Química Clínica 2006; 25 (2) 64-74

Aplicación de la Espectrometría de Masas en Tándem al análisis de aminoácidos, acilcarnitinas, acilglicinas y ácidos orgánicos en muestras de orina en papel*

M. Rebollido, J.A. Cocho, D.E. Castiñeiras, M.D. Bóveda, J.M. Fraga

Resumen

La detección de metabolitos anormales en orina es importante para el diagnóstico de un elevado número de errores congénitos del metabolismo (ECM), por lo que son necesarios métodos de cribado que simultáneamente permitan la detección y la cuantificación de forma fiable de un elevado número de moléculas. Se desarrolló un método de MS/MS con ionización por electrospray (ESI) en modo de ionización positiva y negativa, para detectar aminoácidos, acilcarnitinas, acilglicinas y ácidos orgánicos como marcadores en muestras de orina impregnadas en papel de filtro. Se estudió la fragmentación de todas las moléculas seleccionadas y se establecieron los métodos de análisis. Se adaptaron estos métodos al análisis de muestras de orina impregnadas en papel de filtro y se aplicaron a un grupo de muestras patológicas.

El análisis por inyección directa de los aminoácidos y las acilcarnitinas en ionización positiva y de los ácidos orgánicos y las acilglicinas en ionización negativa se realiza con un tiempo de análisis de 2,6 y 2,5 minutos por ensayo respectivamente.

La sensibilidad de la MS/MS permite el análisis de los metabolitos seleccionados en una muestra biológica de reducido tamaño y baja concentración, como es la orina impregnada en papel de filtro.

Palabras clave: Cribado neonatal, errores congénitos del metabolismo, Espectrometría de Masas en tándem, orina impregnada en papel

Summary. Analysis of amino acids, acylcarnitines, acylglycines and organic acids in dried filter paper urine samples by Tandem Mass Spectrometry

Detection of abnormal metabolites in urine is important for the diagnosis of many inborn errors of metabolism (IEM). Reliable screening methods are therefore necessary to simultaneously detect and quantify a wide variety of molecules.

We developed an electrospray tandem mass spectrometry method (ESI-MS/MS) in positive and negative ionization mode to detect amino acids, acylcarnitines, acylglycines and organic acids as markers in filter-paper urine samples. We studied the fragmentation of all the molecules selected and established analytical methods. These methods were adapted to filter-paper urine samples and they were applied to a group of pathological samples.

The analysis of amino acids and acylcarnitines in positive mode and organic acids and acylglycines in negative mode takes 2,6 and 2,5 minutes respectively.

The sensitivity of MS/MS allows the analysis of the selected metabolites in a small, low concentration biological sample such as dried filter-paper urine.

Key words: Newborn screening, inborn errors of metabolism, Tandem Mass Spectrometry, dried urine samples

INTRODUCCIÓN

El objetivo del cribado neonatal es la detección con precisión de errores congénitos del metabolismo (ECM) en los recién nacidos a una edad en la que la aplicación de un programa terapéutico pueda evitar el daño o mejorar su evolución *(1)*. Muchos ECM se caracterizan por la acumulación de metabolitos específicos en los fluidos biológicos y muchas de estas alteraciones se pueden identificar por la excreción de metabolitos patológicos en la orina, normalmente no detectados en individuos sanos, o por excreciones masivas de metabolitos que habitualmente están presentes en la orina sólo en pequeñas cantidades. Los ácidos orgánicos, en particular, son detectados principalmente en la orina debido a la rápida excreción renal de estos ácidos solubles en agua; mientras que la concentración de estos marcadores en sangre es bastante baja.

Desde hace cerca de 50 años *(2)* existen métodos de cribado para la determinación de algunos de estos metabolitos. Las técnicas de espectrometría de masas para el diagnóstico de enfermedades metabólicas fueron desarrolladas a principios de los años setenta *(3)* y han adquirido un amplio y rápido desarrollo *(4,5)*. Sin embargo, estos métodos estaban basados en separaciones cromatográficas con procesos de preparación de muestras muy laboriosos y con tiempos de análisis generalmente superiores a 30 minutos *(6)*. El desarrollo de nuevas técnicas de ionización como el bombardeo con átomos rápidos (FAB) y posteriormente del *electrospray* (ESI) en los ochenta significó un gran adelanto para la espectrometría de masas en aplicaciones biomédicas, ya que permitió el análisis directo de moléculas de origen biológico *(7,8)*.

Laboratorio de Metabolopatías, Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela

*Este trabajo corresponde a una comunicación científica presentada y premiada en el XXIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, celebrado en Cádiz el 20,21 y 22 de octubre de 2004

Abreviaturas no estandarizadas
ECM: errores congénitos del metabolismo
ESI-MS/MS: espectrometría de masas en tándem con ionización por *electrospray*
GC/MS: cromatografía de gas y espectrometría de masas

La metodología básica para el cribado neonatal de ECM por espectrometría de masas en tándem, fue desarrollada por Millington et al. *(9*), Chace et al. *(10)* y por Rashed et al. *(11)*. El método está basado en la determinación de la concentración de aminoácidos y acilcarnitinas por espectrometría de masas en tándem con ionización por *electrospray* (ESI-MS/MS) *(12,13,14)*.

Los ECM de la β-oxidación mitocondrial y de algunos ácidos orgánicos pueden ser diagnosticados usando los perfiles de acilcarnitinas generados por ESI-MS/MS sin la necesidad de una separación cromatográfica. Además, los perfiles de aminoácidos pueden ser también generados modificando simplemente las propiedades del barrido del espectrómetro de masas. Con esta técnica, estos perfiles pueden ser generados en aproximadamente 2 minutos. Un importante número de laboratorios en el mundo están adoptando esta tecnología para el cribado neonatal de muestras de sangre impregnadas en papel de filtro con la que se pueden detectar más de 30 ECM *(13,15,16)*.

Sin embargo, algunos ECM no provocan perfiles alterados ni en acilcarnitinas ni en aminoácidos en sangre y surge la necesidad de realizar análisis de orina en aquellos pacientes con sospecha diagnóstica *(17)*. El empleo de cromatografía de gas acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) en orina líquida es la clave para el diagnóstico clínico de las Acidurias orgánicas, pero la orina líquida no es apropiada para un programa de cribado neonatal. Con este fin han sido desarrolladas técnicas aplicables a orina impregnada en papel de filtro desecada *(18,19)*. Sin embargo, la GC/MS no es adecuada para su aplicación a un programa de cribado neonatal, siéndolo en cambio la ESI-MS/MS.

La ESI-MS/MS es una técnica muy poderosa que permite detectar compuestos específicos en muestras complejas, evitando en muchos casos la necesidad de una separación cromatográfica previa. La aplicación de esta técnica al análisis de muestras de orina, iniciada por Pitt et al. *(20)*, permite completar y ampliar la información obtenida mediante el análisis de acilcarnitinas y aminoácidos en sangre por MS/MS, que se lleva realizando en el Programa Gallego de Detección Precoz de Enfermedades Metabólicas desde el año 2000 *(21)*.

El estudio conjunto de los aminoácidos *(22,23)* y las acilcarnitinas *(24)* en ionización positiva, y las acilglicinas *(25,26)* y los ácidos orgánicos en ionización negativa permite obtener una elevada cantidad de información en un único análisis de orina. Si esto se realiza además en muestras de orina impregnada en papel, en el contexto de un programa de cribado neonatal, se acelera el establecimiento del diagnóstico y ello conlleva notables beneficios sociales y de ahorro de gasto sanitario.

El presente trabajo describe el desarrollo de métodos de ESI-MS/MS que permiten realizar análisis de los grupos de metabolitos seleccionados, sobre muestras de orina impregnadas en papel de filtro, de forma rápida y completa y su aplicación al diagnóstico de un amplio rango de ECM dentro de un programa de cribado neonatal.

