



Biomédica

ISSN: 0120-4157

biomedica@ins.gov.co

Instituto Nacional de Salud

Colombia

González, Ernesto C.; Díaz, Libertad; Frómeta, Amarilys; Herrera, Darlenis; Montenegro, Adonis
Ensayo cuantitativo para la determinación de la actividad hidrolítica de la enzima biotinidasa

Biomédica, vol. 21, núm. 4, diciembre, 2001, pp. 360- 368

Instituto Nacional de Salud

Bogotá, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84321411>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

ARTÍCULO ORIGINAL

Ensayo cuantitativo para la determinación de la actividad hidrolítica de la enzima biotinidasa

Ernesto C. González ¹, Libertad Díaz ², Amarilys Frómata ¹,
Darlenis Herrera ¹, Adonis Montenegro ²

¹ Laboratorio de Tamizaje Neonatal, Centro de Inmunoensayo, La Habana, Cuba.

² Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas Victoria de Girón, Departamento de Inmunología, La Habana, Cuba.

El presente trabajo describe la estandarización de un ensayo diseñado para cuantificar la actividad hidrolítica de la enzima biotinidasa en muestras de suero humano, el cual se basa en el método de Wolf y colaboradores, que emplea el N-biotinil-p-aminobenzoico (BPABA) como sustrato. Con la adición de detergentes a la solución de nitrito de sodio, se eliminan las burbujas de nitrógeno formadas durante la reacción de diazotación y se mejora la precisión del ensayo. Se observó que la congelación-descongelación de las muestras de suero no afecta la actividad hidrolítica de la enzima biotinidasa. La evaluación de la interferencia de fármacos en el ensayo mostró que con el sulfametoxasol/trimetoprim y la procaína/benzilpenicilina hay desarrollo de color en ausencia del sustrato BPABA. Los valores promedio de actividad hidrolítica de la biotinidasa, obtenidos en un grupo de 205 niños sanos, fue de $7,04 \pm 2,2$ nmol/min/ml. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al evaluar la actividad de la enzima por sexo, raza y grupos de edad. Este ensayo se puede emplear en la determinación de la actividad hidrolítica de la enzima biotinidasa en muestras de suero humano y, específicamente, en la confirmación de los casos detectados por los programas de tamizaje neonatal para la deficiencia de biotinidasa.

Palabras clave: deficiencia de biotinidasa, ensayo colorimétrico, tamizaje neonatal.

Quantitative assay to determine the hydrolytic activity of biotinidase

A quantitative assay was standardized to determine the hydrolytic activity of biotinidase in human serum samples. The current Wolf *et al.* assay uses N-biotinyl-p-aminobenzoic acid as substrate. The assay's precision was improved by the addition of detergents to the sodium nitrite solution. This eliminated the formation of nitrogen bubbles during the diazotation reaction. Freezing and thawing of the serum samples did not affect the hydrolytic activity. Farmaco's interference test showed positive results with sulfametoxasol/trimetoprima and procaine/benzylpenicilline. The hydrolytic activity of biotinidase averaged 7.04 ± 2.2 nmol/min/ml in a group of 205 healthy children. No statistically significant differences in enzymatic activity was observed between variables of sex, races and age group. The standardize assay can determine the hydrolytic activity of biotinidase human serum samples and can confirm the positive cases detected by neonatal screening programs for biotinidase deficiency.

Key words: Biotinidase deficiency, colorimetric assay, neonatal screening.

Uno de los errores innatos del metabolismo de la biotina lo constituye la deficiencia de la enzima

Correspondencia:

Ernesto C. González, Apartado postal 6653, Cubanacán, Playa C, Habana, Cuba.

Recibido: 07/05/01; aceptado: 19/11/01

biotinidasa. Descrita en la década de los 50, la biotinidasa es la enzima encargada del reciclaje de la biocitina obtenida de la degradación de las carboxilasas y de la liberación de la biotina unida a las proteínas de la dieta, llevándolas a una forma biológicamente viable (1,2).

La deficiencia de biotinidasa es un trastorno metabólico autosómico recesivo que se clasifica en deficiencia total (<10% de actividad hidrolítica) o parcial (10-30%)(3-5). El cuadro clínico y el tiempo de presentación de los síntomas es muy variable (6-10). La sintomatología inicial está relacionada con el sistema nervioso: hipotonía muscular, ataxia y retraso en el desarrollo psicomotor (6,8). También puede observarse pérdida de la audición, atrofia óptica, alopecia, problemas respiratorios, dermatitis, conjuntivitis, infecciones fúngicas e inmunodeficiencias (8). Las manifestaciones bioquímicas más frecuentes son la acidosis cetoláctica y la aciduria orgánica. La descompensación metabólica puede llevar al coma y a la muerte (6). Un diagnóstico temprano en el período neonatal permite una terapia efectiva con biotina (6-8).

