

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**YENİDOĞAN TARAMA PROGRAMI İLE
TANI KONULMUŞ BİOTİNİDAZ
EKSİKLİĞİ OLAN HASTALARIMIZIN
RETROSPEKTİF DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Gökberk Ural GÖKPINAR

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İZMİR 2020

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**YENİDOĞAN TARAMA PROGRAMI İLE
TANI KONULMUŞ BİOTİNİDAZ
EKSİKLİĞİ OLAN HASTALARIMIZIN
RETROSPEKTİF DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Gökberk Ural GÖKPINAR

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. Nur ARSLAN

İZMİR 2020

TEŞEKKÜR

Başta bu tezin hazırlanmasında ve uzmanlık eğitimim boyunca bana her konuda yardımcı olan tez hocam Prof. Dr. Nur Arslan'a,

Bu tez çalışmamın istatistiksel analiz kısmı dâhil hazırlanmasında ve onun dışında bir ağabey olarak her konuda yanımda olan Uz. Dr. Engin Köse'ye,

Uzmanlık eğitimim boyunca mesleki bilgi ve deneyimini esirgemeyen değerli hocam Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Murat Duman'a,

İlminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum tüm hocalarıma,

Eğitimime katkıda bulunan, birlikte çalışmaktan keyif aldığım uzmanlarıma,

Uyum içinde çalıştığımız tüm hemşire ve personellerimize,

Zorlu asistanlık sürecinde kazandığım arkadaştan öte kardeş olabildiğim Dr. Yağmur Damla Akçura, Dr. Coşkun Armağan, Dr. Ali Öksel, Dr. Gizem Bakır, Dr. Abdullah Sağlık, Dr. Kardelen Akın, Dr. Buğra Yalçın ve Dr. Beste Nigar Gök Yalçın'a,

Daima desteğini hissettiğim biricik eşim, en iyi dostum, meslektaşım, yol arkadaşım ve kızımızın annesi Dr. Lale Gökpınar'a,

Hayatımın her aşamasında yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Gökberk Ural Gökpınar

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
TABLO LİSTESİ.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
KISALTMALAR.....	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	viii
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. DOĞUMSAL METABOLİK HASTALIKLAR.....	3
2.2. YENİDOĞAN TARAMASI.....	3
2.3. BİOTİN VE BİOTİNİN YAPISI	5
2.4. HOLOKARBOKSİLAZ SENTETAZ EKSİKLİĞİ.....	6
2.5. BİOTİNİDAZ EKSİKLİĞİ.....	7
2.5.1. Biotinidaz Eksikliğinin Klinik Bulguları	7
2.5.2. Biotinidaz Eksikliğinin Tanısı	8
2.5.3. Biotinidaz Eksikliğinin Taranması.....	9
2.5.4. Biotinidaz Eksikliğinin Tedavisi.....	10
3. GEREÇ VE YÖNTEM	11
3.1. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME.....	11
4. BULGULAR	13
5. TARTIŞMA.....	27
6. SONUÇLAR.....	30
KAYNAKÇA	34
EKLER.....	38
Ek 1: Etik Kurul Onayı.....	38
Ek 2: Olgu Rapor / Veri Kayıt Formu Örneği	39

TABLO LİSTESİ

Tablo 1 Hastaların demografik verileri	13
Tablo 2 Çalışmaya dahil olan tüm hastaların BTM gen analizi sonuçları	14
Tablo 3 Hastalarda görülen mutasyonların sıklıkları	15
Tablo 4 Enzim düzeylerine göre grupların kıyaslanması	22
Tablo 5 Ağır enzim eksikliği olan hastalarda BTM gen analizi sonuçları	23
Tablo 6 Parsiyel enzim eksikliği olan hastalarda BTM gen analizi sonuçları	24
Tablo 7 Heterojen enzim eksikliği olan hastalarda BTM gen analizi sonuçları	25
Tablo 8 Hastaların enzim aktivitesi ile genetik sonuçların kıyaslanması	25
Tablo 9 Aile taraması sonuçları	26

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1 Biotine bağımlı karboksilazların ara metabolizmada yeri	5
Şekil 2 Biotin döngüsü.....	6
Şekil 3 Biotinidaz eksikliği akış şeması	9
Şekil 4 Mutasyon tipine göre hastaneye başvuru anında bakılan botinidaz enzim aktivitelerinin karşılaştırılması	16
Şekil 5 Mutasyon tipine göre hastaların takip süresince saptanan en düşük biotinidaz enzim aktivitelerinin karşılaştırılması.....	17
Şekil 6 Mutasyon tipine göre hastaların takip süresince saptanan en yüksek biotinidaz enzim aktivitelerinin karşılaştırılması	18
Şekil 7 Mutasyon tipine göre hastaların hastaneye başvuru anında bakılan biotinidaz enzim aktivitesi yüzdelerinin karşılaştırılması	19
Şekil 8 Mutasyon tipine göre hastaların takip süresince saptanan en düşük biotinidaz enzim aktivitesi yüzdelerinin karşılaştırılması	20
Şekil 9 Mutasyon tipine göre hastaların takip süresince saptanan en yüksek biotinidaz enzim aktivitesi yüzdelerinin karşılaştırılması.....	21

KISALTMALAR

ACC: Asetil koenzim-A karboksilaz

AMP: Adenozin mono fosfat

BD: Biotinidaz eksikliği

BOS: Beyin omurilik sıvısı

BTD: Biotinidaz sentezinden sorumlu gen

CoA: Koenzim-A

FKÜ: Fenilketonüri

HCS: Holokarboksilaz sentetaz eksikliği

LAC: Laktat

MCC: 3-metil krotonil koenzim-A karboksilaz

MCD: Multipl karboksilaz eksikliği

OAA: Oksaloasetat

OR: Otozomal resesif

PC: Piruvat karboksilaz

PCC: Propionil koenzim-A karboksilaz

SSS: Santral sinir sistemi

YENİDOĞAN TARAMA PROGRAMI İLE TANI KONULMUŞ BİOTİNİDAZ EKSİKLİĞİ OLAN HASTALARIMIZIN RETROSPEKTİF DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Gökberk Ural GÖKPINAR

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı

ÖZET

Giriş: Biotin birçok besinin içinde bulunan ve suda çözünen bir vitamindir. Biotin proteine bağlı olarak bulunmakta ve gereği halinde biotinidaz enzimi ile serbestleşmektedir. Serbest biotin, holokarboksilaz sentetaz enzimi ile apokarboksilazlar ile birleşerek holokarboksilazları oluşturur ve bu enzimlerin kofaktörü olarak görev yapar. Biositinden biotinidaz enzimi ile yeniden serbest biotin ve lizin oluşur. Biotinidaz eksikliği 3p25.1 bölgesinde lokalize olan *BTD* geninde defekt olması sonucu ortaya çıkan, otozomal resesif geçişli bir metabolik hastalıktır.

Amaç: Bu araştırmada, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Çocuk Beslenme ve Metabolizma Bilim Dalı'nda takip edilen ve yenidoğan tarama programı ile tanı konulmuş biotinidaz eksikliği olan olgularda genotip fenotip ilişkisinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

Gereç ve Yöntem: Çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Beslenme ve Metabolizma Bilim Dalı'nda yapıldı. Yenidoğan tarama programı ile biotinidaz eksikliği ön tanısı ile yönlendirilip, biotinidaz eksikliği tanısı alan olguların dosyaları geriye dönük olarak değerlendirildi. Seksen üç olgu çalışmaya dâhil edildi. Olguların demografik bilgileri (yaş, cinsiyet, anne baba akrabalığı), tanı yaşları, tedaviye başlama yaşı, takip süreleri, verilen tedavi ve dozları değerlendirildi. Hastaneye başvuru anında bakılan biotinidaz enzim aktivitesi düzeyi, takibi boyunca bakılan en yüksek ve en düşük biotinidaz enzim aktivitesi düzeyleri ve *BTD* geni mutasyon analizleri kayıt edildi. İstatistiksel analizler için SPSS 23.0 programı kullanıldı.

Bulgular: Hastaların 41'i (%49,4) kız, 42'si (%50,6) erkekti. Hastaların median tanı yaşı 11 gün (5-46) olarak saptandı. Çalışmaya katılan 83 hasta içinde 62 (%74,7) hastanın ebeveynleri arasında akrabalık yokken, 21 (%25,3) hastanın ebeveynleri arasında akrabalık mevcuttu. Tüm olgulara *BTD* gen (OMIM 253260) analizi yapıldı. Yirmi altı olguda (%31,3) homozigot, elli yedi olguda (%68,7) bileşik heterozigot

mutasyon olduğu belirlendi. Olguların *BTD* gen analiz sonuçları incelendiğinde, en sık saptanan mutasyonlar c.1330G>C (p.D444H) (87; %52,4), c.470G>A (p.R157H) (25; %15,1) ve c.98-104delinsTCC (p.C33fs) (17; %10,2) olarak saptandı. Bir hastada daha önce tanımlanmamış c.625C>T (p.R209C) olası patojenik varyasyon belirlendi. Olgular *BTD* geninde p.D444H mutasyonu içermelerine göre 3 gruba ayrıldığında, 20 olguda (%24,3) p.D444H homozigot mutasyon, 48 (%57,8) olguda p.D444H ile başka bir mutasyonun eşlik ettiği birleşik heterozigot ve 15 (%17,9) olguda p.D444H içermeyen mutasyon saptandı. *BTD* geninde homozigot p.D444H, p.D444H'in eşlik ettiği bileşik heterozigot ve p.D444H mutasyonu içermeyen mutasyonu olan hasta gruplarında biotinidaz enzim eksiklik düzeyleri incelendiğinde ağır enzim eksikliği saptanan yirmi iki olgudan on tanesinin (%52,6) p.D444H mutasyonu içermediği görüldü. Ayrıca heterojen enzim eksikliği olan on üç olgunun tamamı ya homozigot p.D444H mutasyonu ya da p.D444H içeren heterozigot mutasyonlara sahipti. Parsiyel enzim eksikliği olan elli bir olgunun otuz üç tanesi (%64,7) p.D444H içeren bileşik heterozigot mutasyonlara sahipti. Mevcut bulgular ile p.D444H mutasyonu ile enzim eksikliği düzeyi arasında negatif yönde istatistiksel anlamlı ilişki saptanmıştır. Hastanemizde yenidoğan taramasıyla tanı konmuş olguların anne, baba ve varsa 2008 öncesi doğumlu kardeşleri de rutin olarak biotinidaz eksikliği açısından taranmaktadır. Bu kapsamda yapılan aile taraması sonucu 83 olgudan 6 tanesinin annesinde, 1 olgunun babasında ve 2 olgunun birinin bir, diğerinin iki kız kardeşinde biotinidaz eksikliği saptandı.

Sonuç: Bu çalışma, her ne kadar taramalar sayesinde erken tanı ve tedavi başlanıp hastalığa ait fenotipik bulguların ortaya çıkışının önüne geçilmiş olsa da, genotip-fenotip ilişkisinin olduğunu göstermiştir. Yenidoğan tarama programının en etkin tarama programlarından biri olduğu ve semptomların önüne geçtiği görülmüştür. Tarama programının ayrıca tanı konulmuş olguların asemptomatik anne, baba ve kardeşlerine de tanı koymada faydalı olduğu gösterilmiştir. Uygulanan 10-20 mg/gün dozunda biotin tedavisinin ise güvenli ve yeterli olduğu gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Biotinidaz eksikliği, yenidoğan taraması

RETROSPECTIVE EVALUATION OF PATIENTS DIAGNOSED WITH BIOTINIDASE DEFICIENCY THROUGH THE NEONATAL SCREENING PROGRAM

Gökberk Ural GÖKPINAR, MD

Dokuz Eylül University Faculty of Medicine Department of Pediatrics

ABSTRACT

Background: Biotin is a water-soluble vitamin found in several nutrients. Biotin binds to proteins and is released by the enzyme named biotinidase when necessary. Free biotin combines with apocarboxylases by means of holocarboxylase synthetase to form holocarboxylases, and acts as a cofactor of these enzymes. Free biotin and lysine are reformed from biocytin by biotinidase. Biotinidase deficiency is an autosomal recessive metabolic disease caused by a defect in the *BTD* gene located in 3p25.1.

Aim: The aim of this study is to evaluate the genotype-phenotype relationship in patients diagnosed with biotinidase deficiency through the neonatal screening program at Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, Pediatric Nutrition and Metabolism Division.

Materials and Methods: The study was conducted at Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, Pediatric Nutrition and Metabolism Division. Charts of patients referred with a provisional diagnosis of biotinidase deficiency by the neonatal screening program and diagnosed with biotinidase deficiency were evaluated retrospectively. Eighty-three cases were enrolled in the study. Demographic data (age, sex, parental consanguinity), age at the time of diagnosis, age at the onset of treatment, follow-up period, treatment and doses were documented. Biotinidase enzyme activity levels at the time of admission, highest and lowest biotinidase enzyme activity levels in the follow-up period, and *BTD* gene mutation analyzes were recorded. SPSS 23.0 program was used for statistical analysis.

Results: Forty-one (49.4%) of the patients were female and 42 (50.6%) were male. The median age of the patients was 11 days (5-46). Of the 83 patients included in the study, 62 (74.7%) had no parental consanguinity, while 21 (25.3%) had

consanguinity between their parents. Biotinidase deficiency (BTD) gene (OMIM 253260) analysis was performed in all cases. Twenty-six cases (31.3%) had homozygous mutations and fifty-seven cases (68.7%) had compound heterozygous mutations. When BTD gene analysis results were examined, the most common mutations were c.1330G>C (p.D444H) (87; 52.4%), c.470G>A (p.R157H) (25; 15.1%) and c.98-104delinsTCC (p.C33fs) (17; 10.2%). One of the patients had a previously identified possible pathogenic variation of c.625C>T (p.R209C). When the cases were stratified into 3 groups according to their p.D444H mutation status in BTD gene, 20 (24.3%) had homozygous p.D444H mutations, 48 (57.8%) had compound heterozygote mutation with p.D444H and another mutation, and 15 (17.9%) had p.D444H-free mutations. When the level of biotinidase enzyme deficiency was examined in these three patient groups, ten (52.6%) of the twenty-two cases (52.6%) with severe enzyme deficiency were found to have no p.D444H mutation. In addition, all thirteen cases with heterogeneous enzyme deficiency had either homozygous p.D444H mutation or heterozygous mutations containing p.D444H. Thirty-three (64.7%) of the fifty cases with partial enzyme deficiency had compound heterozygous mutations containing p.D444H. There was a statistically significant negative correlation between p.D444H mutation and enzyme deficiency level. In our hospital, the mother, father and siblings born before 2008 of the cases diagnosed through the neonatal screening are also routinely screened for biotinidase deficiency. As a result of family screening, biotinidase deficiency was detected in the mother in 6 cases, the father in 1, and in one sister and two sisters in 2 cases.