Se estudió la fragmentación de todas las moléculas de interés biológico seleccionadas en ionización positiva y negativa respectivamente, mediante la infusión de los productos comerciales puros, por ESI-MS/MS. Se monitorizaron los fragmentos más abundantes con la optimización de sus parámetros de MS/MS, proponiéndose las transiciones más sensibles y específicas para cada molécula. Se establecieron métodos de análisis para todas las moléculas y la adaptación de estos métodos al análisis de muestras de orina impregnadas en papel de filtro. Finalmente, se hizo un estudio de las posibles interferencias isobáricas e isoméricas y se evaluó su utilidad mediante el análisis de un grupo de orinas patológicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos, material y equipos

Reactivos y material

La fase móvil empleada estuvo compuesta de acetonitrilo (Merck, ref. 30): agua (1:1).

Para la butilacion de acilcarnitinas y aminoacidos se empleó butanol clorhidrico 3N (Regis, ref. 201007).

Para la preparación de reactivos se empleó agua obtenida con un sistema Milli-Q (Millipore).

Las moléculas seleccionadas están recogidas en las tablas I y II *(20,22,25,27,28,29)*, en función de la polaridad en la que han sido estudiadas, y fueron suministradas por Sigma-Aldrich-Fluka, Merck-Calbiochem o ICN.

De todos los metabolitos estudiados se prepararon, en agua, disoluciones madre de concentraciones 10 o 20 mM que fueron congeladas a –20 ºC. Para los estudios de infusión se prepararon a partir de ellas, diariamente, disoluciones 10 µM en fase móvil. Estas disoluciones fueron mantenidas a 4 ºC en caso de ser necesarias para estudios posteriores.

Se prepararon disoluciones de calibración con la mezcla de todos los metabolitos disponibles, a seis concentraciones, en una matriz que simula la composición de la orina. Esta matriz contiene 30 mmol/L de urea, 11,4 mmol/L de cloruro sódico, 7,8 mmol/L de cloruro potásico, 1,5 mmol/L de ortofosfato dihidrógeno potásico y 7,6 mg/L de albúmina de suero bovino (*20*).

Se prepararon dos muestras de orina, de origen humano, que fueron diluidas a una concentración de creatinina 0,5 mmol/L. A una de ellas se le añadieron cantidades elevadas de los metabolitos para controlar la recuperación del método y para ser utilizadas como controles internos.

Se emplearon placas de microtitulación de 96 pocillos (Greiner bio-one ref. 655101 y 780270) para la preparación de las muestras de orina.

Equipos

La espectrometría de masas en tándem se llevó a cabo con un equipo de triple cuadrupolo ESI-MS/MS API 2000 (Sciex Applied Biosystems, Toronto, Canadá) equipado con una bomba de jeringa integrada para realizar infusiones individuales y una fuente de Turboión Spray. Como gas de colisión y gas cortina se empleó nitrógeno.

Las muestras fueron infundidas acoplando un equipo de HPLC compuesto de un muestreador automático para microplacas y una bomba modelo Series 200 (Perkin-Elmer).

Para el corte de las muestras de orina impregnada en papel y su introducción en las placas de microtitulación se empleó una taladradora automática BSD 700 (BSD tech. Brisbanne, Australia).

Para la extracción de la orina del papel de filtro se empleó un vórtex de sobremesa para microplacas (SBS).

La evaporación a sequedad de las muestras se realizó en un evaporador Micro-DS96 (Porvair Sciences) con nitrógeno.

Patrones internos marcados isotópicamente

Para la cuantificación de los metabolitos estudiados en ionización positiva se usaron:

Química Clínica 2006; 25 (2) 64-74

Tabla I. Moléculas de interés biológico estudiadas para el diagnóstico de errores congénitos del metabolismo, en ionización positiva

Nombre	PM	Interés biológico
Glicina	75	Hiperglicinemia no cetósica, acidemias orgánicas
Alanina	89	Hiperlactacidemia, citopatías mitocondriales
Ác. 3-Aminoisobutírico	103	Neoplasia, excesiva ruptura muscular, β–Alaninemia
Serina	105	Deficiencia vitamina B6
Creatinina	113	Marcador funcionamento renal
Prolina	115	Hiperprolinemia (tipo I e II)
Ác. Guanidinoacético	117	Deficiencia de Guanidoacetato Metiltransferasa (GAMT)
Valina	117	Jarabe de Arce (MSUD)
Treonina	119	Disfunción Renal
Creatina	131	GAMT
Allo-isoleucina	131	MSUD, Aciduria Etilmalónica
Hidroxiprolina	131	Hiperprolinemia (tipo I e II), Hidroxiprolinemia
Isoleucina	131	MSUD
Leucina	131	MSUD
Ornitina	132	Defectos del ciclo de la urea, Cistinuria
Ác. DL-Aspártico	133	Tratamiento con asparaginasa (leucemia), aminoaciduria dicarboxílica
Ác. DL-Glutámico	147	Defectos del ciclo de la urea
Metionina	149	Homocistinuria, Hipermetioninemia, Tirosinemia tipo I
Histidina	155	Histidinemia, Enfermedad de Hartnup
Ác. 2-Aminoadípico	161	Aciduria 2-aminoadípica y 2-Cetoadípica
Carnitina libre	162	Deficiencia primaria de carnitina
Fenilalanina	165	Fenilcetonuria, Hiperfenilalaninemia
Ác. δ-Aminolevulínico	168	Tirosinemia tipo I, porfirias
Glicil-prolina	172	Iminodipeptiduria, Def. de Prolidasa
Arginina	174	Defectos del ciclo de la urea, Cistinuria, Def. de Creatina
Citrulina	175	Defectos del ciclo de la urea, Enf. de Hartnup
Tirosina	181	Tirosinemia tipo I y II, Fenilcetonuria clásica
Homocitrulina	189	Defectos del ciclo de la urea, Sacaropinuria
Acetilcarnitina	204	Tratamiento con carnitina
Triptófano	204	Síndrome Hartnup, Triptofanuria
Propionilcarnitina	218	Aciduria Propiónica (PA) y Metilmalónica (MMA)
Butirilcarnitina	232	Deficiencia de la Acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta (SCAD)
Cistina	240	Cistinuria
3-Metilcrotonilcarnitina	244	β-cetotiolasa
Isovalerilcarnitina	246	Aciduria Isovalerica (IVA), MADD
Malonilcarnitina	248	Aciduria Malónica
Hexanoilcarnitina	260	MCAD, MADD
3-OH-isovalerilcarnitina	262	Aciduria 3-Hidroxi-3-metilglutárica, 3-Metilcrotonilglicinuria (MCC)
Homocistina	268	Homocistinuria
Glutarilcarnitina	276	Aciduria Glutárica tipo I
Octanoilcarnitina	288	MCAD, MADD
Decanoilcarnitina	316	MCAD, MADD
Miristoilcarnitina	372	CPT II, VLCAD
Palmitoilcarnitina	400	CPT II, VLCAD
3-Metilglutarilcarnitina	402	Def. HMG-CoA liasa
Ác. Argininsuccínico	426	Aciduria Argininsuccínica

MADD: Deficiencia múltiple de Acil-CoA deshidrogenasas
MCAD: Deficiencia de Acil-CoA deshidrogenasa de cadena media
VLCAD: Deficiencia de Acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga
CPT II: Deficiencia de carnitina palmitoil transferasa

Mezcla de isótopos estables de Cambridge Isotope Laboratorios (CIL, Andover, MA, USA) conteniendo: Set A de Aminoácidos ($^{15}N_2{}^{13}C$-Glicina, $^2H_4$-Alanina, $^2H_8$-Valina, $^2H_3$-Leucina, $^2H_3$-Metionina, $^{13}C_6$-Tirosina, $^2H_3$-Aspartato, $^2H_3$-Glutamato, $^2H_2$-Ornitina.2HCl, $^2H_2$-Citrulina, $^2H_4$, ^{13}C-Arginina.HCl, $^2H_5$-Fenilalanina) y Set B de Acilcarnitinas ($^2H_9$-Carnitina, $^2H_3$-Acetilcarnitina, $^2H_3$-Propionilcarnitina, $^2H_3$-Butirilcarnitina, $^2H_9$-Isovalerilcarnitina, $^2H_3$-Octanoilcarnitina, $^2H_9$-Miristoilcarnitina, $^2H_3$-Palmitoilcarnitina).

