

Instytut Matki i Dziecka

Lidia Suchoń

Ocena znaczenia klinicznego, wykrywanego
w badaniach przesiewowych noworodków
w populacji polskiej, deficytu biotynidazy wraz
z próbą określenia korelacji genotyp - fenotyp

Rozprawa doktorska

Promotor:

dr hab. n. med. Jolanta Sykut-Cegielska

Warszawa 2022

Streszczenie

Deficyt biotynidazy (BD, MIM: 253260; ICD-10: E53.8; ORPHA: 79241) jest bardzo rzadką wrodzoną wadą metabolizmu, spowodowaną zmniejszeniem lub całkowitym brakiem aktywności biotynidazy. Choroba dziedziczy się w sposób autosomalny recesywny, spowodowana jest mutacją w genie *BTD* zlokalizowanym na chromosomie 3p25.1.

Biotynidaza jest enzymem odpowiedzialnym za uwolnienie wolnej biotyny (witaminy H) ze składników pożywienia oraz jej reutilizację i udostępnienie do ważnych procesów metabolicznych. Biotyna pełni funkcję kofaktora dla czterech karboksylaz, które biorą udział w procesie glukoneogenezy, metabolizmie tłuszczów oraz katabolizmie aminokwasów. Brak biotyny powoduje złożony niedobór karboksylaz (*Multiple Carboxylase Deficiency*, MCD), czego skutkiem jest zaburzenie wyżej wymienionych procesów. Deficyt biotynidazy zwany jest MCD – *late onset*, a objawy kliniczne zwykle ujawniają się najwcześniej w późnym niemowlęctwie. W zależności od stopnia obniżenia aktywności enzymu w surowicy krwi wyróżnia się częściowy BD (10% - 30% prawidłowej aktywności) i głęboki BD (<10% prawidłowej aktywności). W postaci głębokiej BD przebieg choroby jest postępujący (często podstępny), dominują objawy neurologiczne takie jak: hipotonia, ataksja, napady padaczkowe, zanik nerwów wzrokowych oraz głuchota, którym towarzyszą wysypki skórne i łysienie. W badaniach neuroobrazowych stwierdza się zmiany przypominające zespół Leigha. Pacjenci z częściowym BD mogą pozostawać bezobjawowi, ale czasem rozwijają objawy analogiczne do tych obserwowanych w głębokim deficycie. Wczesne wykrycie BD i leczenie farmakologicznymi dawkami biotyny zapobiega występowaniu takich powikłań choroby jak: stan padaczkowy, śpiączka, niedowład spastyczny czterokończynowy, ślepotą i głuchotą, do zgonu włącznie.

Do niedawna BD był rozpoznawany wyłącznie poprzez skrining selektywny (tj. u pacjentów objawowych), często już z nieodwracalnymi objawami uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego. W Polsce od 2016 roku realizowano w Zakładzie Badań Przesiewowych i Diagnostyki Metabolicznej IMiD pilotażowy program badań przesiewowych noworodków w kierunku BD.

Celem pracy były: a) charakterystyka kliniczna, wyniki diagnostyki potwierdzającej i wyniki obserwacji pacjentów zidentyfikowanych poprzez pilotażowe w populacji polskiej badania przesiewowe noworodków w kierunku deficytu biotynidazy; b) próba ustalenia korelacji genotyp - fenotyp u polskich pacjentów z deficytem biotynidazy; c) oszacowanie częstości występowania deficytu biotynidazy w Polsce; d) opracowanie zaleceń postępowania w przypadku uzyskania nieprawidłowego wyniku badania przesiewowego noworodków w kierunku deficytu biotynidazy.

Praca miała charakter retrospektywny. Materiał pracy stanowiła grupa dzieci, u których wykryto nieprawidłowe wyniki w pilotażowym badaniu przesiewowym noworodków w kierunku deficytu biotynidazy, realizowanym w Zakładzie Badań Przesiewowych i Diagnostyki Metabolicznej IMiD od marca 2016 roku do sierpnia 2020 roku. W tym okresie przebadano 1 071 463 noworodków w kierunku deficytu biotynidazy. Ponownego oznaczenia aktywności enzymu w „suchej” kropli krwi (tj. w drugiej, trzeciej lub czwartej bibule) wymagało 1 538 noworodków. Spośród nich w związku z nieprawidłowym wynikiem badania przesiewowego 22 dzieci wezwano celem pogłębienia diagnostyki. Wśród nich 18 pacjentów znalazło się pod opieką Poradni Chorób Metabolicznych oraz Kliniki Wrodzonych Wad Metabolizmu i Pediatrii IMiD. Pozostałe czworo

dzieci znajduje się pod opieką Poradni Metabolicznej przy Oddziale Klinicznym Chorób Metabolicznych i Diabetologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie.

