

# Revista de Saúde Pública

JOURNAL OF PUBLIC HEALTH

## Estudo de prevalência em recém-nascidos por deficiência de biotinidase\*

*Neonatal screening for biotinidase deficiency*

Anna L. R. Pinto \*\*, Kimiyo M. Raymond, Isac Bruck e Sérgio A Antoniuk

*Departamento de Pediatria da Universidade Federal do Paraná (UFPr). Curitiba, PR - Brasil*

# Estudo de prevalência em recém-nascidos por deficiência de biotinidase\*

## *Neonatal screening for biotinidase deficiency*

Anna L. R. Pinto \*\*, Kimiyo M. Raymond, Isac Bruck e Sérgio A Antoniuk

Departamento de Pediatria da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Curitiba, PR - Brasil

### Resumo

#### Introdução

A deficiência de biotinidase é um erro inato do metabolismo caracterizado principalmente por ataxia, crise convulsiva retardo mental, dermatites, alopecia e susceptibilidade a infecções. É atribuída a esta deficiência enzimática a forma tardia de deficiência múltipla das carboxilases. Com o objetivo de verificar a prevalência da deficiência de biotinidase e validar o teste de triagem neonatal considerando a relação custo/benefício, elaborou-se estudo prospectivo na população de recém-nascidos no Estado do Paraná.

#### Material e Método

Em um período de 8 meses foram triados 125.000 recém-nascidos. A amostra sanguínea foi a mesma obtida para os testes de triagem para fenilcetonúria e hipotireoidismo congênito, submetida ao teste semiquantitativo colorimétrico para atividade de biotinidase. As amostras consideradas suspeitas foram repetidas em duplicatas do mesmo cartão de papel de filtro, e as que permaneceram alteradas solicitou-se novo cartão. O teste quantitativo colorimétrico da doença foi realizado nos casos em que a segunda amostra testada em duplicata sugeriu deficiência de biotinidase.

#### Resultados

A taxa de repetição em duplicata variou de 0,9% a 0,5% do total de exames realizados por mês. A taxa de reconvocação do segundo cartão foi de 0,17%, sendo que destes 212 casos, 30% não retornaram o segundo cartão solicitado. Foram identificados 2 casos, um de deficiência total de biotinidase e outro de deficiência parcial. A prevalência da doença na população de estudo foi de 1:62.500 nascidos-vivos. A sensibilidade do teste semiquantitativo colorimétrico foi calculada em 100% e a especificidade 99,88%.

#### Conclusão

A prevalência da doença no Estado do Paraná foi de 1:125.000 nascidos-vivos para deficiência total da enzima, levando-se em consideração que 30% de casos suspeitos que repetiram novo teste. O teste semiquantitativo colorimétrico foi considerado efetivo em identificar os casos afetados, com sensibilidade de 100% e especificidade de 99,88%. A relação custo/benefício foi satisfatória, permitindo a inclusão do teste de detecção de deficiência de biotinidase no programa de triagem neonatal do Estado do Paraná.

**Biotina. Erros inatos do metabolismo, epidemiologia. Prevalência.**

\*Baseado em dissertação de mestrado, apresentada em 1995 ao Departamento de Pediatria da UFPR Apresentado no XIII Congresso Brasileiro de Neurologia e Psiquiatria Infantil, Brasília, 1995.

\*\*Aluna de pós-graduação do Departamento de Pediatria da UFPR

Correspondência para/Correspondence to: Anna Leticia Ribeiro Pinto - Alameda Cabral, 471/122 - Bl. B - Centro - 80410-210 Curitiba, PR - Brasil. Recebido em 28.4.1997. Aprovado em 9.10.1997.

### Abstract

#### Introduction

*Biotinidase deficiency is an inheritable disorder of biotin metabolism. This disorder fulfills major criteria for consideration for newborn screening: the affected children do not show clinical signs in the newborn period; the disease is highly disabling; treatment is effective in preventing neurological sequelae if undertaken promptly.*

#### Material and Methods

*Screening of 125,000 infants born in Paraná State was carried out to establish the prevalence of biotinidase deficiency. A simple colorimetric procedure was used to detect two infants with biotinidase deficiency (1:62,500), one of them with profound deficiency (1:125,000) and the other with partial deficiency (1:125,000) of the enzyme.*

#### Results

*There were no known false-negative test results and 0.12% were false-positive, defined by further blood samples which were negative upon repeated testing. Sensitivity was 100% and specificity was 99.88%. Repeat blood samples could not be obtained in 63 (30%) suspected cases.*

