

Análisis de ácidos orgánicos en orina mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas

J. A. Prieto, F. Andrade, L. Aldámiz-Echevarría, P. Sanjurjo

Resumen

La determinación de ácidos orgánicos en orina es de enorme interés para el diagnóstico y control del tratamiento de los pacientes con errores congénitos del metabolismo intermediario. En este trabajo se describe detalladamente el procedimiento de cromatografía de gases-espectrometría de masas seguido en nuestro laboratorio, aportando los datos y la bibliografía necesaria para su rápida implantación práctica. La muestra de orina se acidifica y se extrae tres veces con acetato de etilo, utilizando ácido trópico como patrón interno. El extracto se evapora mediante nitrógeno y se derivatiza para formar los trimetilsilil derivados. Asimismo, se recogen los resultados y la experiencia obtenidos en nuestro hospital sobre las muestras de orina con sospecha de metabolopatía recibidas desde la puesta a punto de la técnica, además de los resultados de análisis cualitativo de ácidos orgánicos e interpretación del perfil de muestras remitidas por el control interlaboratorio en que se participa.

Palabras clave: Errores innatos del metabolismo. Cromatografía de gases. Espectrometría de masas.

Summary. Analysis of urinary organic acids by gas chromatography-mass spectrometry

Analysis of urine organic acids is of great interest for the diagnosis and follow-up of patients with inborn errors of intermediary metabolism. In this work, we describe in detail the gas chromatography-mass spectrometry procedure used in our laboratory, including the data and the necessary bibliography for a quick practical approach. Urine sample is acidified and extracted three times with ethyl acetate, using tropic acid as internal standard. Extract is evaporated under nitrogen, and it is derivatized to yield trimethylsilyl derivatives. Furthermore, we describe the experience and results obtained from urine samples received in our laboratory since this technique was available, for the diagnosis of some suspected inborn error of metabolism. We also report the results and interpretation of an external inter-laboratory control program for qualitative analysis of organic acids in which our laboratory takes part.

Keywords: Inborn Errors of metabolism. Gas Chromatography-Mass Spectrometry.

INTRODUCCIÓN

Los errores innatos del metabolismo son un grupo complejo y heterogéneo de enfermedades monogénicas, que generalmente resultan de una actividad deficiente en una única vía metabólica. Las consecuencias clínicas de estas enfermedades son a menudo graves, siendo una causa importante de mortalidad y morbilidad, especialmente en la edad pediátrica (1).

La orina humana contiene numerosos ácidos orgánicos y otros metabolitos en concentraciones muy variadas. En la orina de un paciente con deficiencia de una enzima o un cofactor, el sustrato de la enzima, o los metabolitos formados debido a la activación de vías metabólicas secundarias por a la acumulación de sustrato, se incrementan de forma muy acusada. Los errores innatos del metabolismo en muchos casos pueden diagnosticarse gracias a la presencia de estos metabolitos en orina, tales como los ácidos orgánicos, acilglicinas, acilcarnitinas, aminoácidos, etc. Muchas enfermedades metabólicas muestran una presentación clínica si-

milar, por lo que el diagnóstico definitivo sólo puede realizarse mediante el análisis de fluidos biológicos. En muchos casos la rápida detección es fundamental para el inicio del tratamiento y evitar complicaciones, en ocasiones letales (2).

Los ácidos orgánicos comprenden metabolitos claves de casi todas las vías metabólicas del metabolismo intermediario, por lo que el análisis de los mismos ofrece información sobre el estado de dichas vías. Sin embargo el diagnóstico se complica debido a la variabilidad de la excreción de estos ácidos, y además pueden tener un origen ambiguo, ya que la excreción puede verse alterada secundariamente en pacientes con otras enfermedades, o ser debida a fuentes nutricionales, yatrogénicas (tratamiento con valproato, salicilato...) o artificiales (3), por ello la colaboración con el clínico es esencial y el diagnóstico se debe confirmar mediante la realización de análisis enzimáticos y/o genéticos. En la orina pueden encontrarse más de 250 ácidos orgánicos y acilglicinas, y al menos 65 enfermedades metabólicas dan lugar a un perfil característico que permite su diagnóstico.