Conclusion: Although screening studies have allowed early diagnosis and treatment, thereby preventing emergence of phenotypic findings, our study demonstrated a genotypic-phenotype relationship. The neonatal screening program has been shown to be one of the most effective screening programs, and prevents symptoms. The screening program has also been shown to be useful for diagnosing asymptomatic mothers, fathers and siblings of diagnosed cases. Biotin treatment at a dose of 10-20mg has been shown to be safe and sufficient.

Keywords: Biotinidase deficiency, neonatal screening

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Biotin birçok besinin içinde bulunan ve suda çözünen bir vitamindir. Biotin proteine bağlı olarak bulunmakta ve gereği halinde biotinidaz enzimi ile serbestleşmektedir. Serbest biotin, holokarboksilaz sentetaz enzimi ile apokarboksilazlar ile birleşerek holokarboksilazları oluşturur ve bu enzimlerin (piruvat karboksilaz, 3-metilkrotonil-CoA karboksilaz, propiyonil-CoA karboksilaz, asetil-CoA karboksilaz) kofaktörü olarak görev yapar [1]. Reaksiyon tamamlandıktan sonra enzimlerden proteolitik degradasyonla biositin (birbirine kovalent bağla bağlı lizin-biotin kompleksi) ayrılır. Biositinden biotinidaz enzimi ile yeniden serbest biotin ve lizin oluşur.

Biotinidaz eksikliği 3p25.1 bölgesinde lokalize olan *BTD* geninde defekt olması sonucu ortaya çıkan, otozomal resesif geçişli bir metabolik hastalıktır [2]. Ağır biotinidaz eksikliği (enzim düzeyi %10'un altında) 1:112.000, parsiyel biotinidaz eksikliği (enzim düzeyi %10-30 arasında) ise 1:129.000 sıklığında görülür [3].

Biotinidaz eksikliğinin klinik bulguları oldukça geniş bir yelpazede görülmektedir. Bu durumun en büyük nedeni hastalarda farklı düzeylerde enzim eksikliği olmasıdır. İlk bulgular yenidoğan döneminde başlayabileceği gibi adölesan döneme kadar da gecikebilir [4]. Nörolojik semptomlar en sık görülen bulgulardır. Ataksi, letarji, kas güçsüzlüğü, grand mal ve myoklonik nöbetler görülebilir. Bunların dışında stridor, apne ve hiperventilasyon epizotları gibi solunum sistemi bulguları ortaya çıkabilir. Yama tarzında tutulum gösteren, eritamatöz ve eksüdatif cilt lezyonları, alopesi ve keratokonjonktivit de diğer bulgular arasındadır [5]. Hastalığın spesifik olmayan klinik bulguları ve bulguların varyasyonu geç tanı konulmasına neden olmaktadır. Geç tanı konulması psikomotor retardasyona, nörolojik semptomlara, lökoensefalopatiye, geri dönüşü olmayan işitme kaybına ve optik atrofiye neden olur [6]. Laboratuvar bulguları olarak metabolik asidoz ve idrar organik asit analizinde tipik metabolitlerin (3-hidroksi izovalerik asit) atılımları olmakla birlikte, bu bulgular çoğu hastada ortaya çıkmamaktadır.

Hastalığın tanısı kan biotinidaz aktivitesinin ölçülmesi ve genetik çalışma ile konulur. Biotinidaz sentezinden sorumlu gen *BTD* genidir ve bu gende 165'in üzerinde mutasyon bildirilmiştir. Ağır mutasyon olup asemptomatik olan veya aynı

mutasyonla semptomatik olabilen olguların mevcut olması genetik fenotip ilişkisinin olmadığı ve tüm olguların tedavi edilmesi gerektiği sonucunu çıkarmaktadır [7].

Bu araştırmada, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Çocuk Beslenme ve Metabolizma Bilim Dalı'nda takip edilen ve yenidoğan tarama programı ile tanı konulmuş biotinidaz eksikliği olan olgularda genotip fenotip ilişkisinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. DOĞUMSAL METABOLİK HASTALIKLAR

Doğumsal metabolik hastalıklar enzimin, kofaktörün, transport protein veya yapısal proteinlerin eksikliği ya da aktivitesinde azalma sonucu ortaya çıkan biyokimyasal bozukluklardır. Çoğunlukla otozomal resesif kalıtım gösterirler [8]. Metabolik hastalıklar nörolojik bulgular başta olmak üzere, kalp, gastrointestinal sistem, hematolojik sistem, göz, işitme ve böbrekler gibi pek çok organı veya sistemi farklı kombinasyonlarda tutarak etkilemektedirler.

Alkaptonüri, sistinüri, pentosuri ve albinizmin genetik ve biyokimyasal doğalarını tanıyan Garrod, “kimyasal bireysellik” fikrini geliştirdi ve doğumsal metabolik hastalıklar alanının kurucusu oldu. Garrod 1908'de Kraliyet Hekimler Koleji'ne Croonian Lectures olarak “Metabolizmanın Doğuştan Gelen Hataları” başlıklı çalışmasını sundu. Bu eser ilk olarak 1909'da yayınlandı ve ilk bölümde iyi bir şekilde belirterek bu durumu canlı organizmaların dokularının kimyasal bileşimi ve bu dokuların oluşturulduğu ve parçalandığı metabolik işlemler olarak tanımladı [9].

Son yıllarda yenidoğan tarama testlerinde kaydedilen ilerlemeler sayesinde (Guthrie testi, Tandem mass spektrometri vb) birçok metabolik hastalığa, erken dönemde tanı konularak sağaltıma başlanmakta, böylece aksi takdirde gelişimleri kaçınılmaz olan, motor-mental retardasyon gibi sonuçlar engellenebilmektedir. Eskiden çoğu sağaltılamaz gözü ile bakılan metabolik hastalıklarda bilimin ilerlemesi olanakları artırmış, sağaltımlarda ve sonuçlarında çok önemli ilerlemeler kaydedilmiştir.

2.2. YENİDOĞAN TARAMASI

Hastalıkları erken veya presemptomatik dönemde yakalamak düşüncesi çok çeşitli tarama testlerinin gelişimi için ilham kaynağı olmuştur. Özellikle, kütle spektrometrisinin kullanıma girmesi ile yenidoğan taraması çerçevesinde bakılan hastalık sayısı giderek artmıştır. Doğumsal metabolizma hastalıklarının bir bölümünde, kalıcı hasara ya da ölüme neden olmalarını önlenmek amacıyla "yenidoğan taraması" uygulanmaktadır. İlk yenidoğan tarama programı, 1962'de Guthrie tarafından kurulmuştur. Bugün için önemini aynı değerinde koruyan, ucuz,

semikantitatif ve bakteriyolojik inhibisyon esasına dayanan yöntem fenilketonüri (FKÜ) hastalığı için başlatılmıştır [10]. Ekonomik ve teknolojik koşulları iyi merkezlerde, Tandem kütle spektrofotometrisi gibi komplike aletlerin yenidoğan tarama programlarında kullanılmaya başlanması ile bugün aynı anda 35'in üzerinde hastalığın taraması yapılabilmektedir [11].

Yenidoğan tarama programı için dünyada moleküler bazlı taramalar da gündeme girdi. 2018-19 yıllarını kapsayan Almanya'da yapılan prospektif bir pilot çalışmada 257,734 yenidoğan sistinozis açısından tarandı. Hastalığın prevalansında benzer şekilde bir olguda hastalık saptandı ve hiçbir yanlış pozitif sonuca rastlanmadı. Tespit edilen olguya 18. günde oral sisteamin tedavisi başlandı, 16 aylık tedavi sonucunda hastada renal Fanconi sendromuna ait hiçbir bulguya rastlanmadı [12].

Çocukluk çağında en sık görülen nörodejeneratif hastalık olan spinal muskuler atrofi ciddi sonuçları olan ve tedavisi oldukça pahalı bir durumdur. SMN2 kopya sayısı analizine göre yapılan çalışmada 2 ve 3 SMN2 kopya sayısı olan olgulara yaşamın ilk 15-39 günü arası nusinersen tedavisi başlandığında nörolojik sonuçlar oldukça yüz güldürücü olarak saptanmıştır [13].

Yenidoğan taramaları konusunda son dönemde vitamin eksikliklerinin de eklenmesi tartışılmaktadır. Kolayca tedavi edilebilir bir durum olan vitamin B12 eksikliğinin tedavi edilmediği takdirde ciddi nörolojik sekellere yol açabilmekte olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda sıklığı metabolik hastalıklara göre çok daha fazla olan bu durumun yenidoğan tarama programına alınmasının çok etkili sonuçları olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur [14, 15].

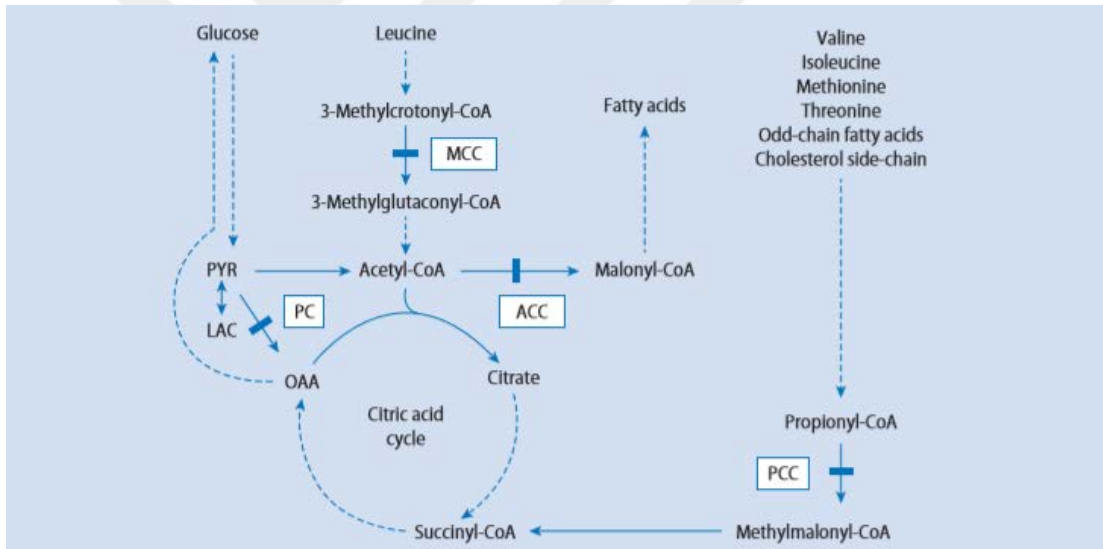
Yenidoğan taramaları için yeni yaklaşımlardan biri de Targeted Next-Generation Sequencing Panel olarak adlandırılan yöntemdir. Bu yöntemin konvansiyonel yenidoğan taraması ile birlikte kullanılması konvansiyonel taramada saptanamayan hastalıkları saptamayı sağlamakta ve yanlış tandem kütle spektrofotometri sonuçlarını engellemektedir [16].

Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu aracılığıyla yapılan projede, Türkiye'deki yenidoğanlarda fenilketonüri (FKÜ) görülme sıklığı beklenenden daha yüksek bulunmuştur. Bunu takiben, T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından 1986 yılında yenidoğan tarama programına başlanmış ve daha sonra bu

tarama programı genişletilmiştir. Programın ilk yıllarında taramalar bazı pilot merkezleri (Ankara, İstanbul, İzmir, Sivas) kapsamıştır. Konjenital hipotiroidinin 25 Aralık 2006 tarihinde FKÜ tarama programına eklenmesiyle programın ismi “Ulusal Yenidoğan Tarama Programı” olarak değiştirilmiştir [17]. Programa, Ekim 2008 itibarıyla biotinidaz eksikliği, 1 Ocak 2015 tarihi itibarıyla da kistik fibrozis eklenmiştir.

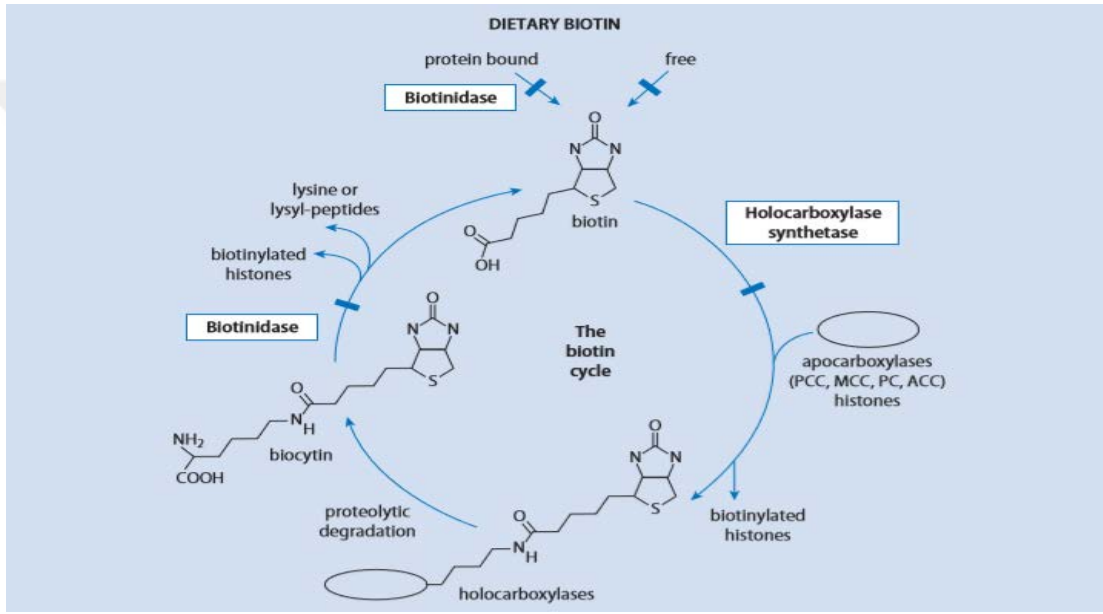
2.3. BİOTİN VE BİOTİNİN YAPISI

Biotin, çoğunlukla proteinle bağlı olduğu doğal gıda maddelerinde küçük miktarlarda yaygın olarak bulunan suda çözünür bir vitamindir. Biotinin klasik rolü, glukoneogenez, yağ asidi sentezi ve çeşitli amino asitlerin katabolizmasında rol oynayan dört önemli karboksilazın koenzimi olarak işlev görmesidir (Şekil 1).