También se incluyó $^2H_4$-Cistina y $^2H_8$-Homocistina (Cambridge Isotope Laboratories) para cuantificar los correspondientes aminoácidos y $^2H_3$-creatinina (CDN Isotopes).

Para la cuantificación de los metabolitos en ionización negativa se emplearon:

$^2H_3$-Hexanoilglicina, $^2H_3$-Propionilglicina (Dr. Herman J. ten Brink, VU Medical Center, Amsterdam), y los siguientes ácidos orgánicos: $^2H_3$-3-Hidroxi-3-metilglutárico, $^2H_3$-3-Hidroxiisovalérico y $^2H_3$-Acetilaspartico de Herman J. ten Brink y $^{13}C_6$-Adípico, $^2H_3$-Metilmalónico y 1,3 $^{15}N_2$-Úrico de CIL lab.

Tabla II. Moléculas de interés biológico estudiadas para el diagnóstico de errores congénitos del metabolismo en ionización negativa

Nombre	PM	Interés biológico
Ác. Glicólico	76	Hiperoxaluria I, Aciduria Glicólica
Ác. Láctico	90	Acidosis Láctica, déficit múltiple de carboxilasas
Ác. 3-Hidroxipropiónico	90	Aciduria Propiónica (PA), déficit múltiple de carboxilasas
Ác. 4-Hidroxibutírico	104	Aciduria 4-Hidroxibutírica
Ác. Fumárico	116	Aciduria Fumárica, citopatías mitocondriales
Ác. Maleico	116	
Ác. 3-Hidroxiisovalérico	118	Aciduria Isovalérica (IVA), HMG, MADD, MCC
Ác. 2-Hidroxiisovalérico	118	Jarabe de arce (MSUD)
Ác. Succínico	118	Citopatías mitocondriales, deficiencia de fumarasa, aciduria malónica
Ác. Metilmalónico	118	Aciduria Metilmalónica (MMA), Aciduria Malónica
Ác. Glicérico	125	Hiperoxaluria II, Aciduria Glicérica
Ác. 3-Hidroxibutírico	126	Cetosis, Def. 3-Oxotiolasa
Ác. Piroglutámico	129	Def. Oxoprolinasa, Hawkinsinuria, Def.de Glutatione Sintasa
Propionilglicina	131	MMA, PA
Ác. Glutárico	132	Aciduria Glutárica tipo I, MADD
Ác. Etilmalónico	132	SCAD, MADD
Ác. Metilsuccínico	132	SCAD
Adenina	135	Def. de Adenina Fosforibosiltransferasa
Fosfoetanolamina	141	Hipofosfatasa
Ác. 3-Metilglutacónico	144	HMG, Glicogenosis I, Aciduria 3-Metilglutacónica
Butirilglicina	145	PA, MMA, SCAD, MADD
Ác. 2-Metilglutárico	146	HMG
Ác. Adípico	146	MCAD, MADD, cetosis
Ác. 3-Hidroxiglutárico	148	Aciduria Glutárica tipo I, SCHAD
Ác. Mevalónico	148	Aciduria Mevalónica
Ác. 4-Hidroxifenilacético	152	Tirosinemias, Fenilcetonuria (PKU), Hawkinsinuria
Xantina	152	Defectos del metabolismo de las purinas
Ác. Orótico	156	Defectos del ciclo de la urea, síndrome de HHH, Aciduria Orótica
3-Mecrotonilglicina	157	Glut I, MADD, MCC, HMG
Succinilacetona	158	Tirosinemia tipo I
Isovalerilglicina	159	MADD, IVA
Ác. 3-Hidroxi-3-metilglutárico	162	IVA, HMG
Ác. Homogentísico	168	Alcaptonuria
Hexanoilglicina	173	MCAD, MADD, SCAD
Ác. Subérico	174	MCAD, LCHAD, MADD, cetosis
Ác. N-Acetilaspártico	175	Enfermedad de Canavan
Ác. Homovanílico	182	Neuroblastoma
Ác. 4-Hidroxifenilláctico	182	Acidosis Láctica, Tirosinemias, PKU, Hawkinsinuria, intolerancia a la fructosa
Ác. Úrico	190	Defectos del metabolismo de las purinas
Ác. 2-Hidroxiglutárico	192	MADD, aciduria malónica, aciduria 2-Hidroxiglutárica
Sulfocisteina	201	Deficiencia de sulfito oxidasa
Guanosina	283	metabolismo purinas
Suberilglicina	231	MCAD, MADD
3-Fenilpropionilglicina	207	MCAD
Ác. Siálico	309	Sialuria, desórdenes del almacenamiento siálico

HMG: Deficiencia de HMG-CoA liasa
SCAD: Deficiencia de la deshidrogenasa Acil-CoA de cadena corta
MCAD: Deficiencia de la deshidrogenasa Acil-CoA de cadena media
HHH síndrome: Hiperammonemia, Hiperornitinemia, Homocitrulinuria
LCHAD: Deficiencia de la deshidrogenasa Acil-CoA de cadena larga
SCHAD: Deficiencia de la deshidrogenasa Hidroxiacil-CoA de cadena corta
MCC: 3-Metilcrotonilglicinuria
MADD: Deficiencia múltiple de Acil-CoA deshidrogenasas

Estudios moleculares de fragmentación en MS/MS

El estudio de las magnitudes de MS/MS se llevó a cabo mediante la infusión de disoluciones individuales de los compuestos puros (49 en ionización positiva y 38 en ionización negativa) de concentración 10 µM a un flujo de 10 µL/min. Estas magnitudes, una vez optimizadas de forma específica para cada instrumento, permiten la detección por MS/MS con la máxima sensibilidad y selectividad. Las transiciones para cada una de las moléculas estudiadas fueron seleccionadas intentando evitar al máximo las posibles interferencias isobáricas e isoméricas entre los diferentes compuestos. Estas transiciones aparecen recogidas en las tablas III y IV.

Química Clínica 2006; 25 (2) 64-74

Tabla III. Transiciones seleccionadas y fragmentos alternativos en ionización positiva