El estudio de pacientes con posibles acidemias orgánicas se ha abordado por diferentes vías: el análisis de ácidos orgánicos en orina mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) (4-9) y el perfil de acilcarnitinas y otros metabolitos en sangre impregnada en papel, principalmente me-

División de Metabolismo, Departamento de Pediatría, Hospital de Cruces, Barakaldo.

diente espectrometría de masas en tandem (MS/MS) (10-13) o cromatografía de gases-espectrometría de masas (14). Otros métodos menos empleados debido a su menor adecuación, son la cromatografía gaseosa con detección de ionización de llama (FID) (15, 16), que precisa de la conexión de dos columnas para la segura identificación de los constituyentes, y la electroforesis capilar, limitada por su sensibilidad a los metabolitos más concentrados (17, 18). La espectrometría de masas en tandem se está utilizando con éxito en los programas de cribado neonatal, debido a la rapidez y la facilidad de preparación de la muestra. Sin embargo, el análisis de ácidos orgánicos es un procedimiento lento y costoso, por lo que no se utiliza para la población general, como sucede con la fenilcetonuria o la detección del hipotiroidismo, sino para el cribado selectivo en pacientes previamente sintomáticos.

En general, la etapa crítica en la determinación de ácidos orgánicos en orina es la extracción, ya sea con disolventes orgánicos o mediante resinas de intercambio aniónico (19, 20). Para la extracción con disolventes orgánicos se suele utilizar éter y/o acetato de etilo en medio ácido. También se ha probado la utilización de orina impregnada en papel como muestra de análisis (21). A continuación se realiza una derivatización para incrementar su volatilidad bien por oximación o por sililación (22-24), seguida de una cromatografía de gases con detección de masas en modo SCAN de adquisición de datos. El tiempo de retención y el espectro de masas permiten identificar el metabolito, y la abundancia de la masa de un fragmento específico del compuesto permite cuantificarlo, aunque el resultado es, a lo sumo, semicuantitativo, ya que la recuperación depende de un gran número de variables y se trata de un grupo muy heterogéneo de compuestos cuyo análisis no puede optimizarse simultáneamente (25).

Para el diagnóstico y para el seguimiento de algunas de estas enfermedades es necesario determinar de forma más precisa los metabolitos característicos, empleándose entonces métodos más específicos de extracción y mejorando la exactitud mediante la utilización del compuesto marcado isotópicamente u otro patrón interno adecuado (6).

El presente trabajo trata de mostrar un método sencillo para el análisis de ácidos orgánicos en orina que ha sido utilizado en nuestro laboratorio durante los últimos tres años. Pretende facilitar la rápida implantación de esta técnica por laboratorios que posean un cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas, ayudando asimismo en la interpretación de los resultados y remitiendo a la bibliografía necesaria para el correcto diagnóstico. Finalmente se incluye nuestra experiencia en cuanto a detección de casos durante este tiempo y los resultados obtenidos en un control interlaboratorio a nivel europeo en el que nuestro laboratorio participa desde 2004.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Instrumentación

La extracción líquido-líquido de la orina se realizó con ayuda de un agitador automático IKA vibrax VXR basic. Para la derivatización de la muestra se utilizó un termobloque Selecta Tembloc. Los extractos de orina se analizaron en un cromatógrafo de gases HP 6890 equipado con un detector de masas HP 5973 (Agilent).

2. Reactivos

Los patrones se obtuvieron principalmente de las casas Sigma (Madrid), y Merck (Darmstadt, Alemania). Las diferentes

acilglicinas se obtuvieron por medio del Departamento de Química Orgánica de la Universidad Autónoma de Madrid, el ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico se obtuvo a través del profesor Ten Brink (Universidad Libre de Amsterdam, Holanda).

La derivatización se llevó a cabo con bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) (Sulpeco, Bellefonte, Estados Unidos).

Los reactivos generales: acetato de etilo, cloruro sódico, piridina y ácido clorhídrico 35%, fueron suministrados por la casa Merck y de calidad para análisis.

3. Procedimiento

Extracción y preparación de la muestra

La excreción de ácidos orgánicos está condicionada por la dilución de la orina. Por lo tanto, todos los valores se expresan en relación con la concentración de creatinina. El volumen de orina tomado para los análisis es el que contiene 3,5 μ moles de creatinina. Este volumen (en mL) se calcula dividiendo 39,6 (obtenido del factor de conversión de unidades de mg/dL a mmol/L y multiplicando por 3,5) entre la concentración de creatinina (en mg/dL), pero con límites. El volumen tomado se acota entre 0,25 y 2,5 mL, modificando el factor de dilución en caso de que el valor calculado sea menor o mayor que el comprendido en este intervalo. En todo caso, si el volumen de orina calculado es menor de 1 mL, se completará hasta esta cantidad con agua destilada a fin de facilitar separación de fases.