U dzieci z nieprawidłowym wynikiem badania przesiewowego noworodków w kierunku deficytu biotynidazy (badanie z „suchej” kropli krwi) przeprowadzono badania weryfikujące podejrzenie choroby, tj.: zebranie szczegółowego wywiadu rodzinnego i osobniczego, obserwację kliniczną, powtórne badanie aktywności biotynidazy w „suchej” kropli krwi, badanie aktywności biotynidazy w surowicy krwi metodą kolorymetryczną, profil kwasów organicznych w moczu metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią masową (GC/MS), profil acylokarnityn w „suchej” kropli krwi metodą tandemowej spektrometrii mas (MS/MS) oraz badania molekularne.

Wszystkie noworodki z grupy badanej, poza jednym (który pochodził z romskiej grupy etnicznej), były pochodzenia polskiego, przeważały dziewczynki. Sześcioro dzieci urodziło się w województwie lubelskim, pięcioro w województwie mazowieckim, czworo w województwie małopolskim, po dwoje w województwach dolnośląskim, podlaskim i śląskim, a jedno dziecko w województwie łódzkim. U wszystkich noworodków wywiad rodzinny w kierunku wrodzonych wad metabolizmu, a w szczególności w kierunku deficytu biotynidazy, był nieobciążony. U jednego dziecka wywiad rodzinny był obciążony rozpoznaniem spektrum autyzmu u syna brata matki. Nie odnotowano też w wywiadzie rodzinnym poważnych chorób neurologicznych, ani nagłych zgonów o nieustalonej przyczynie. Siedmioro noworodków pochodziło z ciąży pierwszej, dziesięcioro z ciąży drugiej, dwoje z ciąży trzeciej i dwoje z ciąży czwartej. Okres ciąży przebiegał prawidłowo w przypadku sześciorga dzieci. W pozostałych przypadkach okres prenatalny był powikłany (wg dostępnej dokumentacji): u matki – zakażeniem układu moczowego, nadciśnieniem tętniczym, cukrzycą ciążową, niedokrwistością, infekcją dróg rodnych, podejrzeniem zespołu Sjögrena, poza tym – zaburzeniem wzrastania płodu, zaburzeniami przepływu w naczyniach pępowinowych, toksoplazmozą, cytomegalią, infekcją o etiologii *Streptococcus agalactiae*. W badanej grupie w 14 przypadkach porody odbyły się siłami natury, a w siedmiu przypadkach poprzez cięcie cesarskie z następujących powodów (według dostępnej dokumentacji): brak postępu porodu, zagrażająca zamartwica płodu, zaburzenia przepływu w naczyniach pępowinowych, podejrzenie przecieku płodowo-płodowego, zaburzenia wzrastania płodu, hipotrofia płodu, stan po cięciu cesarskim. W przypadku jednej pacjentki żadne dane dotyczące okresu okołoporodowego nie były dostępne. Dzieci były urodzone pomiędzy 33. i 42. hbd z masą ciała od 1460 g do 4500 g oraz długością ciała od 41 cm do 63 cm. U pięciorga noworodków przy urodzeniu stwierdzono hipotrofię wewnątrzmaciczną – masa ciała 1460 g (wiek 34 hbd), 1630 g (wiek 33 hbd, z ciąży bliźniaczej), 1730 g (wiek 33 hbd, z ciąży bliźniaczej), 2030 g (wiek 37 hbd) oraz 2480 g (wiek 40 hbd). Osiemnaścioro dzieci urodziło się w stanie dobrym, uzyskując 10 punktów w skali Apgar, pozostali otrzymali odpowiednio 6/6/8, 7/7/8 oraz 8/8/9 punktów. Okres adaptacyjny po urodzeniu przebiegał nieprawidłowo u siedmiorga noworodków (zgodnie z dostępną dokumentacją). W szczególności u czworga dzieci stosowano żywienie pozajelitowe, u dwojga prowadzono antybiotykoterapię (ampicylina z sulbaktamem). Ponadto u trojga dzieci stwierdzono PFO i PDA. Żółtaczkę obserwowano w przypadku ośmiorga pacjentów. Wśród innych zaburzeń w grupie badanej obserwowano: zaburzenia elektrolitowe, poszerzenie układu kielichowo-miedniczkowego nerek, cechy infekcji wrodzonej (u czworga noworodków).