En 1984, se comenzó el primer programa de tamizaje neonatal de la deficiencia de biotinidasa en el estado de Virginia, Estados Unidos (11). Otros países también han desarrollado programas para el tamizaje de la enfermedad como un acto de medicina preventiva (12-21). Se estima que la incidencia mundial de la deficiencia de biotinidasa es de 1:60.000 (4). Su incidencia es baja si se compara con otras patologías conocidas como son el hipotiroidismo congénito (1:4.000) y la fenilcetonuria (1:15.000), pero es similar a otras como la galactosemia (1:60.000).

El presente trabajo describe la estandarización de un ensayo colorimétrico que permite la cuantificación de la actividad hidrolítica de la enzima biotinidasa en muestras de suero humano. La interferencia de los medicamentos de la familia de las sulfonamidas se ha informado en los ensayos para la detección de la deficiencia de biotinidasa que emplean el BPABA como sustrato. Por tanto, es importante evaluar el posible efecto de fármacos de uso común en el período neonatal y en la infancia sobre este tipo de ensayo, para disminuir la posibilidad de falsos resultados (11,22).

Materiales y métodos

Reactivos

El ácido tricloroacético (TCA), el N-biotinil-p-aminobenzoico (B-PABA), el p-amino-benzoico

(PABA), el fosfato de potasio, el nitrito de sodio (NaNO_2), el sulfato de amonio, el N-1-naftiletil-endiaminodihidrocloreto (vitamina K-6) y el ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) se obtuvieron de *Sigma Chemical Co.*, St. Louis, U.S.A.

Ensayo para determinar la actividad hidrolítica de la enzima biotinidasa en muestras de suero humano

El ensayo se basa en una modificación al método descrito por Wolf *et al.* (23), en la cual se adicionan 25 ml de suero a una mezcla de reacción compuesta por 200 mM del sustrato B-PABA y 4,5 mM de EDTA en solución tampón fosfato de potasio, 47 mM, pH 6,0 para un volumen final de 500 ml. Se empleó una curva de calibración de 5, 10, 20, 40 y 80 mM de PABA y 4,5 mM de EDTA en solución tampón fosfato de potasio, 47 mM, pH 6,0. Se incubó a 37 °C en cámara húmeda para que ocurriera la reacción enzimática. Se detuvo la reacción con 50 ml de una solución fría de TCA (1,84 M). Después de 10 minutos, se centrifugó a 16.000 g; se tomaron 300 ml del sobrenadante y se le añadieron 100 ml de agua destilada. Luego, se adicionaron 40 ml de los siguientes reactivos con intervalos de 3 minutos: nitrito de sodio (14,5 mM), sulfamato de amonio (43,8 mM) y vitamina K-6 (3,86 mM). Se esperaron 10 minutos y se transfirieron 200 ml a placas microELISA. Se midió la densidad óptica a 546 nm, empleando el lector de placas Fluorímetro-Fotómetro PR 521 (Tecnología SUMA, Centro de Inmunoensayo).

La figura 1 muestra el diagrama de la reacción enzima-sustrato, los productos obtenidos y las reacciones que dan lugar a la formación del complejo coloreado.

La actividad enzimática se calculó según la siguiente fórmula:

actividad enzimática = nmoles de PABA producidos/tiempo de incubación/volumen de muestra.

Se determinó si la adición de detergentes a la solución de nitrito de sodio eliminaba las burbujas de nitrógeno formadas durante la reacción de diazotación, las cuales interfieren en la señal obtenida de absorbancia. Se emplearon los

