pitoisuus riippuen biotiinihäiriön poistamiseen käytetystä kaupallisen magneettipartikkeliliuoksen määrästä.



Kuvio 5. Kaupallisen streptavidiinilla päällystettyjen magneettipartikkelien käyttö biotiinihäiriön poistamiseen AMH-määrityksessä.

Kuvio 5 havainnollistaa magneettipartikkelien määrän lisäämisen vaikutuksen mitattuun AMH-tasoon.

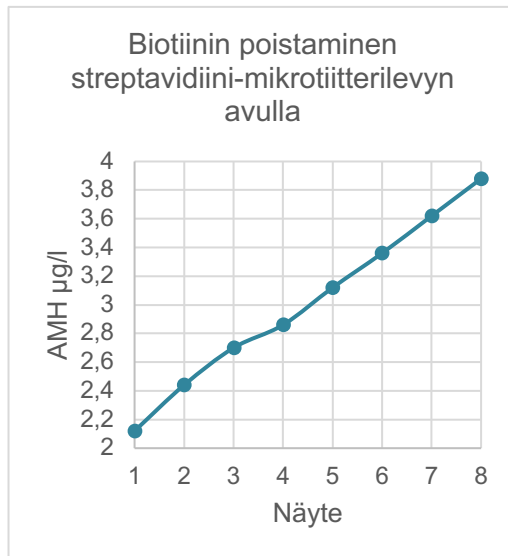
### 5.5 Biotiinin poistaminen mikrotiitterilevyn avulla

Seerumipooliin, jonka AMH-pitoisuus oli 4,84 µg/l, lisättiin biotiinia siten, että sen biotiinipitoisuus oli 100 ng/ml. Streptavidiinilla päällysteyllä mikrotiitterilevyllä inkuboidut näytteet analysoitiin Roche cobas e 411 -laitteella.

Taulukko 5. Näytteen numero ja käsittelyjen määrä suhteessa mitattuun AMH-pitoisuuteen.

Näytteen numero	Mitattu AMH-pitoisuus (µg/l)
1	2,12
2	2,44
3	2,7
4	2,86
5	3,12
6	3,36
7	3,62
8	3,88

Taulukossa 5 on esitetty analysaattorilla mitattu AMH-pitoisuus riippuen biotiinihäiriön poistamiseen käytettyjen mikrotiitterilevyn kuoppien määrästä ja inkubointiajan pituudesta.



Kuvio 6. Biotiinihäiriön poistaminen AMH-näytteestä streptavidiini-mikrotiiterilevyn avulla.

Kuvio 6 havainnollistaa mikrotiiterilevyn kuoppien määrän ja inkubointiajan lisäämisen vaikutuksen mitattuun AMH-tasoon.

## 6 Pohdinta

### 6.1 Tulosten tarkastelu ja johtopäätökset

Opinnäytetyöstä saatujen tulosten perusteella on todettavissa, että veressä oleva ylimääräinen biotiini aiheuttaa häiriötä biotiini-streptavidiini-tekniikkaan perustuvissa laboriotutkimuksissa. Lisätyn biotiinimäärän noustessa myös näytteestä analysoitu AMH- tai progesteronitulos lähtevät vääristymään huomattavasti.

Kolmella eri biotiinihäiriön poistomenetelmällä pystytään huomaamaan selvä vaikutus tulostasoon. Kaikki kolme menetelmää onnistuvat vähentämään biotiinin aiheuttamaa häiriötä ainakin jonkin verran. Tehokkain vaikuttaa olevan kaupallinen magneettipartikeliliuos, koska sitä tarvitaan paljon vähemmän häiriön poistamiseen kuin reagenssin ylijäämäpartikkeleita. Tämä johtuu siitä, että kaupallisessa liuoksessa on magneettipartikkeleita paljon enemmän reagenssiliuoksessa suhteessa niiden tilavuuteen.

Tulosten perusteella Anti-Müllerian hormoni- ja progesteronitulokset vääristyvät selkeästi, kun näytteissä on 15-30 ng/ml tai enemmän biotiinia.

Tehokkain menetelmä biotiinihäiriön poistamiseen oli kaupallinen streptavidiinilla päällystetty magneettipartikkeliliuos. Käsittelmällä näyte noin 200 µl liuosta oli mahdollista saavuttaa sama AMH-taso kuin ennen biotiinin lisäämistä. Jos kuitenkin jatkoi magneettipartikkelien lisäämistä, AMH-tulos alkoi laskea. Tämä voisi johtua esimerkiksi magneettipartikkeliliuoksessa irrallaan olevasta streptavidiinista. Ilmiö voitaisiin estää mahdollisesti esipesemällä magneettipartikkeliliuos vaihtamalla sen puskuri muutaman kerran ennen magneettien käyttämistä biotiinin poistamiseen.