Antes de realizar el análisis, se añaden al tubo de extracción 25 μ L de ácido trópico 6 mM disuelto en metanol como patrón interno. El metanol se evapora a sequedad con nitrógeno y se añade el volumen de orina que se ha calculado, cloruro sódico sólido a saturación, 6 mL de acetato de etilo y 100 μ L de ácido clorhídrico al 35%, agitando durante cinco minutos. La cantidad de ácido condiciona la extracción de los componentes de la orina, por lo que se debe garantizar un pH de la fase acuosa menor que 2, pero evitando excesos que dificultan el rendimiento de la extracción, en especial de los ácidos de cadena corta. La fase orgánica se recoge, y la fase acuosa se extrae dos veces más con 6 mL de acetato de etilo, uniendo los tres extractos en un tubo de vidrio. El extracto se evapora en corriente de nitrógeno a 50°C. Cuando queda aproximadamente 1 mL de líquido, se añade una punta de espátula de sulfato sódico anhidro, a fin de eliminar los restos de agua, y se decanta a otro vial para terminar el secado. Una vez seco, el residuo se redissuelve en 100 μ L de etanol y se vuelve a evaporar. La reacción de derivatización se realiza añadiendo al residuo seco 50 μ L de BSTFA y 50 μ L de piridina, que actúa como catalizador, según indica el fabricante. La mezcla se incubó a 60°C durante media hora, obteniéndose los trimetilsilil derivados volátiles, que se inyectan en el sistema cromatográfico (26).

Sistema cromatográfico

La inyección de la muestra se realiza en modo *split*, con un volumen de inyección de 1 mL y una relación de *split* de 1:25. La temperatura del inyector es 275°C, la de la fuente de iones 230°C y la del cuadrupolo 150°C.

La separación se lleva a cabo en una columna capilar de sílice fundido HP-5MS (Agilent) de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro y 0,25 mm de espesor de película. El programa de temperaturas comienza a 70°C durante 5 min, con una rampa de 4,5 °C/min hasta los 300°C, manteniéndose a dicha temperatura durante 5 min (tiempo total de análisis 61 min).

La ionización se realiza mediante el modo de impacto electrónico, recogiendo el espectro de masas cada 0,25 s en el intervalo comprendido entre m/z 50 y 480.

Calibración del equipo

El presente trabajo se realizó calibrando 52 compuestos y 56 picos (algunos compuestos, como las acilglicinas, el ácido hipúrico y acetoacético dan lugar a dos derivados trimetilsilano), teniendo en cuenta los marcadores para detectar la mayoría de enfermedades. Las disoluciones estándar se realizan según Sweetman (27), la mayoría de ellas en concentración 10 mmol/L (tabla I) y disueltas en bicarbonato sódico 20 mmol/L, excepto los ácidos trópico, hipúrico, aconítico, subérico, sebácico y 4-hidroxifenilpirúvico, que por su baja solubilidad se disuelven en metanol, y los ácidos acetoacético y 2-oxoglutarico que se disuelven en ácido clorhídrico 20 mmol/L. A partir de estas disoluciones patrón individuales se preparan cuatro mezclas (denominadas mezclas 1-4, tabla I), añadiendo 0,5 mL de cada estándar a un matraz de 20 mL. En todo caso, los patrones disueltos en metanol son los primeros que se añaden al matraz, evaporando el disolvente a sequedad antes de añadir el resto de componentes de la mezcla. Cada una de estas cuatro disoluciones contiene, por lo tanto, 0,25 mmol/L de la mayoría de los compuestos. Estas disoluciones patrón se deben guardar al abrigo de la luz a -20°C , siendo estables durante varios años.