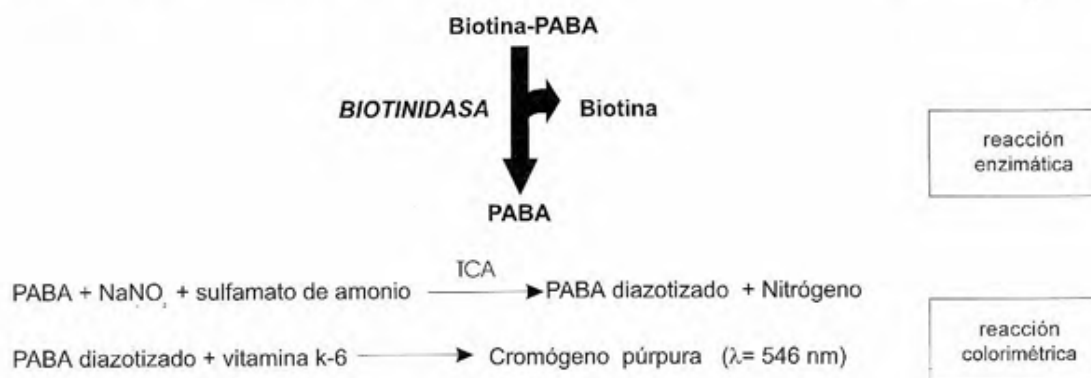


Figura 1. Hidrólisis del sustrato BPABA por la enzima biotinidasa (reacción enzimática) y detección del PABA formado (reacción colorimétrica).

detergentes no iónicos tween 20 y tritón X-100, los cuales se añadieron a la solución de nitrito de sodio en concentraciones de 0,1 y 0,5%.

Se estableció el tiempo óptimo de incubación del ensayo y se evaluaron los valores promedio de absorbancia obtenidos con los diferentes puntos de la curva de PABA ($n=5$) y con una muestra de suero humano con actividad normal de biotinidasa ($n=5$). Los tiempos estudiados fueron 0, 10, 20, 30, 60, 90 y 120 minutos y se determinó como óptimo el tiempo a partir del cual no variaba la señal obtenida de absorbancia.

Se evaluó la interferencia con la reacción colorimétrica de los siguientes fármacos: sulfametoxazol/trimetoprim, ampicilina, gentamicina, fenobarbital y estreptomina a concentraciones de 0,625, 1,25, 2,5, 5 y 10 mg/ml y de procaína/benzilpenicilina a 188, 375, 750, 1.500 y 3.000 unidades internacionales (UI). Se empleó un suero humano libre de actividad de la enzima biotinidasa al que se le adicionaron los fármacos. En este ensayo, las muestras se incubaron con el tampón fosfato en sustitución del sustrato.

Se estudió la interferencia de fármacos en muestras de niños que estaban recibiendo medicamentos en el momento de la toma de la muestra. Este ensayo se realizó incubando simultáneamente las muestras con tampón fosfato y con la solución sustrato.

Se estudió el efecto de eventos repetidos de congelación-descongelación de las muestras de

suero humano sobre la actividad hidrolítica de la enzima biotinidasa. Las muestras se sometieron a 5 ciclos de congelación a -35°C durante 30 minutos y descongelaciones a temperatura ambiente. Se calculó la actividad enzimática de la biotinidasa para cada uno de los ciclos de congelación-descongelación.

Para la determinación de los coeficientes de variación (CV) intra e interensayo, se evaluaron muestras de actividad conocida de biotinidasa. El CV se definió como la división entre la desviación estándar y el valor promedio de cada muestra, multiplicado por 100.

Se determinaron los porcentajes de recuperación obtenidos para el ensayo al mezclar muestras de suero humano con actividad biotinidasa conocida. El porcentaje de recuperación se definió como la división entre la actividad biotinidasa obtenida y la actividad esperada, multiplicado por 100.

Determinación de la actividad hidrolítica de la biotinidasa en muestras de suero humano

Se emplearon muestras de suero de un grupo de niños ($n=205$) con edades comprendidas entre 1 y 17 años, a quienes se les habían ordenado ensayos clínicos de rutina. Estas muestras se obtuvieron en el Laboratorio de Bioquímica del Hospital Pediátrico de Centro Habana, Ciudad de La Habana, Cuba. Los niños presentaban enfermedades frecuentes en esta etapa de la vida (influenza, enfermedades diarreicas) cuyos signos clínicos excluyen desórdenes neurológicos y

metabólicos que puedan asociarse con la deficiencia de biotinidasa.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa *Statistics for Windows*, versión 4.5. Para evaluar la influencia del proceso de congelación-descongelación sobre la actividad de la biotinidasa en muestras de suero humano, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple. En la comparación de los valores promedios de actividad hidrolítica de la enzima biotinidasa, obtenidos por sexo, raza y grupos de edad se empleó la prueba *t* de Student. Con ambos datos estadísticos se trabajó para un nivel de significación de $p < 0,05$.

Resultados y discusión

Evaluación de la adición de detergentes a la solución de nitrato de sodio y determinación del tiempo óptimo de incubación del ensayo

En la figura 2 se muestran los valores promedio de absorbancia obtenidos para cada punto de la curva de PABA al evaluar la adición de los detergentes no iónicos tritón X-100 y tween 20 a la solución de nitrato de sodio, con el objetivo de eliminar las burbujas de nitrógeno formadas durante la reacción de diazotación y que pudieran interferir en la medición de la absorbancia.