Compuesto	Transición (m/z)	Iones fragmento alternativos (m/z)
Creatinina	114>44	86
$^{2}H_{3}$-Creatinina	117>47	43
Glicina	132>76	57
^{15}N, 2-^{13}C-Glicina	134>78	
Alanina	146>44	90, 57
$^{2}H_{4}$-Alanina	150>48	
Histidina	156>110	95, 83
Ác. 3-Aminoisobutírico	160>86	104, 57
Serina	162>60	106, 88, 70, 57
Prolina	172>70	116, 57
Ác. Guanidinoacético	174>101	157, 132, 129, 118, 76, 73
Valina	174>72	
Treonina	176>74	158, 120, 102, 84, 56
$^{2}H_{8}$-Valina	182>80	
Ác. δ-Aminolevulínico	188>114	132, 86
Leucina	188>43	86, 41, 44
Hidroxiprolina	188>68	86, 57, 41
Allo-isoleucina	188>69	86, 69
Isoleucina	188>69	86, 41
Creatina	188>90	146, 132, 114, 57, 44
Ornitina	189>70	116
$^{2}H_{3}$-Ornitina.2HCl	191>72	
$^{2}H_{3}$-Leucina	191>89	
Metionina	206>104	189, 133, 102, 74, 61
$^{2}H_{3}$-Metionina	209>107	
Carnitina libre	218>103	85, 60, 57, 43, 41
Fenilalanina	222>120	103
$^{2}H_{9}$-Carnitina	227>103	
$^{2}H_{5}$-Fenilalanina	227>125	
$^{2}H_{3}$-Propionilcarnitina	227>85	
Glicil-prolina	229>70	127, 116
Arginina	231>70	116, 112, 60, 43
Citrulina	232>113	172, 170, 159, 142
$^{2}H_{2}$-Citrulina	234>115	
$^{2}H_{4}$, ^{13}C-Arginina.HCl	236>75	
Tirosina	238>136	179, 165, 147, 123
$^{13}C_{6}$-Tirosina	244>142	
Homocitrulina	246>127	229, 203, 186, 173, 110, 100, 84
Ác. DL-Aspártico	246>144	190, 172, 130, 88
$^{2}H_{3}$-Aspartato	249>147	
Ác. DL-Glutámico	260>84	186, 158, 130, 102, 57
Acetilcarnitina	260>85	200, 145
Triptofano	261>244	202, 188, 170, 159, 144
$^{2}H_{3}$-Acetilcarnitina	263>85	
$^{2}H_{3}$-Glutamato	263>87	
Propionilcarnitina	274>85	159, 141
Ác. 2-Aminoadípico	274>98	172, 144, 116, 70
Butirilcarnitina	288>85	200, 173, 141
$^{2}H_{3}$-Butirilcarnitina	291>85	
3-Metilcrotonilcarnitina*	300>85	
Isovalerilcarnitina	302>85	200, 187, 141
$^{2}H_{9}$-Isovalerilcarnitina	311>85	
Hexanoilcarnitina	316>85	201, 141, 99, 71
3-OH-isovalerilcarnitina*	318>85	
Homocistina	325>190	134, 118, 88
$^{2}H_{8}$-Homocistina	333>194	
Octanoilcarnitina	344>85	200, 127
$^{2}H_{3}$-Octanoilcarnitina	347>85	
Cistina	353>130	208, 176, 120, 74
$^{2}H_{4}$-Cistina	357>130	
Malonilcarnitina*	360>85	
Decanoilcarnitina	372>85	
Glutarilcarnitina*	388>85	
3-Metilglutarilcarnitina*	402>85	
Miristoilcarnitina*	428>85	
$^{2}H_{9}$-Miristoilcarnitina	437>85	
Palmitoilcarnitina*	456>85	
Ác. Arginosuccínico	459>144	172, 88
$^{2}H_{3}$-Palmitoilcarnitina	459>85	

*compuestos no disponibles, sus fragmentaciones fueron establecidas en función de su estructura.

Muestras de orina

Para el establecimiento de la utilidad diagnóstica de los métodos desarrollados fueron analizadas muestras de orina neonatales correspondientes a pacientes detectados dentro del Programa Gallego de Cribado Neonatal que fueron recogidas de recién nacidos al tercer día de vida sobre papel SS 903 (Schleicher & Schuell). Las muestras llegan por correo ordinario al laboratorio y se conservan en nevera mientras están en análisis para posteriormente ser almacenadas a –20 ºC durante dos años.

También fueron analizadas muestras de orina en papel de pacientes diagnosticados previamente, muestras de sospecha diagnóstica, y muestras provenientes de otras unidades de diagnóstico. Todas ellas fueron recogidas igualmente sobre papel SS 903.

Preparación de las muestras de orina

Cuatro discos de ¼ de pulgada de cada muestra se cortan en una placa de microtitulación de un volumen máximo de 2 mL, empleando la taladradora automática, y son eluidos con 300 µL de agua en un vórtex de sobremesa durante treinta minutos. Del mismo eluato obtenido de las muestras en papel, se preparan dos placas.

Para ionización positiva se toman 10 µL del eluato en una microplaca, de un volumen máximo 300 µL, en la que previamente se han añadido y evaporado a sequedad los patrones internos correspondientes en cada pocillo. Después de ser evaporadas, las muestras son derivatizadas añadiendo 60 µL de butanol clorhídrico y calentadas durante 20 minutos a 65ºC. Esto provoca la butilación del grupo ácido de los aminoácidos y las acilcarnitinas, bloqueándolo y favoreciendo así su ionización positiva.

Para trabajar en ionización negativa se toman otros 10 µL del mismo eluato en otra microplaca en la que ya se han añadido previamente los patrones internos correspondientes. Se evaporan a sequedad y posteriormente las muestras son únicamente diluidas con la fase móvil, homogeneizadas e inyectadas directamente en el sistema.

Espectrometría de Masas en Tándem: procedimientos

Para la medida de los metabolitos se trabaja en dilución isotópica. Este método de patrón interno permite corregir las variaciones en la intensidad de la señal debido a la composición de la fase móvil, o de la matriz compleja en la cual las moléculas son analizadas.

Tabla IV. Transiciones seleccionadas, fragmentos alternativos y valores de optimización para la transición seleccionada en ionización negativa

Compuesto	Transición (m/z)	Iones fragmento alternativos (m/z)
Ác. Glicólico	75>47	45
Ác. Láctico	89>43	45
Ác. 3-OH-Propiónico	89>59	41, 43, 45
Ác. 3-Hidroxibutírico	103>59	
Ác. 4-Hidroxibutírico	103>57	
Ác. Glicérico	105>75	59, 57
Ác. Fumárico	115>71	97
Ác. Maleico	115>71	32, 27
Ác. 3-Hidroxiisovalérico	117>59	
Ác. 2-Hidroxiisovalérico	117>71	45
Ác. Succínico	117>73	99, 55
Ác. Metilmalónico	117>73	
$^{2}H_{3}$-Metilmalónico	120>76	
$^{2}H_{3}$-3-Hidroxiisovalérico	123>59	
Ác. Piroglutámico	128>84	
Propionilglicina	130>74	86
Ác. Glutárico	131>87	113, 69, 59, 41
Ác. Etilmalónico	131>87	113, 69, 41
Ác. Metilsuccínico	131>87	113, 69, 59,
$^{2}H_{3}$-Propionilglicina	133>74	89
Adenina	134>107	92
Fosfoetanolamina	140>79	–
Ác. 3-Metilglutacónico	143>99	
Butirilglicina	144>74	100
Ác. 2-cetoglutárico	145>101	57, 73
Ác. 2- Metilglutárico	145>101	
Ác. Adípico	145>83	83, 81
Ác. Mevalónico	147>59	57
Ác. 3-Hidroxiglutárico	147>85	
Ác. 4-Hidroxifenilacético	151>107	121
Xantina	151>108	80, 42
$^{13}C_{6}$-Adípico	151>88	133, 106, 86
Ác. Orótico	155>111	59
3-Mecrotonilglicina	156>74	
Succinilacetona	157>99	115
Isovalerilglicina	158>74	115
Ác. 3-Hidroxi-3-metilglutárico	161>99	101, 59, 57
$^{2}H_{3}$-3-Hidroxi-3-metilglutárico	164>102	104, 60
Ác. Homogentísico	167>123	108
Ác. Úrico	167>124	96, 69, 42
1,3 $^{15}N_{2}$-Úrico	169>125	97, 70, 43
Hexanoilglicina	172>74	128
Ác. Subérico	173>111	155, 129, 83
Ác. N-Acetilaspártico	174>88	130, 71, 58
$^{2}H_{3}$-Hexanoilglicina	175>74	131
$^{2}H_{3}$-Acetilaspartico	177>89	133, 115, 61
Ác. Homovanílico	181>137	151, 122
Ác. 4-Hidroxifenilláctico	181>163	135,119, 73
Sulfocisteína	200>136	120, 113
3-Fenilpropionilglicina	206>74	
Suberilglicina	230>74	111
Guanosina	282>150	133
Ác. Siálico	308>87	170, 119, 98

Condiciones instrumentales

La fuente de Turboión spray del espectrómetro de masas se calienta a 200 ºC empleando como gas auxiliar Nitrógeno. En ella se inyectan 30 y 40 µL de las muestras preparadas que son infundidas en el espectrómetro de masas con un flujo de 50 y 60 µL/min en ionización positiva y negativa respectivamente. El tiempo total de análisis por muestra es 2,6 y 2,5 minutos respectivamente.