#### Conclusions

*Newborn screening for biotinidase is useful in identifying affected children, is inexpensive and allows early intervention, which may prevent irreversible neurological damage.*

***Biotina. Metabolism, inborn errors, epidemiology. Prevalence.***

## INTRODUÇÃO

Nas últimas três décadas o rastreamento de doenças metabólicas no período neonatal passou a ser medida importante de medicina preventiva. O primeiro erro inato do metabolismo descrito, com o privilégio de ser tratado foi a fenilcetonúria. Guthrie<sup>1</sup> desenvolveu teste viável para detecção e tratamento precoces e, em 1962, detectou-se a primeira criança portadora de fenilcetonúria, entre 800 recém-nascidos triados. Atualmente, do ponto de vista epidemiológico, milhões de recém-nascidos são testados para vários distúrbios congênitos e hereditários do metabolismo, por ano no mundo<sup>1</sup>.

A deficiência de biotinidase, descrita pela primeira vez em 1983<sup>5</sup>, preenche todos os principais critérios para inclusão na lista de doenças a serem pesquisadas<sup>3</sup>: os sintomas são conhecidos, porém inaparentes no período neonatal com graves conseqüências clínicas; existe tratamento inquestionavelmente efetivo, quando administrado precocemente; dispõe de teste diagnóstico viável economicamente e com baixos índices de resultados falso-negativo e falso-positivo.

A biotinidase é uma enzima hidrolase de fundamental importância no metabolismo da biotina. Sua função é liberar a biotina ligada covalentemente à proteína (dieta) ou aos peptídeos (biocitina -

substrato natural). A deficiência de biotinidase causa quadro clínico compatível com o que se conhece como deficiência múltipla das carboxilases, na forma juvenil ou tardia. A idade de início dos sintomas pode variar de uma semana a dois anos de idade, em média cinco meses, entre eles estão retardo mental, convulsões e ataxia que justificam a gravidade da doença. É um distúrbio metabólico com variada expressão fenotípica, caracterizada principalmente por sintomas neurológicos, quais sejam ataxia, crise convulsiva, retardo mental e atraso no desenvolvimento psico-motor; dermatites, alopecia e predisposição a infecções<sup>6</sup>.

Heard e col.<sup>2</sup>(1984) desenvolveram teste viável de detecção da enzima, assim como o teste diagnóstico confirmatório da doença. O tratamento é conhecido e consiste na administração de biotina via oral diariamente.

Em relação à metodologia, elaborou-se o presente trabalho prospectivo, orientado a averiguar a prevalência da deficiência de biotinidase na população de recém-nascidos do Estado do Paraná.

O impacto que causa a triagem neonatal de doenças tratáveis em saúde pública, assim como a necessidade de ampliar o número de doenças diagnosticáveis no período neonatal, permitindo a prevenção do retardo mental, motivaram a realização do presente trabalho.

## MATERIAL E MÉTODO

Realizou-se um trabalho prospectivo, no período de 8 meses, na população de 125.000 recém-nascidos, que perfazem um total de 90% dos recém-nascidos do Estado do Paraná. A amostra sanguínea foi obtida por punção do calcanhar e colhida em papel de filtro, procedimento de rotina nos testes já oficializados, quais sejam para fenilcetonúria (PKU) e hipotireoidismo congênito (HTC). O material foi processado em laboratório que centraliza o "teste do pezinho" no Paraná.

As amostras eram provenientes de hospitais e maternidades conveniadas, e posto de saúde, nos casos de alta precoce (nas primeiras 24 horas) e parto domiciliar. No laboratório eram as mesmas registradas, cadastradas e processadas para os testes habitualmente realizado. O método a ser implantado, foi incorporado a uma rotina previamente estabelecida.

As amostras foram submetidas ao teste semi-quantitativo colorimétrico para atividade de biotinidase, desenvolvido por Heard e col.<sup>2</sup> (1984). Foram considerados valores anormais os que exibissem coloração inferior ao padrão visual de 25% do valor normal.

Os casos suspeitos no primeiro exame eram repetidos em duplicata, com retirada do material do mesmo cartão. Se permanecesse alterado solicitava-se a colheita de material por meio de cartas ou ligações telefônicas com as instituições responsáveis ou com os pais (sanguíneo em um segundo cartão) - são considerados os falsos-positivos os exames que se encontravam normais após este procedimento. Os casos que após o envio do segundo cartão e testagem em duplicata desta amostra continuavam exibindo resultados anormais eram reconvidados e nova amostra sanguínea era solicitada, porém para o exame confirmatório era necessário 2ml de sangue total em tubo seco. Separava-se o soro e estocava-se a -70°C.