Los altos valores de absorbancia para la condición en la cual no se adicionó ningún detergente están asociados con las interferencias provocadas por la presencia de las burbujas en la solución. No se observaron grandes diferencias en los valores promedios de absorbancia obtenidos entre todas las condiciones donde se adicionó detergente. Sin embargo, la evaluación visual mostró que sólo se eliminaban completamente las burbujas de nitrógeno en la solución empleando el nitrato de sodio que contenía tritón X-100 al 0,1%. Este detergente en concentraciones entre 0,1 y 0,5% no afectó la actividad de la enzima y ya había sido empleado en el tampón sustrato (24). Con la adición de este detergente a la solución de nitrato de sodio, se mejoraron los valores de absorbancia que se obtienen para el calibrador de concentración de PABA igual a 0. Esto garantiza una mejor separación entre los dos primeros puntos de la

curva de calibración y mejora la precisión del ensayo.

El cuadro 1 muestra los valores de absorbancia obtenidos al incubar a 37 °C la curva de PABA a diferentes tiempos. El tiempo de incubación no afectó los valores de absorbancia obtenidos para las diferentes concentraciones de la curva de calibración y se obtuvo una buena correlación (0,999) entre todos los tiempos estudiados.

Se evaluó el efecto del tiempo de incubación sobre los valores promedio de absorbancia obtenidos con una muestra de suero humano con actividad normal de biotinidasa. Los resultados se pueden observar en la figura 3.

A partir de los 60 minutos de incubación de las muestras con la solución sustrato, se obtuvieron valores de absorbancia que no variaron con el tiempo de incubación. Estos valores de absorbancia se encuentran en una zona media de la curva de PABA lo cual nos permite hacer una buena discriminación entre las muestras de individuos afectados con la enfermedad e individuos con actividad normal de biotinidasa.

A partir de estos resultados, se decidió emplear en el ensayo un tiempo de incubación de 60 minutos. La absorbancia se pudo medir en el lector fluorímetro-fotómetro PR 521, 10 minutos después del desarrollo de color y se observó que esta señal era estable durante dos horas si se mantenían las placas protegidas de la luz.

Precisión y exactitud

En el cuadro 2 se muestran los coeficientes de variación (CV) intra e interensayo. En ambos casos se evaluaron muestras de actividad de biotinidasa conocida y que abarcaban un amplio intervalo de la curva de calibración del ensayo. En todos los casos, los coeficientes de variación fueron inferiores al 10%.

Los porcentajes de recuperación obtenidos para el ensayo al mezclar muestras de suero humano con actividad de biotinidasa conocida, fueron de $98,3 \pm 7,5\%$ y los porcentajes individuales oscilaron entre 94 y 108%.

Los resultados anteriores nos permiten plantear que el ensayo es preciso y exacto dentro de un

intervalo que garantiza poder diferenciar poblaciones con diferentes valores de actividad de la enzima biotinidasa.

Determinación del límite de detección

El límite de detección del ensayo se definió como el valor promedio de absorbancia del calibrador 0 de la curva de calibración más tres desviaciones estándar. La actividad mínima detectable fue de 0,64 nmol/min/ml. Este valor de actividad nos permite utilizar el ensayo para evaluar la actividad de la enzima biotinidasa en poblaciones normales

y clasificar la deficiencia en total o parcial. La deficiencia total se informa para valores de actividad inferiores a 0,7 nmol/min/ml y la deficiencia parcial en un rango de actividad entre 0,7 y 2,1 nmol/min/ml. Los heterocigóticos obligados muestran una actividad enzimática entre 2,2 y 5,2 nmol/min/ml (24).

Pruebas de interferencia

En ausencia de sustrato no hubo interferencia en las muestras de suero a las que se le adicionaron las diferentes concentraciones (0-10 mg/ml) de

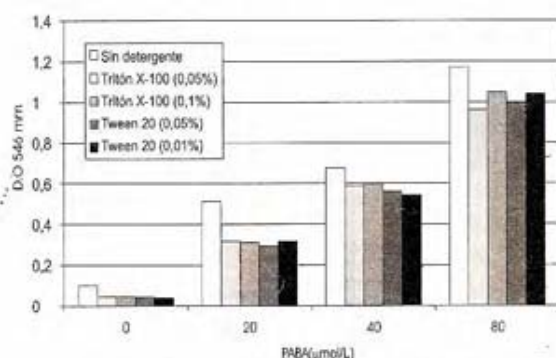


Figura 2. Comparación de los valores promedio de absorbancia (n=5) obtenidos para los puntos de la curva de PABA al emplear detergentes en la solución de nitrato de sodio.

