
EL TAMIZAJE METABÓLICO EN EL DIAGNÓSTICO DE LOS ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO

José Henry Osorio¹
Nelsy Loango Chamorro²
Patricia Landázuri³

RESUMEN

Los errores innatos del metabolismo pueden debutar clínicamente desde el nacimiento hasta la edad adulta. Sin embargo, muchas alteraciones pueden ser manejadas si se realiza diagnóstico precoz, evitando lesiones severas en algunos sistemas del organismo. La presente revisión analiza la literatura científica disponible con relación al tamizaje de estas enfermedades mediante espectrometría de masas en tándem.

Palabras clave: enfermedades hereditarias, tamizaje metabólico, espectrometría de masas en tándem.

METABOLIC SCREENING FOR THE DIAGNOSIS OF METABOLIC INBORN ERRORS

ABSTRACT

Clinical manifestations of inherited inborn errors can manifest themselves from birth to adulthood. However, many disorders can be treated if an early diagnosis is performed, in order to avoid severe lesions in some organic systems. The present review analyzes the scientific literature related to the screening of these diseases by means of tandem mass spectrometry.

Key words: ereditary diseases, metabolic screening, tandem mass spectrometry.

¹ Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Laboratorio de Patología Molecular. Universidad de Caldas. Correspondencia: Universidad de Caldas, Departamento de Ciencias Básicas de la Salud. Calle 65 No. 26-10. Manizales. e-mail: jose.osorio_o@ucaldas.edu.co

² Facultad de Ciencias Básicas, Programa de Biología. Universidad del Quindío.

³ Grupo de Investigación en Enfermedades Cardiovasculares y Metabólicas. Laboratorio de Bioquímica y Genética. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad del Quindío.

INTRODUCCIÓN

Los Errores Innatos del Metabolismo (EIM) son enfermedades causadas por mutaciones genéticas que dan origen a disfunciones enzimáticas de carácter específico en su mayoría del tipo autosómico recesivo, por lo que cabe esperar que 25% de la descendencia resulte afectada (1). Se han descrito más de 300 enfermedades metabólicas congénitas identificadas como errores innatos del metabolismo de aminoácidos, ácidos orgánicos, hidratos de carbono y lípidos; su diagnóstico precoz favorece la intervención médica temprana, lo que permite prevenir o reducir significativamente los síntomas clínicos asociados, como retardo mental, crisis metabólicas agudas, convulsiones, o incluso la muerte súbita infantil (2).

Desde el punto de vista fisiopatológico, los EIM presentes en el período neonatal pueden dividirse en tres grupos: 1) Aminoacidopatías, acidurias orgánicas, defectos del ciclo de la urea y alteraciones del metabolismo de los hidratos de carbono, todos caracterizados por intoxicación endógena, la cual se manifiesta tras un período libre de síntomas, después del nacimiento en neonatos a término; en la mayoría de estos trastornos, es posible establecer un tratamiento. 2) Los errores congénitos del metabolismo que causan alteraciones en la producción de energía o en su utilización, que afectan fundamentalmente a tejidos como el hígado, el miocardio, el músculo, o el cerebro; los trastornos de este grupo se caracterizan por el predominio de la hipoglucemia, como es el caso de las glucogenosis, el hiperinsulinismo, las alteraciones de la oxidación mitocondrial de ácidos grasos y las acidemias lácticas congénitas. 3) Enfermedades que alteran la síntesis o el catabolismo de moléculas complejas; en su mayoría, carecen de tratamiento, como las enfermedades lisosomales y las peroxisomales, entre otras (3).

El tamizaje neonatal se define como un procedimiento que se realiza para descubrir

aquellos recién nacidos aparentemente sanos, pero que ya tienen una enfermedad que con el tiempo ocasionará daños graves, irreversibles, antes de que éstos se manifiesten, con la finalidad de poder tratarla, evitando o disminuyendo sus consecuencias (4).