Kustannuksiltaan edullisimmaksi tulisi reagenssista ylijäävän magneettipartikkeliliuoksen käyttäminen biotiinin poistamiseen, sillä se olisi muuten hävitettävää liuosta. Toisaalta, että suuri määrä biotiinia saadaan näytteestä pois, tarvitaan reagenssin magneettipartikkeliliuosta paljon. Opinnäytetyön koetilanteessa liuosta tarvittiin 3 ml, että AMH-taso saatiin lähelle alkuperäistä AMH-tulosta. Yhdessä reagenssipullossa hukkatilavuutta on ehkä juuri kolme millilitraa, joten riippuu laboratorion suuruudesta ja käsiteltävien näytteiden määrästä, onnistuuko menetelmän suorittaminen.

Kaikista huonoin menetelmä oli mikrotiitterilevyn käyttö. Tulosten perusteella viimeinen, eli kahdeksas näyte, joka on ollut kahdeksassa kuopassa viisi minuuttia eli yhteensä 40 minuuttia, ei vielä ollut samalla tulostasolla kuin alkuperäinen näyte. Tässä menetelmässä käytettiin näytettä, jossa oli kymmenen kertaa vähemmän biotiinia kuin muissa menetelmissä, joten on selvää, ettei se ole yhtä tehokas menetelmä. Lisäksi menetelmä sitoo yhden työntekijän 40 minuutiksi näytteenkäsittelyyn. Jos halutaan saada samaa tasoa vastaava tulos kuin alkuperäinen näyte, se tarvitsisi luultavasti kaksitoista kuoppakäsittelyä, johon kuluisi 60 minuuttia.

## 6.2 Luotettavuus ja eettisyys

Opinnäytetyötä tehdessä on pyritty seuraamaan hyvän tieteellisen käytännön ohjeistusta. Tutkimuksesta saadut tulokset on esitetty rehellisesti ja selkeästi tässä työssä. Työskenneltäessä on pyritty huolehtimaan tutkimuksen ja tulosten luotettavuudesta. Laboratoriotyöskentelyssä on pyritty tarkkuuteen ja huolellisuuteen. Analysaattorille on tehty ohjeiden mukaiset huollot ja kalibraatiot, ja niiden onnistuminen on tarkistettu kontrollien avulla, jotta tulokset olisivat luotettavia.

Ennen työskentelyn aloittamista, on laadittu tutkimussuunnitelma ja sen avulla on haettu tarvittavat tutkimusluvut projektiin osallistuvilta tahoilta. Opinnäytetyössä käytetyt lähteet on valittu niin, että ne ovat mahdollisimman luotettavia. Opinnäytetyössä käytetyt lähteet

on merkitty raporttiin selkeästi ja niin, että ne on helppo löytää. Opinnäytetyöraportissa on selkeästi kuvattu, mitä opinnäytetyöprosessin aikana on tehty.

Opinnäytetyössä näytteinä käytettiin sekä kaupallista proteiinipuskuria että useasta potilasnäytteestä valmistettua seerumipoolia. Näin ollen kenenkään yksittäisen ihmisen näytettä ei ole analysoitu, eikä heille ole saatu diagnostisia tuloksia.

### 6.3 Kehittämisehdotukset

Opinnäytetyön tulosten pohjalta on mahdollista lähteä jatkamaan rutiinimenetelmän kehittämistä biotiinihäiriön poistamiseksi. Jatkon kannalta merkittävää tietoa on varsinkin eri poistomenetelmien toimivuus. Tulosten pohjalta voidaan valita esimerkiksi yksi menetelmä, jota lähdetään jatkokehittämään.

Tulosten perusteella voidaan huomata, että biotiini vääristää biotiini-streptavidini-tekniikkaan perustuvia tutkimuksia. Näiden tutkimusten ohjeistukseen olisi hyvä lisätä ohjeistus biotiinin käytön rajoittamisesta ennen verinäytteenottoa. Ongelmalliseksi nousevat kuitenkin tilanteet, kun ei tiedetä onko potilas ottanut biotiinia juuri ennen näytteenottoa.