W badanej grupie aktywność biotynidazy w „suchej” kropli krwi oznaczano u pojedynczego dziecka najczęściej trzykrotnie, w trzech przypadkach – czterokrotnie, a w pięciu przypadkach – dwukrotnie, w jednym przypadku tylko jednorazowo. Aktywność ta wynosiła w pierwszych

bibułach przesiewowych pobieranych w oddziałach noworodkowych (zgodnie z rekomendacjami) w 3. lub 4. dobie życia od 0,1% do 38%, w drugich bibułach od 3,1% do 71,6%, w trzecich bibułach od 1,6% do 129%, a w czwartych bibułach od 18% do 30%. Średnia wartość aktywności biotynidazy we wszystkich badanych „suchych” kroplach krwi wynosiła w badanej grupie 27,8%, z wartością mediany równą 23%. Aktywność biotynidazy w surowicy, weryfikująca nieprawidłowy wynik oznaczenia aktywności enzymu w „suchej” kropli krwi (tj. podejrzenie deficytu biotynidazy), wynosiła od 0% do 102%, z wartością mediany równą 22% i średnią wartością aktywności enzymatycznej równą 27,8%. Badania te były wykonywane na zlecenie lekarza Poradni Chorób Metabolicznych IMiD między 8. a 218. dniem życia, najczęściej jednak między 25. a 31. dobą życia. W ramach diagnostyki różnicowej deficytu biotynidazy u 18 dzieci w wieku pomiędzy 8. dobą a 8. miesiącem życia przeprowadzono analizę profilu kwasów organicznych w moczu metodą GC/MS. Nieprawidłowości wykazano w przypadku siedmiorga pacjentów. Wynik profilu acylokarnityn w bibule przesiewowej był prawidłowy w całej badanej grupie.

Badania molekularne przeprowadzono u 17 pacjentów. W czterech przypadkach analiza genu BTD była dwuetapowa. U czworga dzieci, u których metodami biochemicznymi stwierdzono wcześniej aktywność biotynidazy w zakresie wartości prawidłowych, odstąpiono od wykonywania badań molekularnych. U jednej pacjentki nie wykonano analizy DNA. Ogółem w grupie badanej na 34 allelach zidentyfikowano 37 wariantów patogennych lub prawdopodobnie patogennych, w tym 16 różnych wariantów. Najczęściej wykrywany był wariant p.Asp444His. Drugi co do częstości był wariant p.Leu215Phe. Trzecie pod względem częstości w badanej grupie występowały dwa warianty: p.Cys33PhefsTer36 oraz c.[309+2C>G]. Pozostałe warianty takie jak: p.Gln456His, p.Cys418Ser, p.Cys33PhefsTer36, p.Gly488Asp, p.Thr532Met, p.Leu405Pro, p.Ala171Thr, p.Ile248Thr, p.Tyr438Cys, p.Tyr540Cys oraz p.Val62Met zostały zidentyfikowane na pojedynczych allelach. W badanej grupie wykryto trzy nowe, potencjalnie patogenne warianty, tj.: p.Gly310Arg, p.Phe484Leu oraz c.[309+2C>G]. Oszacowano również częstość występowania wariantów p.Asp444His oraz p.Leu215Phe w badanej grupie kontrolnej. Częstość występowania tych wariantów wśród przebadanych alleli wynosiła odpowiednio 5,2% oraz 0,045%.

Na podstawie przeprowadzonej diagnostyki ostatecznie zidentyfikowano sześć przypadków głębokiego deficytu biotynidazy oraz dziesięć przypadków częściowego deficytu biotynidazy. Uzyskane wyniki pozwoliły na oszacowanie częstości deficytu biotynidazy w Polsce na 1 : 66 966 urodzeń, w tym postaci głębokiego deficytu biotynidazy na 1 : 178 577 urodzeń oraz postaci częściowego deficytu biotynidazy na 1 : 107 146 urodzeń.