Şekil 1: Biotine bağımlı karboksilazların ara metabolizmada yeri. ACC, asetil-CoA karboksilazlar (ACC-1, sitozolik; ACC-2, dış mitokondriyal membran); CoA, koenzim A; HCS, holokarboksilaz sentetaz; LAC, laktat; MCC, 3-metilkrotonil-CoA karboksilaz; OAA, oksaloasetat; PC, piruvat karboksilaz; PCC, propiyonil-CoA karboksilaz; PYR, piruvat. Tam çizgiler bir enzimi belirtir ve noktalı çizgiler birkaç enzimin rol oynadığını gösterir. Enzim kusurlarının bölgeleri dolu çubuklarla belirtilmiştir (Jean-Marie Saudubray Eds. Inborn Metabolic Diseases Diagnosis and Treatment 6th Edition).

Biotinin, holokarboksilaz sentetaz (HCS) tarafından katalize edilen inaktif apokarboksilazlara kovalent bağlanması, enzimlerin aktif hale gelmesi için gereklidir (Şekil 2). Karboksilasyon reaksiyonu tamamlandıktan sonra (enzimatik reaksiyon gerçekleştikten sonra) ise ilk önce, holokarboksilazların proteolizi gerçekleşir, ancak biotin bu karboksilazlardan tek başına ayrılamaz, enzimin lizin rezidüsüne bağlı biotin (biositin) olarak ayrılabilir. Biotinidaz bu biositin molekülünü lizin ve serbest biotine parçalar. Biotinidaz enzimi ayrıca, diyetle alınan biositin moleküllerini de parçalayarak aktif biotin elde edilmesini sağlar [18].



Şekil 2: Biotin döngüsü (Jean-Marie Saudubray Eds. Inborn Metabolic Diseases Diagnosis and Treatment 6th Edition).

2.4. HOLOKARBOKSİL AZ SENTETAZ EKSİKLİĞİ

HCS, biotinin karboksilazlara entegrasyonunu sağlar, ayrıca gen regülasyonunda da görevlidir. HCS tam eksikliği embriyonik dönemde letaldir. HCS eksikliği başlangıçta erken başlangıçlı multiple karboksilaz eksikliği olarak adlandırılmış olsa da, klinik deneyimler bulguların başlangıç yaşının, doğumdan birkaç saat sonradan 8 yaşına kadar geniş ölçüde değiştiğini göstermektedir [19]. Bununla birlikte, hastaların yaklaşık yarısı, yaşamın ilk günlerinde, diğer organik asidürilere benzer ağır bulgularla (hipotoni, kusma, nöbet ve hipotermi) başvururlar. Bu hastalarda, ağır metabolik asidoz, ketonemi ve hiperamonyemi ortaya çıkar. Daha

hafif hastalar, tekrarlayan ve yaşamı tehdit eden metabolik asidoz atakları ile de ortaya çıkabilir [20, 21].

Akut hastalık atakları sıklıkla enfeksiyonlar ile ilişkili katabolizma artışı nedeniyle ortaya çıkar. Biotin tedavisi olmadan iyileşen ve daha az ciddi bir bozukluğu olan tedavi edilmemiş erken başlangıçlı hastalarda psikomotor gerilik, saç dökülmesi ve cilt lezyonları gelişebilir. Bunlar, tüm vücuda yayılan ancak özellikle bebek bezinde ve iç içe geçen bölgelerde belirgin olan eritemli, pullu deri döküntüleridir, alternatif olarak, döküntü seboreik dermatit veya iktiyozise benzeyebilir [22].

2.5. BİOTİNİDAZ EKSİKLİĞİ

Biotinidaz eksikliği (biotinidase deficiency, BD), ilk kez 1983 yılında Wolf ve arkadaşları tarafından tanımlanan otozomal resesif geçişli nadir bir hastalıktır [23]. Biotinidaz eksikliğinde, biotin lizinden ayrılamaz ve vücutta serbest biotin eksikliği ortaya çıkar. Bu durum biotine bağımlı enzimlerde (propiyonil-CoA karboksilaz, metil-krotonilCoA karboksilaz, piruvat karboksilaz ve asetil-CoA karboksilaz) aktivite eksikliğine yol açar [24]. Ağır biotinidaz eksikliği (enzim düzeyi %10'un altında) 1:112.000, kısmi biotinidaz eksikliği ise (enzim düzeyi %10-30 arasında) 1:129.000 sıklığında görülür [25].

2.5.1. Biotinidaz Eksikliğinin Klinik Bulguları

Erken tanı konulup tedavi başlanmayan BD hastalarında farklı zamanlarda ve farklı kombinasyonlarla nörolojik, dermatolojik, immünolojik ve oftalmolojik bulgular ortaya çıkabilir [26, 27]. Nörolojik bulgular (hipotoni, grand mal ve miyoklonik nöbetler, ataksi, gelişimsel gecikme) en sık görülen semptomlardır. Ayrıca, birçok hastada işitme kaybı, konjonktivit ve optik atrofi ortaya çıkar. Deri döküntüsü ve alopesi hastalığın ayırt edici özellikleridir; ancak bunlar geç gelişebilir veya hiç gelişmeyebilir [28, 29]. Deri lezyonları genellikle yamalı tutulum gösteren, eritemli, eksudatif veya egzematoid karakterdedir; tipik olarak baş-boyun bölgesinde, saçlı deride veya periorifisiyal bölgede lokalizedir.

Biotinidaz eksikliği olan bazı hastalarda geç çocukluk, adolesan ve hatta erişkin döneme kadar semptom gelişmeyebilir [28, 30]. Bu vakalarda hastalık

belirtileri genellikle daha az karakteristiktir ve motor güçsüzlük, spastik paraparezi, spinal kord demiyelinizasyonu şeklinde görülebilir [28, 30, 31]. Bu hastalarda da optik nöropati, görme keskinliği bozulması ve skotomata gibi göz problemleri gelişebilir [28, 30]. Literatürde, yenidoğan taraması ile BD tanısı almış hastaların aile taraması sonucu BD tanısı konulan pek çok asemptomatik yetişkin hasta bulunmaktadır [32]. Bu nedenle, biotinidaz eksikliği olan hastaların tüm aile üyelerinin araştırılması kritik öneme sahiptir. Biotinidaz eksikliğinin klinik bulgularının çok değişken ve tipik olmaması, farklı zamanlarda farklı kombinasyonların görülebilmesi nedenleriyle hastalık tanısı sıklıkla gecikmektedir [33, 34]. Ancak geç tanı konulmuş olan hastalara tedavi başlansa bile psikomotor gerilik, işitme kaybı ve optik atrofi gibi nörolojik bulgular geriye dönmemektedir [4, 35].

2.5.2. Biotinidaz Eksikliğinin Tanısı

Biotinidaz eksikliği tanısı serumda biotinidaz aktivitesinin ölçülmesi ve ortalama aktivite ile karşılaştırılması ile konulur. Hastanın enzim aktivitesi ortalamanın %10'undan az ise tam eksiklik, %10-30'u arasında ise kısmi (parsiyel) eksiklik olarak sınıflandırılır [36].

Biotinidaz eksikliğinin kesin tanısı genetik çalışma ile konulur. Biotinidaz sentezinden sorumlu gen *BTD* genidir ve bu gende 165'in üzerinde mutasyon bildirilmiştir [37]. Hastalıkta kesin bir genotip fenotip ilişkisi olmamakla beraber, delesyon, insersiyon ve nonsense mutasyonlar genellikle tam enzim eksikliği ile seyretmektedir. Missense mutasyonlar ise tam ya da kısmi enzim eksikliğine neden olmaktadır [38]. Hafif biotinidaz eksikliği bulunan hastaların bir geninde D444H mutasyonu olmakla birlikte diğer allelde ağır mutasyon tipi bulunabilmektedir. İki allelinde de D444H mutasyonu olanların enzim aktivitesi %45-50 arasında seyretmektedir [7, 38]. Ağır mutasyon olup asemptomatik olan veya aynı mutasyonla semptomatik olabilen olguların mevcut olması genetik fenotip ilişkisinin olmadığı ve tüm olguların tedavi edilmesi gerektiği sonucunu çıkarmaktadır [7].

2.5.3. Biotinidaz Eksikliğinin Taranması

Biotinidaz eksikliğinin toplumda sık görülmesi, klinik bulgular ortaya çıkmadan önce latent bir periyodunun olması, bulguların non-spesifik olması nedeniyle tanının sıklıkla atlanması, ortaya çıkan bulguların önemli bir kısmının geri dönüşümsüz olması ve bu bulguların ortaya çıkmasının erken tedaviyle önlenebilir olması, tarama ve tanı testlerinin kolay olması, tedavinin etkin, ucuz ve kolay yolla (ağız yoluyla) uygulanabiliyor olması koşulları nedeniyle BD, yenidoğan taraması yapılmaya en uygun hastalıklardan birisidir [28]. Ülkemizde BD, 2008 yılından beri ulusal yenidoğan taramasının bir parçası olarak tüm yenidoğanlarda taranmaktadır. Ülkemizde uygulanan tarama akış şeması Şekil 3'te verilmiştir.

Yenidoğan bebeklerden alınan kuru kan damlası örneklerinin tarama laboratuvarlarında çalıştırılması sonucunda enzim aktivitesi düşük olan tüm yenidoğanlar Çocuk Beslenme ve Metabolizma Merkezleri'ne sevk edilmekte ve buralarda tanı almaları ve tedavi edilmeye başlanmaları sağlanmaktadır.



Şekil 3: Biotinidaz Eksikliği Akış şeması. Alınan kan örneği tarama laboratuvarına ulaştırılır ve enzim aktivitesinin hangi seviyede olduğu tespit edilir (thsk.saglik.gov.tr).

2.5.4. Biotinidaz Eksikliğinin Tedavisi

Tam biotinidaz eksikliği olan tüm hastaların yaş ve vücut ağırlığından bağımsız olarak 5-20 mg/gün dozunda oral biotin ile tedavi edilmeleri önerilmektedir [39]. Bu tedavi biotinidaz eksikliğinin tüm semptomlarını önlemede etkili bulunmuştur. Kısmi biotinidaz eksikliği saptanan hastalara verilecek olan biotin dozu konusunda net bir fikir birliği yoktur. Ancak, yenidoğan taraması ile biotinidaz eksikliği tanısı konulmuş olan 142 hastanın 25 yıl izlendiği literatürdeki en uzun izlem süresine sahip olan çalışmada kısmi biotinidaz eksikliği olan hastalara 5 mg/gün biotin verildiğinde işitme kaybı gibi bazı bulguların geliştiği saptandığından, kısmi biotinidaz eksikliği olan hastalara da bulguların gelişimine göre daha yüksek dozlarda tedavi verilmesi ve bu hastaların da klinik bulgular açısından yakından takip edilmeleri önerilmektedir [39, 40].

Geç tanı alan hastalarda tedaviye başlamadan önce geri dönüşü olmayan beyin hasarı gelişmiş olabilir. Özellikle, işitsel ve görsel eksiklikler sıklıkla biotin tedavisine rağmen devam eder [41, 42].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Beslenme ve Metabolizma Bilim Dalı'nda yapıldı. Yenidoğan tarama programı ile biotinidaz eksikliği ön tanısı ile yönlendirilip, biotinidaz eksikliği tanısı alan olguların dosyaları geriye dönük olarak değerlendirildi. Seksen üç olgu çalışmaya dahil edildi.

Olguların demografik bilgileri (yaş, cinsiyet, anne baba akrabalığı), tanı yaşları, tedaviye başlama yaşı, takip süreleri, verilen tedavi ve dozları değerlendirildi. Hastaneye başvuru anında bakılan biotinidaz enzim aktivitesi düzeyi, takibi boyunca bakılan en yüksek ve en düşük biotinidaz enzim aktivitesi düzeyleri ve *BTD* geni mutasyon analizleri kayıt edildi.

Biotinidaz enzim aktivitesi %10'un altında olanlar ağır enzim eksikliği, %10-30 arasında olanlar parsiyel enzim eksikliği olarak değerlendirildi. Biotinidaz enzim aktivitesi %30'un üzerinde olanlar heterojen enzim eksikliği olarak sınıflandırıldı. Olguların enzim aktiviteleri ile *BTD* gen analiz sonuçları kıyaslandı. Olguların *BTD* geninde saptanan mutasyonların sıklıkları analiz edildi.

Olgular mutasyonlarına göre homozigot p.D444H mutasyonu olanlar, p.D444H mutasyonu içeren birleşik heterozigot mutasyonu olanlar ve p.D444H mutasyonu içermeyenler mutasyonu olanlar olarak üç kategoride incelendi. Olguların mutasyon tiplerine göre başvuru anındaki biotinidaz enzim aktivitesi düzeyleri, takip süresince en düşük ve en yüksek enzim aktivitesi düzeyleri incelendi.

Tüm olguların başvuru anında ve izlemleri süresince ortaya çıkan semptomları ve bulguları incelendi.