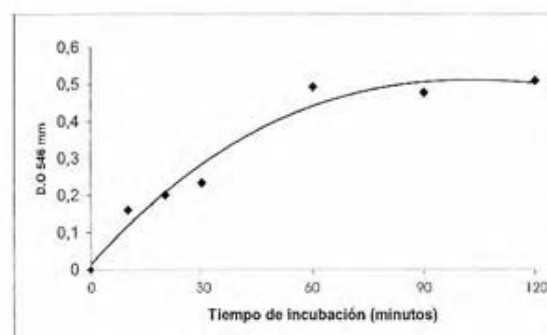


Figura 3. Efecto del tiempo de incubación sobre los valores de absorbancia en una muestra de suero humano con actividad normal de la enzima biotinidasa.

Cuadro 1. Valores promedio de absorbancia de la curva de PABA a diferentes tiempos de incubación.

Curva (µmol/ml)	Tiempo (min)							CV
	0	10	20	30	60	90	120	
0	0,049	0,045	0,048	0,047	0,045	0,046	0,046	3,2
5	0,110	0,099	0,103	0,108	0,110	0,106	0,102	4,0
10	0,176	0,160	0,175	0,171	0,169	0,177	0,178	3,7
20	0,272	0,296	0,307	0,298	0,297	0,308	0,310	4,3
40	0,541	0,537	0,554	0,562	0,560	0,544	0,560	1,8
80	0,980	0,941	0,985	0,982	1,014	0,983	0,961	2,3

CV: coeficiente de variación para cada punto de la curva

Cuadro 2. Precisión del ensayo.

Actividad enzimática (nmol/min/ml)	Desviación estándar	CV intraensayo (n=20)	Actividad enzimática (nmol/min/ml)	Desviación estándar	CV interensayo (n=10)
2,61	0,20	7,7	4,1	0,31	7,5
5,71	0,29	5,1	6,0	0,31	5,9
10,12	0,67	6,6	8,5	0,70	7,8

ampicilina, gentamicina, fenobarbital y estreptomina. Los valores de absorbancia obtenidos fueron similares al valor del calibrador 0 del ensayo, que fue de 0,09. Los sueros que contenían sulfametoxazol/trimetoprim y procaína/benzilpenicilina sí interfirieron en el ensayo. Estos resultados se muestran en el cuadro 3. El valor de absorbancia del calibrador de 80 μ M de la curva de calibración de PABA fue de 1,25. Con el sulfametoxazol/trimetoprim, para todas las concentraciones estudiadas, los valores de absorbancia fueron superiores al valor del calibrador de 80 μ M de PABA. En el caso de la procaína/benzilpenicilina, los valores de absorbancia disminuyeron a partir de 750 UI, aunque todavía a la concentración de 188 UI esos valores de absorbancia interfirieron en el ensayo.

Entre las muestras provenientes del Hospital Pediátrico de Centro Habana se encontraron 5 niños que estaban en tratamiento con sulfametoxazol/trimetoprim. En el cuadro 4 se observan los valores de absorbancia y de actividad enzimática calculada para esas muestras, antes y después de corregida la posible interferencia con el fármaco. Esta corrección se realizó teniendo en cuenta la absorbancia obtenida con las muestras en ausencia de sustrato. En las muestras

1, 2 y 3 se observó la interferencia del fármaco, lo que hace que en todos los casos la actividad real de la enzima sea mucho menor. Al ser corregida la actividad enzimática en las muestras 2 y 3 pudimos observar que los niños que presentaban una actividad de biotinidasa por encima del valor promedio de la población (7,1 nmol/min/ml), realmente clasificaban dentro del grupo de heterocigóticos obligados (24). Las muestras 4 y 5 no mostraron señales de interferencia, pues los valores de absorbancia obtenidos en ausencia de sustrato son similares a los del calibrador 0 de la curva de PABA (0,045). La ausencia de interferencia en las dos últimas muestras puede deberse a que, en el momento de la toma de la muestra, el fármaco ya había sido metabolizado por el organismo. No se pudieron precisar en ninguno de los casos las dosis y el tiempo de tratamiento.

Se conocía de la interferencia producida por los medicamentos pertenecientes a la familia de las sulfonamidas (11,22). En el caso de la procaína/benzilpenicilina la interferencia se debe al grupo 4-aminobenzoico en la estructura de la procaína. En ambos medicamentos, la interferencia está asociada con la similitud estructural del fármaco con el PABA. La presencia de grupos aminos

Cuadro 3. Valores promedio de absorbancia obtenidos con los sueros a los que se les adicionaron los medicamentos sulfametoxazol/trimetoprim y procaína/benzilpenicilina.