Métodos de medida

Los datos de ionización positiva y negativa fueron adquiridos en experimentos distintos. Para la medida de los Aminoácidos y de los Ácidos Orgánicos, se emplea como técnica de detección *multiple reaction monitoring* (MRM). Esto permite la optimización de los parámetros experimentales para cada compuesto individualmente, proporcionando sensibilidad y selectividad óptimas, ya que cada precursor e ión producto tiene sus propios parámetros individuales.

Para la medida de las Acilcarnitinas y de las Acilglicinas, que son compuestos que presentan una fragmentación común entre ellos, se emplea la técnica de *precursor ion scan* (PC). Nos permite detectar, dentro de un intervalo de masa establecido, todos los compuestos que presentan un fragmento común que en el caso de las acilcarnitinas es de m/z 85 y en el de las acilglicinas de m/z 74.

Determinación de creatinina

Se puso a punto la determinación de la creatinina por MS/MS utilizando $^{2}H_{3}$-creatinina como patrón interno. El MRM específico para ella y su patrón interno se incluyeron en el experimento de ionización positiva (tabla III).

Calibrado y cálculos de concentración

Para la cuantificación de los metabolitos se trabaja en dilución isotópica. Además de este método de cuantificación, se determinan cada día la linealidad y pendiente de la curva de calibración para cada metabolito analizando las disoluciones de calibración.

En cada tanda, se miden por duplicado las disoluciones de calibración preparadas a seis concentraciones. Estos calibradores son preparados en una matriz que simula la composición de las muestras de orina para así compensar los efectos de la supresión en la ionización que ocurren en presencia de sales.

Además, en cada experimento las muestras de orina humanas son analizadas por duplicado, a las que se le han añadido cantidades elevadas de los metabolitos, con el fin de controlar la recuperación y tener información que permita ser utilizada para el control interno.

Los datos de las muestras son tratados mediante el software Chemoview 1.2 (Applied Biosystems/MSD SCIEX). El software calcula la intensidad de cada uno de los metabolitos y la divide por la señal del patrón interno marcado idéntico, o en su ausencia aquel con estructura, fragmentación o masa molecular más próxima y propiedades químicas similares. Estos datos son exportados a una hoja Excel (Microsoft) para cálculos posteriores.

Estos datos son extrapolados sobre las rectas de calibrado, obteniéndose así la concentración en las muestras de orina. Una vez obtenidas las concentraciones en µmol/L, éstas son referidas al valor de creatinina del eluato de la muestra medida en el análisis de ionización positiva.

Química Clínica 2006; 25 (2) 64-74

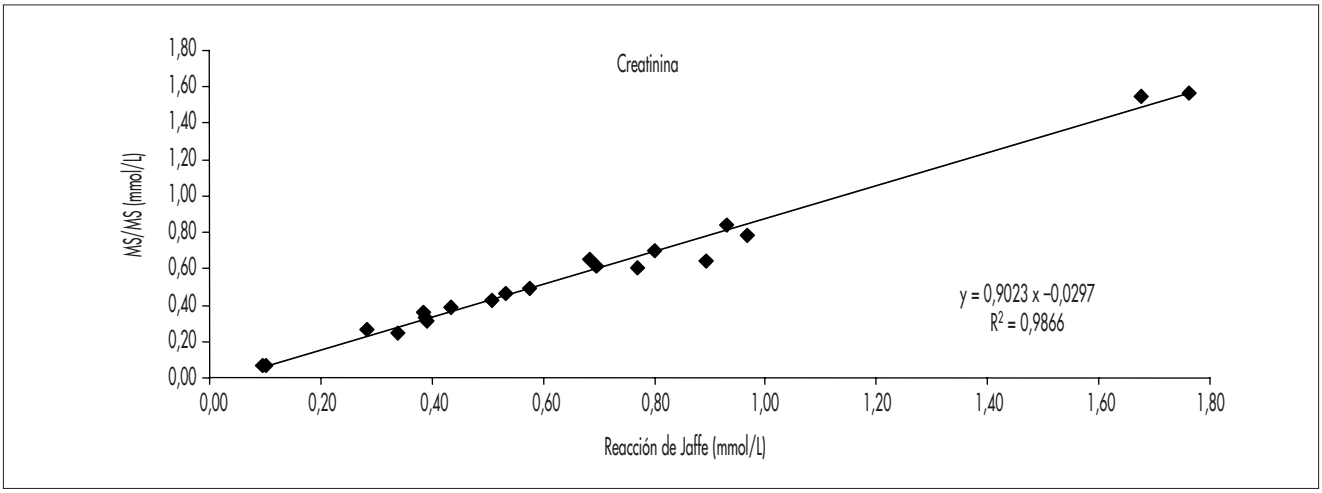

Figura 1

En los casos en que no fue posible trazar rectas de calibrado, los valores de concentración fueron calculados de forma directa por el software de procesado, considerando que su respuesta es idéntica a la de su patrón interno correspondiente.

RESULTADOS

Se comprobó la concordancia de la determinación de creatinina respecto al método clásico de análisis basado en la reacción de Jaffé realizado en un equipo Cobas Mira. Para ello se analizaron por

Tabla V. Rectas de calibrado y recuperaciones obtenidas para los metabolitos estudiados en ionización positiva

Metabolito	Pendiente	Intersección	R2	Recuperación (%)
Creatinina	0,0087	0,0162	0,9987	95
Creatina	0,0547	–0,0574	0,9995	118
Ac. Guanidoacético	0,0329	0,0216	0,9969	139
Fenilalanina	0,0643	–0,0971	0,9960	88
Tirosina	0,0379	–0,0226	0,9974	102
Ác. δ-Aminolevulínico	0,0601	0,1182	0,9981	101
Leucina	0,0208	0,1332	0,9957	103
Valina	0,0477	0,3630	0,9988	114
Prolina	0,1853	–0,0289	0,9999	97
Glicina	0,0084	–0,0713	0,9972	113
Metionina	0,0440	0,3810	0,9956	103
Citrulina	0,0466	–0,0134	0,9993	102
Alanina	0,0346	0,0072	0,9996	112
Cistina	0,0108	0,0033	0,9995	93
Arginina	0,0414	–0,1479	0,9840	94
Ornitina	0,0604	–0,0942	0,9976	105
Homocitrulina	0,0504	–0,0258	0,9984	104
Homocistina	0,0128	–0,0011	0,9986	97
Glicil-Prolina	0,0081	–0,0057	0,9993	105
Serina	0,0106	0,1518	0,9829	112
Histidina	0,0458	0,0062	0,9991	92
Triptófano	0,0322	–0,1335	0,9905	86
Ác. Glutámico	0,0878	–0,1024	0,9949	127
Ác. Aspártico	0,0304	0,0471	0,9995	105
Ác. 3-Aminoisobutírico	0,0671	–0,0768	0,9983	110
Ác. 2-Aminoadípico	0,0293	0,0050	0,9997	98
Carnitina libre	0,3379	0,7906	0,9928	121
Acetilcarnitina	0,3874	0,1469	0,9967	108
Propionilcarnitina	2,9264	0,0629	0,9809	103
Butirilcarnitina	2,1845	0,2375	0,9928	127
Isovalerilcarnitina	2,2510	0,0141	0,9957	99
Hexanoilcarnitina	2,3340	0,3023	0,9912	103
Octanoilcarnitina	2,6476	0,2306	0,9913	95
Decanoilcarnitina	3,0610	0,0326	0,9959	79