Na podstawie przeprowadzonych badań wysunięto następujące wnioski: a) u noworodków z małą masą ciała (urodzonych z hipotrofią wewnątrzmaciczną i/lub przedwcześnie) pojedynczy wynik badania przesiewowego w kierunku deficytu biotynidazy nie może być podstawą do podejrzenia tej choroby, a powinien zostać powtórzony z oznaczeniem aktywności biotynidazy w surowicy (którego wartość jest rozstrzygająca); b) wobec zmiennych odchyleń biochemicznych, obserwowanych w deficycie biotynidazy (zwłaszcza aktywność enzymu w „suchej” kropli krwi czy profil kwasów organicznych w moczu) szczególnie u dzieci bezobjawowych klinicznie i z granicznymi wartościami oznaczeń enzymatycznych, wskazane jest określenie genotypu celem ustalenia ostatecznego rozpoznania; c) dotychczasowe doniesienia dotyczące korelacji genotyp - fenotyp w deficycie biotynidazy bywają niespójne; pewna korelacja jest możliwa w niewielu przypadkach, np. najczęstszy wariant p.Asp444His obecny w jednym z alleli (niebędących wariantami podwójnymi) odpowiada za wystąpienie częściowego deficytu biotynidazy, a obecny

w układzie homozygotycznym powoduje obniżenie aktywności enzymu do połowy; jednocześnie wariant p.Asp444His w konfiguracji *in cis* z nowo wykrytymi wariantami jest odpowiedzialny za wystąpienie głębokiego deficytu biotynidazy; d) pilotażowe badania przesiewowe noworodków w kierunku deficytu biotynidazy w Polsce potwierdziły znaczenie kliniczne przedobjawowej identyfikacji pacjentów i wykazały większą częstość występowania w populacji polskiej częściowego względem głębokiego deficytu biotynidazy (co jest zgodne z piśmiennictwem europejskim i amerykańskim); e) oszacowana częstość występowania deficytu biotynidazy w populacji polskiej zarówno dla głębokiego i częściowego deficytu wynosi 1 : 66 966 urodzeń, w tym dla częściowego deficytu biotynidazy – 1 : 107 146 urodzeń, a dla głębokiego deficytu biotynidazy – 1 : 178 577 urodzeń; f) wobec możliwości wystąpienia objawów i podstępnego przebiegu choroby u pacjentów z częściowym deficytem biotynidazy, a więc konieczności monitorowania ich stanu klinicznego z zaleceniami prewencyjnej suplementacji biotyną, są podstawy do rozszerzenia wskazań w badaniach przesiewowych noworodków o postać częściowego deficytu biotynidazy; g) w związku z trudnościami w diagnostyce weryfikującej i różnicowej, nieprawidłowych wyników badań przesiewowych noworodków w kierunku deficytu biotynidazy, opracowano praktyczne zalecenia dla lekarzy specjalistów pediatrii metabolicznej i pediatrów opiekujących się dziećmi wykrytymi poprzez te badania.

Pracę wykonano dzięki współpracy z ZBPiDM IMiD oraz Centrum Medycznym Medgen.

Summary

Biotinidase deficiency (BD, MIM: 253260; ICD-10: E53.8; ORPHA: 79241) is an ultrarare inborn error of metabolism, caused by a decreased or absent activity of biotinidase due to the pathogenic mutation in the *BTD* gene with locus 3p25.1, inherited in an autosomal recessive trait.

Biotinidase is an enzyme responsible for the release of free biotin (vitamin H) from food components and its reutilization and access for important metabolic processes. Biotin works as a cofactor for four carboxylases that are involved in the process of gluconeogenesis, fat metabolism and amino acid catabolism. Lack of biotin causes multiple carboxylase deficiency (MCD) which results in abnormalities of the above-mentioned processes. The biotinidase deficiency was called MCD – late onset and clinical symptoms usually appear in late infancy at the earliest. Depending on the degree of reduction of the enzyme activity in the blood serum, partial BD (10% - 30% of the normal activity) and a profound BD (less than 10% of the normal activity) are differentiated. In the profound form of BD the course of the disease is progressive (often insidious), with the dominant neurological symptoms such as: hypotonia, ataxia, seizures, optic nerve atrophy and deafness accompanied by skin rashes and alopecia. Neuroimaging shows abnormalities as Leigh-like syndrome. Patients with partial BD may stay asymptomatic, but sometimes develop the same symptoms as those seen in profound deficiency. Early diagnosis of biotinidase deficiency and treatment with pharmacological doses of biotin prevent complications of the disease, such as status epilepticus, coma, spastic tetraparesis, blindness and deafness, including death.