3.1. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Kategorik veriler sayı ve yüzde (%) ile ifade edilirken rakamsal veriler median (minimum-maksimum) şeklinde ifade edildi. Kategorik verilerin karşılaştırılmasında Ki-kare testi kullanıldı. Bağımsız üç grubun rakamsal verileri karşılaştırılırken öncelikle verilerin parametrik özellik gösterip göstermediği incelendi; bu incelemede örneklem büyüklüğü ile Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro Wilk testleri kullanıldı. Bağımsız üç grubun parametrik özellik göstermeyen rakamsal verileri Kruskal Wallis testi ile karşılaştırıldı. Tüm analizler Statistical

Package for the Social Sciences 23.0 (IBM SPSS) istatistik programı ile hesaplandı.
 $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

Yenidoğan tarama programı ile biotinidaz tanısı alan 83 hasta değerlendirildi. Hastaların 41'i (%49,4) kız, 42'si (%50,6) erkekti. Hastaların median tanı yaşı 15 gün (5-46) olarak saptandı. Median tedavi başlama yaşı 18 gün (5-46) saptandı. Takip edilen olguların median yaşı 38 ay (7-109) olarak tespit edildi. Olguların median takip süreleri 37 ay (6-108) olarak saptandı (Tablo 1). Hastaların hiçbirinde geliş anında biotinidaz eksikliği ilişkili semptom veya bulguya rastlanılmadı. Çalışmaya katılan 83 hasta içinde 62 (%74,7) hastanın ebeveynleri arasında akrabalık yokken, 21 (%25,3) hastanın ebeveynleri arasında akrabalık mevcuttu (Tablo 1). Çalışmaya dahil olan hastaların hastaneye başvuru anında bakılan median biotinidaz enzim aktivitesi düzeyi 1,95 nmol/dk/ml (0,33-4,5) (Referans aralığı:4,4-12,0 nmol/dk/ml) bulundu (Tablo 1). Hastalara 10-20 mg/gün arası biotin tedavisi verildiği görüldü.

Tablo 1: Hastaların demografik verileri.

Parametreler	
Yaş (ay), median (min-maks)	38 (7-109)
Cinsiyet (K/E), n (%)	41 (%49,4) / 42 (%50,6)
Tanı yaşı (gün), median (min-maks)	15 (5-46)
Tedavi başlama yaşı (gün), median (min-maks)	18 (5-46)
Takip süresi (ay), median (min-maks)	37 (6-108)
Anne-baba akrabalığı, n (%)	21 (%25,3)
Hastaneye başvuru anında semptom veya klinik bulgusu olan, n (%)	0 (0)
Hastaneye başvuru anında bakılan biotinidaz aktivitesi düzeyi (nmol/dk/ml), median (min-maks)	1,95 (0,33-4,5)

Tüm hastalara *BTD* gen (OMIM 253260) analizi yapıldı. Yirmi altı olguda (%31,3) homozigot, elli yedi olguda (%68,7) bileşik heterozigot mutasyon olduğu belirlendi (Tablo 2). Olguların 20'sinde (%24,0) homozigot c.1330G>C, 16'sında (%19,2) c.1330G>C / c.470G>A birleşik heterozigot mutasyon olduğu görüldü (Tablo 2).

Tablo 2: Çalışmaya dahil olan tüm hastaların BTD gen analizi sonuçları.

BTd geninde saptanan mutasyon tipleri	Mutasyon 1	Mutasyon 2	n	%
Homozigot mutasyonlar n=26	p.D444H (c.1330G>C)	p.D444H (c.1330G>C)	20	24,0
	p.C33fs (c.98-104delinsTCC)	p.C33fs (c.98-104delinsTCC)	2	2,4
	p.R157H (c.470G>A)	p.R157H (c.470G>A)	2	2,4
	p.T351KfsX12 (c.956C>T)	p.T351KfsX12 (c.956C>T)	1	1,2
	p.T532M (c.1595C>T)	p.T532M (c.1595C>T)	1	1,2
Birleşik heterozigot mutasyonlar n=57	p.D444H (c.1330G>C)	p.R157H (c.470G>A)	16	19,2
	p.D444H (c.1330G>C)	p.C33fs (c.98-104delinsTCC)	10	12,0
	p.D444H (c.1330G>C)	p.V442SfsX59 (c.1324delG)	5	6,0
	p.D444H (c.1330G>C)	p.T532M (c.1595C>T)	4	4,8
	p.D444H (c.1330G>C)	p.A171T (c.1052delC)	2	2,4
	p.R157H (c.470G>A)	p.C33fs (c.98-104delinsTCC)	2	2,4
	p.V457M (c.1369G>A)	p.C418S (c.1253G>C)	2	2,4
	p.D444H (c.1330G>C)	p.Q456H (c.1368A>C)	1	1,2
	p.A287T (c.1320delG)	p.Q456H (c.1368A>C)	1	1,2
	p.D444H (c.1330G>C)	p.W140X (c.926C>G)	1	1,2
	p.D444H (c.1330G>C)	p.C186Y (c.133G>A)	1	1,2
	p.D444H (c.1330G>C)	p.L215F (c.235C>T)	1	1,2
	p.D444H (c.1330G>C)	p.L440Lfsx61 (c.420G>A)	1	1,2
	p.D444H (c.1330G>C)	p.R209C (c.625C>T)	1	1,2
	p.D444H (c.1330G>C)	p.S319F (c.557G>A)	1	1,2
	p.D444H (c.1330G>C)	p.T309R (c.859G>A)	1	1,2
	p.D444H (c.1330G>C)	p.C186Y (c.133G>A)	1	1,2
	p.R157H (c.470G>A)	p.R79C (c.643C>T)	1	1,2
	p.R157H (c.470G>A)	p.G45R (c.511G>A)	1	1,2
	p.R157H (c.470G>A)	p.R79C (c.643C>T)	1	1,2
p.R157H (c.470G>A)	p.S319F (c.557G>A)	1	1,2	
p.C418S (c.1253G>C)	p.V457M (c.1369G>A)	1	1,2	
p.G45R (c.511G>A)	p.C186Y (c.133G>A)	1	1,2	

Hastaların *BTD* gen analiz sonuçları incelendiğinde, en sık saptanan mutasyonlar c.1330G>C (p.D444H) (87; %52,4), c.470G>A (p.R157H) (25; %15,1) ve c.98-104delinsTCC (p.C33fs) (17; %10,2) olarak saptandı. Bir hastada daha önce tanımlanmamış c.625C>T (p.R209C) olası patojenik varyasyon belirlendi (Tablo 3).

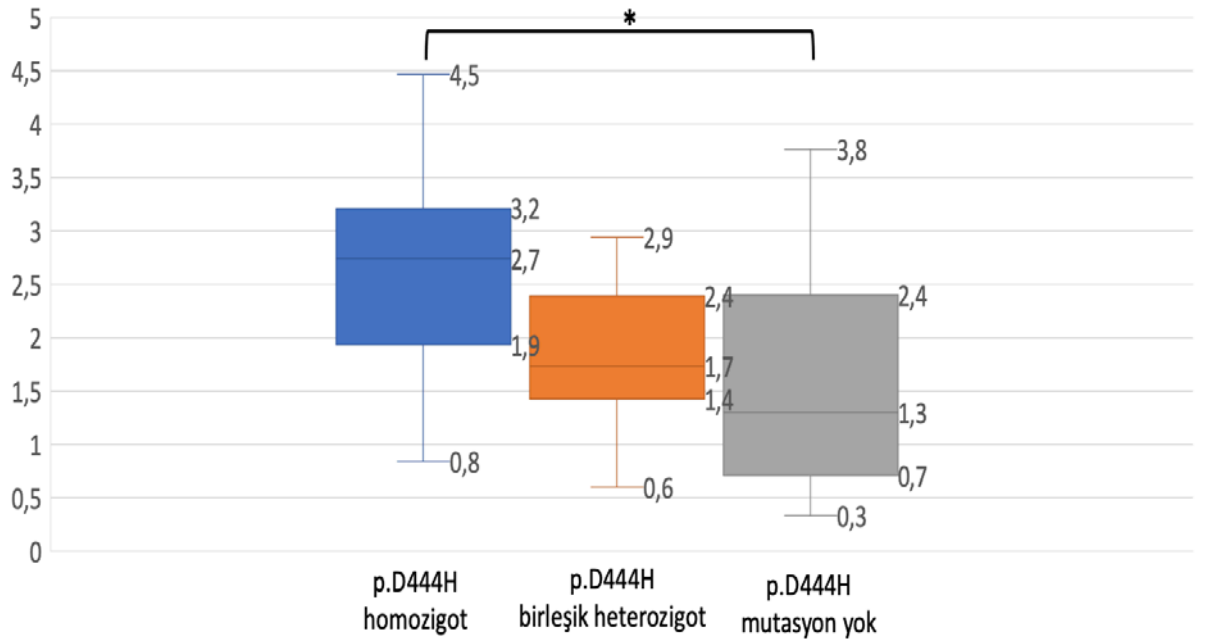
Tablo 3: Hastalarda görülen mutasyonların sıklıkları.

Mutasyonlar	n	%
p.D444H (c.1330G>C)	87	52,4
p.R157H (c.470G>A)	25	15,1
p.C33fs (c.98-104delinsTCC)	17	10,2
p.T532M (c.1595C>T)	6	3,6
p.V442SfsX59 (c.1324delG)	5	3,0
p.V457M (c.1369G>A)	3	1,8
p.Q456H (c.1368A>C)	3	1,8
p.C418S (c.1253G>C)	3	1,8
p.T351KfsX12 (c.956C>T)	2	1,2
p.S319F (c.557G>A)	2	1,2
p.G45R (c.511G>A)	2	1,2
p.C186Y (c.133G>A)	2	1,2
p.A171T (c.1052delC)	2	1,2
p.W140X (c.926C>G)	1	0,6
p.T309R (c.859G>A)	1	0,6
p.R79C (c.643C>T)	1	0,6
p.L440Lfsx61 (c.420G>A)	1	0,6
p.L215F (c.235C>T)	1	0,6
p.A287T (c.1320delG)	1	0,6
p.R209C (c.625C>T)*	1	0,6
Toplam	166	100

*: Daha önce tanımlanmamış varyasyon.

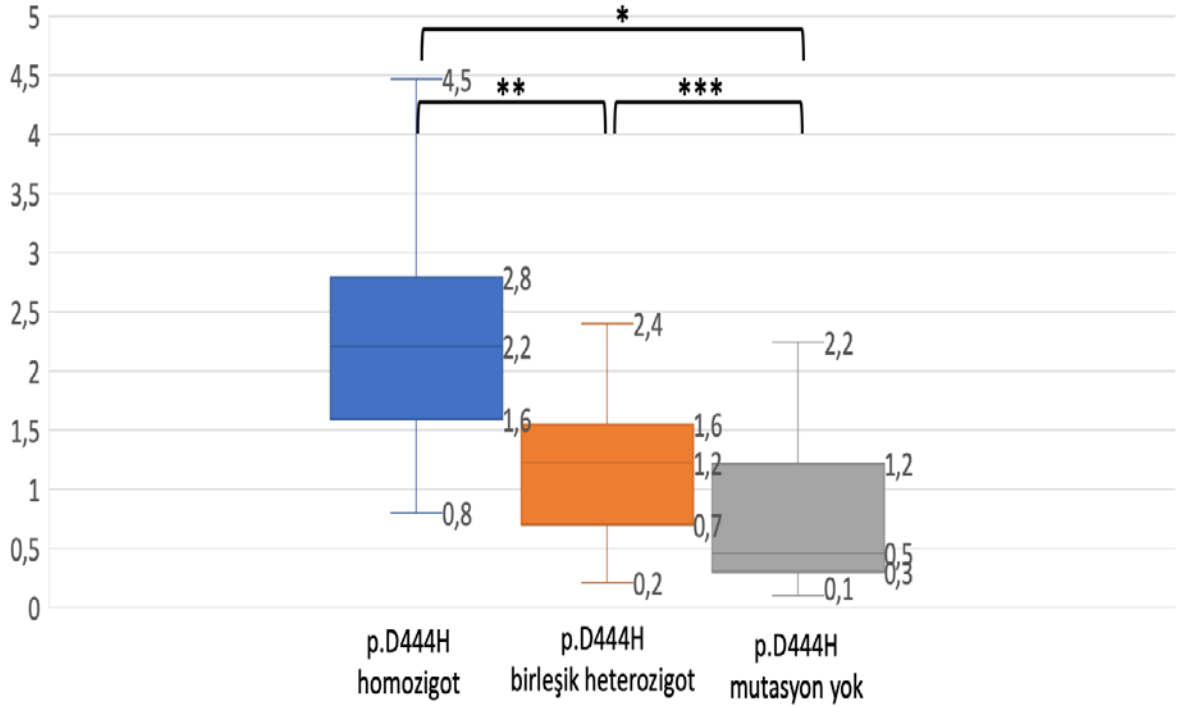
Hastalar *BTD* geninde p.D444H mutasyonu taşımalarına göre 3 gruba ayrıldığında, 20 olguda (%24,3) p.D444H homozigot mutasyon, 48 (%57,8) olguda p.D444H ile başka bir mutasyonun eşlik ettiği birleşik heterozigot ve 15 (%17,9) olguda p.D444H içermeyen mutasyon saptandı.

Grupların hastanemize başvurusunda bakılan biotinidaz enzim düzeyleri incelendiğinde p.D444H homozigot mutasyonlara sahip hastaların median biotinidaz enzim aktivitesi 2,7 nmol/dk/ml (0,8-4,5) saptanırken, p.D444H mutasyonu tespit edilmeyen olguların median biotinidaz enzim aktivitesi 1,3 nmol/dk/ml (0,3-3,8) olarak belirlendi. İki grup arasında enzim aktiviteleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,005$) (Şekil 4). Bir allelede p.D444H mutasyonu saptanan grubun ise median biotinidaz enzim aktivitesi 1,7 nmol/dk/ml (0,6-2,9) saptandı.