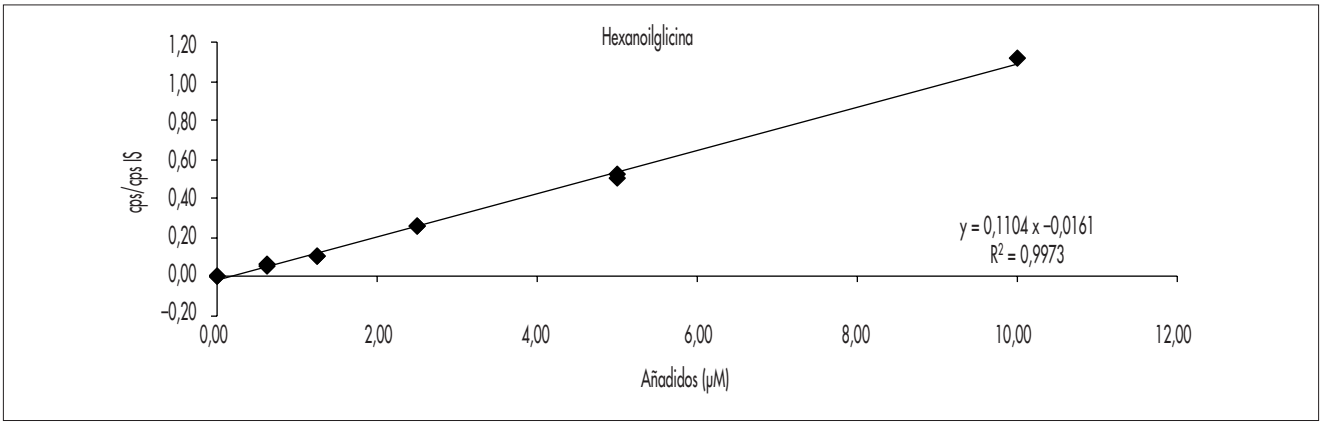

Figura 2

duplicado por ambos métodos 20 muestras de orina impregnada en papel que cubrieran todo el intervalo de interés. Los resultados aparecen recogidos en la figura 1. De ellos se deduce una recuperación en la determinación de la creatinina de en torno al 90 % y una buena correlación de los resultados obtenidos por ambos métodos.

En las tablas V y VI aparecen los datos de todas las rectas de calibrado de los metabolitos, establecidas para cada experimento. Asimismo, en la figura 2 se ve un ejemplo de una de estas rectas de calibrado para el caso de la hexanoilglicina. La mayoría de los coeficientes de correlación de los metabolitos

Tabla VI. Rectas de calibrado y recuperaciones obtenidas para los metabolitos estudiados en ionización negativa

	Pendiente	**Intersección**	**R^2**	**Recuperación (%)**
Ác. Glicólico	0,0006	0,0050	0,9936	131
Ác. Glicérico	0,0114	–0,0141	0,9993	107
Ác. Láctico	0,0040	0,1053	0,9946	152
Ác. Fumárico	0,0065	0,0530	0,9960	138
Ác. 2-Hidroxisovalérico	0,0434	0,0074	0,9987	120
Ác. 3-Hidroxibutírico	0,0164	0,0284	0,9927	136
Ác. 3-Hidroxiisovalérico	0,1401	–0,6310	0,9926	105
Ác. 3-Hidroxi-3-metilglutárico	0,0202	–0,0717	0,9979	100
Ác. p-Hidroxifenilláctico	0,3012	–1,0561	0,9951	100
Ác. p-Hidroxifenilacético	0,0079	–0,0150	0,9933	106
Ác. Glutárico	0,0324	–0,1650	0,9959	103
Ác. 2-Hidroxiglutárico	0,0075	–0,0397	0,9917	196
Ác. 2-Metilglutárico	0,0199	–0,1517	0,9916	111
Ác. Metilmalónico	0,0611	–0,0917	0,9939	116
Ác. 3-Hidroxipropiónico	0,0044	0,0028	0,9980	100
Ác. Adípico	0,0128	–0,0523	0,9973	101
Ác. Subérico	0,0430	–0,1962	0,9966	112
Ác. Mevalónico	0,0199	0,0362	0,9947	97
Ác. Homogentísico	0,6631	–1,5775	0,9970	88
Ác. N-Acetilaspártico	0,0271	–0,0948	0,9975	106
Ác. Homovanílico	0,0286	–0,0736	0,9937	198
Ác. Siálico	0,0745	–0,4420	0,9916	91
Ác. Úrico	0,0179	–0,0499	0,9907	99
Ác. Orótico	0,1551	–0,4617	0,9956	97
Adenina	0,0379	0,1714	0,9971	81
Guanosina	0,0702	–0,1963	0,9953	88
Fosfoetanolamina	0,0090	–0,0268	0,9945	100
Sulfocisteina	0,0210	–0,0039	0,9965	91
Propionilglicina	0,0425	0,0046	0,9975	80
Butirilglicina	0,0520	0,0640	0,9988	83
Valerilglicina	0,0683	–0,1368	0,9995	94
3-Metilcrotonilglicina	0,0567	0,0079	0,9957	96
Hexanoilglicina	0,0956	–0,2670	0,9989	99
Suberilglicina	0,0059	0,0144	0,9961	96
Succinilacetona	0,1131	0,1565	0,9945	78
3-Fenilpropionilglicina	0,0701	0,3207	0,9927	95
Ác. 3-Hidroxiglutárico	0,0132	–0,0248	0,9989	100
Ác. 3-Metilglutacónico	0,0632	–0,1660	0,9977	100

Química Clínica 2006; 25 (2) 64-74

Tabla VII. Interferencias Isobáricas encontradas en ionización positiva

Molécula	Transición (m/z)
Ác. Guanidinoacético	174>101
Valina	174>72
Ác. δ-Aminolevulínico	188>114
Creatina	188>90
Allo-isoleucina	188>69
Isoleucina	188>69
Hidroxiprolina	188>68
Leucina	188>43
Homocitrulina	246>127
Ac. DL-Aspártico	246>144
Ac. DL-Glutámico	260>84
Acetilcarnitina	260>85
Ac. α-Aminoadípico	274>98
Propionilcarnitina	274>85

estudiados se encuentran en el intervalo 0,95-1,00, e indican por tanto una buena linealidad en la calibración. Esto hace pensar que los efectos de supresión ocurren de igual forma en los metabolitos y en sus patrones internos.

En la tablas V y VI aparecen asimismo los datos de recuperación analítica obtenidos a partir de los valores de las concentraciones de los metabolitos añadidos sobre las muestras de orina control preparadas.

Los valores permanecen en general en márgenes analíticamente aceptables (90-110%). Aparecen, no obstante, casos como los del Ác. Láctico, Ac. 2-Hidroxiglutárico y Ac. Homovanílico, que hacen suponer la presencia de interferencias isobáricas que no fue posible identificar.

El estudio de diferentes compuestos que presentan interferencias isobáricas e isoméricas aparece resumido en las tablas VII y VIII. Como puede observarse, fue posible evitarlas optimizando un fragmento de relación m/z diferente en la mayoría de los casos. Sin embargo, no fue posible encontrar transiciones alternativas en el caso de los isómeros de la Leucina; la Isoleucina y la Allo-isoleucina, en ionización positiva y en los de las interferencias isobáricas entre el Ác. Succínico y el Metilmalónico, entre el Ác. Glutámico, Etilmalónico y Metilsuccínico, y entre el 2-Cetoglutárico y el 2-Metilglutárico, en ionización negativa.

DISCUSIÓN

En el análisis de ionización positiva fueron incorporados algunos metabolitos que normalmente no forman parte del panel de los programas de cribado por MS/MS en muestras de sangre como el guanidinoacetato, δ-aminolevulinato, cistina, homocistina, creatina, creatinina y argininsuccinato. Algunos de estos metabolitos, como la cistina y la homocistina, son marcadores de ECM y pueden encontrarse únicamente aumentados en orina.

Además de estos metabolitos usualmente no analizados, el perfil de acilcarnitinas en orina parece muy útil porque nos permite obtener información complementaria con la obtenida del análisis de las acilcarnitinas en sangre. Por ejemplo, en las acidurias glutáricas tipo I, la glutarilcarnitina en sangre puede estar no muy elevada o *borderline*, y en nuestra experiencia, las concentraciones de glutarilcarnitina en orina están siempre elevadas, incluso en las bajo excretoras.