La curva de calibrado se realiza añadiendo 25 μL de patrón interno a cada tubo, y una vez evaporado el metanol se añaden 40, 200, 600 o 1000 μL , es decir, cuatro concentraciones de cada disolución (16 tubos en total) que corresponden a 10, 50, 150 y 250 nmoles de la mayoría de los compuestos, completando con agua hasta 1,5 mL. Se añade el cloruro sódico y el ácido clorhídrico, extrayéndose tres veces con acetato de etilo, como las muestras de orina, y procediendo a la derivatización de la misma manera.

Para la determinación cuantitativa, se utilizó un ión cuantificador, suficientemente sensible y libre de interferencias, y un cualificador, cuya presencia e intensidad relativa ayuda a la confirmación del compuesto. En general, los compuestos dan lugar a un pico de masa M-15, correspondientes a la pérdida de un metilo del grupo TMS que es el que se utiliza como cuantificador. La lista de los iones utilizados se muestra en la tabla I. La identificación se realiza asimismo por la utilización de una espectroteca creada a partir de las disoluciones patrón, y mediante la librería Wiley 275.

La representación de las áreas de pico (relativas al ácido trópico) frente a la concentración, daba lugar a curvas de calibrado lineales, y en algunos casos parabólicas, dependiendo del compuesto.

Para la obtener el valor cuantitativo de los ácidos orgánicos en orina, los resultados obtenidos en la cuantificación automática se deben dividir por 3,5, ya que el volumen de orina contiene 3,5 μmoles de creatinina, obteniéndose entonces las concentraciones de cada ácido orgánico en mmol/mol de creatinina.

4. Población

El análisis de ácidos orgánicos se realizó sobre las muestras de orina remitidas a nuestro laboratorio por sospecha de metabolopatía. Todos los pacientes estaban en edad pediátrica. La orina se congeló a -20°C hasta su análisis, normalmente en pocos días.

RESULTADOS

Durante los tres años que recoge nuestro estudio se han recibido un total de 317 muestras procedentes de nuestro hospital y de las

provincias limítrofes, con una población de unos tres millones de habitantes. Durante este periodo se han detectado: cuatro tirosinemias tipo I, una acidemia propiónica y dos acidemias glutáricas tipo I (tabla II).

El método ha sido probado en 33 muestras remitidas por un control interlaboratorios: *European Research Network of Inborn Errors of Metabolism* (ERNDIM, Heidelberg, Alemania). En todos los casos bien se identificó una orina no patológica, o se realizó el diagnóstico correcto, excepto en uno de ellos, cuya interpretación y diagnóstico se valoró como dudosa. En este caso, se confundió una deficiencia de 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa con una deficiencia múltiple de carboxilasas, que tienen algunos metabolitos comunes. En todos los casos se realizó una identificación correcta de los compuestos con excreción alterada. En la tabla II se recogen los resultados obtenidos en este control, indicando los compuestos que se encuentran elevados.

Las curvas de calibrado de los constituyentes se ajustaban con muy buena calidad a una ecuación lineal o parabólica, siempre con $r^2 > 0,993$. Se realizaron algunos análisis de repetitividad, comprobándose que la desviación estándar relativa de inyecciones consecutivas de una misma muestra estaba por debajo del 10%, y que en el caso de repeticiones de una misma muestra en diferentes días, la desviación estándar relativa estaba por debajo del 20% para los picos menores, y por debajo del 15% para los picos más intensos, lo que concuerda con los datos de la bibliografía (27).

DISCUSIÓN

El método expuesto da lugar a un cromatograma en el que normalmente todos los picos estudiados están bien resueltos y cuya presencia es patente en caso de excreción alterada (figura 1). El *split* seleccionado elimina gran cantidad del ruido de la línea base, pero posee aún suficiente sensibilidad para la correcta identificación de la mayoría de los ácidos. Como ya se ha indicado, existen muchos más ácidos orgánicos que los que han sido incluidos en la lista, aunque siempre se ha intentado incluir al menos uno de los marcadores para cada enfermedad. En las muestras patológicas que hemos recibido o detectado, los picos no habituales no identificados en la calibración siempre han destacado con respecto al perfil fisiológico, y pudieron ser identificados mediante la espectroteca.

Merece la pena comentar que algunos autores hacen uso de la ureasa como forma de eliminar la urea de la orina antes de llevar a cabo la extracción (6, 28). La urea da lugar a un pico muy ancho que se solapa con el del ácido acetoacético, pero sin existir interferencia debido a la selección de las masas, y dado que aumenta el tiempo de preparación de la muestra, se decidió eliminar este paso.