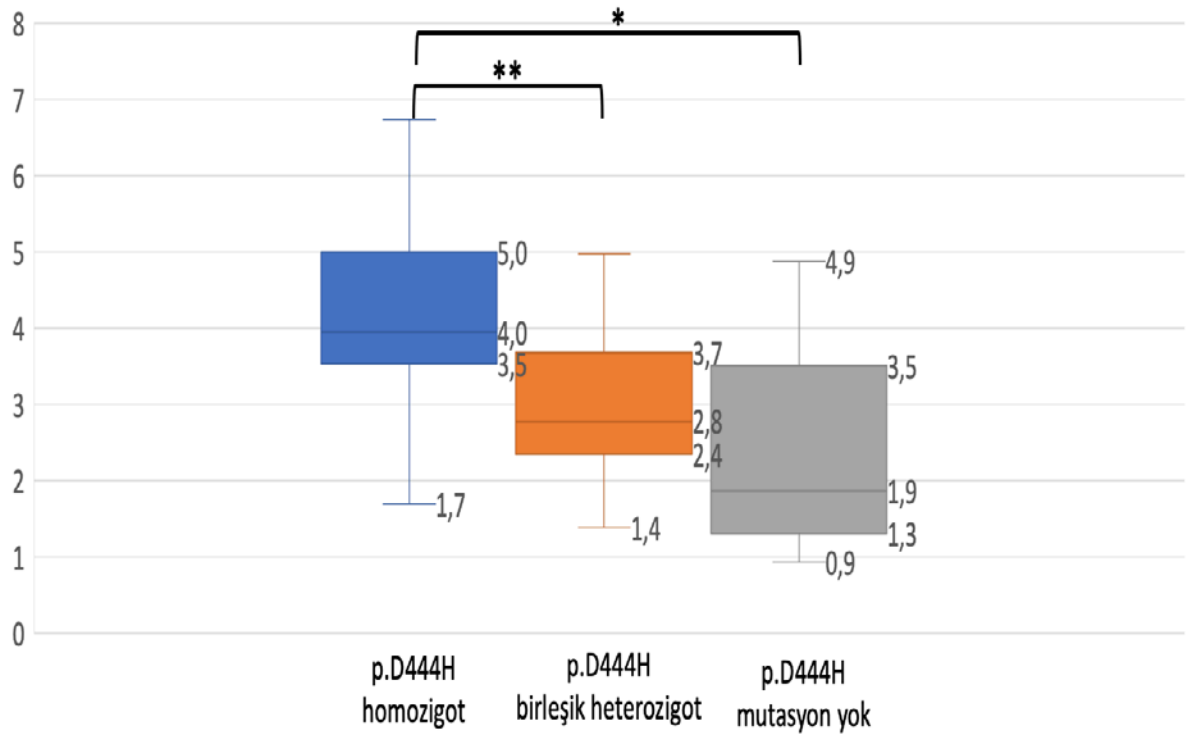
Şekil 4: Mutasyon tipine göre hastaların hastaneye başvuru anında bakılan biotinidaz enzim aktivitelerinin karşılaştırılması. (* $p=0,005$)

Hastaların klinik takipleri süresince bakılan enzim düzeyleri değerlendirildiğinde, median en düşük biotinidaz düzeyleri p.D444H homozigot mutasyonu tespit edilen hastalarda 2,2 nmol/dk/ml (0,8-4,5), p.D444H mutasyonu içeren birleşik heterozigot mutasyonun eşlik ettiği olgularda 1,2 nmol/dk/ml (0,2-2,4), p.D444H mutasyonu içermeyen mutasyonu olan olgularda 0,5 nmol/dk/ml (0,1-2,2) olarak tespit edildi. En düşük enzim aktiviteleri düzeylerine göre her üç grup kıyaslandığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edildi (p.D444H homozigot /p.D444H mutasyon yok: $p<0,0001$; P.D444H homozigot / p.D444H birleşik heterozigot: $p=0,034$; p.D444H birleşik heterozigot / p.D444H mutasyon yok: $p=0,003$) (Şekil 5).



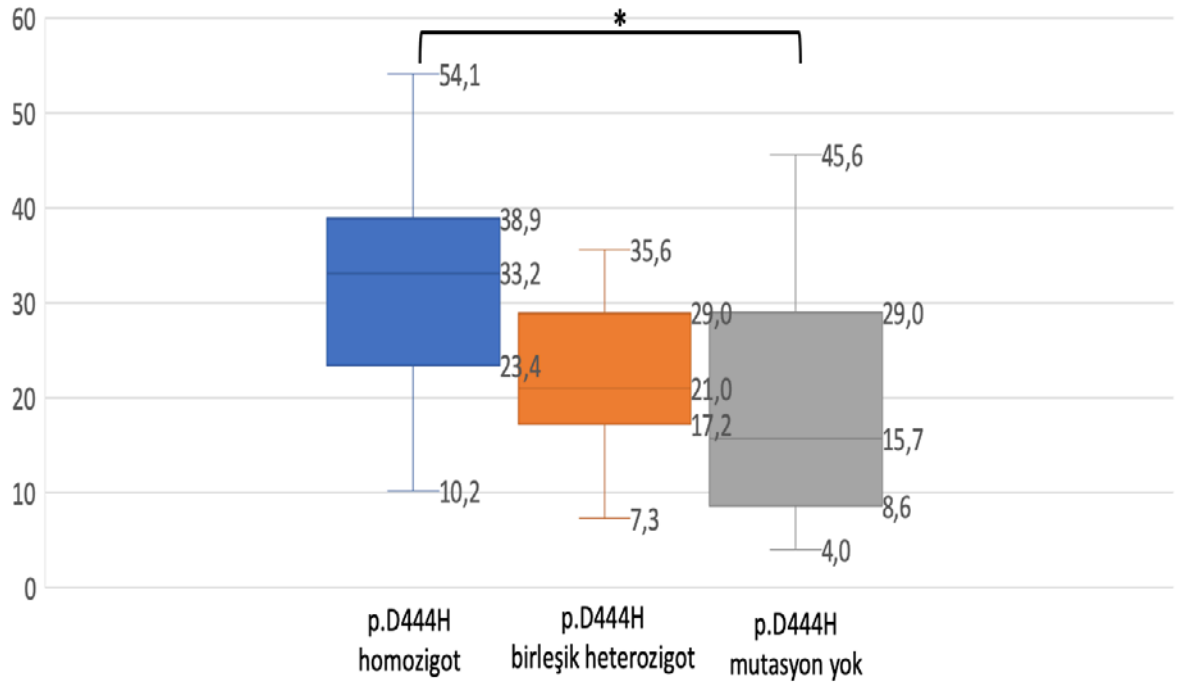
Şekil 5: Mutasyon tipine göre hastaların takip süresince saptanan en düşük biotinidaz enzim aktivitelerinin karşılaştırılması. (* $p<0,0001$, ** $p=0,034$, *** $p=0,003$)

Median en yüksek biotinidaz düzeylerine göre bakıldığında p.D444H homozigot mutasyonu tespit edilen hastalarda 4,0 nmol/dk/ml (1,7-6,8), p.D444H mutasyonuna başka bir mutasyonun eşlik ettiği birleşik heterozigot mutasyonu olan olgularda 2,8 nmol/dk/ml (1,4-5,0), p.D444H mutasyonunun olmadığı mutasyonlarda 1,9 nmol/dk/ml (0,9-4,9) saptandı. En yüksek düzeylere göre bakıldığında p.D444H homozigot mutasyona sahip grup ile diğer iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edildi (p.D444H homozigot /p.D444H mutasyon yok: $p < 0,0001$; P.D444H homozigot / p.D444H birleşik heterozigot: $p = 0,0006$) (Şekil 6).



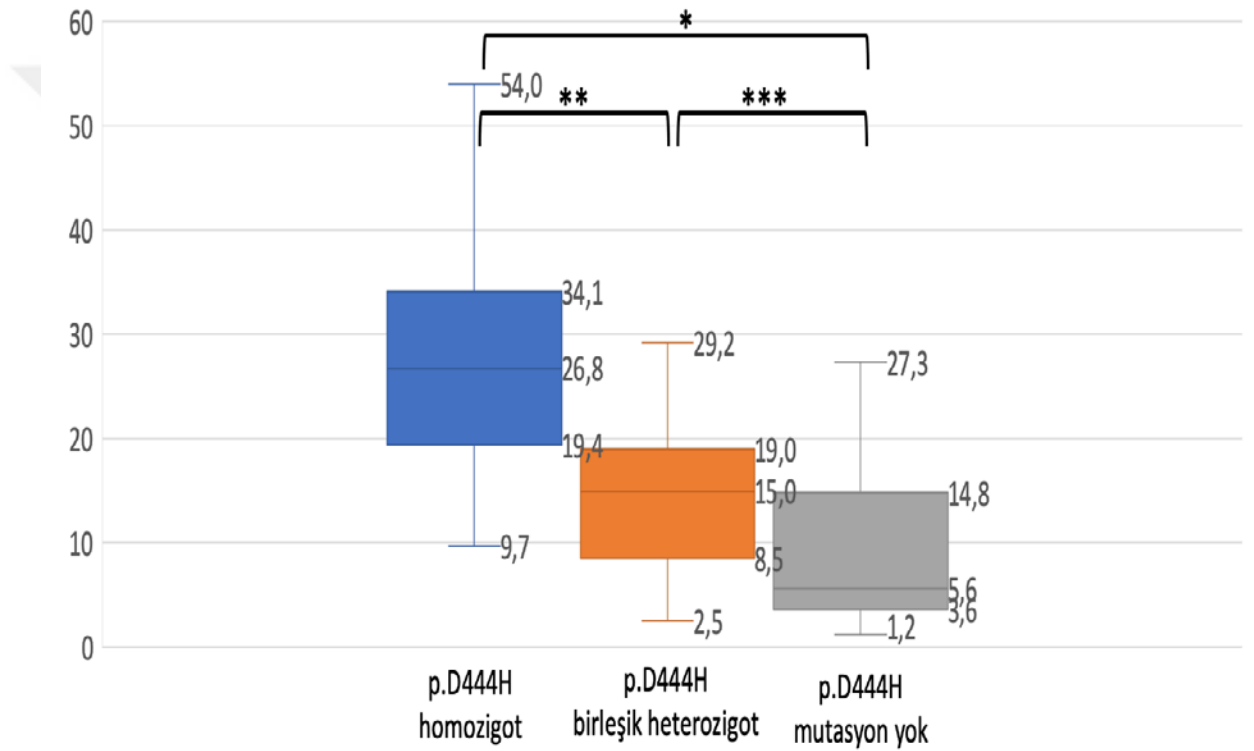
Şekil 6: Mutasyon tipine göre hastaların takip süresince saptanan en yüksek biotinidaz enzim aktivitelerinin karşılaştırılması. (* $p < 0,0001$, ** $p = 0,0006$)

Hastaların klinik takipleri süresince bakılan enzim aktivitesi yüzdesi değerlendirildiğinde, median hastaneye başvuru anında bakılan biotinidaz enzim aktivitesi yüzdesi homozigot p.D444H mutasyonu olan olgularda %33,2 (10,2-54,1), p.D444H mutasyonu içeren birleşik heterozigot mutasyonun eşlik ettiği olgularda %21,0 (7,3-35,6), p.D444H mutasyonu içermeyen mutasyonu olan olgularda %15,7 (4,0-45,6) olarak hesaplandı. Homozigot p.D444H mutasyonu taşıyan olgularla p.D444H mutasyonu taşımayan olgular arasında enzim aktiviteleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,005$) (Şekil 7).



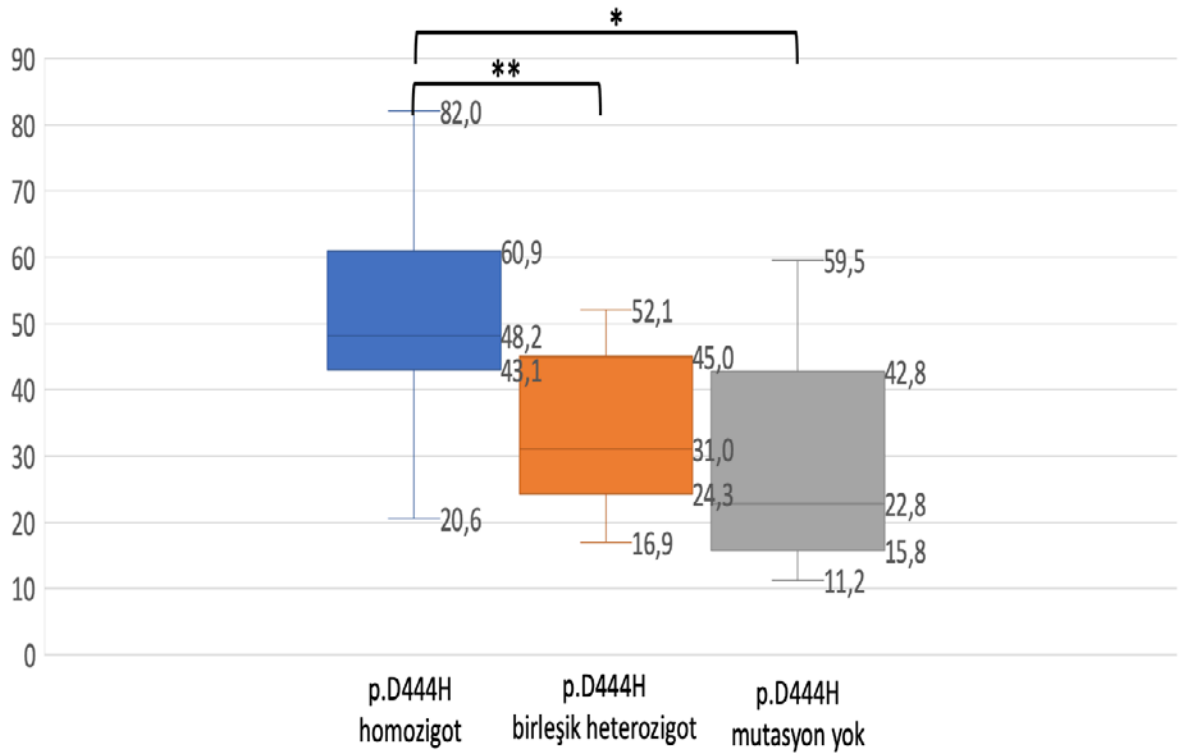
Şekil 7: Mutasyon tipine göre hastaların hastaneye başvuru anında bakılan biotinidaz enzim aktivitesi yüzdelerinin karşılaştırılması. ($*p=0,005$)

Median en düşük biotinidaz enzim aktivitesi yüzdesi homozigot p.D444H mutasyona sahip hastalarda %26,8 (9,7-54,0), p.D444H mutasyonu içeren birleşik heterozigot mutasyonun eşlik ettiği olgularda %15,0 (2,5-29,2), p.D444H mutasyonu içermeyen mutasyonu olan olgularda %5,6 (1,2-27,3) saptandı. Median en düşük biotinidaz aktivitesi yüzdelerine göre bakıldığında her üç grup arasında istatistiksel anlamlı farklılık tespit edildi (p.D444H homozigot /p.D444H mutasyon yok: $p<0.0001$; P.D444H homozigot / p.D444H birleşik heterozigot: $p=0,033$; p.D444H birleşik heterozigot / p.D444H mutasyon yok: $p=0,004$) (Şekil 8).



