

Aplicación de la espectrometría de masas en tandem en el tamiz neonatal de los errores innatos del metabolismo*

Use of tandem mass spectrometry for the newborn screening of inborn errors of metabolism

Aplicação da espectrometria de massas em tandem no screening tamiz neonatal dos erros inatos do metabolismo

► Derbis Campos Hernández¹

¹ Master of Science

* Centro Nacional de Genética Médica. Campus del ICBP Victoria de Girón. Calle 146 No. 3102, Playa. La Habana 16, C.P: 1600. Cuba.

Resumen

La aplicación de la espectrometría de masas en *tandem* en el diagnóstico de los errores innatos del metabolismo ofrece la posibilidad de ampliar el número de enfermedades que son tamizadas durante el periodo neonatal. Esta tecnología permite detectar, con gran sensibilidad, especificidad y rapidez, más de 30 enfermedades metabólicas en un mismo ensayo a partir de un único disco de sangre seca sobre papel de filtro. Para esto se realiza el análisis combinado del perfil de aminoácidos y acilcarnitinas sin requerir, generalmente, de sistemas de cromatografía adicionales. El procesamiento analítico que actualmente se utiliza en los diferentes laboratorios de tamiz es relativamente homogéneo.

Palabras clave: espectrometría de masas en *tandem* * tamiz neonatal * errores innatos del metabolismo * acilcarnitinas * aminoácidos

Summary

The use of tandem mass spectrometry in the diagnosis of inborn errors of metabolism has the potential to expand newborn screening programmes to include many different diseases. This technique can quickly detect, with great specificity and sensibility, more than 30 diseases using the same punch of dried blood in filter paper through the combined analysis of acylcarnitines and amino acid mass spectra profile. The detection of a particular disease this way could be made without the need of a chromatographic system. The analytical analyses in current use by different screening laboratories are very similar.

Key words: tandem mass spectrometry * newborn screening * inborn errors of metabolism * acylcarnitines * amino acids

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

Resumo

A aplicação da espectrometria de massas em tandem no diagnóstico dos erros inatos do metabolismo oferece a possibilidade de ampliar os programas de screening neonatal para incluir maior número de doenças. Esta tecnologia permite detectar, com grande sensibilidade, especificidade e rapidez, mais de 30 doenças metabólicas em um mesmo ensaio a partir de um único disco de sangue seco sobre papel de filtro. Para isso é realizada a análise combinada do perfil de aminoácidos e acilcarnitinas sem precisar, geralmente, de sistemas de cromatografia adicionais. O processamento analítico que atualmente é utilizado nos diferentes laboratórios de screening é relativamente homogêneo.

Palavras chave: *espectrometria de massas em tandem * screening neonatal * erros inatos do metabolismo * acilcarnitinas * aminoácidos*

Introducción

Los errores innatos del metabolismo intermediario (EIM) comprenden más de 200 afecciones monogénicas, individualmente poco frecuentes, pero con una incidencia conjunta significativa en la población neonatal e infantil. En su mayoría evolucionan hacia un cuadro clínico desfavorable con severos daños multisistémicos y un desenlace fatal en los primeros años de vida. El diagnóstico asintomático de algunas de estas enfermedades, mediante programas de tamiz neonatal, ofrece la posibilidad de alterar el curso de la enfermedad y prevenir o reducir su morbilidad y mortalidad.

El tamiz neonatal se remonta a la década de los 60 del pasado siglo cuando Guthrie *et al*, desarrollaron un método simple, rápido y confiable para diagnosticar la fenilcetonuria en muestras de sangre seca sobre papel de filtro, permitiendo su utilización en los sistemas de salud de un gran número de países (1). Durante los siguientes 30 años el número de EIM que se añadieron a estos programas de tamiz fue muy reducido (2). La principal limitante tecnológica había sido que para la detección de cada enfermedad era necesario un ensayo independiente y una porción diferente de la muestra de sangre seca del neonato.

Este panorama cambió radicalmente mediante la utilización de la espectrometría de masas en *tandem* (MS/MS). Esta tecnología permite el diagnóstico, con gran rapidez, sensibilidad y especificidad, de más de 30 enfermedades metabólicas en un mismo ensayo a partir de un solo disco de sangre seca (3).

ANÁLISIS DE LOS ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO POR MS/MS

En los EIM relacionados con la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos y la degradación de los aminoácidos se produce la acumulación en los fluidos

corporales de ácidos grasos y ácidos orgánicos, respectivamente. Además, ocurre la acumulación intramitocondrial de acil-CoA ésteres específicos según la deficiencia enzimática. Estos últimos se trans-esterifican con moléculas de carnitina libre para restablecer la homeostasis mitocondrial. Las acilcarnitinas formadas son liberadas hacia el exterior celular, aumentan su concentración en la sangre y se excretan finalmente en la orina (4). Por lo tanto, los niveles de acilcarnitinas en estos fluidos reflejan la acumulación mitocondrial de sus correspondientes acil-CoA ésteres y permiten diagnosticar la enfermedad.