La historia del estudio de los recién nacidos buscando errores del metabolismo comenzó con las ideas de Garrod en 1902, quien señaló la posibilidad de la herencia de defectos bioquímicos específicos en el metabolismo (5). La fenilcetonuria, anomalía descrita en 1934, fue la primera enfermedad que se buscó identificar en forma temprana durante la infancia, inicialmente a través de tamizaje de la orina, utilizando cloruro férrico (6). En 1961, el Dr. Robert Guthrie desarrolló la prueba de tamizaje recolectando gotas de sangre en papel filtro para la detección de fenilcetonuria. La prueba se basa en un ensayo de inhibición bacteriana, utilizando un antimetabolito análogo de la fenilalanina (7). El mismo principio fue empleado en años posteriores, para identificar otras alteraciones del metabolismo de la histidina y otros aminoácidos como: metionina, lecitina y tirosina (8). En 1963, fueron reportados los resultados del diagnóstico de errores congénitos del metabolismo en la etapa perinatal con el uso de un método rápido, que se podría utilizar como prueba de tamizaje. A raíz de estos hallazgos, tomó interés la implementación de las pruebas de tamizaje neonatal (9). En 1973 se estableció el primer programa de Tamizaje para hipotiroidismo congénito, en Canadá (10).

DIAGNÓSTICO DE LOS ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO

Existe una amplia gama de técnicas bioquímicas para el estudio de los errores innatos del metabolismo. Ante la sospecha clínica, los exámenes de sangre preliminares más valiosos para el análisis de posibles errores congénitos del metabolismo incluyen: mediciones de glucosa, electrolitos, BUN, creatinina, lactato, amonio,

carnitina, y enzimas tales como AST, ALT y, especialmente, CK. En algunos exámenes de rutina, como el urianálisis, se debe buscar la presencia o ausencia de cuerpos cetónicos, y hemoglobina en ausencia de glóbulos rojos, lo que podría indicar la presencia de mioglobina, como consecuencia de un proceso rabiomolítico. Las pruebas adicionales específicas para ciertas enfermedades incluyen medidas de aminoácidos en sangre y orina, ácidos grasos libres en el plasma, perfiles de carnitina acilcarnitinas en la sangre y ácidos orgánicos en la orina (11).

ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM

Hasta ahora, se han desarrollado muchos métodos para el estudio de las alteraciones del metabolismo, pero entre los más avanzados se cuenta actualmente con la espectrometría de masas en tándem (MS/MS), mediante la cual pueden detectarse más de 20 alteraciones del metabolismo; se utiliza incluso para el cribado básico y para la confirmación posterior de dichas alteraciones, así como para la monitorización de los tratamientos instaurados (12). Esta técnica tiene como ventajas la utilización de sangre impregnada en papel de filtro, la rapidez de preparación y análisis, y la alta sensibilidad (13). Las bases del análisis por espectrometría de masas en tándem son la producción de especies moleculares intactas a partir de una mezcla compleja, a través de una técnica de ionización suave, seguida por la identificación de fragmentos moleculares de componentes específicos inducidos con moléculas neutras de argón o nitrógeno. El uso de dos espectrómetros de masas unidos en tándem y separados por una celda de colisión, en la cual tiene lugar la fragmentación secundaria, permite el análisis altamente selectivo y específico de varios aminoácidos y acilcarnitinas (14). Las separaciones cromatográficas son innecesarias, porque la separación y el análisis tienen lugar simultánea y completamente dentro del equipo. Esta tecnología, además, permite la reducción

en el límite de detección a 1 nM/mL de sangre, y hace posible el uso de especímenes secos en papel de filtro (15). La versatilidad de este método, además, permite el análisis de una gran variedad de compuestos químicos, incluidos grupos de α -aminoácidos y aminoácidos básicos, simplemente mediante un cambio en los parámetros de monitorización (16).

La aplicación de la espectrometría de masas en tándem en el diagnóstico de los EIM se relaciona principalmente con el tamizaje de la oxidación mitocondrial de ácidos grasos, acidurias orgánicas y aminoacidopatías (17). La L-carnitina y las acilcarnitinas contienen un grupo funcional de amonio cuaternario, que hace que se comporten como iones positivos preformados (cationes) polares y no volátiles (18). Los butilésteres derivativos y no derivativos de la carnitina y las acilcarnitinas muestran un producto iónico común con una masa de 85 Da, lo cual permite identificarlos (19). Sin embargo, la identificación de carnitina como precursor de este ion empleando sangre entera en papel de filtro es todavía un tema de controversia, por lo que algunas técnicas se han diseñado para la valoración de la carnitina libre y total en el plasma por MS/MS (20, 21).