Şekil 8: Mutasyon tipine göre hastaların takip süresince saptanan en düşük biotinidaz enzim aktivitesi yüzdelerinin karşılaştırılması. (* $p<0,0001$, ** $p=0,033$, *** $p=0.004$)

Median en yüksek biotinidaz enzim aktivitesi yüzdesi değerlendirildiğinde p.D444H mutasyonlu olgularda değer %48,2, p.D444H mutasyonunun olduğu heterozigot mutasyonlarda aktivite değeri median %31,0, p.D444H mutasyonunun eşlik etmediği olgularda değer median %22,8 saptandı. En yüksek biotinidaz aktivitesi yüzdelere göre bakıldığında p.D444H homozigot mutasyona sahip grup ile diğer iki grup arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptandı p.D444H homozigot /p.D444H mutasyon yok: $p<0,0001$; P.D444H homozigot / p.D444H birleşik heterozigot: $p=0,0006$ (Şekil 9).



Şekil 9: Mutasyon tipine göre hastaların takip süresince saptanan en yüksek biotinidaz enzim aktivitesi yüzdelерinin karşılaştırılması. (* $p<0,0001$, ** $p=0,006$)

Çalışmaya alınan olguların; 19’unda (%22,8) ağır enzim eksikliği (enzim aktivitesi <%10), 51’inde (%61,4) parsiyel enzim eksikliği (enzim aktivitesi %10-30), 13’ünde (%15,8) heterojen enzim eksikliği (enzim aktivitesi >%30) saptandı. Ağır enzim eksikliği saptanan hastaların median en düşük biotinidaz düzeyleri 0,4 nmol/dk/ml (0,1-0,8), median en düşük biotinidaz aktivite yüzdeleri ise %4,8 (1,2-9,7) saptandı. Parsiyel enzim eksikliği saptanan hastaların median en düşük biotinidaz düzeyleri 1,5 nmol/dk/ml (0,8-2,4), median en düşük biotinidaz aktivite yüzdeleri ise %18,5 (10,1-29,2) saptandı. Heterojen enzim eksikliği saptanan hastaların ortanca en düşük biotinidaz düzeyleri 2,8 nmol/dk/ml (2,5-4,8), ortanca en düşük biotinidaz aktivite yüzdeleri ise %34,8 (30,2-59,0) saptandı (Tablo 4).

Tablo 4: Enzim düzeylerine göre grupların kıyaslanması

Parametreler	Ağır enzim eksikliği n=19	Parsiyel enzim eksikliği n=51	Heterojen enzim eksikliği n=13	p
Biotinidaz enzim aktivitesi düzeyi (nmol/dk/ml), median (min-maks)	0,4 (0,1-0,8)	1,5 (0,8-2,4)	2,8 (2,5-4,8)	<0,0001
Biotinidaz enzim aktivitesi yüzdesi (%),median (min-maks)	4,8 (1,2-9,7)	18,5 (10,1-29,2)	34,8 (30,2-59,0)	<0,0001

Ağır enzim eksikliği saptanan 19 olgunun sadece bir tanesinde p.D444H homozigot mutasyonu saptandı. Ağır enzim eksikliği olan olgularda en sık görülen mutasyon 5 olgu (%26,3) ile p.D444H / p.R157H bileşik heterozigot mutasyonu idi. Sonrasında sırasıyla ikişer olguda c.98_104delinsTCC homozigot ve p.R157H homozigot mutasyonları saptandı (Tablo 5).

Tablo 5: Ağır enzim eksikliği olan hastalarda BTĐ gen analizi sonuçları

Mutasyon 1	Mutasyon 2	Hasta Sayısı	%
p.D444H (c.1330G>C)	p.R157H (c.470G>A)	5	26,3
p.C33fs (c.98-104delinsTCC)	p.C33fs (c.98_104delinsTCC)	2	10,5
p.R157H (c.470G>A)	p.R157H (c.470G>A)	2	10,5
p.C418S (c.1253G>C)	p.V457M (c.1369G>A)	1	5,2
p.D444H (c.1330G>C)	p.C33fs (c.98-104delinsTCC)	1	5,2
p.D444H (c.1330G>C)	p.C186Y (c.133G>A)	1	5,2
p.D444H (c.1330G>C)	p.D444H (c.1330G>C)	1	5,2
p.D444H (c.1330G>C)	p.W140X (c.926C>G)	1	5,2
p.R157H (c.470G>A)	p.C33fs (c.98-104delinsTCC)	1	5,2
p.R157H (c.470G>A)	p.R79C (c.643C>T)	1	5,2
p.T351KfsX12 (c.956C>T)	p.T351KfsX12 (c.956C>T)	1	5,2
p.T532M (c.1595C>T)	p.T532M (c.1595C>T)	1	5,2
p.V457M (c.1369G>A)	p.C418S (c.1253G>C)	1	5,2

Parsiyel enzim eksikliği saptanan 51 olguda en sık p.D444H homozigot mutasyonu saptandı. 13 olguda (%25,4) p.D444H homozigot mutasyonu parsiyel eksikliği olan hastalarda saptandı. On bir olguda (%21,5) p.D444H / p.R157H bileşik heterozigot ve 7 olguda (%13,7) p.D444H / c.98_104delinsTCC bileşik heterozigot mutasyonu saptandı (Tablo 6).

Tablo 6: Parsiyel enzim eksikliği olan hastalarda BTB gen analizi sonuçları

Mutasyon 1	Mutasyon 2	Hasta Sayısı n=	%
p.D444H (c.1330G>C)	p.D444H (c.1330G>C)	13	25,4
p.D444H (c.1330G>C)	p.R157H (c.470G>A)	11	21,5
p.D444H (c.1330G>C)	p.C33fs (c.98-104delinsTCC)	7	13,7
p.D444H (c.1330G>C)	p.T532M (c.1595C>T)	4	7,8
p.D444H (c.1330G>C)	p.Q456H (c.1368A>C)	2	3,9
p.D444H (c.1330G>C)	p.V442SfsX59 (c.1324delG)	2	3,9
p.A287T (c.1320delG)	p.Q456H (c.1368A>C)	1	1,9
p.D444H (c.1330G>C)	p.A171T (c.1052delC)	1	1,9
p.D444H (c.1330G>C)	p.C418S (c.1253G>C)	1	1,9
p.D444H (c.1330G>C)	p.L215F (c.235C>T)	1	1,9
p.D444H (c.1330G>C)	p.L440Lfsx61 (c.420G>A)	1	1,9
p.D444H (c.1330G>C)	p.S319F (c.557G>A)	1	1,9
p.D444H (c.1330G>C)	p.T309R (c.859G>A)	1	1,9
p.D444H (c.1330G>C)	p.V457M (c.1369G>A)	1	1,9
p.G45R (c.511G>A)	p.C186Y (c.133G>A)	1	1,9
p.R157H (c.470G>A)	p.C33fs (c.98-104delinsTCC)	1	1,9
p.R157H (c.470G>A)	p.G45R (c.511G>A)	1	1,9
p.R157H (c.470G>A)	p.S319F (c.557G>A)	1	1,9

Heterojen enzim eksikliği olan 13 olgunun içinde ise en sık p.D444H homozigot mutasyonu 6 olguda (%46,1) olmak üzere tespit edildi (Tablo 7).

Tablo 7: Heterojen enzim eksikliği olan hastalarda BTM gen analizi sonuçları

Mutasyon 1	Mutasyon 2	Hasta Sayısı n=	%
p.D444H (c.1330G>C)	p.D444H (c.1330G>C)	6	46,1
p.D444H (c.1330G>C)	p.V442SfsX59 (c.1324delG)	3	23,0
p.D444H (c.1330G>C)	p.C33fs (c.98-104delinsTCC)	2	15,3
p.D444H (c.1330G>C)	p.A171T (c.1052delC)	1	7,6
p.D444H (c.1330G>C)	p.R209C (c.625C>T)	1	7,6

Biotinidaz eksikliği geninde homozigot p.D444H, p.D444H'in eşlik ettiği bileşik heterozigot ve p.D444H mutasyonu içermeyen mutasyonu olan hasta gruplarında biotinidaz enzim eksiklik düzeyleri incelendiğinde ağır enzim eksikliği saptanan yirmi iki olgudan on tanesinin (%52,6) p.D444H mutasyonu içermediği görüldü. Ayrıca heterojen enzim eksikliği olan on üç olgunun tamamı ya homozigot p.D444H mutasyonu ya da p.D444H içeren heterozigot mutasyonlara sahipti. Parsiyel enzim eksikliği olan elli bir olgunun otuz üç tanesi (%64,7) p.D444H içeren bileşik heterozigot mutasyonlara sahipti. Mevcut bulgular ile p.D444H mutasyonu ile enzim eksikliği düzeyi arasında negatif yönde istatistiksel anlamlı ilişki saptanmıştır ($p<0.0001$) (Tablo 8).

Tablo 8: Hastaların enzim aktivitesi ile genetik sonuçların kıyaslanması.

	Homozigot p.D444H mutasyonu olanlar n=20 (%)	p.D444H ile birleşik heterozigot n=48 (%)	p.D444H mutasyonu olmayanlar n=15 (%)
Ağır enzim eksikliği olanlar n=19	1 (5,0)	8 (16,7)	10 (66,7)
Parsiyel enzim eksikliği olanlar n=51	13 (65,0)	33 (68,8)	5 (33,3)
Heterojen enzim eksikliği olanlar n=13	6 (30,0)	7 (14,6)	0 (0,0)

Olgularımızdan biri p.D444H homozigot mutasyonu taşımasına rağmen ağır enzim eksiklik düzeyindeydi. 10 mg/gün biotin tedavisi alan hastanın takiplerinde nörolojik, işitme ve görme muayeneleri olağandı. Tekrarlayan ölçümleri 1,0 - 0,8 - 3,0 - 2,3 - 3,0 - 1,4 - 2,0 - 1,6 - 3,0 - 4,3 - 3,0 - 1,9 - 2,9 nmol/dk/ml saptandı.

Hastanemizde yenidoğan taramasıyla tanı konmuş olguların anne, baba ve varsa 2008 öncesi doğumlu kardeşleri de rutin olarak biotinidaz eksikliği açısından taranmaktadır. Bu kapsamda yapılan aile taraması sonucu 83 olgudan 6 tanesinin annesinde, 1 olgunun babasında ve 2 olgunun birinin bir, diğerinin iki kız kardeşinde biotinidaz eksikliği saptandı (Tablo 9). Tarama sonucu BE saptanan olguların hepsi asemptomatikti. Eksiklik saptanan 3 anne olgunun gen analizi sonucunda p.D444H homozigot mutasyonu saptandı.

Tablo 9: Aile taraması sonuçları

Aile taraması	n	%
Eksiklik yok	63	75,9
Annede eksiklik var	6	7,2
Babada eksiklik var	1	1,2
Kardeşte eksiklik var	2	2,4
Aile taramaya katılmadı	11	13,3
Toplam	83	100,0

5. TARTIŞMA

Biotinidaz eksikliği (biotinidase deficiency, BD), ilk kez 1983 yılında Wolf ve arkadaşları tarafından tanımlanan otozomal resesif geçişli nadir bir hastalıktır [23]. Erken tanı konulup tedavi başlanmayan BD hastalarında farklı zamanlarda ve farklı kombinasyonlarla nörolojik, dermatolojik, immünolojik ve oftalmolojik bulgular ortaya çıkabilir [27]. Ağır biotinidaz eksikliği (enzim düzeyi %10'un altında) 1:112.000, parsiyel biotinidaz eksikliği (enzim düzeyi %10-30 arasında) ise 1:129.000 sıklığında görülür [25]. Ağır ve parsiyel biotinidaz eksikliği insidansı 1:60.000, Türkiye'de biotinidaz eksikliği görülme sıklığı ise 1:7116'dır [43]. Canda ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptıkları 259 olgu içeren çalışmada akraba evliliği oranı %33,2 saptandı [44]. TÜİK 2016 verilerine göre Türkiye'de akraba evliliği oranı %23,2 olarak saptanmış olup çalışmamızda ise bu oran %25,3 saptandı.

Halen BTD geninin 165 üzerinde bildirilen mutasyonu mevcuttur. BTD genotip ve biotinidaz enzim aktivitesi arasındaki ilişki kesin olarak ortaya konmuş olmasa da bizim çalışmamızda ve genel olarak da en sık görülen mutasyon olan p.D444H mutasyonudur. En az bir allelinde p.D444H mutasyon saptanan olgularda biotinidaz enzim aktivitesi diğer mutasyon tiplerindeki enzim aktiviteleri ile kıyaslandığında daha yüksek seyretmektedir [45, 46]. Thodi ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptıkları bir çalışmada 63.119 olgunun dahil edildiği bir taramada 14 parsiyel enzim eksikliği bulunan biotinidaz eksikliği tanısı alan olgu saptanmış ve hepsinin en az bir allelinde p.D444H mutasyonu saptanmıştır [47]. Benzer şekilde çalışmamızda da p.D444H mutasyonuna sahip hastalarda sahip olmayan hastalara göre enzim eksikliği istatistiksel olarak daha hafif saptanmıştır. Yalnızca bir olgunun homozigot p.D444H mutasyonuna sahip olup ağır enzim eksikliğine sahip olduğu görüldü. Heterojen enzim eksikliği olan hastaların hepsinin en az bir allelinde p.D444H mutasyonu saptandı.