Desde hace varias décadas, la espectrometría de masas se ha empleado como método analítico de elección para el diagnóstico de diferentes EIM mediante la cuantificación de ácidos orgánicos acumulados en sangre y orina (5)(6). Dada la complejidad de estos fluidos, se requiere la utilización de sistemas de cromatografía gaseosa acoplados al espectrómetro de masas (GC-MS) para separar diferentes componentes de la muestra según sus características fisicoquímicas. De esta forma, es posible la detección de un mayor número de especies iónicas y la identificación correcta de los biomarcadores específicos de cada enfermedad (7).

Por GC-MS se cuantifican los ácidos grasos y ácidos orgánicos excretados en la orina, característicos de cada deficiencia. La metodología que actualmente se emplea para la detección de estos EIM mediante MS/MS en el tamiz neonatal se basa en la identificación del perfil de acilcarnitinas presente en muestras de sangre seca sobre papel de filtro. Además, se incluye el análisis del perfil de aminoácidos dentro del mismo ensayo para la detección de aminoacidemias (8-11).

La utilización de la GC-MS en los programas de tamiz neonatal presenta importantes limitaciones prácticas: bajo rendimiento debido a los laboriosos y lentos procedimientos de preparación de las muestras, y largo tiempo de análisis (40-60 minutos) debido a la corrida cromatográfica (12). Sin embargo, mediante la MS/MS

es posible separar y detectar en un mismo ensayo aminoácidos, derivados de los ácidos grasos y ácidos orgánicos, así como otras clases de metabolitos en una mezcla sin necesidad de un sistema cromatográfico. Este análisis es muy rápido, dos a tres minutos y requiere de una menor preparación de la muestra por lo que ofrece grandes potencialidades para su utilización en el tamiz neonatal de los EIM (8) (10).

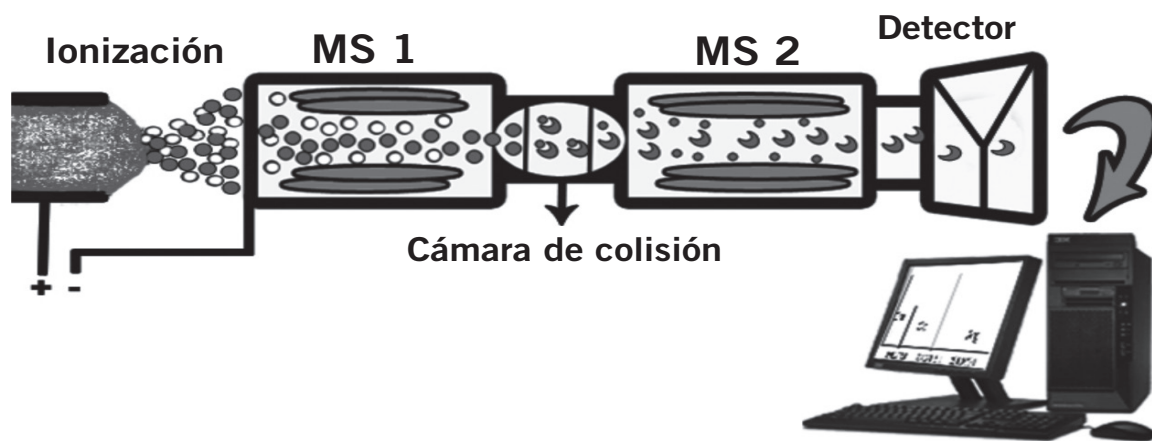
Un espectrómetro de masas en *tandem* presenta al menos dos analizadores de masas conectados en serie, separados por una cámara de colisión (Figura 1). El primero separa una especie iónica de interés, denominado ión precursor, del resto de los iones generados en la fuente de ionización y permite su acceso hacia la cámara de colisión. Aquí se induce la fragmentación de los iones moleculares, relativamente estables, por la colisión con un gas inerte, generalmente nitrógeno o argón. Los fragmentos iónicos, denominados iones producto, son acelerados hacia el segundo analizador de masas en donde son separados permitiendo su detección y registro de forma independiente (13). La asociación entre los dos analizadores de masas posibilita la separación y cuantificación con elevada sensibilidad de diferentes metabolitos en una mezcla compleja, como lo es el eluato de un disco de sangre seca.

TIPO DE MUESTRA Y ESTABILIDAD

Las muestras de sangre seca sobre papel de filtro son muy útiles para el tamiz neonatal debido a sus ventajas prácticas y económicas (14-16). Cualquier metabolito que se determine en sangre, suero o plasma puede

también determinarse en sangre seca sobre papel de filtro; por lo que tanto los aminoácidos como las acilcarnitinas son factibles de analizar por esta vía. Los procedimientos para la correcta toma y conservación inmediata de este tipo de muestra son ampliamente conocidos (17). Existe consenso entre los especialistas en señalar el periodo comprendido entre el segundo y quinto día de nacido como el más apropiado para tomar la muestra y ofrecer un diagnóstico por MS/MS con suficiente sensibilidad y especificidad (18). La estabilidad en el tiempo y ante diferentes temperaturas de almacenamiento de los aminoácidos y acilcarnitinas es un factor a tener en cuenta, sobre todo cuando se analizan muestras conservadas durante largos periodos de tiempo.