Aunque el objetivo principal del análisis cualitativo de ácidos orgánicos no es la exacta cuantificación de los constituyentes, los análisis de repetibilidad realizados muestran una suficiente precisión. Por supuesto los constituyentes que dan lugar a picos débiles dan valores de precisión inaceptables en un análisis cuantitativo, pero el objetivo es diferenciar la excreción patológica, y habitualmente suele estar marcadamente elevada respecto a las orinas no patológicas.

Dada la cantidad de picos cromatográficos que eluyen en el análisis de ácidos orgánicos, además de que se posea experiencia a la hora de manejar el cromatógrafo de gases, también se necesita una experiencia para diferenciar un cromatograma de

Tabla I. Relación y características de ácidos orgánicos cuantificados en el método. Se indica la concentración de la disolución patrón, en cual de las cuatro mezclas de patrones se introduce cada compuesto, el ión cuantificador y cualificador (Q), y la relación de intensidades entre ambos

	Conc (mM)	Nº Mezcla	t ret (min)	Cuantif	Q	% inten
Láctico (Na)	40	1	7,80	191	219	45
Glicólico	30	1	8,30	177	205	110
2-OH-butírico	10	1	10,15	131	233	4
Oxálico	10	2	10,40	219	190	183
3-OH-propiónico (Na)	10	3	10,68	177	219	80
3-OH-butírico	40	1	11,26	191	117	229
2-OH-isovalérico	10	3	11,41	145	219	11
2-Me-3-OH-butírico (K)	10	2	12,49	117	147	94
Acetoacético (Li), 2TMS	10	3	12,75	231	99	9
3-OH-isovalérico	10	1	12,84	205	131	1188
Metilmalónico	10	3	13,09	218	247	95
4-OH-butírico (Na)	10	4	13,82	204	117	287
Acetoacético (Li), 1 TMS	50	3	14,15	231	99	16
Etilmalónico	10	1	15,17	261	217	168
Succínico	10	1	16,16	247	172	30
Metilsuccínico	10	2	16,54	261	217	63
Uracilo	10	4	16,94	241	256	46
Glicérico (Ca)	10	3	16,95	189	292	80
Fumárico	10	1	17,15	245	147	37
Mevalónico lactona	10	1	17,81	115	187	24
Isobutirilglicina 1	10	2	18,37	202	158	219
Glutárico	10	1	18,85	261	158	95
3-Me-glutárico	10	1	19,42	204	69	473
Isobutirilglicina 2	10	2	19,53	274	289	34
3-Me-glutacónico Z	10	3	19,90	198	183	68
3-Me-glutacónico E	10	3	21,06	198	183	27
Málico	10	1	21,48	233	245	80
Adípico	10	1	21,66	275	111	257
Isovalerilglicina	10	2	21,97	176	288	132
5-oxoprolina	10	1	22,04	156	258	8
Tigilglicina	10	3	23,17	286	184	48
3-Me-crotonilglicina	10	4	23,49	286	211	28
2-OH-glutárico	10	1	23,73	247	203	36
3-OH-glutárico (K)	10	2	23,79	259	217	79
Trópico (P.I.)	6		23,91	280	118	82
3-OH-3-Me-glutárico	10	2	24,37	199	363	31
2-oxoglutárico	40	1	24,56	347	318	39
4-OH-fenilacético	20	1	25,05	179	252	42
Hexanoilglicina	10	4	25,46	302	200	160
Succinilacetona	10	3	25,62	157	169	46
N-Acetilaspártico	10	4	26,16	274	184	32
Subérico	10	2	26,54	303	169	96
Orótico	5	3	27,94	254	357	37
Trans-aconítico	10	1	28,01	375	285	64
Homovanílico	10	1	28,31	326	209	165
Hipúrico 2TMS	120	4	29,09	105	308	12
Hipúrico 1TMS	120	4	29,62	105	236	12
Cítrico	160	4	29,85	183	257	64
Metilcítrico (2S, 3S)	10	4	30,16	361	479	51
Metilcítrico (2S, 3R)	10	4	30,30	361	479	51
Sebácico	10	1	31,04	331	215	92
Vanilmandélico	10	2	31,07	297	371	5
4-OH-fenilacético	10	1	31,35	179	308	24
Fenilpropionilglicina 2TMS	10	4	33,13	351	336	45
Fenilpropionilglicina 1TMS	10	4	33,21	264	279	142
4-OH-fenilpirúvico	10	2	34,48	325	381	65
3-OH-sebácico (K)	5	4	34,86	233	419	37
Suberilglicina	10	3	38,43	360	189	154