O teste quantitativo colorimétrico é o exame que permite classificar numericamente os pacientes em normais (4 a 10 nmol de PABA liberado/min), deficientes parciais de biotinidase (10 a 30% da atividade normal da enzima) e deficientes totais (< 10% da atividade normal da enzima). Enquanto a leitura do teste semiquantitativo é visual por comparação, o teste quantitativo colorimétrico é realizado por espectrofotômetro para leitura da densidade óptica (absorbância de 546nm)<sup>7</sup>. Ambos os procedimentos consistem na liberação de ácido r-amino benzóico (PABA) pela ação da biotinidase. Este PABA liberado para ser identificado sofre diazotação, portanto se a biotinidase estiver presente e ativa ao final da reação, visualiza-se cor rosa, do contrário não desenvolve nenhuma cor.

## RESULTADOS

As amostras foram testadas primeiramente em unidades e os casos suspeitos foram repetidos em duplicata, cujas taxas variaram de 0,9% a 0,5% do total de exames realizados por mês.

Quando as amostras persistiam exibindo coloração em níveis inferiores a 25% da atividade normal (segundo o padrão), prosseguiu-se à reconvocação de uma nova amostra sanguínea (teste positivo). A taxa de reconvocação foi de 0,17%. Dos 212 casos de reconvocação, 70% (n=149) enviaram novo cartão com material e 30% (n=63) não repetiram o exame. As principais causas apontadas para a não-adesão à pesquisa, foram: mudança de endereço confirmada; recusa da nova coleta; óbito antes do segundo exame; habitação em zona rural, dificultando o acesso às famílias; sem causa estabelecida (n=30). Do total de repetições, 147 tiveram o segundo exame normal. Por definição são os casos falso-positivos.

Foram identificados 2 casos de deficiência de biotinidase, sendo um de deficiência parcial e outro de deficiência total. A prevalência da doença na população de estudo é de 1:62.500.

A criança com deficiência total (caso 1) da enzima foi avaliada com 41 dias de vida e apresentou exame físico e DPM normais. É do sexo feminino e segunda filha de casal não consanguíneo. A criança portadora de deficiência parcial (caso 2) é filha única de casal não consanguíneo, branca e do sexo feminino. A paciente foi avaliada pela primeira vez com 60 dias de vida e estava assintomática, com desenvolvimento psico-motor adequado (DPM). Ambas iniciaram o tratamento com biotina, 10 e 5mg respectivamente, por ocasião do diagnóstico (Tabela 1).

A Tabela 2 exhibe os valores necessários aos cálculos da sensibilidade e especificidade.

**Tabela 1** - Valores da atividade de biotinidase nos casos identificados.

	Valor da atividade da biotinidase		
	Criança	Mãe	Pai
Caso 1	0,9*	4,1	4,5
Caso 2	3,3	5,0	4,9

\*unidade em nmol de PABA liberado/min/ml

**Tabela 2** - Números de falso-positivos, falso-negativos e casos identificados.

**Table 2** - False-positive and false-negative results and affected infants.

Teste	Deficiência de biotinidase	
	Presente	Ausente
Semiquantitativo colorimétrico	Positivo	02      147
	Negativo	0      124.788

$$\text{Sensibilidade} = \frac{2}{2+0} = 1(100\%)$$

$$\text{Especificidade} = \frac{124.788}{147+124.788} = 0,9988 (99,88\%)$$

O custo total do programa foi R\$ 8.430,50. Os itens relevantes e específicos ao custo da implantação do programa e seus valores totais estão listados na Tabela 3.

O custo da manutenção do tratamento foi de R\$ 12,00, segundo comunicação pessoal dos pais.

**Tabela 3** - Distribuição dos custos do programa.

**Table 3** - Costs of the program.

Infra-estrutura necessária	Custos*
Equipamento	7.079,00
Reagentes	351,50
Serviço telefônico e correio	1.000,00
Total	8.430,50

\* Em Reais.

## DISCUSSÃO

A prática de programas de “screening” neonatal não tem somente beneficiado pacientes e suas famílias, mas também tem permitido maiores informações sobre epidemiologia, fisiopatologia, diagnóstico e tratamento das doenças.

Para o estudo da deficiência de biotinidase recomenda-se, no mínimo, uma população de 100.000 recém-nascidos para obtenção de resultados mais fidedignos, pois pela experiência mundial a doença pode acontecer na proporção de 1:49.000 até 1:137.000<sup>8</sup>.

No presente estudo a prevalência encontrada foi de 1:125.000 para deficiência total da enzima, levando-se em consideração que 30% dos casos suspeitos não tiveram repetição de novo teste - 93,3% pela literatura<sup>8</sup> e 70% de adesão neste trabalho - pode-se supor que mais casos de deficiência da enzima eventualmente não foram detectados. Embora os dados sobre a prevalência da deficiência de biotinidase exijam a realização de mais estudos, estes dados preliminares sugerem que esta deficiência é mais freqüente que a galactosemia, doença do Xarope do bordo e homocistinúria<sup>4</sup>.

Os resultados falso-positivos encontrados foram de 212, 0,17% do total de exames realizados, para o teste semiquantitativo colorimétrico (“padrão-ouro”), definidos como os indivíduos que necessitaram um segundo cartão contendo a amostra a ser testada e com resultado normal. Este dado aproxima-se da-

quele encontrado por Wolf e col.<sup>8</sup> (1990).

Tanto no estudo realizado, quanto nos referidos na literatura<sup>2,8</sup>, a única droga descrita capaz de modificar o resultado, provocando um resultado falso-negativo, é o grupo das sulfonamidas. Como esses compostos não são usados no período neonatal, e nenhum dos exames realizados sugerem a presença de substância cromogênica, não se conhece resultados falso-negativos neste teste de triagem, tanto na literatura como no presente trabalho.

Os valores calculados para sensibilidade (100%) e especificidade (99,88%) concordam com os valores relatados na literatura<sup>3</sup>.

Quanto às particularidades dos casos encontrados na presente pesquisa, o fato de ambos serem do sexo feminino, não é significativo, uma vez que este distúrbio metabólico não tem predomínio entre os sexos. A grande maioria dos casos encontrados na literatura é da raça branca, embora tenham sido descritos casos em que os pacientes são da raça negra<sup>5</sup>.

O paciente portador de deficiência parcial permaneceu assintomático, e neste caso optou-se pelo tratamento com dose de 5mg/dia, pois não há consenso a respeito da evolução clínica.

A criança portadora da deficiência total da enzima recebe biotina 10mg/dia oralmente desde 41 dias de vida, e até o presente evoluindo de forma assintomática.

O programa de “screening” neonatal para deficiência de biotinidase, pelo fato de utilizar a mesma amostra sanguínea processada para os testes já aceitos na rotina, gera outra grande vantagem do teste que é de ser simplesmente incorporado ao programa já existente.

A relação custo/benefício do programa para deficiência de biotinidase foi considerada satisfatória, e o teste faz parte do “screening” neonatal no Estado do Paraná.

## AGRADECIMENTOS

À Dra Vivian Shih, professora de Pediatria e Neurologia da “Harvard Medical School,” por ter possibilitado a técnica, ao Dr Ehrenfried O. Wittig, diretor, e Mousseline T. Domingues, coordenadora, do Centro de Pesquisa da Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional, pelo apoio.

## REFERÊNCIAS

1. GUTHRIE, R. The origin of newborn screening. *Screening.*, **1**:5-15,1992.
2. HEARD, G.S. et al. Screening for biotinidase deficiency in newborns. *Clin. Chem.*, **30**:125-7,1984.
3. HEARD, G.S. et al. Neonatal screening for biotinidase deficiency: results of a 1 year pilot study. *J. Pediat.*, **108**:40-6, 1986.
4. LEVY, H.L. et al. Screening of the newborn. *Pediat. Infect. Dis. J.*, **12**: 111-9, 1993.
5. TAITZ, L.S. et al. Biotinidase deficiency and ear. *Lancet*, **2** (8355): 918, 1983.
6. WOLF, B. et al. Phenotypic variation in biotinidase deficiency. *J. Pediat.*, **103**:233-7, 1983.
7. WOLF, B. et al. Biotinidase activity. *Clin. Chem. Acta*, **131**:273-81,1983.
8. WOLF, B. et al. Screening for biotinidase deficiency in newborns: world experience. *Pediatrics*, **85**: 512-7 1990.
9. WOLF, B. Disorders of biotin metabolism. In: Scriver, J.B. The metabolic and molecular bases of inherited disease. McGraw Hill Book Company, 1996. p. 3151-77.