Estudios realizados por Strnadová *et al* en muestras de sangre seca almacenadas durante 15 años a temperatura ambiente mostraron que la concentración de los aminoácidos fenilalanina, alanina, arginina, leucina y metionina tuvo un decremento constante por año de 3 a 8% según el aminoácido en cuestión, siendo la metionina el menos estable (19). En estos estudios, la valina y la tirosina prácticamente no variaron durante los primeros cinco años, mientras la citrulina disminuyó notablemente durante este tiempo (8,1%) para luego estabilizarse sin variaciones perceptibles (19). Chace *et al* han demostrado una disminución del 15-17% para la fenilalanina, leucina, tirosina y valina, y del 24% para la metionina después de 30 días de almacenamiento a 37 °C (20). Uno de los aminoácidos menos estables a temperatura ambiente es la glutamina, con una disminución de más del 50% luego de dos años de conservación (21).



Análisis de los datos

Figura 1. Diagrama de un espectrómetro de masas en tandem. Una vez introducida la muestra en estado líquido, se ioniza por electronebulización. Los iones moleculares de los diferentes metabolitos (○/●) son separados en el primer analizador de masas (MS1) de acuerdo a su relación masa/carga. Los iones de interés son fragmentados en la cámara de colisión generándose diferentes fragmentos iónicos característicos de cada compuesto. Estos fragmentos son separados en el segundo analizador de masas (MS2) y finalmente se detectan y registran de manera independiente, obteniéndose un espectro de masas.

En relación a las acilcarnitinas, la hexanoilcarnitina y la octanoilcarnitina muestran un decremento en su concentración en sangre seca luego de 4 años a 4 °C de 17 y 15%, respectivamente (9). Bajo las mismas condiciones, la disminución de la hexadecanoilcarnitina es menor del 10% de su concentración inicial (22). Las especies de cadena corta son menos estables (23). En su estudio, Strnadová *et al* indican una disminución por año, durante los primeros cinco años de conservación, de 27 y 18% para la propionilcarnitina y acetilcarnitina, respectivamente; así como un incremento en la concentración de carnitina libre del 40% durante el mismo intervalo de tiempo debido a la hidrólisis de las acilcarnitinas esterificadas (16). Para la malonilcarnitina se ha informado un tiempo de vida medio de 248 días a temperatura ambiente (24).

Los estudios en los que se realiza el diagnóstico retrospectivo de EIM o su confirmación a partir de muestras tomadas en la etapa neonatal también permiten determinar la estabilidad de estas moléculas y su efectividad para realizar un diagnóstico certero (20) (25) (26).

Preparación de las muestras

La preparación de las muestras para la detección neonatal por MS/MS de diferentes EIM se basa esencialmente en el método desarrollado por Millington *et al* (27). A un disco de sangre seca de 3 mm se le adiciona una solución metanólica que contiene los estándares internos. Éstos consisten en isótopos, generalmente deuterados, de los aminoácidos y acilcarnitinas a cuantificar. La adición de estos compuestos permite la cuantificación de cada metabolito, técnica conocida como dilución isotópica. La eficiencia del proceso de extracción es de alrededor del 90% (8) (19) (28). Otros factores que influyen en el valor de cuantificación es el contenido de sangre de cada disco, el cual sólo se conoce de forma aproximada, así como el efecto del hematocrito (29) (30).

La extracción de los metabolitos del disco de sangre seca se realiza por un periodo de alrededor de 30 minutos, con ayuda o no de una agitación suave; se transfiere el extracto metanólico a una placa de poliestireno y se evapora el metanol bajo una corriente de nitrógeno. Algunos laboratorios utilizan aire caliente para este propósito, aunque existe la posibilidad de que ocurra la oxidación de los analitos por la presencia del oxígeno y vapor de agua (31). Una vez realizada la extracción se lleva a cabo la derivatización de los aminoácidos y acilcarnitinas mediante la esterificación butílica de los grupos carboxilo libres. Para esto se emplea una solución de butanol acidificado con ácido clorhídrico, se incuban las muestras por alrededor de 15 min a 65 °C y se detiene la reacción mediante evaporación en corriente de nitrógeno (24).

La derivatización de los aminoácidos y las acilcarnitinas incrementa significativamente la eficiencia de su ionización y por tanto aumenta la sensibilidad del análisis en comparación con sus homólogos no derivatizados, particularmente para las especies dicarboxílicas (32) (33). Su principal desventaja radica en que este proceso puede provocar la degradación de algunos analitos. Las especies acetilcarnitina, decanoilcarnitina y octadecanoilcarnitina sufren alrededor de un 30%, 8% y 6% de butanolisis, respectivamente, originando carnitina libre butilada (34). El contenido de glutamina se transforma en ésteres dibutílicos de ácido glutámico y de ácido piroglutámico, no distinguibles de los formados a partir del ácido glutámico y piroglutámico endógeno de la muestra. Una transformación análoga ocurre para la asparagina, lo cual hace inexacta la determinación del contenido de ácidos glutámico y aspárticos en la muestra. Para el análisis particular de estos aminoácidos es aconsejable la obtención de ésteres butil formamidenos, más estables que sus correspondientes ésteres butílicos (35).