Opinnäytetyössä käytettyjen analyyttien, eli AMH- ja progesteronimääritysten, lisäksi biotiinin aiheuttama häiriö koskee myös muita biotiini-streptavidini-tekniikkaan perustuvia laboratoriotutkimuksia. Laitevalmistajilla on tarjolla biotiini-streptavidini-tekniikkaan perustuvia tutkimuksia, jotka voivat olla joissain sairaanhoitopiireissä päivystyskäytössä. Niiden tulosten luotettavuus on erittäin tärkeää, sillä osaa käytetään esimerkiksi sydäninfarktin diagnostiikassa (Troponiini T hs). Tällaisissa tilanteissa vääristyneet tulokset voivat johtaa väärin diagnooseihin ja täten väärin hoitopäätöksiin. Niiden kannalta olisi tärkeää välttää biotiinin aiheuttama häiriötä laboratoriotutkimuksissa.

### 6.4 Ammatillinen kasvu

Opinnäytetyö on kehittänyt minua ammatillisena toimijana. Olen oppinut vuoden aikana paljon projektityöskentelystä. Perusteellisen suunnitelman tekeminen on ollut tärkeä pohja lähtiessä projektiin.

Opinnäytetyö on ollut mielestäni erittäin mielenkiintoinen. Aihe on tärkeä, sillä laboratoriotutkimuksien laadukkuus ja luotettavuus pitäisi aina olla paras mahdollinen. Väärät

tulokset voivat aiheuttaa pahimmillaan virheitä potilaan hoidossa, joten virheiden mahdollisuus on minimoitava.



## Lähteet

Grimsey, Paul – Frey, Nicolas – Bending, Garnet – Zitzler, Juergen – Lorenz, Oliver – Kasapic, Dusanka – Zaugg, Christian E. 2017. Population pharmacokinetics of exogenous biotin and the relationship between biotin serum levels and in vitro immunoassay interference. Verkkodokumentti. <<https://www.future-science.com/doi/abs/10.4155/ipk-2017-0013>>. Luettu 26.9.2018

HUSLAB 2017. AMH-menetelmäohje.

HUSLAB 2018. PROG-menetelmäohje.

Piketty, Marie-Liesse – Polak, Michel – Flechtner, Isabelle – Gonzales-Briceno, Laura – Souberbielle, Jean-Claude 2016. False biochemical diagnosis of hyperthyroidism in streptavidin-biotin-based immunoassays: the problem of biotin intake and related interferences. Verkkodokumentti. <<https://www.degruyter.com/download-pdf/j/cclm.2017.55.issue-6/cclm-2016-0606/cclm-2016-0606.pdf>>. Luettu 24.9.2018

PubChem 2004. Compound Summary: Biotin. Verkkodokumentti. <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/171548>>. Luettu 28.9.2018

Roche Diagnostics 2015. Progesterone III –reagenssiohje.

Roche Diagnostics 2016a. Elecsys AMH Plus –reagenssiohje.

Roche Diagnostics 2016b. Electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) for the in vitro quantitative determination of progesterone in human serum and plasma. Verkkodokumentti. <<https://usdiagnostics.roche.com/en/resourcecenter/public/Progesterone-Fact-Sheet-PP-US-06966.pdf>>. Luettu 25.9.2018

Rzeszowska, Marzena – Leszcz, Agnieszka – Putowski, Lechosław – Hałabiś, Magdalena – Tkaczuk-Włach, Joanna – Kotarski, Jan – Polak, Grzegorz 2016. Anti-Müllerian hormone: structure, properties and appliance. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27723076>>. Luettu 26.9.2018

Savolainen, Kari – Parviainen, Markku 2010. Immunokemialliset menetelmät. Teoksessa Niemelä, Onni – Pulkki, Kari (toim.): Laboratoriolääketiede – Kliininen kemia ja hematologia. 3. painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy. 65–66.

Thermo Fisher Scientific. Protein Biology Resource Library: Avidin-Biotin Interaction. Verkkodokumentti. <<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/avidin-biotin-interaction.html>>. Luettu 29.9.2018

Trambas, Christina – Lu, Zhong – Yen, Tina – Sikaris, Ken 2017. Depletion of biotin using streptavidin-coated microparticles: a validated solution to the problem of biotin interference in streptavidin–biotin immunoassays. Verkkodokumentti. <<https://doi.org/10.1177%2F0004563217707783>>. Luettu 24.9.2018