El análisis de aminoácidos por MS/MS es posible gracias a que los α -aminoácidos, después de butilarse, se ionizan óptimamente dentro del espectrómetro de masas. Después de someter estos iones a disociación por colisión inducida –al chocar con un gas, generalmente argón o neón–, se genera butilformato (102 Da), el cual es común a todos los α -aminoácidos; el butilformato se pierde dentro del proceso, debido a que es una molécula –sin carga– y no un ion. Este proceso, conocido como pérdida neutra, permite la selección de estos aminoácidos (glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, tirosina y ácido glutámico, entre otros), para posteriormente analizar su espectro de masas (22).

Otros aminoácidos importantes en el estudio

de los EIM (aminoácidos básicos) se pueden detectar igualmente, debido a que contienen un grupo amino lábil que se fragmenta, a la vez, con el butilformato, y produce una fragmentación neutra de 102 Da (butil formato) + 17 Da (amonio), para una pérdida combinada

de 119 Da. Las Tablas 2 y 3 muestran algunos de los hallazgos bioquímicos más importantes de las aminoacidopatías y acidurias orgánicas detectables por cribado neonatal mediante MS/MS (23, 24).

Tabla 1. Principales hallazgos bioquímicos de las aminoacidurias detectables en el tamizaje neonatal por MS/MS.

| Nombre común | Deficiencia enzimática | Aminoácidos en sangre por HPLC | Ácidos orgánicos en orina por GC-MS | Marcador metabólico por MS/MS en sangre seca en papel de filtro |
|---------------------------------------|--|---|---|---|
| Argininemia | | Arginina ↑ | - | Arginina |
| Citrulinemia | | Citrulina ↑ | | Citrulina |
| Aciduria Arginosuccínica | Argininosuccinato liasa | Ácido arginosuccínico | | Citrulina |
| Homocistinuria | Cistationina β-sintasa | Homocistina ↑ Metionina ↑ Cistina ↓ Cistationina ↓ | - | Metionina |
| | Metilentetrahidrofolato reductasa | Homocistina ↑ Metionina N -↓ | | |
| | Metionina sintasa | Homocistina ↑ Metionina N -↓ | | |
| Hipermetioninemia | | Metionina ↑ | | Metionina |
| Enfermedad de orina de jarabe de arce | Complejo de deshidrogenasas de cetoácidos de cadena ramificada | Leucina ↑ Isoleucina ↑ Valina ↑ Aloisoleucina ↑ | hidroxiácidos (α-hidroxisovalérico) Cetoácidos | Leucina Isoleucina Valina |
| Hiperglicinemia no cetótica | Sistema de escisión de la glicina | Glicina ↑ | - | Glicina |
| Fenilcetonuria | Fenilalanina hidroxilasa | Fenilalanina ↑ Tirosina ↓ | | Fenilalanina |
| Tirosinemia tipo I | Fumarilacetoacetato hidroxilasa | Tirosina ↑ Metionina ↑ Fenilalanina ↑ | 4-OH-fenilderivados Succinilacetoacético Succinilacetona | Tirosina |
| Tirosinemia tipo II | Tirosinoamino-transferasa citosólica | Tirosina ↑ | Perahidroxifenilpirúvico Parahidroxifenilacético n-acetiltirosina p-tiramina P-OH-fenil-láctico | Tirosina |

Abreviaturas: ↑ aumentado, ↓ disminuido.

Tabla 2. Principales hallazgos bioquímicos de las acidurias orgánicas detectables en el tamizaje neonatal por MS/MS.