Los aminoácidos que contienen grupos -SH libres como la homocisteína y la cisteína forman fácilmente enlaces disulfuros entre ellos o con moléculas de proteínas. Su análisis por MS/MS se realiza de forma independiente adicionando un agente reductor en la mezcla de extracción (36).

Algunos laboratorios informan el análisis de aminoácidos y acilcarnitinas sin realizar su derivatización, evitando la degradación de los analitos más sensibles y con la posibilidad de cuantificar especies isobáricas. Sin embargo, para esto utilizan sistemas de cromatografía líquida adicionales acoplado a la MS/MS (37). Otra variante consiste en la extracción acuosa de los analitos de la muestra de sangre seca, seguida de un paso de ultrafiltración y desalado antes de su introducción al espectrómetro empleando cartuchos de extracción en fase sólida o sistemas de cromatografía líquida (38) (39).

Ionización y fragmentación

El análisis de aminoácidos y acilcarnitinas por MS/MS es posible mediante el empleo de la electronebulización como método de ionización. Este es un método "suave", ya que origina poca fragmentación colateral durante el proceso de ionización y permite analizar estas moléculas polares, no volátiles y térmicamente lábiles, que no pueden ser procesadas directamente por GC-MS (40). En ambos casos el análisis de masa se realiza mediante el seguimiento de iones positivos (41).

Luego del proceso de extracción y derivatización, la muestra se reconstituye en una mezcla de agua/acetoneitrilo y se inyectan alrededor de 10 mL en el flujo continuo de este solvente (20–50 mL/min) hacia el interior del espectrómetro, con un período de inyección entre muestras de alrededor de dos minutos. La adición

de ácido fórmico a la fase móvil permite aumentar la eficiencia de ionización de moléculas anfotéricas como los aminoácidos y las acilcarnitinas (38). El suministro del solvente puede ser a través de un sistema de cromatografía líquida o más frecuentemente mediante una bomba de jeringa, método llamado análisis por inyección fluida (42).

Esta metodología posibilita analizar entre 200-400 muestras en cada equipo por día, lo cual resulta muy conveniente dado el elevado volumen de las mismas que se genera durante un programa de tamiz neonatal (28) (43).

Recientemente se ha informado el empleo de otros métodos alternativos de ionización para el análisis de

aminoácidos extraídos de sangre seca sin derivatizar, posibilitando discriminar entre individuos sanos y enfermos. Este es el caso de la ionización por desorción y electronebulización y el de ionización y desorción con láser asistida por una matriz (44) (45).

Una vez ionizada la muestra, ocurre la fragmentación de los iones moleculares bajo una energía de aproximadamente 70 eV y se realiza el análisis por MS/MS de las especies de acilcarnitinas y aminoácidos mediante diferentes funciones de barrido (Figura 2). Dichas funciones pueden ser utilizadas de forma consecutiva o alterna durante el tiempo que la muestra fluye a través de la fuente iónica, permitiendo la identificación simultánea de metabolitos de naturaleza química diferente (46).

| Ajuste MS1 | Fragmentos iónicos (disociación inducida por colisión) | Ajuste MS2 | Función de análisis |
|---|---|---|---------------------------------|
| $[M + H]^+$ Seleccionar | $A^+ (B^+) C^+$ | A^+, B^+, C^+ Barrido m/z (A - C) | Barrido de ión producto |
| $[M + H]^+$ Seleccionar | $A^+ (B^+) C^+$ | A^+ Seleccionar m/z (A) | Monitoreo de reacción selectiva |
| $[M + H]^+$ $[N + H]^+$ Barrido m/z ($M^* - N$) | $A^+ (B^+) C^+$ $A^+ (D^+) E^+$ | A^+ Seleccionar m/z (A) | Barrido de ión precursor |
| $[M + H]^+$ $[N + H]^+$ Barrido m/z ($M^* - N$) | $A^+ (B^+) C^+$ $F^+ (D^+) E^+$ Fragmento neutro (NL) | $[M + H]^+ - X (A^+, B^+, C^+) = NL$ $[N + H]^+ - X (F^+, D^+, E^+) = NL$ Barrido m/z $[Y (M, N) + H]^+ - X = NL$ | Barrido de pérdida neutra |