Tabla VIII. Interferencias Isobáricas encontradas en ionización negativa

Molécula	Transición (m/z)
Ác. Fumárico	115>97
Ác. Maleico	115>27
Ác. 3-Hidroxibutírico	103>59
Ác. 4-Hidroxibutírico	103>57
Ác. Succínico	117>73
Ác. Metilmalónico	117>73
Ác. 2-Hidroxiisovalérico	117>71
Ác. 3-Hidroxiisovalérico	117>59
Ác. Glutárico	131>87
Ác. Etilmalónico	131>87
Ác. Metilsuccínico	131>87
Ác. 2-Cetoglutárico	145>101
Ác. 2-Metilglutárico	145>101
Ác. Adípico	145>83
Ác. 2-Hidroxiglutárico	147>129
Ác. Mevalónico	147>59
Ác. 3-Hidroxiglutárico	147>85
Ác. p-hidroxifenilacético	151>107
Xantina	151>108
Ác. Homogentísico	167>123
Ác. Úrico	167>124
Ác. Homovanílico	181>137
Ác. ρ-Hidroxifenilláctico	181>163

Al contrario del análisis en ionización positiva, en el análisis de ionización negativa, el panel de los metabolitos introducidos es muy amplio en comparación con los métodos de cribado por MS/MS clásicos. Muchos metabolitos asociados con ECM pueden ser satisfactoriamente analizados por ESI en ionización negativa sin la necesidad de derivatización. Este hecho es particularmente relevante en varias acidurias orgánicas que no presentan alteraciones en el panel de las acilcarnitinas.

La combinación de los datos obtenidos del análisis de las muestras de orina en ionización positiva y negativa, permite el establecimiento del diagnóstico de una manera mucho más fiable. En la figura 3 puede verse un ejemplo de estas posibilidades con el espectro de los metabolitos detectados en ionización negativa en el análisis de una orina de una deficiencia de 3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA liasa.

A pesar de que la espectrometría de masas en tándem presenta una elevada especificidad, en algunos compuestos isoméricos donde además de la misma masa molecular éstos presentan la misma fragmentación, no pudieron encontrarse transiciones específicas que permitieran distinguirlos.

Para los diferentes compuestos que presentan interferencias isobáricas, recogidos en las tablas VII y VIII, así como de aquellos en los que el porcentaje de recuperación aparece claramente elevado sin justificación metodológica, serían necesarios estudios alternativos mediante GS-MS que permitan la confirmación diagnóstica. Sin embargo, en la mayoría de los casos, seleccionando una transición más específica por MRM, fue posible medir algunos isómeros independientemente.

Debido a estas interferencias isobáricas, los datos obtenidos del análisis de las muestras supuestamente patológicas para esos metabolitos en concreto, deben ser evaluados con precaución e intentando reunir la máxima cantidad de información posible.

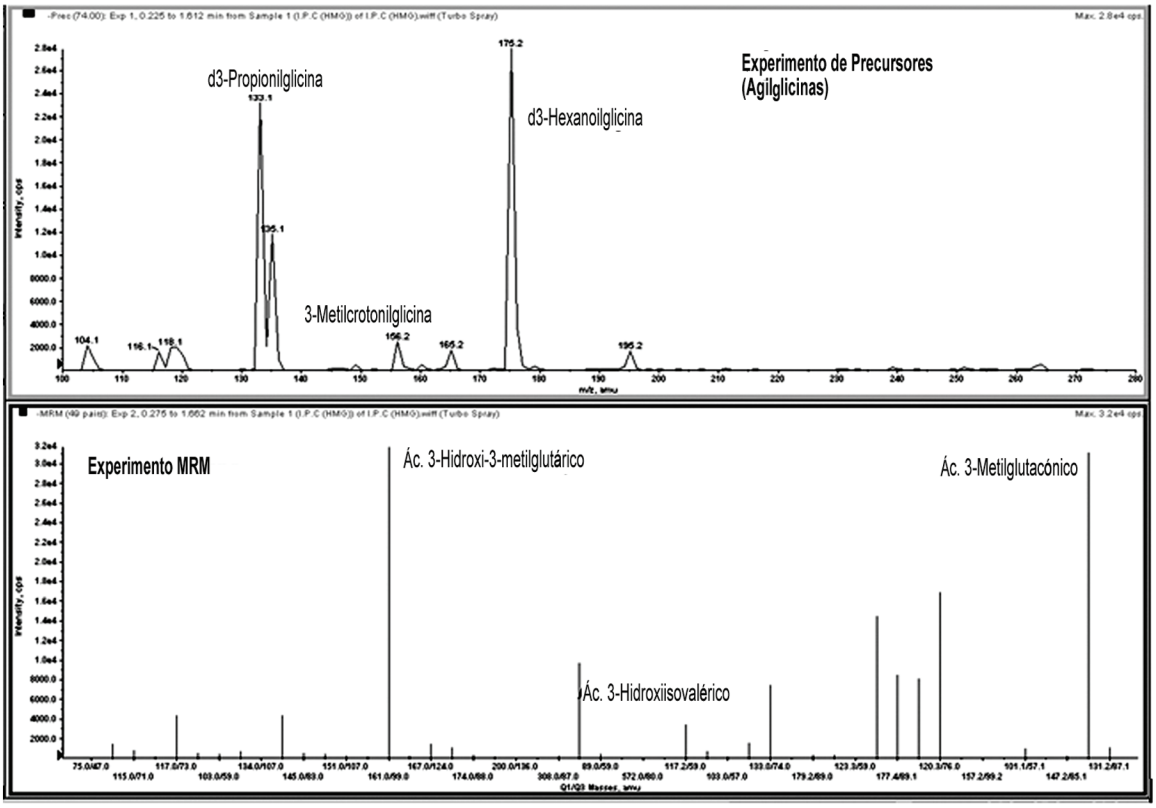

Figura 3

Tabla IX. Metabolitos detectados en las muestras patológicas de orina en papel analizadas

Patología	Metabolitos ionización positiva	Metabolitos ionización negativa
Def. 3-Hidroxi-3-metilglutaril CoA Liasa*	3-Metilglutarilcarnitina, 3-OH-Isovalerilcarnitina	Ác. 3-OH-3-metilglutárico, 3-Metilcrotonilglicina, Ác. 3-OH-Isovalérico, Ác. 3-Metilglutacónico
Def. Acil-CoA Deshidrogenasa de Cadena Media*	Hexanoilcarnitina, Octanoilcarnitina	Hexanoilglicina, Suberilglicina, Ác. Adípico, Ác. Subérico
Acidemia Isovalérica*	Isovalerilcarnitina	Isovalerilglicina
Homocistinuria clásica*	Metionina, Homocistina	
Aciduria Propiónica*	Propionilcarnitina	Ác. 3-HidroxiPropiónico, Propioniglicina, tiglilglicina
Aciduria 4-OH-Butírica°		Ác. 4-Hidroxibutírico
Enfermedad de Canavan°		Ác. N-Acetilaspártico
Aciduria Mevalónica°		Ác. Mevalónico
Alcaptonuria°		Ác. Homogentísico
Aciduria Argininsuccínica°	Citrulina, Ác. Argininsuccínico	
Cistinuria°	Cistina, Arginina, Ornitina	
Def. Guanidoacetato Metiltransferasa°	Ác Guanidoacético, Creatina, Creatinina	

*Complementariedad con la sangre
°Ampliación del cribado

El análisis de la serie de muestras de pacientes diagnosticados nos permitió comprobar la utilidad y la gran potencialidad diagnóstica del método desarrollado, gracias a la elevada cantidad de información obtenida, y que además puede todavía aumentarse al ser valorada conjuntamente con la información del análisis de la muestra de sangre en papel por MS/MS. En la tabla IX aparecen recogidos diferentes metabolitos detectados en las muestras patológicas analizadas de orina en papel y en ella se indica en cuales de estos casos se ampliaría o complementaría nuestro Programa de Cribado Neonatal sobre muestras de sangre.