Biotinidaz eksikliği tanısında enzim aktivitesinin ölçümü önemlidir. Bununla birlikte mutasyon taraması tanıyı doğrulayabilir, biyokimyasal ve analitik yöntemlerden kaynaklanan yanlış teşhisi önleyebilir ve özellikle genotip-fenotip ilişkisinin anlaşılmasını artırabilen eşlik oranlarının daha yüksek olduğu popülasyonlarda homozigot mutasyonların enzim aktivitesi üzerindeki olası etkilerini açıklayabilir. Çalışmamızda p.D444H, p.R207H, p.C33fs, p.T351KfsX12, p.T532M

olmak üzere beş adet homozigot mutasyon saptandı. Bunlardan p.D444H haricinde diğerlerinin hepsinde ağır enzim eksikliği mevcuttu. Literatürde p.R207H, p.C33fs ve p.T532M mutasyonlarının ağır eksiklik ile ilgili olduğunu bildiren yayınlar bulunmaktadır [47]. Benzer şekilde bizim çalışmamızda da bu homozigot mutasyonların enzim eksikliği derecesi üzerinde olası etkilerinin yüksek olduğu söylenebilir.

Biotinidaz eksikliğinin önemli bulgularından biri de sensörinöral işitme kaybıdır. Çoğu bulgunun aksine sensörinöral işitme kaybı geri dönüşümsüzdür. Türkiye’de yenidoğan tarama programına girmeden önce Genç ve arkadaşlarının 2007’de yaptıkları 20 olgu içeren bir çalışmada %55 oranında sensörinöral işitme kaybı gözlenirken çalışmamızda hiçbir olguda işitme kaybına rastlanmadı [48]. Burada etkili olan faktörün çalışmamıza dahil edilen tüm olguların yenidoğan tarama programı ile tanı konup erken tanı ve tedavi almaları olduğu söylenebilir. Çalışmamızda tüm hastaların ilk 2 ay içinde tarama programı sonucu ile hastanemize başvurduğu ve gerekli tedavilerinin başladığı görüldü.

Biotinidaz eksikliği ülkemizde yenidoğan tarama programına girdiğinden semptomatik hastalara çok nadir oranda rastlanmaktadır. Parsiyel ya da heterojen enzim eksikliğine sahip olan hastaların ölçülebilir enzim aktivitesi olmayanlara göre klinik seyirlerinin daha hafif olacağı ve daha düşük oranda biotin gereksinimine ihtiyaç duyacakları belirtilmiştir [32]. Literatürde birçok ülkeden gelen raporlar sonucu biotinidaz ile tedavi edilmemiş olan asemptomatik çocukların özellikle gastroenterit atağı ve diğer bulaşıcı hastalıklar esnasında deri dökülmesi, hipotoni ve saç dökülmesi gibi semptomlar geliştirdiği ve böylelikle birçok yeni parsiyel enzim eksiklikli çocuğun fark edilmesini sağlamıştır [5]. Ülkemizde yapılan çalışmalarda da biotin tedavisi altındaki olguların akut gastroenterit atağı geçirirken semptomatik hale geldiğini bildiren yayınlar mevcuttur [49]. Asemptomatik hastaların enfeksiyon atağı gibi dönemlerinde semptomatik hale gelme riskleri de olduğundan tedavi konusunda tavsiye bütün hastalara ağır enzim eksikliği olan hastalara yaklaşım gibi davranmaktır [25]. Porta ve arkadaşlarının 2017 yılında yayınladıkları 30 seneyi kapsayan yenidoğan tarama programı sonucunda tespit edilen hastaların geriye yönelik incelemesini içeren çalışmada, tüm tespit edilen hastaların 10-20 mg/gün dozunda yan etkisiz başarılı bir şekilde tedavi edildikleri gösterilmiştir [50]. Wolf

tarafından 2016 yılında yayınlanan yenidoğan taraması ile tanı konulmuş 44 ergen ve genç yetişkinin dahil edildiği çalışmada 10 mg/gün dozunda biotin kullanımının yetişkinler içinde yeterli olduğu görülmüştür [51]. Çalışmamızdaki tüm hastalara da 10-20 mg/gün dozunda tedavi verilmiştir. Bu tedaviyle birlikte çalışmamızda semptomatik hastaya rastlanmamıştır.

Literatürde semptomatik çocukların asemptomatik erişkin ebeveynleri ve kardeşleri veya yenidoğan taraması ile tanı konulan tedavisiz asemptomatik kalan hastalar hakkında yayınlar mevcuttur [52, 53]. Canda ve arkadaşlarının 2018'de yaptıkları 259 olgu içeren çalışmada da aile taraması sonucu 15 ebeveyne biotinidaz eksikliği tanısı konulduğu ve bunların hepsinin asemptomatik olduğu saptanmıştır [44]. Benzer şekilde çalışmamızda da 9 ebeveyn ve kardeşe biotinidaz eksikliği tanısı konulmuştur ve bu hastaların hepsi tanı anında asemptomatik olarak tespit edilmiştir.

Bu çalışmada tespit edilen yeni mutasyon p.R209C (c.625C>T) mutasyonudur. Bir olguda p.R209C / p.D444H bileşik heterozigot mutasyonu saptandı ve enzim eksiklik düzeyi heterojen seviyededeydi. Nadir görülen mutasyonlar arasında ise daha önce Karaca ve arkadaşlarının saptadığı mutasyon olan c1320delG saptandı [54]. En sık saptanan mutasyonlar sırasıyla p.D444.H, p.R157H ve c.98-104delinsTCC mutasyonlarıydı. Ülkemizde yapılan diğer çalışmalara benzer şekilde ağır enzim eksiklikli olgularda sık görülen mutasyon p.R157H, parsiyel enzim eksiklikli hastalarda sık görülen mutasyon ise p.D444H mutasyonları dikkat çekti [44, 49]. Daha iyi bir genotip-enzim aktivitesi ilişkisi kurulabilmesi için novel mutasyonların homozigot olarak görüldüğü hasta popülasyonlarına ihtiyaç vardır. Bu yüzden çalışmamızda saptanan novel p.R209C mutasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi hakkında yorum yapılamamaktadır.

Sonuç olarak, bizim çalışmamızda biotinidaz eksikliği hastalığının yenidoğan tarama programına alınması ile hastalara erken tanı ve tedavi başlanabildiği, böylece hastalığa ait bulguların ortaya çıkışının önüne geçilmiş olduğunu gösterilmiştir. p.D444H mutasyonu ile enzim aktivitesi arasındaki belirgin ilişki saptanmıştır. Tarama programının sadece hastalara değil ayrıca asemptomatik anne, baba ve kardeşlerine de tanı koymada faydalı olduğu gösterilmiştir. Uygulanan 10-20 mg/gün dozunda biotin tedavisinin ise güvenli ve semptomların ortaya çıkmasını önlemede yeterli olduğu saptanmıştır.

6. SONUÇLAR

- 1) Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Beslenme ve Metabolizma Bilim Dalı'nda yapıldı. Yenidoğan tarama programı ile biotinidaz eksikliği ön tanısı ile başvurup, biotinidaz eksikliği tanısı 83 olgu çalışmaya dahil edildi.
- 2) Çalışmaya dahil edilen olguların 41'i (%49,4) kız, 42'si (%50,6) erkekti. Olguların median tanı yaşı 15 gün (5-46) olarak saptandı. Median tedavi başlama yaşı 18 gün (5-46) saptandı. Takip edilen olguların median yaşı 38 ay (7-109) olarak tespit edildi.
- 3) Olguların hiçbirinde geliş anında biotinidaz eksikliği ilişkili semptom veya bulguya rastlanılmadı. Çalışmaya katılan 83 olgu içinde 21 (%25,3) olgunun ebeveynleri arasında akrabalık mevcuttu.
- 4) Çalışmaya dahil olan olguların hastaneye başvuru anında bakılan median biotinidaz enzim aktivitesi düzeyi 1,95 nmol/dk/ml (0,33-4,5) bulundu. Olgulara 10-20 mg/gün arası biotin tedavisi verildiği görüldü.
- 5) Tüm olgulara biotinidaz eksikliği (*BTD*) gen (OMIM 253260) analizi yapıldı. Yirmi altı olguda (%31,3) homozigot, elli yedi olguda (%68,7) bileşik heterozigot mutasyon olduğu belirlendi. Olguların 20'sinde (%24,1) homozigot c.1330G>C, 16'sında (%19,3) c.1330G>C / c.470G>A birleşik heterozigot mutasyon olduğu görüldü.
- 6) Olguların *BTD* gen analiz sonuçları incelendiğinde, en sık saptanan mutasyonlar c.1330G>C (p.D444H) (87; %52,4), c.470G>A (p.R157H) (25; %15,1) ve c.98-104delinsTCC (p.C33fs) (17; %10,2) olarak saptandı. Bir hastada daha önce tanımlanmamış c.625C>T (p.R209C) olası patojenik varyasyon belirlendi.
- 7) Olgular *BTD* geninde p.D444H mutasyonu içermelerine göre 3 gruba ayrıldığında, 20 olguda (%24,3) p.D444H homozigot mutasyon, 48 (%57,8) olguda p.D444H ile başka bir mutasyonun eşlik ettiği birleşik heterozigot ve 15 (%17,9) olguda p.D444H içermeyen mutasyon saptandı.

- 8) Grupların hastanemize başvurusunda bakılan biotinidaz enzim düzeyleri incelendiğinde p.D444H homozigot mutasyonlara sahip hastaların median biotinidaz enzim aktivitesi 2,7 nmol/dk/ml (0,8-4,5) saptanırken, p.D444H mutasyonu tespit edilmeyen olguların median biotinidaz enzim aktivitesi 1,3 nmol/dk/ml (0,3-3,8) olarak belirlendi. İki grup arasında enzim aktiviteleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p=0.005).
- 9) Olguların klinik takipleri süresince bakılan enzim düzeyleri değerlendirildiğinde, median en düşük biotinidaz düzeyleri p.D444H homozigot mutasyonu tespit edilen hastalarda 2,2 nmol/dk/ml (0,8-4,5), p.D444H mutasyonu içeren birleşik heterozigot mutasyonun eşlik ettiği olgularda 1,2 nmol/dk/ml (0,2-2,4), p.D444H mutasyonu içermeyen mutasyonu olan olgularda 0,5 nmol/dk/ml (0,1-2,2) olarak tespit edildi.
- 10) Olguların klinik takipleri süresince bakılan enzim aktivitesi yüzdesi değerlendirildiğinde, median hastaneye başvuru anında bakılan biotinidaz enzim aktivitesi yüzdesi homozigot p.D444H mutasyonu olan olgularda %33,2 (10,2-54,1), p.D444H mutasyonu içeren birleşik heterozigot mutasyonun eşlik ettiği olgularda %21,0 (7,3-35,6), p.D444H mutasyonu içermeyen mutasyonu olan olgularda %15,7 (4,0-45,6) olarak hesaplandı. Homozigot p.D444H mutasyonu taşıyan olgularla p.D444H mutasyonu taşımayan olgular arasında enzim aktiviteleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p=0.005).
- 11) Çalışmaya alınan olguların; 19'unda (%22,8) ağır enzim eksikliği (enzim aktivitesi <%10), 51'inde (%61,4) parsiyel enzim eksikliği (enzim aktivitesi %10-30), 13'ünde (%15,8) heterojen enzim eksikliği (enzim aktivitesi >%30) saptandı. Ağır enzim eksikliği saptanan hastaların median en düşük biotinidaz düzeyleri 0,4 nmol/dk/ml (0,1-0,8), median en düşük biotinidaz aktivite yüzdeleri ise %4,8 (1,2-9,7) saptandı. Parsiyel enzim eksikliği saptanan hastaların median en düşük biotinidaz düzeyleri 1,5 nmol/dk/ml (0,8-2,4), median en düşük biotinidaz aktivite yüzdeleri ise %18,5 (10,1-29,2) saptandı. Heterojen enzim eksikliği saptanan hastaların ortanca en düşük biotinidaz düzeyleri 2,8 nmol/dk/ml (2,5-4,8),

ortanca en düşük biotinidaz aktivite yüzdeleri ise %34,8 (30,2-59,0) saptandı.

- 12) Ağır enzim eksikliği saptanan 19 olgunun sadece bir tanesinde p.D444H homozigot mutasyonu saptandı. Ağır enzim eksikliği olan olgularda en sık görülen mutasyon 5 olgu (%26,3) ile p.D444H / p.R157H bileşik heterozigot mutasyonu idi. Sonrasında sırasıyla ikişer olguda c.98_104delinsTCC homozigot ve p.R157H homozigot mutasyonları saptandı.
- 13) Parsiyel enzim eksikliği saptanan 51 olguda en sık p.D444H homozigot mutasyonu saptandı. 13 olguda (%25,5) p.D444H homozigot mutasyonu parsiyel eksikliği olan hastalarda saptandı. On bir olguda (%21,6) p.D444H / p.R157H bileşik heterozigot ve 7 olguda (%13,7) p.D444H / c.98_104delinsTCC bileşik heterozigot mutasyonu saptandı.
- 14) Biotinidaz eksikliği geninde homozigot p.D444H, p.D444H'in eşlik ettiği bileşik heterozigot ve p.D444H mutasyonu içermeyen mutasyonu olan hasta gruplarında biotinidaz enzim eksiklik düzeyleri incelendiğinde ağır enzim eksikliği saptanan yirmi iki olgudan on tanesinin (%52,6) p.D444H mutasyonu içermediği görüldü. Ayrıca heterojen enzim eksikliği olan on üç olgunun tamamı ya homozigot p.D444H mutasyonu ya da p.D444H içeren heterozigot mutasyonlara sahipti. Parsiyel enzim eksikliği olan elli bir olgunun otuz üç tanesi (%64,7) p.D444H içeren bileşik heterozigot mutasyonlara sahipti. Mevcut bulgular ile p.D444H mutasyonu ile enzim eksikliği düzeyi arasında negatif yönde istatistiksel anlamlı ilişki saptanmıştır ($p < 0.0001$).
- 15) Olgularımızdan biri p.D444H homozigot mutasyonu taşımasına rağmen ağır enzim eksiklik düzeyindeydi. Takiplerinde nörolojik, işitme ve görme muayeneleri olağandı. Büyüme geriliği olması nedeniyle beslenme desteği alıyor.
- 16) Hastanemizde yenidoğan taramasıyla tanı konmuş olguların anne, baba ve varsa 2008 öncesi doğumlu kardeşleri de rutin olarak biotinidaz eksikliği açısından taranmaktadır. Bu kapsamda yapılan aile taraması sonucu 83 olgudan 6 tanesinin annesinde, 1 olgunun babasında ve 2 olgunun birinin

bir diğzerinin iki kız kardeşinde biotinidaz eksikliği saptandı. Tarama sonucu BE saptanan olguların hepsi asemptomatikti. Eksiklik saptanan 3 anne olgunun gen analizi sonucunda p.D444H homozigot mutasyonu saptandı.