Figura 2. Representación esquemática de diferentes funciones de barrido por espectrometría de masas en tandem. Barrido de ión producto: el primer analizador de masas (MS1) realiza un barrido de la muestra para seleccionar al ión precursor especificado ($[M+H]^+$). Este ión pasa a la cámara de colisión y se induce su disociación en fragmentos iónicos (A^+, B^+, C^+) que son separados y analizados por otro analizador de masas ubicado a continuación (MS2). Esta función permite detectar las diferentes especies iónicas producto de un mismo analito y obtener el patrón de fragmentación específico del mismo. Este tipo de función es muy importante para el análisis estructural de un analito y determinar los fragmentos iónicos más representativos. Monitoreo de reacción selectiva: tanto MS1 como MS2 analizan solo los iones precursores y fragmentos iónicos previamente especificados. Cuando se seleccionan varios fragmentos a partir de un único precursor se denomina como monitoreo de reacción múltiple. Este tipo de función es la más sensible para la detección de un analito y por lo tanto es muy útil para su cuantificación precisa. Barrido de ión precursor: MS1 solo permite el paso hacia la cámara de colisión de aquellos iones precursores ($[M+H]^+$ y $[N+H]^+$) cuya disociación produzca el fragmento iónico especificado (A^+) y analizado en el MS2. Este tipo de análisis permite detectar simultáneamente un grupo de analitos que produzcan un mismo ión como las acilcarnitinas. Barrido de pérdida neutra: MS1 y MS2 se ajustan de tal forma que ambos analizan en paralelo los iones precursores y sus fragmentos iónicos detectando una diferencia de unidades de masa entre ellos equivalente a la pérdida de un fragmento neutro (NL) en el ión precursor. Esta función permite monitorear un grupo de analitos cuya disociación genere una molécula neutra como son la mayoría de los α -aminoácidos.

La fragmentación de los iones moleculares de las acilcarnitinas, con una longitud de entre 2 a 20 átomos de carbono, provoca la pérdida del ácido graso, trimetilamina y butano (para las especies butil-éster derivadas) originando un ión producto con una relación masa/carga (m/z) de 85 (19). Este fragmento iónico común permite el análisis diferencial de las acilcarnitinas derivadas de ácidos grasos saturados, insaturados, hidroxílicos y dicarboxílicos mediante un barrido de ión precursor (47) (48). Los iones moleculares de carnitina libre originan igualmente el ión producto de m/z 85 por lo que se incluye en este análisis. Sin embargo, la carnitina libre derivatizada también puede ser analizada por un barrido de ión precursor mediante el seguimiento del ión producto de m/z 103. Este contiene el grupo $-OH$ alifático cuya disociación de la molécula requiere una mayor energía, por lo que generalmente se encuentra en mayor abundancia (49).

La fragmentación de los iones moleculares de los α -aminoácidos, a diferencia de los γ - y δ -aminoácidos, ácidos grasos y acilcarnitinas, provoca la pérdida de una molécula neutra de ácido fórmico (56 Da) o de ácido butil-fórmico (102 Da) para los butil-éster derivados. Esto posibilita el análisis selectivo, mediante un barrido de pérdida neutra, de aminoácidos neutros como la fenilalanina, tirosina, leucina, alanina, valina y metionina (8) (11).

Los α -aminoácidos como la arginina, citrulina y ornitina que presentan un grupo funcional básico de fácil fragmentación se analizan mediante un barrido diferente. Para la citrulina y la ornitina se emplea un barrido de pérdida neutra de 119 Da que incluye el fragmento de ácido butil-fórmico más una molécula de amonio, mientras que la arginina se detecta mediante un barrido de pérdida neutra de 161 Da equivalente al grupo arginino (29). Los aminoácidos isómeros como la leucina, isoleucina, allo-isoleucina e hidroxiprolina comparten un ión molecular de m/z 188 por lo que no se pueden analizar de forma selectiva mediante esta función de barrido (50). Esto también ocurre con la alanina y la sarcosina (m/z 146), la prolina y la asparagina (m/z 172) y la glutamina y la lisina (m/z 186) (29).

Estas funciones de barrido son las que con mayor frecuencia se emplean durante la detección de EIM por MS/MS como parte de su tamiz neonatal. Sin embargo, existen determinados aminoácidos y otros metabolitos de interés que por sus características estructurales presentan un patrón de fragmentación diferente y no pueden ser detectados con precisión en este análisis. En estos casos se emplea un barrido de monitoreo de reacción múltiple en el cual se especifican los principales iones productos y moléculas neutras originadas por la fragmentación de cada especie del ión molecular. Esta función posibilita optimizar los parámetros del espectrómetro de masa para incrementar la sensibilidad y la selectividad en la detección de cada analito (51).

Conclusiones

Durante estos últimos 10 años se ha producido un acelerado desarrollo en el diagnóstico y el tamiz de los EIM gracias a la utilización de la MS/MS. De la detección de sólo cinco o seis enfermedades de forma individual, que por décadas fue la práctica habitual, los especialistas se vieron, a comienzos de este siglo, con la posibilidad de detectar de forma simultánea más de 40 enfermedades en el neonato. Numerosos centros de tamiz e instituciones nacionales alrededor del mundo ya han expandido sus programas neonatales incluyendo un mayor número de enfermedades a detectar mediante la utilización de esta tecnología (52). En otros casos, aún cuando no se ha producido oficialmente esta expansión, se encuentran en desarrollo programas pilotos o se han creado comisiones de expertos para evaluar su aplicación (53-56). Incluso, se han reemplazado pruebas de tamiz clásicas para algunas enfermedades, como la fenilcetonuria, por su detección mediante MS/MS al probarse una mayor sensibilidad y especificidad por este método (57).