Until recently BD has been diagnosed only based on the selective screening (symptomatic patients), often already with the irreversible symptoms of central nervous system damage. A pilot program of newborn screening for BD in Poland has been carried out since 2016 in the Department of Newborn Screening and Metabolic Diagnostics in the Institute of Mother and Child. The goals of the study were: a) to present clinical characteristics, results of confirmatory diagnostics and the follow-up

results of the patients identified by the pilot newborn screening for BD in the Polish population; b) an attempt to establish a genotype-phenotype correlation in Polish patients with BD; c) to estimate the BD frequency in Poland; d) to establish recommendations of procedures, when abnormal result through newborn screening suggest BD.

The study was retrospective. The material of the study was a group of children with abnormal results in a pilot newborn screening for BD. This study was performed in the Department of Newborn Screening and Metabolic Diagnostics in the Institute of Mother and Child between March 2016 and August 2020. During this period 1,071,463 newborns were tested for BD. 1,538 newborns required to retest the enzyme activity in the "dry" blood spot (the second, third or fourth DBS). From them, due to the abnormal results, 22 children were qualified for the further diagnostics. 18 patients were admitted to the Department of Inborn Errors of Metabolism and Paediatrics or to the Metabolic Outpatient Clinic in the Institute of Mother and Child. Four patients were admitted to the Metabolic Outpatient Clinic belonging to the Clinical Ward of Metabolic Diseases and Diabetology of the University Hospital in Cracow. Children with abnormal results of the newborn screening for BD (test using DBS) were verified due to the suspicion of the disease by the: family and personal history, clinical observation, repeated testing of biotinidase activity in DBS, biotinidase activity in blood serum by colorimetric method, urinary organic acid profile by gas chromatography combined with mass spectrometry (GC/MS), acylcarnitine profile in DBS by tandem mass spectrometry (MS/MS) and molecular analysis. All newborns from the study group, except for one (who came from the Gypsy ethnic group), were of Polish origin, girls predominated. Six children were born in the Lublin voivodeship, five in the Mazovia voivodeship, four in the Lesser Poland voivodeship, two each in the Lower Silesia, Subcarpathia and Silesia voivodeships, and one child in the Lodz voivodeship. All newborns' family history for inborn errors of metabolism was insignificant, especially since there was no patient identified with BD among their families. In one patient's family history diagnosis of the mother's son's autism spectrum disorder was noted. Family history of serious neurological diseases or sudden death of unknown causes also were insignificant. Seven newborns came from the first pregnancy, ten from the second, two from the third and two from the fourth pregnancy. The gestation period was normal for six children. In other children the prenatal period was complicated (according to the available medical documentation): in the mother – urinary tract infection, hypertension, gestational diabetes, anaemia, infection of the genital tract, suspected Sjögren syndrome, also – impaired foetal growth, impaired flow in the umbilical vessels, toxoplasmosis, cytomegalovirus, Streptococcus agalactiae infection. In the cohort, 14 cases were spontaneous vaginal delivered, and seven cases were delivered by the caesarean section for the following reasons (according to the available medical documentation): failure to labour progress, foetal asphyxia, impaired blood flow in the umbilical vessels, suspected Twin-to-Twin Transfusion Syndrome, growth foetus disorders, foetal hypotrophy, caesarean section in the past. Perinatal data were unavailable at one child. The newborns were born between the 33rd and the 42nd week of gestation with a birth weight from 1460 g to 4500 g and a body length from 41 cm to 63 cm. Five newborns were diagnosed with the intrauterine hypotrophy at birth – birth weight 1460 g (34 hbd), 1630 g (33 hbd, twin), 1730 g (33 hbd, twin), 2030 g (37 hbd) and 2480 g (40 hbd). Eighteen children were born with 10 points in the Apgar scale, the rest received 6/6/8, 7/7/8 and 8/8/9 points. Postnatal period in seven babies was incorrect (according to their medical documentation). Especially four children received parenteral nutrition, two received antibiotic therapy (ampicillin with sulbactam). In addition PFO and PDA were found in three children. Jaundice has been observed in eight patients. Other disorders in the study group were observed such