Tabla II. Casos reales detectados y diagnóstico de las muestras remitidas por el control interlaboratorios ERNDIM. Se indican los metabolitos alterados

Enfermedad metabólica	Metabolitos alterados	Procedencia
Tirosinemia	Succinilacetona, 4-hidroxifenil ácidos	Hospital de Cruces 2003, 2004, 2005 y 2006
Acidemia glutárica tipo I	Ácido 3-hidroxiglutarico, ácido glutárico	Hospital de Cruces 2004 y 2005
Acidemia propiónica	Ácido 3-hidroxipropiónico, ácido me tilcitríco, tigililglicina	Hospital de Cruces 2004
Acidemia mevalónica	Ácido mevalónico*, mevalonolactona*	ERNDIM 2004
Acidemia propiónica	Ácido 3-hidroxipropiónico, ácido metilcitríco	ERNDIM 2004
Acidemia metilmalónica	Ácido 3-hidroxipropiónico, ácido metilmalónico	ERNDIM 2004
Acidemia isovalérica	Isovalerilglicina	ERNDIM 2004
Aciduria 4-hidroxibutírica	Ácido 4-hidroxibutírico	ERNDIM 2005
Enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce	Ácido 2-hidroxiisovalérico, ácido 2-oxoisocaproico*, ácido 2-hidroxiisocaproico*, ácido 4-hidroxifeniláctico	ERNDIM 2005
Deficiencia de 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa	Ácido 3-hidroxiisovalérico, 3-metilcrotonilglicina	ERNDIM 2005
Acidemia metilmalónica	Ácido metilcitríco, ácido metilmalónico	ERNDIM 2005
Aciduria 3-hidroxi-3-metilglutárica	Ácido 3-hidroxiisovalérico, ácido 3-metilglutacónico, ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico, 3-hidroxicrotonilglicina*	ERNDIM 2005
Aciduria isovalérica	Ácido 3-hidroxiisovalérico, isovalerilglicina	ERNDIM 2006
Fenilcetonuria	Ácidos fenilacético*, mandélico*, glicérico, feniláctico*	ERNDIM 2006
Alcaptonuria	Ácido homogentísico*	ERNDIM 2006
Enfermedad de Cánavan	Ácido N-acetilaspártico	ERNDIM 2006

*Metabolitos no valorados en el método descrito, pero fácilmente distinguibles con respecto a un perfil fisiológico e identificables mediante la espectroscopia.

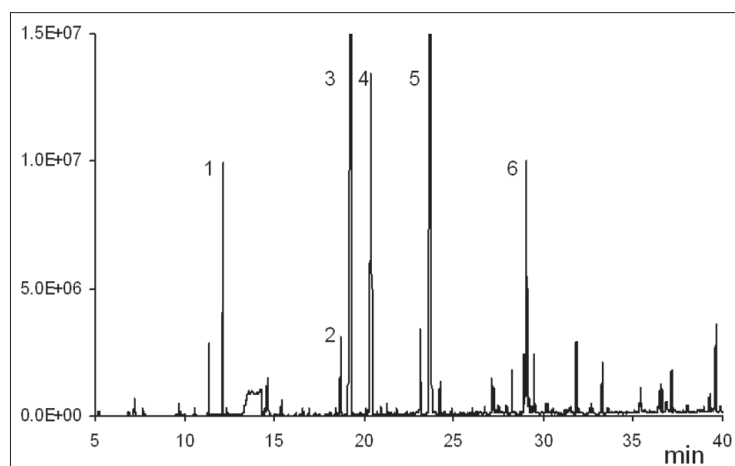


Figura 1. Cromatograma perteneciente a un extracto de una orina de un paciente con aciduria 3-hidroxi-3-metilglutárica. 1: ácido 3-hidroxiisovalérico; 2: ácido 3-metilglutárico; 3: ácido 3-metilglutacónico Z; 4: ácido 3-metilglutacónico E; 5: ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico; 6: ácido cítrico.