Desde el punto de vista técnico existe una relativa homogeneidad en los métodos de procesamiento analítico de las muestras; las mayores variaciones se encuentran en la interpretación de los resultados a partir de los perfiles o analitos que cada laboratorio considere apropiados para señalar un resultado como alterado. En este sentido, la implementación de sistemas de control de la calidad, institucionales e internacionales, representa un elemento imprescindible para garantizar la confiabilidad del diagnóstico final y la comparación de resultados entre diferentes programas de tamiz neonatal (58-60).

CORRESPONDENCIA

DERBIS CAMPOS HERNÁNDEZ
Centro Nacional de Genética Médica
Campus del ICBP Victoria de Girón
Calle 146 No. 3102, Playa
LA HABANA 16, C.P. 1600. Cuba
Teléfono: 208 9991
E-mail: derbisch@cngen.sld.cu

Referencias bibliográficas

1. Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Paediatrics* 1963; 32(3): 338-43.
2. Pämpols T. Neonatal screening. *Turk J Pediatr* 2003; 45(2): 87-94.
3. Dhondt JL. Expanded newborn screening: social and ethical issues. *J Inher Metab Dis* 2010; 33(Suppl 2): S211-17.

4. Rinaldo P, Hahn SH, Matern D. Inborn errors of amino acid, organic acid, and fatty acid metabolism. En: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, editors. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 4th. ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2005. p. 2207-47.
5. Lo SF, Young V, Rhead WJ. Identification of urine organic acids for the detection of inborn errors of metabolism using urease and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Methods Mol Biol* 2010; 603: 433-43.
6. Wajner M, Raymond K, Barschak A, Luft AP, Ferreira G, Domingues G, *et al.* Detection of organic acidemias in Brazil. *Arch Med Res* 2002; 33(6): 581-5.
7. Kuhara T. Diagnosis and monitoring of inborn errors of metabolism using urease-pretreatment of urine, isotope dilution, and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 781(1-2): 497-517.
8. Yu CL, Gu XF. Newborn screening of inherited metabolic diseases by *tandem* mass spectrometry. *Beijing Da Xue Xue Bao* 2006; 38(1): 103-6.
9. Wilcken B, Wiley V. Newborn screening. *Pathology* 2008; 40(2): 104-15.
10. De Jesús VR, Chace DH, Lim TH, Mei JV, Hannon WH. Comparison of amino acids and acylcarnitines assay methods used in newborn screening assays by *tandem* mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 2010; 411(9-10): 684-9.
11. Chace DH, Kalas TA. A biochemical perspective on the use of *tandem* mass spectrometry for newborn screening and clinical testing. *Clin Biochem* 2005; 38(4): 296-309.
12. Jones PM, Bennett MJ. Urine organic acid analysis for inherited metabolic disease using gas chromatography-mass spectrometry. *Methods Mol Biol* 2010; 603: 423-31.
13. Chernushevich IV, Loboda AV, Thomson BA. An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2001; 36(8): 849-65.
14. McDade TW, Williams S, Snodgrass JJ. What a drop can do: dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research. *Demography* 2007; 44(4): 899-925.
15. Mei JV, Alexander JR, Adam BW, Hannon WH. Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. *J Nutr* 2001; 131(5): 1631S-6S.
16. Torres E, Baloy A, Frómata A, Fernández L. Determinación de fenilalanina y galactosa total a partir de una muestra de sangre seca en papel de filtro: aplicación al tamizaje neonatal. *Biomédica* 2002; 22(1): 22-9.
17. Espada M, Dulín E. Procedimiento para la obtención y recogida de especímenes de sangre sobre papel de filtro en los programas de detección precoz neonatal de errores congénitos del metabolismo. *Química Clínica* 2001; 20: 81-8.
18. Khalid JM, Oerton J, Besley G, Dalton N, Downing M, Green A, *et al.* Relationship of octanoylcarnitine concentrations to age at sampling in unaffected newborns screened for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Clin Chem* 2010; 56(6): 1015-21.
19. Strnadová KA, Holub M, Mühl A, Heinze G, Ratschmann R, Mascher H, *et al.* Long-term stability of amino acids and acylcarnitines in dried blood spots. *Clin Chem* 2007; 53(4): 717-22.
20. Chace DH, Adam BW, Smith SJ, Alexander JR, Hillman SL, Hannon WH. Validation of accuracy-based amino acid reference materials in dried-blood spots by *tandem* mass spectrometry for newborn screening assays. *Clin Chem* 1999; 45(8 Pt 1): 1269-77.
21. Trinh MU, Blake J, Harrison JR, Gerace R, Ranieri E, Fletcher JM, *et al.* Quantification of glutamine in dried blood spots and plasma by *tandem* mass spectrometry for the biochemical diagnosis and monitoring of ornithine transcarbamylase deficiency. *Clin Chem* 2003; 49(4): 681-4.
22. Chace DH, Millington DS, Hillman SL. The role of *tandem* mass spectrometry in reducing the number of false positive and false negative results in the diagnosis of metabolic disease from dried blood spots. En: Pass K, Levy H, editors. *Early hospital discharge: impact on newborn screening*. Council of regional networks for genetics services. Atlanta: Emory University School of Medicine; 1995. p. 272-83.
23. Fingerhut R, Ensenauer R, Röschinger W, Arnecke R, Olgemöller B, Roscher AA. Stability of acylcarnitines and free carnitine in dried blood samples: implications for retrospective diagnosis of inborn errors of metabolism and neonatal screening for carnitine transporter deficiency. *Anal Chem* 2009; 81(9): 3571-5.
24. Santer R, Fingerhut R, Lässker U, Wightman PJ, Fitzpatrick DR, Olgemöller B, *et al.* *Tandem* mass spectrometric determination of malonylcarnitine: diagnosis and neonatal screening of malonyl-CoA decarboxylase deficiency. *Clin Chem* 2003; 49(4): 660-2.
25. Kobayashi H, Hasegawa Y, Endo M, Purevsuren J, Yamaguchi S. A retrospective ESI-MS/MS analysis of newborn blood spots from 18 symptomatic patients with organic acid and fatty acid oxidation disorders diagnosed either in infancy or in childhood. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30(4): 606.
26. Moammar H, Cheriyan G, Mathew R, Al-Sanna N. Incidence and patterns of inborn errors of metabolism in the Eastern Province of Saudi Arabia, 1983-2008. *Ann Saudi Med* 2010; 30(4): 271-7.
27. 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(3): 321-4.
28. Garg U, Dasouki M. Expanded newborn screening of inherited metabolic disorders by *tandem* mass spectrometry: clinical and laboratory aspects. *Clin Biochem* 2006; 39(4): 315-32.
29. Adam BW, Alexander JR, Smith SJ, Chace DH, Loeber JG, Elvers LH, *et al.* Recoveries of phenylalanine from two sets of dried-blood-spot reference materials: prediction from hematocrit, spot volume, and paper matrix. *Clin Chem* 2000; 46(1): 126-8.