| Nombre común | Defecto enzimático | Aminoácidos en sangre por HPLC | Ácidos orgánicos en orina | Marcador metabólico por MS/MS en sangre seca en papel de filtro |
|--------------------------------------|--|--------------------------------|--|---|
| Aciduria glutátrica I | Glutaril-CoA-deshidrogenasa | - | Glutárico 3-OH-glutárico | C _{5DC} |
| Aciduria glutátrica II | Múltiple de acil-CoA deshidrogenasas | - | Isovalerilglicina Isobutirilglicina Hexanoilglicina Suberilglicina | C ₄ , C ₅ , C _{5DC} , C ₈ , C ₁₀ , C ₁₄ |
| HMG-CoA lyasa | 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA liasa | - | 3-HMG-3-metilglutacónico 3-OH-glutárico | C _{5OH} 3-metil-C _{5DC} |
| Isobutiril-CoA deshidrogenasa | Isobutiril-CoA deshidrogenasa | - | 3-OH-isobutírico | C ₄ |
| Acidemia isovalérica | Isovaleril-CoA-deshidrogenasa | - | 3-OH-isovalérico Isovalerilglicina | C ₅ |
| β-cetotiolasa | 3-metilacetoacetyl-CoA-tiolasa | - | 2-metilacetoacético Tigililglicina 3-OH-isobutírico | C _{5OH} |
| 3-metilcrotonil glicinuria | metilcrotonil-CoA carboxilasa | - | 3-OH-isovalérico 3-metil-crotonilglicina | C _{5OH} |
| Aciduria metilglutacónica | 3-metilglutaconil-CoA-hidratasa | - | 3-metilglutacónico 3-metilglutárico 3-OH-isovalérico | C _{5OH} |
| Acidemia metilmalónica | Metilmalonil-CoA-mutasa | Glicina ↑ Alanina ↑ | Metilmalónico Propiónico 3-OH-propiónico Metilcitrato | C ₃ |
| Deficiencia Múltiple de carboxilasas | Holocarboxilasa-sintasa Biotinidasa | - | 3-OH-isovalérico 3-OH-propiónico Metilcitrato 3-metil-crotonil-glicina Láctico | C _{5OH} C _{3OH} |
| Acidemia propiónica | Propionil-CoA-carboxilasa | Glicina ↑ Alanina ↑ | Propiónico 3-OH-propiónico Metilcitrato | C ₃ |

Abreviaturas: C_{5DC} glutarilcarnitina, ↑ aumentado, ↓ disminuido.

TAMIZAJE METABÓLICO POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM PARA LOS ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO

Actualmente se realiza tamizaje metabólico por espectrometría de masas en tándem para cerca de 30 errores innatos del metabolismo, principalmente para deficiencias enzimáticas relacionadas con la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, aminoacidopatías y acidurias orgánicas (Tablas 1, 2 y 3) (25-35).

La espectrometría de masas en tándem es utilizada también para el diagnóstico precoz de la galactosemia, las enfermedades por colestasis hepatobiliar, y las enfermedades de los peroxisomas. Además, ha sido diseñado un mecanismo mediante el uso de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) a la espectrometría de masas en tándem para el estudio de los intermediarios de la degradación de purinas y pirimidinas (36, 37). La Tabla 4 muestra los marcadores metabólicos detectados para este tipo de alteraciones

Tabla 3. Principales hallazgos bioquímicos de errores congénitos de la β -oxidación mitocondrial detectables por MS/MS.

| Acrónimo de la deficiencia | Defecto enzimático | Ácidos grasos libres en plasma | Ácidos orgánicos en orina | Oxidación de ácidos grasos tritriados por fibroblastos % | Marcador metabólico por MS/MS en sangre seca en papel de filtro |
|----------------------------|--|---|---|--|---|
| OCTN2 | Transportador de Carnitina | | - | | C0 ↓↓ |
| CPT I | Carnitina palmitoil Transferasa I | | - | | C0/C ₁₆ + C ₁₈ ↑ |
| CACT | Carnitina-acil carnitina translocasa | - | - | 10-20 | C _{16'} C ₁₈ |
| CPT II | Carnitina palmitoil transfereasa II | - | - | 20-30 | C _{16'} C ₁₈ |
| VLCAD | Acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga | C _{14:1n-9} | Dicarboxílicos (C ₆ -C ₁₄) 3-OH-dicarboxílicos | 20-50 | C _{14:1'} C ₁₄ C ₁₆ |
| TFP | Proteína trifuncional | C _{14:1n-9} OH-carboxílicos | 3-OH-dicarboxílicos | 60-70 | OH-C _{16'} OH-C _{18:2} OH-C _{18:1} |
| LCHAD | Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena larga | C _{14:1n-9} OH-carboxílicos | 3-OH-dicarboxílicos | 40-50 | OH-C ₁₆ OH-C _{18:2} OH-C _{18:1} |
| MCAD | acil-CoA dehidrogenasa de cadena media | C ₈ C _{10:1n-6} C ₁₀ | Dicarboxílicos (C ₆ -C ₁₂) Hexanoilglicina Suberilglicina Fenilpropionilglicina | 10-25 | C _{6'} C _{8'} C _{10:1} C ₁₀ |
| SCAD | acil-CoA deshidrogenasas de cadena corta | - | Etilmalónico | 70-80 | C ₄ |
| MAD | Múltiple de deshidrogenasas ETF/ETF deshidrogenasa | C ₆ -C ₁₈ C _{10:1n-6} | Isovalerilglicina Isobutirilglicina Hexanoilglicina Suberilglicina | | C _{4'} C _{5'} C ₈ C ₁₂ C ₁₄ C _{5DC} |
| DR | Dienoil-CoA reductasa | - | - | ? | 2-trans-4-cis-C _{10:2} |

Abreviaturas: C0 carnitina libre, C_{5DC} glutarilcarnitina, ↑ aumentado, ↓ disminuido.