una orina no patológica de una que es patológica. No cabe duda que el conocimiento de las vías metabólicas y de los mecanismos de las diferentes enfermedades es indispensable para poder interpretar correctamente el perfil obtenido y llegar a un diagnóstico. En general, en las muestras con que nos hemos encontrado las diferencias son muy significativas. Algunas enfermedades dan lugar a compuestos que normalmente no están presentes, o en muy bajas cantidades. En otros casos, como por ejemplo en las acidurias orgánicas, la excreción de metabolitos es tan elevada que no queda duda sobre el diagnóstico. Sin embargo, existen otras patologías en que el diagnóstico bioquímico no es tan evidente. La comunicación entre el clínico y el responsable del análisis es crucial en estos casos, ya que a menudo el perfil de ácidos orgánicos es más alterado en periodos de descompensación.

Los valores fisiológicos se recogen en la bibliografía (29), aunque preferiblemente cada laboratorio deber recoger los suyos propios, pero a grandes rasgos, se puede decir que los valores de concentración se encuentran entre 10 y 50 mmol/mol de creatinina para la mayoría de los compuestos. En cambio, la succinilacetona y las acilglicinas no son detectadas o están por debajo de 5 mmol/mol de creatinina, y algunos compuestos como el ácido cítrico e hipúrico pueden presentarse en concentraciones elevadas de hasta 1500 mmol/mol de creatinina. Algunos metabolitos pueden tener una excreción más variable, fisiológicamente más elevada en recién nacidos, como los ácidos succínico, 4-hidroxifenilacético y 2-oxoglutarico, acónico, oxálico y glicólico, del orden de hasta 200 mmol/mol de creatinina.

La implantación de este método ha redundado, sobre todo, en la rápida disponibilidad del resultado para el diagnóstico, mejorando por lo tanto la calidad asistencial de la División de Metabolismo Pediátrico. Además, puede utilizarse para el seguimiento de las múltiples descompensaciones que sufren estos pacientes, y también evaluar el efecto del tratamiento, mediante el seguimiento de picos específicos. Con este método, el gasto en reactivos es muy pequeño (no así en horas de personal), y el procedimiento de preparación de la muestra es muy sencillo, aunque largo.

En resumen, describimos un método simple para la implantación de este método por un laboratorio que posea un equipo de GC-MS, dando las guías para la puesta a punto de la técnica y la información y bibliografía necesaria para la interpretación del cromatograma.