Sulfametoxazol/trimetoprim (mg/ml)	Absorbancia (546 nm) n=5	Procaína/benzilpenicilina UI	Absorbancia (546 nm) n=5
10,0	3,00	3.000	2,88
5,0	2,99	1.500	1,81
2,5	2,25	750	0,66
1,25	2,18	375	0,64
0,625	1,53	188	0,27

Cuadro 4. Interferencia del sulfametoxazol/trimetoprim en la determinación de la actividad de biotinidasa en muestras de niños.

Muestras	Absorbancia total	Actividad enzimática total (nmol/min/ml)	Absorbancia sin sustrato	Absorbancia corregida	Actividad enzimática corregida (nmol/min/ml)
1	0,55	13,4	0,18	0,37	8,58
2	0,46	10,6	0,26	0,20	3,90
3	0,42	10,0	0,24	0,18	3,39
4	0,37	8,6	0,05	0,32	7,70
5	0,28	6,1	0,03	0,25	5,44

primarios en la estructura aromática de estos fármacos contribuye a la formación del complejo coloreado aún en ausencia de la enzima biotinidasa. Los estudios que se han realizado no han analizado las condiciones farmacológicas de biodisponibilidad y degradación del medicamento (11,22), lo que no descarta la posibilidad de que algunos de sus metabolitos puedan generar otros interferentes.

Los fármacos evaluados son de uso común en el período neonatal y en la infancia en general, por lo que estos estudios de interferencia son un elemento muy importante a tener en cuenta al emplear este ensayo, ya que la presencia de ciertos fármacos puede ser una fuente de falsos negativos y, en aquellos casos en que se obtengan valores de absorbancia muy altos, se debe sospechar la presencia de interferentes. De hecho, se recomienda realizar las dos determinaciones simultáneamente (en ausencia y presencia de sustrato) para descartar posibles interferencias (11,22).

Efecto de la congelación-descongelación sobre la actividad enzimática

El cuadro 5 muestra los resultados obtenidos al evaluar el efecto de la congelación-descongelación sobre la actividad enzimática de la biotinidasa en cinco muestras de suero humano. El proceso de congelación-descongelación no afectó significativamente la actividad de la enzima biotinidasa.

En este trabajo nos referimos a la actividad hidrolítica de la enzima, pues es la única función que se puede medir con el ensayo. Por tanto, no podemos afirmar que las otras funciones de la enzima biotinidasa, por ejemplo, la actividad biotiniltransferasa (24), no se vean afectadas por el proceso de congelación-descongelación. Hay que señalar que este estudio se realizó con muestras recientes, por lo que sería interesante evaluar este efecto con muestras conservadas por largos períodos a diferentes temperaturas.

Determinación de la actividad de la enzima biotinidasa en muestras de suero humano

El valor promedio de actividad hidrolítica de la enzima biotinidasa obtenido al evaluar un grupo

Cuadro 5. Efecto de la congelación-descongelación de las muestras de suero humano sobre la actividad de la biotinidasa; para el análisis estadístico se empleó un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple.

Actividad enzimática (nmol/min/ml)	Descongelaciones					p
	1	2	3	4	5	
6,831	7,662	7,119	7,198	7,825	7,881	0,07
5,731	6,450	5,925	6,631	5,650	6,756	0,27
7,037	7,938	7,413	8,288	8,913	7,800	0,10
5,631	6,869	6,313	5,756	6,381	6,788	0,11
6,163	7,356	6,856	7,662	7,006	7,813	0,19

de niños (n=205), con un promedio de edad de $6,5 \pm 4,2$ años, fue de $7,04 \pm 2,2$ nmol/min/ml. Este resultado es similar a lo informado para otras poblaciones con actividad normal de la enzima (25,26).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores promedios de actividad de la enzima al realizar el estudio por sexo ($p=0,33$) y raza ($p=0,38$). La deficiencia de biotinidasa ha sido descrita en distintas poblaciones y no se ha determinado la existencia de una mayor frecuencia de aparición por sexo o raza.

En el cuadro 6 se pueden observar los valores de actividad enzimática obtenidos para tres grupos de edad diferentes. El valor medio de actividad de biotinidasa obtenido para el grupo 1 fue ligeramente mayor que en el resto de los grupos; sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas al realizar la prueba t de Student entre los grupos 1 y 2 ($p=0,11$), los grupos 1 y 3 ($p=0,21$) y los grupos 2 y 3 ($p=0,94$).