Tabla 4. Tamizaje por espectrometría de masas en tándem, para otros errores innatos del metabolismo.

| ENFERMEDAD | TIPO DE ALTERACIÓN | Marcador metabólico por MS/MS | autor |
|--|---|---|--|
| Galactosemia | Deficiencia de galactosa-1-fosfato uridil transferasa | Hexosa mono-fosfatos totales | Jensen y col (38) |
| Enfermedades por colestasis hepatobiliar | Atresia biliar extrahepática | Acidos biliares conjugados | Mills y col. (39) Mushtaq y col. (40) |
| Enfermedades de los peroxisomas | Deficiencia de acil-CoA oxidasa | C20:0 eicosanoilcarnitina, C22:0 docosanoilcarnitina, C24:0 tetracosanoilcarnitina C26:0 Hexacosanoilcarnitina Sales biliares | Wanders y col (41) Johnson y col. (42) Bootsma y col. (43) |
| | Deficiencia de proteína bifuncional | | |
| | Deficiencia de tiolasa peroxisomal | | |
| | Adrenoleucodistrofia ligada al X | | |
| | Síndrome de Zellweger | | |
| Enfermedades del metabolismo purinas y las pirimidinas | | 17 purinas y pirimidinas en orina | Simmonds HA.(44) Ito y col. (45) |

LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM Y EL DIAGNÓSTICO PRECOZ DE ENFERMEDADES METABÓLICAS HEREDITARIAS

En las familias con antecedentes de EIM, pueden realizarse determinaciones de metabolitos por TMS en sangre de cordón umbilical (SCU) al momento de nacer, sin embargo, los estudios de valoración de la carnitina libre y total en la SCU son poco numerosos (46, 47, 48, 49). De igual manera, muy pocos estudios comunican mediciones de acilcarnitinas por MS/MS en la SCU (50, 51). Patterson et al. (51) analizaron siete casos de pacientes con antecedentes familiares de EIM, tres de los cuales fueron positivos al análisis de la SCU por esta técnica (una acidemia isovalérica y dos deficiencias de MCAD), y se pudo instaurar una vigilancia y un manejo previos a la aparición de secuelas relacionadas con la enfermedad. Estudios recientes han mostrado valores de referencia

para acilcarnitinas en sangre de cordón umbilical y en poblaciones pediátricas (52, 53).

CONCLUSIÓN

Las alteraciones del perfil de acilcarnitinas persisten, aunque el paciente no se encuentre descompensado metabólicamente, y ésta es la ventaja principal de la MS/MS para la identificación de algunos errores congénitos del metabolismo.