BIBLIOGRAFÍA

1. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS. The metabolic and molecular bases of inherited disease, Vol 1. Nueva York: McGraw-Hill, 2001.
2. Sanjurjo P, Baldellou A (Eds). Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. Madrid: Ergon; 2006.
3. Kumps A, Duez P, Mardens Y. Metabolic, nutritional, iatrogenic and artifactual sources of urinary organic acids: a comprehensive table. *Clin Chem* 2002; 48: 708-17.
4. Kuhara T, Shinka T, Inoue Y, Ohse M, Zhen-wei X, Yoshida I, et al. Pilot study of gas chromatographic-mass spectrometric screening of newborn urine for inborn errors of metabolism after treatment with urease. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999; 731: 141-7.
5. Ohie T, Fu X, Iga M, Kimura M, Yamaguchi S. Gas chromatography-mass spectrometry with tert-butylidimethylsilyl derivation: use of the simplified sample preparations and the automated data system to screen for organic acidemias. *J Chromatography B* 2000; 746: 63-73.
6. Kuhara T. Diagnosis and monitoring of inborn errors of metabolism using urease-pretreatment of urine, isotope dilution, and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatography B* 2002; 781: 497-517.
7. Hasegawa Y, Iga M, Kimura M, Shigematsu Y, Yamaguchi S. Prenatal diagnosis for organic acid disorders using two mass spectrometric methods, gas chromatography mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005; 823: 13-7.
8. Hagen T, Korson MS, Sakamoto M, Evans JE. A GC/MS/MS screening method for multiple organic acidemias from urine specimens. *Clin Chim Acta* 1999; 283: 77-88.
9. Divry P, Vianey-Liaud C, Cotte J. Routine gas chromatographic/mass spectrometric analysis of urinary organic acids. Results over a three year period. *Biomed Environ Mass Spectrom* 1987; 14: 663-8.
10. Rashed MS, Bucknall MP, Little D, Awad A, Jacob M, Alamoudi M, et al. Screening blood spots for inborn errors of metabolism by electrospray tandem mass spectrometry with a microplate batch process and a computer algorithm for automated flagging of abnormal profiles. *Clin Chem* 1997; 43: 1129-41.
11. Ghoshal AK, Guo T, Soukhova N, Soldin SJ. Rapid measurement of plasma acylcarnitines by liquid chromatography-tandem mass spectrometry without derivatization. *Clin Chim Acta*. 2005; 358: 104-12.
12. Cavedon CT, Bourdoux P, Mertens K, Van Thi HV, Herremans N, de Laet C, et al. Age-related variations in acylcarnitine and free carnitine concentrations measured by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2005; 51: 745-52.
13. Rebollido M, Cocho JA, Castiñeiras DE, Bóveda MD, Fraga JM. Aplicación de la espectrometría de masas en tándem al análisis de aminoácidos, acilcarnitinas, acilglicinas y ácidos orgánicos en muestras de orina en papel. *Quim Clin* 2006; 25: 64-74.
14. Cyr D, Giguere R, Giguere Y, Lemieux B. Determination of urinary acylcarnitines: a complementary aid for the high-risk screening of several organic acidurias using a simple and reliable GC/MS-based method. *Clin Biochem* 2000; 33: 151-5.
15. Tsai MY, Oliphant C, Josephson MW. Identification of metabolites diagnostic for organic acidurias by simultaneous dual-column capillary gas chromatography. *J Chromatography* 1985; 341: 1-10.
16. Wurth C, Kumps A, Mardens Y. Urinary organic acids: retention indices on two capillary gas chromatography columns. *J Chromatography* 1989; 491: 186-92.
17. García A, Barbas C, Aguilar R, Castro M. Capillary electrophoresis for rapid profiling of organic acidurias. *Clin Chem* 1998; 44: 1905-11.
18. Barbas C, García A, de Miguel L, Simó C. Evaluation of filter paper collection of urine samples for detection and measurement of organic acidurias by capillary electrophoresis. *J Chromatography B* 2002; 780: 73-82.
19. Liu A, Kushnir MM, Roberts WL, Pasquali M. Solid phase extraction procedure for urinary organic acid analysis by gas chromatography mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004; 806: 283-7.
20. Boulat O, Gradwohl M, Matos V, Guignard JP, Bachmann C. Organic acids in the second morning urine in a healthy Swiss paediatric population. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41: 1642-58.
21. 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.
22. Goodman SI, Markey SP. Diagnosis of organic acidemias by gas chromatography-mass spectrometry. Nueva York: Alan R Liss; 1981.
23. Chalmers RA, Lawson AM. Organic acids in man. London: Chapman and Hall; 1982.
24. Ohie T, Fu X, Iga M, Kimura M, Yamaguchi S. Gas chromatography-mass spectrometry with tert-butylidimethylsilyl derivatization: use of the simplified sample preparations and automated system to screen for organic acidemias. *J Chromatogr B* 2000; 746: 63-73.
25. Kumps A, Duez P, Genin J, Mardens Y. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of organic acids: altered quantitative response for aqueous calibrators and dilute urine specimens. *Clin Chem* 1999; 45: 1297-300.

26. Duez P, Kumps A, Mardens Y. GC-MS profiling of urinary organic acids evaluated as a quantitative method. *Clin Chem* 1996; 42: 1609-15.
27. Sweetman L. Organic acid analysis. En Hommes FA (Ed). *Techniques in diagnostic human biochemical genetics*. Nueva York: Wileys-Liss; 1991, pp. 143-76.
28. Shoemaker JD, Elliott WH. Automated screening of urine samples for carbohydrates, organic and amino acids after treatment with urease. *J Chromatography* 1991; 562: 125-38.
29. Hoffmann GF, Feyh P. Organic acid analysis. En: Blau N, Duran M, Blaskovics ME, Gibson KM (Eds). *Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases*. Berlin: Springer-Verlag; 2002, pp. 27-44.

Correspondencia

Dr. José Angel Prieto
División de Metabolismo
Dpto. de Pediatría
Hospital de Cruces
Plaza de Cruces s/n
48903 Barakaldo
laboratorio.metabolismo.cruces@osakidetza.net