30. Holub M, Tuschl K, Ratschmann R, Strnadová KA, Mühl A, Heinze G, *et al.* Influence of hematocrit and localisation of punch in dried blood spots on levels of amino acids and acylcarnitines measured by *tandem* mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 2006; 373(1-2): 27-31.
31. Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. Use of *tandem* mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clin Chem* 2003; 49(11): 1797-817.
32. Rashed MS, Rahbeeni Z, Ozand PT. Application of electrospray *tandem* mass spectrometry to neonatal screening. *Semin Perinatol* 1999; 23(2): 183-93.
33. Manning NJ, Maloney M, Olpin SE, Pollitt RJ, Bonham JR, Heap SJ, *et al.* Analysis of dicarboxylic-acylcarnitines by electrospray-tandem mass spectrometry (ESI-MSMS) without derivatisation. Implications for neonatal screening and routine diagnosis. *J Inherit Metab Dis* 2001; 24(1 Suppl):6.
34. Schulze A, Schmidt C, Kohlmüller D, Hoffmann GF, Mayatepek E. Accurate measurement of free carnitine in dried blood spots by isotope-dilution electrospray tandem mass spectrometry without butylation. *Clin Chim Acta* 2003; 335(1-2): 137-45.
35. Johnson DW. Analysis of amino acids as formamidene butyl esters by electrospray ionization *tandem* mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2001; 15(22): 2198-205.
36. Turgeon CT, Magera MJ, Cuthbert CD, Loken PR, Gavrillov DK, Tortorelli S, *et al.* Determination of total homocysteine, methylmalonic acid, and 2-methylcitric acid in dried blood spots by *tandem* mass spectrometry. *Clin Chem* 2010; 56(11): 1686-95.
37. Zoppa M, Gallo L, Zacchello F, Giordano G. Method for the quantification of underivatized amino acids on dry blood spots from newborn screening by HPLC-ESI-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006; 83(1-2): 267-73.
38. Bodamer OA, Mühl A. Analysis of acylcarnitine ester for the diagnosis of inborn errors of metabolism using *tandem* mass-spectrometry. *Chem Month* 2005; 136: 1293-7.
39. Nagy K, Takáts Z, Pollreis F, Szabó T, Vékey K. Direct tandem mass spectrometric analysis of amino acids in dried blood spots without chemical derivatization for neonatal screening. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2003; 17(9): 983-90.
40. Ho CS, Lam CW, Chan MH, Cheung RC, Law LK, Lit LC, *et al.* Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin Biochem Rev* 2003; 248(1): 3-12.
41. Carpenter KH, Wiley V. Application of *tandem* mass spectrometry to biochemical genetics and newborn screening. *Clin Chim Acta* 2002; 322(1-2): 1-10.
42. Shigematsu Y, Hirano S, Hata I, Tanaka Y, Sudo M, Sakura N, *et al.* Newborn mass screening and selective screening using electrospray *tandem* mass spectrometry in Japan. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 776(1): 39-48.
43. Schulze A, Lindner M, Kohlmüller D, Olgemöller K, Mayatepek E, Hoffmann GF. Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-*tandem* mass spectrometry: results, outcome, and implications. *Pediatrics* 2003; 111(6 Pt 1): 1399-406.
44. Corso G, Paglia G, Garofalo D, D'Apolito O. Neutral loss analysis of amino acids by desorption electrospray ionization using an unmodified *tandem* quadrupole mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2007; 21(23): 3777-84.
45. Gogichaeva NV, Williams T, Alterman MA. MALDI TOF/TOF *tandem* mass spectrometry as a new tool for amino acid analysis. *J Am Soc Mass Spectrom* 2007; 18(2): 279-84.
46. Wilcken B, Wiley V, Hammond J, Carpenter K. Screening newborns for inborn errors of metabolism by *tandem* mass spectrometry. *N Engl J Med* 2003; 348(23): 2304-12.
47. Chace DH, DiPerna JC, Mitchell BL, Sgroi B, Hofman LF, Naylor EW. Electrospray *tandem* mass spectrometry for analysis of acylcarnitines in dried postmortem blood specimens collected at autopsy from infants with unexplained cause of death. *Clin Chem* 2001; 47(7): 1166-82.
48. Kushnir MM, Komaromy-Hiller G, Shushan B, Urry FM, Roberts WL. Analysis of dicarboxylic acids by *tandem* mass spectrometry. High-throughput quantitative measurement of methylmalonic acid in serum, plasma, and urine. *Clin Chem* 2001; 47(11): 1993-2002.
49. Osorio JH, Pourfarzam M. Plasma free and total carnitine measured in children by tandem mass spectrometry. *Braz J Med Biol Res* 2002; 35(11): 1265-71.
50. Oglesbee D, Sanders KA, Lacey JM, Magera MJ, Casetta B, Strauss KA, *et al.* Second-tier test for quantification of alloisoleucine and branched-chain amino acids in dried blood spots to improve newborn screening for maple syrup urine disease (MSUD). *Clin Chem* 2008; 54(3): 542-9.
51. Qu J, Wang Y, Luo G, Wu Z, Yang C. Validated quantitation of underivatized amino acids in human blood samples by volatile ion-pair reversed-phase liquid chromatography coupled to isotope dilution tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2002; 74(9): 2034-40.
52. Campos Hernández D. Tamizaje neonatal por espectrometría de masas en tándem: actualización. *Rev Panam Salud Pública* 2010; 27(4): 309-18.
53. Loukas YL, Soumelas GS, Dotsikas Y, Georgiou V, Molou E, Thodi G, *et al.* Expanded newborn screening in Greece: 30 months of experience. *J Inherit Metab Dis* 2010 Aug 19. Disponible en URL: <http://www.springerlink.com/content/y16v48686h2t1448/> (Fecha de acceso: 25 de octubre de 2010).
54. Torres-Sepúlveda MR, Martínez-de Villarreal LE, Esmer C, González-Alanís R, Ruiz-Herrera C, Sánchez-Peña A, *et al.* Tamiz metabólico neonatal por espectrometría de masas en tándem: dos años de experiencia en Nuevo León, México. *Salud Publica Mex* 2008; 50(3): 200-6.
55. Marín Soria JL, Aldamiz-Echevarria L, Castiñeiras Ramos DE, Dalmau Serra J, Fernández Sánchez A, Gon-