El hecho de no disponer de muestras de orina neonatales de algunas patologías hace que manejemos información no totalmente contrastada que nos permita afirmar la viabilidad de su detección en período neonatal, así como la utilidad de algunos de los marcadores seleccionados para ser empleados en los programas de cribado neonatal.

En resumen, los métodos permiten la detección simultánea de un elevado número de moléculas que son marcadores para el diagnóstico de ECM sin la necesidad de separación cromatográfica previa ni una preparación de muestra muy laboriosa. Únicamente en aquellos casos en los que deban ser diferenciados isómeros, serán necesarios estudios alternativos.

Al aplicarse además a muestras de orina impregnadas en papel de filtro, aprovecha todas las ventajas que supone el envío de este tipo de muestras, reduciendo los costes y agilizando el traslado de muestras desde localizaciones lejanas.

En la actualidad, este método se encuentra en fase de introducción en el Programa Gallego de Cribado Neonatal, habiendo permitido complementar la confirmación diagnóstica de casos de Jarabe de Arce, Homocistinuria clásica, Hipermetioninemia, Deficiencia de Acil-CoA Deshidrogenasa de Cadena Media y Aciduria Propiónica.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. AAP Newborn Screening Task Force. Serving the family from birth to the medical home: Newborn screening: a blueprint for the future – a call for a medical agenda on state newborn screening programs. Pediatrics 2000; 106: 386-427.
2. Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. Pediatrics 1963; 32: 318-43.
3. Tanaka K, West-Dull A, Hine D, Lynn T, Lowe T. Gas-Chromatographic method of analysis for urinary organic acids. II. Description of the procedure, and its application to diagnosis of patients with organic acidurias. Clin Chem 1980; 26 (13): 1847-53.
4. Clayton PT. Applications of mass spectrometry in the study of inborn errors of metabolism. J Inherit Metab Dis 2001; 24: 139-50.
5. Jones PM, Bennett JM. The changing face of newborn screening: diagnosis of inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. Clin Chim Acta 2002; 324: 121-8.
6. Xu K, Wang L, Cai H, Zhang T, Zhang C, Matsumoto I. Screening for inborn errors of metabolism using gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 2001; 758 (1): 75-80.
7. Griffiths WJ, Jhonsson PA, Liu S, Rai DK, Wang Y. Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. Biochem J 2001; 355: 545-61.
8. Bartlett K, Pourfarzam. Tandem mass spectrometry- the potencial. J Inher Metab Dis 1999; 22: 568-71.
9. Millington DS, Kodo N, Norwood DL, Roe CR. Tandem mass spectrometry: a new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism. J Inherit Metab Dis 1990;13:321–4.
10. Chace DH, Millington DS, Terada N, Kahler SG, Roe CR, Hoffman LF. Rapid diagnosis of phenylketonuria by quantitative analysis of phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots by tandem mass spectrometry. Clin Chem 1993; 39: 66-71.
11. Rashed MS, Ozad PT, Bucknall MP, Little D. Diagnosis of inborn errors of metabolism from blood spots by acycarnitines and aminoacids profiling using automates electrospray tandem mass spectrometry. Clin Chem 1995; 38: 324-31.
12. Chace DH, DiPerna JC, Naylor EW. Laboratory integration and utilization of tandem mass spectrometry in neonatal screening: a model for clinical mass spectrometry in the next millennium. Acta Paediatr Suppl 1999; 432: 45-7
13. Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. Clin Chem 2003; 49:1797-817.
14. Zytkovicz HT, Fitzgerald FE, Marsden D, Larson AC, Shih EV, Johnson MD, et al. Tandem Mass Spectrometric Analysis for Amino, Organic, and Fatty Disorders in Newborn Dried Blood Spots: A Two-Year Summary from the New England Newborn Screening Program. Clin Chem 2001; 47:1945-55.
15. Chace DH, Kalas TA. A biochemical perspective on the use of tandem mass spectrometry for newborn screening and clinical testing. Clin Biochem 2005; 38: 296-309.
16. Centers for Disease and Prevention (CDC). Using Tandem Mass Spectrometry for Metabolic Disease Screening Among Newborns. MMWR April 2001; 50:1-34.
17. Tuchman M, McCann MT, Johnson PE, Lemieux B. Screening newborns for multiple organic acidurias in dried filter paper urine samples: method development. Pediatr Res 1991; 30 (4): 315-21.
18. Fu X, Iga M, Kimura M, Yamaguchi S. Simplified screening for organic acidemia using GC/MS and dried urine filter paper: a study on neonatal mass screening. Early Hum Dev 2000; 58: 41-55.
19. Fu X, Kimura M, Iga M, Yamaguchi S. Gas chromatographic-mass spectrometric screening for organic acidemias using dried urine filter paper: determination of α-ketoacids. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 2001; 5; 758 (1): 87-94.
20. Pit JJ, Eggington M, Kahler SG. Comprehensive Screening of Urine Samples for Inborn Errors of Metabolism by Electrospray Tandem Mass Spectrometry. Clin Chem 2002; 48:11: 1970-80.
21. Fraga JM, Cocho JA, Castiñeiras DE, Couce ML, Bóveda MD, Iglesias AJ, et al. Aspectros actuales en el cribado neonatal: aplicación de la espectrometría de tándem masas al diagnóstico precoz de los errores congénitos del metabolismo. An Pediatr 2000; 53 (2): 81-6.
22. Piraud M, Vianey-Saban C, Petritis K, Elfakir C, Steghens JP, Morla A, et al. ESI-MS/MS analysis of underivatised amino acids: a new tool for the diagnosys of inherited disorders of amino acid metabolism. Fragmentation study of 79 molecules of biological interest in positive and negative ionisation mode. Rapid Commun Mass Spectrom 2003; 17: 1297-311.
23. Nagy K, Takáts Z, Pollreisz F, Szabó T, Vékey K. Direct tandem mass spectrometry analysis of amino acids in dried blood spots without chemical derivatization for neonatal screening. Rapid Commun Mass Spectrom 2003; 17: 983-90.
24. Mueller P, Schulze A, Schindler I, Ethofer T, Buehrdel P, Ceglarek U. Validation of an ESI-MS/MS screening method for acylcarnitine profiling in urine specimens of neonates, childrem, adolescents and adults. Clin Chim Acta 2003; 327: 47-57.
25. Bonafé L, Troxler H, Kuster T, Heizmann CW, Chamoles NA, Burlina AB, et al. Evaluation of urinary acylglicines by electrospray tandem mass spectrometry in mitochondrial energy metabolism defects and organic acidurias. Mol Genet Metab 2000; 69: 302-11.
26. Costa CG, Guérand WS, Struys EA, Holwerda U, Brink HJ, Tavares de Almeida I, et al. Quantitative analysis of urinary acylglycines for the diagnosis of β-oxidation defects using GC-NCI-MS. J Pharm Biomed Anal. 2000; 21: 1215-24.
27. Blau N, Duran M, Blaskovics ME, Gibson KM. Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases. 2ª ed. Springer; 2003.
28. Rizzo C. Il laboratorio negli scompensi acuti metabolici. En: Durand P, Sabetta G. Malattie Genetiche. McGraw-Hill; 1998. p. 109-25.
29. Kumpsa A, Duez P, Mardens Y. Metabolic, nutritional, latrogenic, and artifactual sources of urinary organic acids: a comprehensive table. Clin Chem 2002; 48 (5): 708-17.

Correspondencia:
José A. Cocho
Laboratorio de Metabolopatías.
Hospital Clínico Universitario de Santiago
C/ Choupana s/n
15706 Santiago de Compostela
Correo electrónico: pdneonat@usc.es