KAYNAKÇA

1. Knowles, J.R., THE MECHANISM OF BIOTIN-DEPENDENT ENZYMES. 1989. **58**(1): p. 195-221.
2. Kasapkara Çiğdem, S., et al., Mutations in BTD gene causing biotinidase deficiency: a regional report, in *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. 2015. p. 421.
3. Wolf, B., Biotinidase Deficiency, in *GeneReviews*((R)), M.P. Adam, et al., Editors. 1993, University of Washington, Seattle University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.: Seattle (WA).
4. Weber, P., S. Scholl, and E.R. Baumgartner, Outcome in patients with profound biotinidase deficiency: relevance of newborn screening. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 2004. **46**(7): p. 481-484.
5. Secor McVoy, J.R., et al., Partial biotinidase deficiency: Clinical and biochemical features. *The Journal of Pediatrics*, 1990. **116**(1): p. 78-83.
6. Karimzadeh, P., et al., Biotinidase deficiency: a reversible neurometabolic disorder (an Iranian pediatric case series). *Iranian journal of child neurology*, 2013. **7**(4): p. 47-52.
7. Jay, A.M., et al., Outcomes of individuals with profound and partial biotinidase deficiency ascertained by newborn screening in Michigan over 25 years. *Genetics In Medicine*, 2014. **17**: p. 205.
8. Clarke, J.T.R., *A clinical guide to inherited metabolic diseases*. 2007, Cambridge: Cambridge University Press.
9. Vernon, H.J., *Inborn Errors of Metabolism: Advances in Diagnosis and Therapy*. *JAMA Pediatr*, 2015. **169**(8): p. 778-82.
10. Guthrie, R. and A. Susi, A SIMPLE PHENYLALANINE METHOD FOR DETECTING PHENYLKETONURIA IN LARGE POPULATIONS OF NEWBORN INFANTS. *Pediatrics*, 1963. **32**: p. 338-43.
11. Tureček, F., C.R. Scott, and M.H. Gelb, Tandem Mass Spectrometry in the Detection of Inborn Errors of Metabolism for Newborn Screening, in *Quantitative Proteomics by Mass Spectrometry*, S. Sechi, Editor. 2007, Humana Press: Totowa, NJ. p. 143-157.
12. Hohenfellner, K., et al., Molecular based newborn screening in Germany: Follow-up for cystinosis. *Mol Genet Metab Rep*, 2019. **21**: p. 100514.
13. Vill, K., et al., One year of newborn screening for SMA - Results of a German pilot project. *J Neuromuscul Dis*, 2019.
14. Gramer, G., et al., Newborn Screening for Vitamin B12 Deficiency in Germany-Strategies, Results, and Public Health Implications. *J Pediatr*, 2019.
15. Hawthorne, S. and H.L. Levy, Can Newborn Screening for Vitamin B12 Deficiency be Incorporated into All Newborn Screening Programs? *J Pediatr*, 2019.
16. Lee, H., et al., Implementation of a Targeted Next-Generation Sequencing Panel for Constitutional Newborn Screening in High-Risk Neonates. *Yonsei Med J*, 2019. **60**(11): p. 1061-1066.
17. Tezel, B., et al., The Development and Organization of Newborn Screening Programs in Turkey. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2014. **28**(1): p. 63-69.
18. Zempleni, J. and T. Kuroishi, Biotin. *Adv Nutr*, 2012. **3**(2): p. 213-4.

19. Yang, X., et al., Structure of human holocarboxylase synthetase gene and mutation spectrum of holocarboxylase synthetase deficiency. *Human Genetics*, 2001. **109**(5): p. 526-534.
20. Suormala, T., et al., Five Patients with a Biotin-Responsive Defect in Holocarboxylase Formation: Evaluation of Responsiveness to Biotin Therapy in Vivo and Comparative Biochemical Studies in Vi. *Pediatric Research*, 1997. **41**(5): p. 666-673.
21. Geoffrey Sherwood, W., et al., Lactic acidosis in biotin-responsive multiple carboxylase deficiency caused by holocarboxylase synthetase deficiency of early and late onset. *The Journal of Pediatrics*, 1982. **101**(4): p. 546-550.
22. Seymons, K., et al., Dermatologic Signs of Biotin Deficiency Leading to the Diagnosis of Multiple Carboxylase Deficiency. *Pediatric Dermatology*, 2004. **21**(3): p. 231-235.
23. Wolf, B., Biotinidase: its role in biotinidase deficiency and biotin metabolism. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2005. **16**(7): p. 441-445.
24. Hymes, J. and B. Wolf, Biotinidase and its roles in biotin metabolism. *Clinica Chimica Acta*, 1996. **255**(1): p. 1-11.
25. Wolf, B., Clinical issues and frequent questions about biotinidase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2010. **100**(1): p. 6-13.
26. Salbert, B.A., J.M. Pellock, and B. Wolf, Characterization of seizures associated with biotinidase deficiency. *Neurology*, 1993. **43**(7): p. 1351.
27. Wolf, B., et al., Biotinidase deficiency: Initial clinical features and rapid diagnosis. *Annals of Neurology*, 1985. **18**(5): p. 614-617.
28. Wolf, B., Biotinidase deficiency: "if you have to have an inherited metabolic disease, this is the one to have". *Genetics In Medicine*, 2012. **14**: p. 565.
29. Wastell, H.J., et al., Biotinidase deficiency: a survey of 10 cases. *Archives of Disease in Childhood*, 1988. **63**(10): p. 1244.
30. Bottin, L., et al., Biotinidase deficiency mimicking neuromyelitis optica: Initially exhibiting symptoms in adulthood. *Multiple Sclerosis Journal*, 2015. **21**(12): p. 1604-1607.
31. Mc Sweeney, N., et al., Two unusual clinical and radiological presentations of biotinidase deficiency. *European Journal of Paediatric Neurology*, 2010. **14**(6): p. 535-538.
32. Möslinger, D., et al., Clinical and neuropsychological outcome in 33 patients with biotinidase deficiency ascertained by nationwide newborn screening and family studies in Austria. *European Journal of Pediatrics*, 2001. **160**(5): p. 277-282.
33. Regula Baumgartner, E., et al., Biotinidase Deficiency: A Cause of Subacute Necrotizing Encephalomyelopathy (Leigh Syndrome). Report of a Case with Lethal Outcome. *Pediatric Research*, 1989. **26**(3): p. 260-266.
34. Grünewald, S., et al., Biotinidase Deficiency: a Treatable Leukoencephalopathy. *Neuropediatrics*, 2004. **35**(04): p. 211-216.
35. Ramaekers, V.T., et al., A biotinidase Km variant causing late onset bilateral optic neuropathy. *Archives of Disease in Childhood*, 1992. **67**(1): p. 115.
36. Ohlsson, A., et al., Profound biotinidase deficiency: a rare disease among native Swedes. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2010. **33**(3): p. 175-180.

37. Procter, M., et al., The Biotinidase Gene Variants Registry: A Paradigm Public Database. *G3: Genes|Genomes|Genetics*, 2013. **3**(4): p. 727.
38. Gannavarapu, S., et al., Biotinidase deficiency: Spectrum of molecular, enzymatic and clinical information from newborn screening Ontario, Canada (2007–2014). *Molecular Genetics and Metabolism*, 2015. **116**(3): p. 146-151.
39. Jay, A.M., et al., Outcomes of individuals with profound and partial biotinidase deficiency ascertained by newborn screening in Michigan over 25 years. *Genet Med*, 2015. **17**(3): p. 205-9.
40. Wolf, B., Why screen newborns for profound and partial biotinidase deficiency? *Mol Genet Metab*, 2015. **114**(3): p. 382-7.
41. Wolf, B., R. Spencer, and T. Gleason, Hearing loss is a common feature of symptomatic children with profound biotinidase deficiency. *J Pediatr*, 2002. **140**(2): p. 242-6.
42. Duran, M., et al., Cerebrospinal fluid organic acids in biotinidase deficiency. *J Inherit Metab Dis*, 1993. **16**(3): p. 513-6.
43. Karaca, M., et al., Detection of biotinidase gene mutations in Turkish patients ascertained by newborn and family screening. *European Journal of Pediatrics*, 2015. **174**(8): p. 1077-1084.
44. Canda, E., et al., Single center experience of biotinidase deficiency: 259 patients and six novel mutations. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2018. **31**(8): p. 917-926.
45. Procter, M., B. Wolf, and R. Mao, Forty-eight novel mutations causing biotinidase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2016. **117**(3): p. 369-372.
46. Pomponio, R.J., et al., Novel mutations cause biotinidase deficiency in Turkish children. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2000. **23**(2): p. 120-128.
47. Thodi, G., et al., High incidence of partial biotinidase deficiency cases in newborns of Greek origin. *Gene*, 2013. **524**(2): p. 361-362.
48. Genc, G.A., et al., Audiologic findings in children with biotinidase deficiency in Turkey. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 2007. **71**(2): p. 333-339.
49. Seker Yilmaz, B., et al., Twenty-seven mutations with three novel pathogenic variants causing biotinidase deficiency: a report of 203 patients from the southeastern part of Turkey. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2018. **31**(3): p. 339-343.
50. Porta, F., et al., Neonatal screening for biotinidase deficiency: A 30-year single center experience. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, 2017. **13**: p. 80-82.
51. Wolf, B., Successful outcomes of older adolescents and adults with profound biotinidase deficiency identified by newborn screening. *Genetics In Medicine*, 2016. **19**: p. 396.
52. Baykal, T., et al., Asymptomatic adults and older siblings with biotinidase deficiency ascertained by family studies of index cases. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2005. **28**(6): p. 903-912.
53. Wolf, B., et al., Profound biotinidase deficiency in two asymptomatic adults. *American Journal of Medical Genetics*, 1997. **73**(1): p. 5-9.

54. Karaca, M., et al., Detection of biotinidase gene mutations in Turkish patients ascertained by newborn and family screening. *Eur J Pediatr*, 2015. **174**(8): p. 1077-84.



EKLER

Ek 1: Etik Kurul Onayı

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2019/11-04	Tarih:24.04.2019				
Prof.Dr. Nur Arslan 'ın sorumlusu olduğu "Yenidoğan Tarama Programı ile Tanı Konulmuş Biotinidaz Eksikliği Olan Hastalarımızın Retrospektif Değerlendirilmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.						
ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İy Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
ETİK KURUL ÜYELERİ						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Sadık Kıvanç METİN (Başkan)	Kalp ve Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Serkan YENER (Başkan Yardımcısı)	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Arzu GENÇ	Nörolojik Fizyoterapi - Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	katılmadı
Prof.Dr. Sermin ÖZKAL	Tıbbi Patoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Pınar TUNCEL	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Nil Hocaoğlu AKSAY	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Tufan ÇANKAYA	Tıbbi Genetik	Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	katılmadı
Doç.Dr.Ayfer DAYI	Davranış Fizyolojisi	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Korcan DEMİR	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Mahmut Cem ERGON	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Öğr.Gör.Dr.Kıvanç YÜKSEL	Biyostatistik ve Tıbbi Bilişim	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Bilişim A.D	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Av.Esra FIRTINA	Avukat	DEU Rektörlüğü Hukuk Müşavirliği	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	katılmadı
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	

Ek 2: Olgu Rapor / Veri Kayıt Formu Örneği
Veri Kayıt Formu

1. Dosya no:
2. Hasta adı, soyadı:
3. Yaşı, kaç ay:
4. Tanı yaşı, kaç ay:
5. Takip süresi, kaç ay:
6. Cinsiyeti:
 - 1 Erkek
 - 2 kadın
7. Başvuru yılı:
8. Anne-Baba arası akrabalık var mı?
9. Anne-Baba arası akrabalık varsa kaçınıcı derece:
10. Ailede biotinidaz öyküsü var mı?
11. Ailede biotinidaz öyküsü varsa kimde:
12. Topuk kanı taraması ile mi geldi?
13. Geliş semptomu var mı?
14. Geliş semptomu varsa ne:
15. Tedavi başlaması, kaç ay:
16. Geliş biotinidaz düzeyi:
17. En düşük biotinidaz düzeyi:
18. En düşük biotinidaz düzeyinin yüzdesi:
19. En yüksek biotinidaz düzeyi:
20. En yüksek biotinidaz düzeyinin yüzdesi:
21. Enzim eksiklik düzeyi:
22. Takip süresince semptom var mı?
23. Semptom varsa ne:
24. Semptom varsa başlangıç tarihi:
25. İşitme kaybı var mı?
26. İşitme cihazı kullanıyor mu?
27. İzlemde nörolojik bulgu var mı?

28. İzlemede nörolojik bulgusu varsa ne:
29. İzlemede göz bulgusu var mı?
30. İzlemede göz bulgusu varsa ne:
31. Birinci mutasyon:
32. Birinci protein değişikliği:
33. İkinci mutasyon:
34. İkinci protein değişikliği:
35. Mutasyon tipi:
36. Aldığı tedavi dozu:
37. Aile taraması sonucu:

