

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

PINTO Anna L. R. Estudo de prevalência em recém-nascidos por deficiência de biotinidase
Rev. Saúde Pública, 32 (2): 148-52, 1998

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. Guthrie¹ 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 mundo¹.

A deficiência de biotinidase, descrita pela primeira vez em 1983⁵, preenche todos os principais critérios para inclusão na lista de doenças a serem pesquisadas³: 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 infecções⁶.

Heard e col.²(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.² (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 reconvocados 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)⁷. 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 1:137.000⁸.

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 literatura⁸ 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 homocistinúria⁴.

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.⁸ (1990).

Tanto no estudo realizado, quanto nos referidos na literatura^{2,8}, 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 literatura³.

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 negra⁵.

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.