- zález Lamuño D, *et al.* Programas de cribado neonatal en España: actualización y propuestas de futuro. Asociación Española para el Estudio de Errores Congénitos del Metabolismo; Asociación Española de Pediatría, Sección de Errores Innatos del Metabolismo; Sociedad Española de Química Clínica y Patología Molecular, Comisión de Diagnóstico Perinatal. 31 de mayo de 2009. Disponible en URL: <http://www.ae3com.org/noticias/programascribado-neonatal.pdf> (Fecha de acceso: 16 de febrero de 2010).
56. Yamaguchi S. Newborn screening in Japan: restructuring for the new era. *Ann Acad Med Singapore* 2008; 37(12 Suppl): 13-5.
 57. Chace DH, Millington DS, Hillman SL. The role of tandem mass spectrometry in reducing the number of false positive and false negative results in the diagnosis of metabolic disease from dried blood spots. En: Pass K, Levy H, editors. *Early hospital discharge: impact on newborn screening*. Atlanta: Emory University School of Medicine; 1995. p. 272-83.
 58. De Jesús VR, Mei JV, Bell CJ, Hannon WH. Improving and assuring newborn screening laboratory quality worldwide: 30-year experience at the Centers for Disease Control and Prevention. *Semin Perinatol* 2010; 34(2): 125-33.
 59. Lindner M, Hoffmann GF, Matern D. Newborn screening for disorders of fatty-acid oxidation: experience and recommendations from an expert meeting. *J Inher Metab Dis* 2010; 33(5): 521-6.
 60. Centers for Disease Control and Prevention. Newborn screening quality assurance program. Quality control midyear report. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Association of Public Health Laboratories. 2010 Jun; 21 (1). Disponible en URL: http://www.cdc.gov/labstandards/pdf/nsqap/nsqap_qc-midyearreport_2010.pdf (Fecha de acceso: 25 de agosto de 2010).

Aceptado para su publicación el 5 de agosto de 2011