Se ha informado que los niveles de actividad de biotinidasa en recién nacidos es entre 50 y 70% inferior al valor promedio de la población adulta (22); pero los niveles de actividad en adultos se alcanzan al mes de nacidos (27). Esto coincide con nuestros resultados, en los cuales el valor medio de actividad de biotinidasa por grupos de edad es similar a lo informado para la población adulta. Los valores de actividad enzimática obtenidos con las muestras 2 y 3 (cuadro 4), que los define como heterocigóticos obligados, hablan de la necesidad de realizar estudios que permitan evaluar la frecuencia de portadores de genes para

Cuadro 6. Estudio de la actividad hidrolítica de la enzima biotinidasa por grupos de edad ; para el análisis estadístico se empleó la prueba t de Student.

Grupos	Edad (años)	n	Actividad enzimática (nmol/min/ml)
1	1-5	95	7,27 ± 2,13
2	6-10	69	6,75 ± 2,06
3	11-17	41	6,78 ± 2,09

Datos expresados: media ± D.E.

la deficiencia de biotinidasa en la población cubana. Estimados internacionales obtenidos de los programas de tamizaje neonatal muestran una frecuencia de portadores de 1 por cada 123 individuos (28).

La incidencia de la deficiencia de biotinidasa en muchos países es desconocida. Según los resultados de los programas de tamizaje neonatal, la incidencia de la deficiencia total es aproximadamente de 1 en 110.000 y, teniendo en cuenta los casos de deficiencia parcial, se estima una incidencia mundial de 1 en 60.000 (4). El diagnóstico temprano de esta enfermedad mediante los programas de tamizaje neonatal, así como una efectiva suplementación oral con biotina libre, previene la aparición de síntomas.

Este ensayo colorimétrico cuantitativo que emplea como sustrato el B-PABA tiene la ventaja de emplear pequeños volúmenes de muestra (25 ml de suero) sin que se afecte la precisión y exactitud (29,30) y puede utilizarse dentro de los programas de tamizaje neonatal para la confirmación y clasificación de los casos en que se sospeche la deficiencia de biotinidasa. Además, puede emplearse en la realización de estudios familiares y en el análisis de individuos que presenten algunos de los síntomas de la enfermedad.

Referencias

- Nyhan WL. Inborn errors of biotin metabolism. Arch Dermatol 1987;123:1696-8.
- Thomas RW, Peterson WH. The enzymatic degradation of soluble bound biotin. J Biol Chem 1954;210:569-79.
- Wolf B, Grier RE, Allen RJ, Goodman SI, Kien CL. Biotinidase deficiency: the enzymatic defect in late-onset multiple carboxylase deficiency. Clin Chim Acta 1983; 131:273-81.
- Wolf B. Disorders of biotin metabolism. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York: McGraw-Hill, Inc; 1995. p.3151-80.
- Pomponio RJ, Hymes J, Reynolds TR, Meyers GA, Fleischhauer K, Buck GA, et al. Mutations in the human biotinidase gene that cause profound biotinidase deficiency in symptomatic children: molecular, biochemical, and clinical analyses. Pediatr Res 1997;42:840-8.
- Wolf B, Grier RE, Allen RJ, Goodman SI, Kien CL, Parker WD, et al. Phenotypic variation in biotinidase deficiency. J Pediatr 1983;103:233-7.
- Wolf B, Heard GS, Jefferson LG, Proud VK, Nance WE, Weissbecker KA. Clinical findings in four children with biotinidase deficiency detected through a state-wide neonatal screening program. N Engl J Med 1985;313: 16-9.
- Wastell HJ, Bartlett K, Dale G, Shein A. Biotinidase deficiency: a survey of 10 cases. Arch Dis Child 1988;63: 1244-9.
- Lott IT, Lottenberg S, Nyhan WL, Buchsbaum MJ. Cerebral metabolic changes after treatment in biotinidase deficiency. J Inher Metab Dis 1993;16:399-407.
- Collins JE, Nicholson NS, Dalton N, Leonard JV. Biotinidase deficiency: early neurological presentation. Dev Med Child Neurol 1994;36:263-70.
- Heard GS, McVoy JR, Wolf B. A screening method for biotinidase deficiency in newborns. Clin Chem 1984;30: 125-7.
- Minns RA, Kirk J. Biotinidase deficiency in Scotland. Dev Med Child Neurol 1994; 36:748-9.
- Castiñeiras DE, Couce ML, Alonso-Fernández JR. Two cases of biotinidase deficiency within a 9 day period after 8 years of neonatal screening involving the analysis of 175,000 newborn children. En: Levy HL, Hermos RJ, Grady GF, editors. Proceedings, Third Meeting of the International Society for Neonatal Screening, 1996, Oct. 20-23. Boston: New England Regional Newborn Screening Program; 1996. p.190-1.
- Pistaccio LG, Castillo PI, Di Carlo CM, Adam MM, Lanz MH, Gómez FR, et al. Primera experiencia de pesquisa masiva de deficiencia de biotinidasa en Argentina. En: Cornejo V, Raimann E, Colombo M, editores. Resúmenes, II Congreso Latinoamericano de Errores Innatos del Metabolismo y Pesquisa Neonatal, 1999, oct. 24-27. Santiago de Chile: Caupolicán Servicios Gráficos; 1999. p.83.
- Héron B, Gautier A, Dulac O, Ponsot G. Déficit en biotinidase. Une encéphalopathie progressive curable par la biotine. Arch Fr Pediatr 1993;50:875-8.
- Möslinger D, Scheibeneiter S, Mühl A, Suormala T, Baumgartner R, Tiefenthaler M, et al. 12 years newborn screening for biotinidase deficiency in Austria.