Cabe destacar que, por ahora, algunas enfermedades, como el hipotiroidismo, las hemoglobinopatías, la hiperplasia adrenal congénita, la fibrosis quística y la distrofia muscular de Duchenne, se identifican por otras técnicas; sin embargo, no se descarta que en un futuro se puedan incorporar algunas de las deficiencias mencionadas al cribado por MS/MS.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arroyo M, Crawford JM. Hepatic inherited metabolic disorders. *Semin Diagn Pathol* 2006;23(3-4):182-189.
2. Osorio JH. Consideraciones específicas para el entendimiento del síndrome de muerte súbita del lactante. *Revista Hacia la promoción de la salud* 2007;79-88.
3. Saudubray JM. Inborn errors of metabolism. *Semin Neonatol* 2002;7:1.
4. Barba Evia JR. Tamiz neonatal: Una estrategia en la medicina preventiva. *Rev Mex Pat Clin* 51;3:130-144.
5. Garrod AE. The incidence of alkaptonuria: a study in chemical individuality. 1902. *Mol Med* 1996;2(3):274-282.
6. Følling I. The discovery of phenylketonuria. *Acta Paediatr Suppl.* 1994;407:4-10.
7. Dhondt JL. Neonatal screening: from the 'Guthrie age' to the 'genetic age'. *J Inherit Metab Dis* 2007;30(4):418-422.
8. Downing M, Pollitt R. Newborn bloodspot screening in the UK--past, present and future. *Ann Clin Biochem* 2008;45(Pt 1):11-17.
9. Therrell BL, Adams J. Newborn screening in North America. *J Inherit Metab Dis* 2007;30(4):447-465.
10. Alexander D. The National Institute of Child Health and Human Development and phenylketonuria. *Pediatrics* 2003;112(6 Pt 2):1514-1515.
11. Kompare M, Rizzo WB. Mitochondrial fatty-acid oxidation disorders. *Semin Pediatr Neurol* 2008;15(3):140-149.
12. Rinaldo P, Lim JS, Tortorelli S, Gavrilo D, Matern D. Newborn screening of metabolic disorders: recent progress and future developments. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program.* 2008;62:81-93; discussion 93-96.
13. Ho C, Lam C, Chan M, Cheung R, Law L, Lit L, Ng K, Suen M, Tai H. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin Biochem Rev* 2003;24(1):3-12.
14. Daniel Sharer J. An overview of biochemical genetics. *Curr Protoc Hum Genet.* 2005;17:Unit 17.1.
15. Vogeser M, Seger C. A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory-goals for further developments. *Clin Biochem.* 2008;41(9):649-662.
16. Wilcken B, Wiley V. Newborn screening. *Pathology* 2008;40(2):104-115.
17. Naylor EW, Chace DH. Automated tandem mass spectrometry for mass newborn screening for disorders in fatty acid, organic acid, and amino acid metabolism. *J Child Neurol* 1999;14(Suppl 1):S48.
18. Zytovicz TH, Fitzgerald EF, Marsden D, Larson CA, Shih VE, Johnson DM, et al. Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: a two year summary from the New England newborn screening program. *Clin Chem* 2001;47:194555.
19. Levy HL. Newborn screening by tandem mass spectrometry: a new era. *Clin Chem* 1998;44:24012.

20. Hintz SR, Matern D, Strauss A, Bennet MJ, Hoyme HE, Schelleys S, et al. Early neonatal diagnosis of long chain 3hydroxyacyl conzyme A dehydrogenase and mitochondrial trifunctional protein deficiencies. *Mol Genet Metab* 2002;75:1207.
21. Leonard JV, Dezateux C. Screening for inherited metabolic disease in newborn infants using tandem mass spectrometry. *BMJ* 2002;324:45.
22. 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 Inher Metab Dis* 1990;13:321-324.
23. Millington DS, Kodo N, Terada N, Roe D, Chace DH. The analysis of diagnostic markers of genetic disorders in human blood and urine using tandem mass spectrometry with liquid secondary ion mass spectrometry. *Int J Mass Spect Ion Proc* 1991;111:211-228.
24. Millington DS, Chace DH. Carnitine and acylcarnitines in metabolic disease diagnosis and management. in: *Mass spectrometry: clinical and biomedical applications*, vol.I. Desiderio D.M. (ed). Plenum Press, New York. 1992. Pp. 299-316.
25. 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.
26. Chace DH, Naylor EW. Expansion of newborn screening programs using automated tandem mass spectrometry. *Mental Retard Develop Disab* 1999;5:1504.
27. 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):1797-1817.
28. Naylor EW, Chace DH. Automated tandem mass spectrometry for mass newborn screening for disorders in fatty acid, organic acid, and aminoacid metabolism. *J Child Neurol* 1999;14(Suppl 1):S48.
29. Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. The application of tandem mass spectrometry to neonatal screening for inherited disorders of intermediary metabolism. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2002;3:17-45.
30. Clague A, Thomas A. Neonatal biochemical screening for disease. *Clin Chim Acta* 2002;315:99-110.
31. Chace DH. Mass spectrometry in the clinical laboratory. *Chem Rev* 2001;101(2):445-477.
32. Charrow J, Goodman SI, McCabe ERG, Rinaldo P. Tandem mass spectrometry in newborn screening. *Genet Med* 2000;2:2679.
33. 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;88(432):45-47.
34. McCabe LL, McCabe ERB. Newborn screening as a model for population screening. *Mol Genet Metab* 2002;75:299-307.
35. Clayton PT. Applications of mass spectrometry in the study of inborn errors of metabolism. *J Inher Metab Dis* 2001;24:139-150.
36. Nyhan WL. Disorders of purine and pyrimidine metabolism. *Mol Genet Metab* 2005;86(1-2):25-33.
37. Csermely T, Kalász H, Petroianu GA, Kuca K, Darvas F, et al.. Analysis of pyridinium aldoximes - a chromatographic approach. *Curr Med Chem.* 2008;15(23):2401-18.