as: electrolyte abnormalities, dilatation of the pelvicalyceal system of the kidney, signs of congenital infection (in four newborns). In the study group the biotinidase activity in DBS was measured in a single child, most often three times, in three cases – four times, and in five cases – twice, in one case only once. This activity was from 0.1% to 38% in the first DBS, which were collected in the neonatal departments (according to the recommendations) on the 3rd or 4th day of life, in the second DBS collected enzyme activity was 3.1% - 71.6%, in the third DBS – 1.6% - 129%, and in the fourth DBS – 18% - 30% of mean value. The mean value of biotinidase activity in all tested DBS in the study group was 27.8%, with the median value equal to 23%. Serum biotinidase activity, verifying the abnormal result of the enzyme activity in DBS (so suspicion of BD) ranged from 0% to 102% with a median value of 22% and an average enzyme activity value of 27.9%. These tests were performed according to the prescription of the doctor of the Metabolic Outpatient Clinic between the 8th and 305th day of life – most often however between 25 and 31 days of age. As part of the differential diagnosis of BD, 18 children aged between 8 days and 8 months of life were analysed for organic acid profile in urine using the GC/MS method. Abnormalities were found in seven patients. The acylcarnitine profile on the screening filter-paper was correct in the entire study group.

Molecular investigations were performed at 17 patients. In four cases the analysis of the BTBD gene was performed in two steps. Molecular tests were not performed in four children who had previously found biotinidase activity within the normal range. In one patient DNA analysis was not performed. A total of 37 pathogenic or possibly pathogenic variants were identified in the study group in 34 alleles, including 16 different variants. The most frequently detected variant was p.Asp444His. The second most frequent variant was p.Leu215Phe. The third most frequent variants in the studied group were two of them: p.Cys33PhefsTer36 and c.[309+2C>G]. Other variants such as: p.Gln456His, p.Cys418Ser, p.Cys33PhefsTer36, p.Gly488Asp, p.Thr532Met, p.Leu405Pro, p.Ala171Thr, p.Ile248Thr, p.Tyr438Cys, p.Tyr540Cys and p.Val62Met were identified in single alleles. In the study group three new potentially pathogenic variants were detected – p.Gly310Arg, p.Phe484Leu and c.[309+2C>G]. The frequency of the p.Asp444His and p.Leu215Phe variants in the control group was also estimated and revealed the following results: 5.2% and 0.045%, respectively.

The obtained results revealed six cases of profound BD and ten cases of partial BD were finally identified. Based on these results the incidence of the BD in Poland was estimated at 1 : 66,966 births, including profound BD at 1 : 178,577 births and partial BD at 1 : 107,146 births.

Based on the study results the following conclusions were stated: a) in newborns with low body weight (born with intrauterine hypotrophy and/or prematurely), a single abnormal result of screening for BD cannot give rise to suspicion of this disease and test should be repeated with the measurement of serum biotinidase activity (the value of which is conclusive); b) due to the variable biochemical abnormalities observed in BD (especially enzyme activity in DBS or the urinary organic acid profile), especially in clinically asymptomatic children and with borderline values of enzymatic activity, it is recommended to identify the genotype to establish the final diagnosis; c) so far reports on the genotype-phenotype correlation in biotinidase deficiency are sometimes unclear; some correlation is possible in a few cases, e.g. the most common p.Asp444His variant present in one of the alleles (not being double variants) is responsible for the partial BD, and present in a homozygous status reduces the enzyme activity to half; at the same time the p.Asp444His variant in the in cis configuration with newly detected variants is responsible for the occurrence of a profound

BD; d) pilot newborn screening for BD in Poland confirmed the clinical significance of presymptomatic patient identification and showed a higher frequency of partial relative to profound BD in the Polish population (which is consistent with European and American published data; e) the estimated frequency of the BD in the Polish population for both the profound and the partial deficiency is 1 : 66,966 births, for the partial BD 1 : 107,146 births, and for the profound BD 1 : 178,577 births; f) due to a possibility of symptomatic and insidious course of the disease in patients with partial BD, and therefore the need to monitor their clinical condition with recommendations for preventive biotin supplementation, there are grounds for including the partial BD in the newborn screening; g) due to the difficulties in the verification and differential diagnosis of abnormal results of newborn screening for BD, practical recommendations have been made for doctors, specialists in paediatric metabolic medicine and paediatricians caring for children detected through newborn screening.

The work was carried out in cooperation with the Department of Newborn Screening and Metabolic Diagnostics in the Institute of Mother and Child and with the Medgen Medical Center.