- Abstracts, 4th Meeting of the International Society for Neonatal Screening 1999, June 13-16. Oslo: Stockholm Convention Bureau; 1999. p.109.
17. **Pomponio RJ, Yamaguchi A, Arashima S, Hymes J, Wolf B.** Mutation in a putative glycosylation site (N489T) of biotinidase in the only known Japanese child with biotinidase deficiency. *Mol Gen Metabol* 1998; 64:152-4.
 18. **Tokatli A, Coskun T, Özalp I.** Biotinidase deficiency with neurological features resembling multiple sclerosis. *J Inher Metab Dis* 1997;20:707-8.
 19. **Eyskens F.** Neonatal screening for biotinidase deficiency: a success story. Abstracts, 4th Meeting of the International Society for Neonatal Screening 1999, June 13-16. Oslo: Stockholm Convention Bureau; 1999. p.110.
 20. **Guthenberg C, Holme E, Hagenfeldt L.** Screening for biotinidase deficiency in Sweden. En: Levy HL, Hermos RJ, Grady GF, editors. *Proceedings, Third Meeting of the International Society for Neonatal Screening*, 1996, Oct. 20-23. Boston: New England Regional Newborn Screening Program; 1996. p.192.
 21. **Neto EC, Schulte J, Lewis E, Brites A, Giugliani R.** Screening for biotinidase deficiency in South Brazil. Abstracts, 4th Meeting of the International Society for Neonatal Screening 1999, June 13-16. Oslo: Stockholm Convention Bureau; 1999. p.108.
 22. **Heard GS, Wolf B, Jefferson LG, Weissbecker KA, Nance WE, McVoy JRS, et al.** Neonatal screening for biotinidase deficiency: results of a 1-year pilot study. *J Pediatr* 1986;108:40-6.
 23. **Wolf B, Grier RE, Allen RJ, Goodman SI, Kien CL.** Biotinidase deficiency: the enzymatic defect in late-onset multiple carboxylase deficiency. *Clin Chim Acta* 1983; 131:273-81.
 24. **Hymes J, Fleischhauer K, Wolf B.** Biotinidase in serum and tissues. *Methods Enzymol* 1997;279:422-34.
 25. **Burton BK, Roach ES, Wolf B, Weissbecker KA.** Sudden death associated with biotinidase deficiency. *Pediatrics* 1987;79:482-3.
 26. **Lawler MG, Frederick DL, Rodríguez-Anza S, Wolf B, Levy HL.** Newborn screening for biotinidase deficiency: pilot study and follow-up of identified cases. *Screening* 1992;1:37-47.
 27. **Sourmala T, Wick H, Baumgartner ER.** Low biotinidase activity in plasma of some pre-term infants: possible source of false-positive screening results. *Eur J Pediatr* 1988;147:478-90.
 28. **Wolf B, Heard GS.** Disorders of biotin metabolism. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic basis of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, Inc; 1989. p.2083-103.
 29. **Wastell H, Dale G, Bartlett K.** A sensitive fluorimetric rate assay for biotinidase using a new derivative of biotin, biotinyl-6-aminoquinoline. *Ann Biochem* 1984;140:69-73.
 30. **Ebrahim H, Dakshinamurti K.** A fluorometric assay for biotinidase. *Ann Biochem* 1986;154:282-6.