38. Jensen UG, Brandt NJ, Christensen E, Skovby F, Nogaard-Pedersen B, Simonsen H. Neonatal screening for galactosemia by quantitative analysis of hexose monophosphate using tandem mass spectrometry: a retrospective study. *Clin Chem* 2001;47:1364-1372.
39. Mills KA, Mushtaq I, Johnson AW, Whitfield PD, Clayton PT. A method for the quantitation of conjugated bile acids in dried blood spots using electrospray ionization-mass spectrometry. *Pediatr Res* 1998;43:361-368.
40. Mushtaq I, Logan S, Morris M, Johnson AW, Wade AM, Kelly D. Screening of newborn infants for cholestatic hepatobiliary disease with tandem mass spectrometry. *BMJ* 1999;319(7208):471-7.
41. Wanders RJA, Schutgens RBH, Barth PG. Peroxisomal disorders. In: Blau N, Duran M, Blaskovics ME, editors. *Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases*, pp. 359-76. Oxford: Chapman & Hall Medical, 1996.
42. Johnson DW. A rapid screening procedure for the diagnosis of peroxisomal disorders: quantification of very long-chain fatty acids, as dimethylaminoethyl esters, in plasma and blood spots, by electrospray tandem mass spectrometry. *J Inher Metab Dis* 2000;23:475-486.
43. Bootsma AH, Overmars H, van Rooij A, van Lint AE, Wanders RJ, van Gennip AH, et al. Rapid analysis of conjugated bile acids in plasma using electrospray tandem mass spectrometry: application for selective screening of peroxisomal disorders. *J Inher Metab Dis* 1999;22:307-310.
44. Simmonds HA. Purine and pyrimidine disorders. In: Holton JB, editor. *The inherited metabolic diseases*, London: Churchill Livingstone. 1994. pp. 297-349.
45. Ito T, Van Kuilenburg ABP, Bootsma AH, Haasnoot AJ, Cruchten AV, Wada Y, et al. Rapid screening of high-risk patients for disorders of purine and pyrimidine metabolism using HPLC-electrospray tandem mass spectrometry of liquid urine or urine-soaked filter paper strips. *Clin Chem* 2000;46:445-52.
46. Shenai JP, Borum PR, Mohan P, Donlevy SC. Carnitine status at birth of newborn infants of varying gestation. *Pediatr Res* 1983;17:57982.
47. Giannacopoulou C, Evangelidou A, Matalliotakis I, Relakis K, Sbirakis N, Hatzidaki E, et al. Effects of gestation age and of birth weight in the concentration of carnitine in the umbilical plasma. *Clin Exp Obstet Gynecol* 1998;25:425.
48. Bernardi I, Evans MI, Nicolaidis KH, Economides DL, Gahl WA. The fetal concentrating index as a gestational age-independent measure of placental dysfunction in intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 1991;164:14817.
49. Osorio JH, Pourfarzam M. Carnitina libre y total en sangre de cordón umbilical. *Rev Colomb Obstet Ginecol* 2002;53:115.
50. Meyburg J, Schulze A, Kohlmüller D, Linderkamp O, Mayatepek E. Postnatal changes in neonatal acylcarnitine profile. *Pediatr Res* 2001;49:1259.
51. Patterson AL, Pourfarzam M, Henderson MJ. The utility of cord blood analysis in the diagnosis of organic acidemias. *J Inher Metab Dis* 2000;23(Suppl 1):84.
52. Osorio JH, Pourfarzam M. Early diagnosis of neurometabolic diseases by tandem mass spectrometry. acylcarnitine profile from cord blood. *Rev Neurol* 2004;38:11-16.
53. Osorio JH, Pourfarzam M. Determination of normal acylcarnitine levels in a healthy pediatric population as a diagnostic tool in inherited errors of mitochondrial fatty acid beta-oxidation. *An Pediatr (Barc)*. 2007;67:548-52.